

Stefan ANĐUS\*, Zoran KLJAJIĆ\*\*, Momir PAUNOVIĆ\*

## BIOINDIKATORSKI POTENCIJAL MORSKIH SUNĐERA – PRIPREMA UZORAKA ZA HISTOLOŠKU ANALIZU (PILOT STUDIJA)

**Sažetak:** Cilj rada je da se prikaže postupak dobijanja histoloških i mikroskopskih preparata sunđera koji bi se koristili za identifikaciju ovih organizama do nivoa vrste. Pomenu ti postupci predstavljaju preduslov za uključivanje ove grupe organizama u biomonitoring morskih ekosistema. Uzorci su prikupljeni 2013. godine na lokalitetima u okolini Jaza tehnikom SCUBA ronjenja. Uzorci su kasnije obrađeni prilagođavanjem klasičnih histoloških metoda na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Dobijeni uzorci pokazali su odgovarajući kvalitet neophodan za dalji taksonomski rad.

**Ključne reči:** *morski sunđeri, histološki preparati, spikule, svetlosna mikroskopija*

### 1. UVOD

Vodeni beskičmenjaci predstavljaju bitnu komponentu akvatičnih ekosistema [1]. Iz njihove je zastupljenosti i rasprostranjenosti moguće dobiti mnoštvo informacija vezanih za kvalitet, očuvanost i tip određene vode i ekosistema. Akvatični beskičmenjaci u jednom ili više stupnjeva životnog ciklusa naseljavaju akvatične ekosisteme (sediment, detritus, makrofite, filamentozne alge, površinu vode). Veliki broj ovih organizama poseduje mehanizme pričvršćivanja za podlogu na kojoj živi. Sa biološke tačke gledišta ovo su za ispitivanja praktični organizmi zbog svoje sesilnosti i zonalnog rasporeda, neki osetljivi, a drugi rezistentni na različite vrste zagađenja. Sa tehničke strane, njihovo uzorkovanje je relativno jednostavno, a potrebni materijal i oprema ekonomični. Sve ovo, uz dostupnost detaljnih ključeva za determinaciju taksonomskih grupa, čini ih pogodnim subjektima za studije biomonitoringa, određivanje ekoloških profila i statusa staništa i kvaliteta vode.

---

\* MSc Stefan Anđus, PhD Momir Paunović: Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Beograd

\*\* PhD Zoran Kljajić, Institut za biologiju mora, Kotor

Sunđeri su morski, višecelijski, sesilni organizmi iz razdela *Spongia* (*Porifera*) sa izuzetkom jedne familije sa slatkovodnim vrstama.

Postoje tri osnovna tipa građe sunđera: askon, sikon i leukon tip. Askon tip građe je najjednostavniji, nalik šupljem i tankom cilindru. Sikon tip građe ima veću kontaktnu površinu sa vodom, zbog nabiranja unutrašnjeg telesnog zida pokrivenog filtracionim ćelijama (hoanocitama), čime je smanjena zapremina centralne šupljine, spongocela. Leukon tip građe je najsloženiji, centralna šupljina ne postoji, a telo je ispunjeno mezohilom u kome se nalazi mreža komora obloženih hoanocitama.

Hranljive čestice, uključujući i polutante rastvorene u vodi, prolaze kroz pore, kanale i komore u telesnom zidu sunđera i dolaze do spongocela, gde se talože, što se može koristiti u merenju lokalnog zagađenja. Bioindikatorski potencijal sunđera do sada je bio slabo korišćen, a jedan od razloga je nedovoljno poznavanje njihovih biohemijskih i morfoloških karakteristika, čije promene bi mogle imati bioindikatorski značaj u proceni zagađenja životne sredine [2–5].

Cilj ovog rada bio je da se na nekoliko različitih vrsta sunđera uzorkovanih na lokalitetu Jaz-Tunel kod Budve (Crna Gora) uradi histološka analiza primenom klasičnih patohistoloških postupaka koji se koriste u medicini. Ovaj postupak podrazumevao je prethodnu optimizaciju procesa fiksiranja, parafinizacije i sečenja preparata. Takođe, uporedo sa histološkom analizom celih sunđera, cilj je bio da se uradi i analiza kvaliteta mikroskopskih preparata izolovanih spikula.



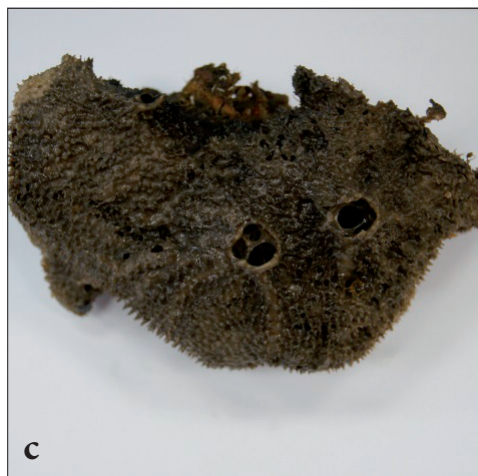
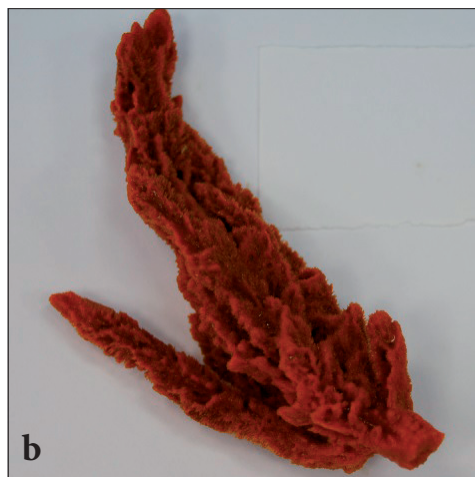
Slika 1. Mapa lokaliteta uzorkovanja

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2. 1. UZORKOVANJE SUNĐERA

Sunđeri su sakupljeni SCUBA zaronima na južnom Jadranu na lokalitetu Jaz-Tunel (Slika 1), na dubinama 10–20 metara, pridržavajući se preporuka i standarda za uzorkovanje makroinvertebrata [6].

Nakon vađenja iz mora, celi sunđeri ili njihovi fragmenti stavljeni su u flakone sa 96% etanolom i čuvani na + 4°C do kalupljenja, odnosno izolovanja spikula. Za pravljenje histoloških preparata odabrani su sunđeri različite morfologije i konzistencije (tvrdoće) iz rodova *Ircinia*, *Axinella*, *Acanthella* i dr. (Slika 2).



Slika 2. Reprezentativni uzorci sunđera sakupljenih na južnom Jadranu (okolina Jaza) koji pripadaju rodovima: (a) *Axinella*; (b) *Acanthella*; (c) *Ircinia*

## 2. 2. PRIPREMA HISTOLOŠKIH PREPARATA ZA SVETLOSNU MIKROSKOPIJU

Priprema materijala koja je rađena na Institutu za patologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, obuhvatila je sledeće faze: uzimanje materijala (isečak sundera ne veći od 0,5 cm<sup>3</sup>), fiksaciju u alkoholu u trajanju od nekoliko dana, dehidraciju držanjem preparata u alkoholu rastuće koncentracije, prosvetljavanje u ksilolu i kalupljenje u parafinu. Preparati debljine 20 μm sečeni su na mikrotomu čeličnim noževima marke Leica (Nemačka). Isečci su montirani iz vode na histološku pločicu, nakon čega je usledila deparafinizacija isečka potapanjem pločice u ksilol, a potom rehidracija uz upotrebu alkohola opadajuće koncentracije. Zatim se pristupilo bojenju, ispiranju od viška boje, ponovnom prosvetljenju ksilolom i konačno pokrivanju isečka ljuspicom, uz korišćenje kanada balzama.

Rađeno je rutinsko bojenje – hematoksilin i eozin bojenje (HE). Hematoksilin je bazna boja, ima afinitet ka negativno naelektrisanim molekulima (kiselina) pa se vezuje za DNK, RNK i neke proteine. Eozin je kisela boja, ima afinitet ka pozitivno naelektrisanim molekulima (baze), pa se vezuje za bazne komponente ćelije. Na histološkom preparatu ovom metodom se hematoksilinom plavoljubičasto boje jedro i ribozomi, a kako je hematoksilin bazna boja, ta osobina se naziva bazofilija, dok se eozinom citosol boji crvenopink, a kako je eozin kisela boja, ta osobina se naziva acidofilija ili eozinofilija. Postupak je izvođen tako što su preparati potapani 20 minuta u ksilol, pa tokom 10 minuta u 100% alkohol i isto toliko u 96% alkohol. Potom je usledilo ispiranje običnom vodom nekoliko puta i bojenje hematoksilinom u trajanju od 10 minuta. Zatim su preparati opet ispirani sve dok se nije uklonio višak plave boje. Pločice su zatim držane 10 minuta u toploj vodi, a onda bojene eozinom 3 minuta, isprane vodom i 96% alkoholom. Postupak se okončava držanjem preparata 10 minuta u 100% alkoholu i na samom kraju 10 minuta u ksilolu. Preparati su slikani na mikroskopu BX 40 kamerom DP 12 marke Olympus (Japan).

## 2. 3. PRIPREMA PREPARATA SPIKULA

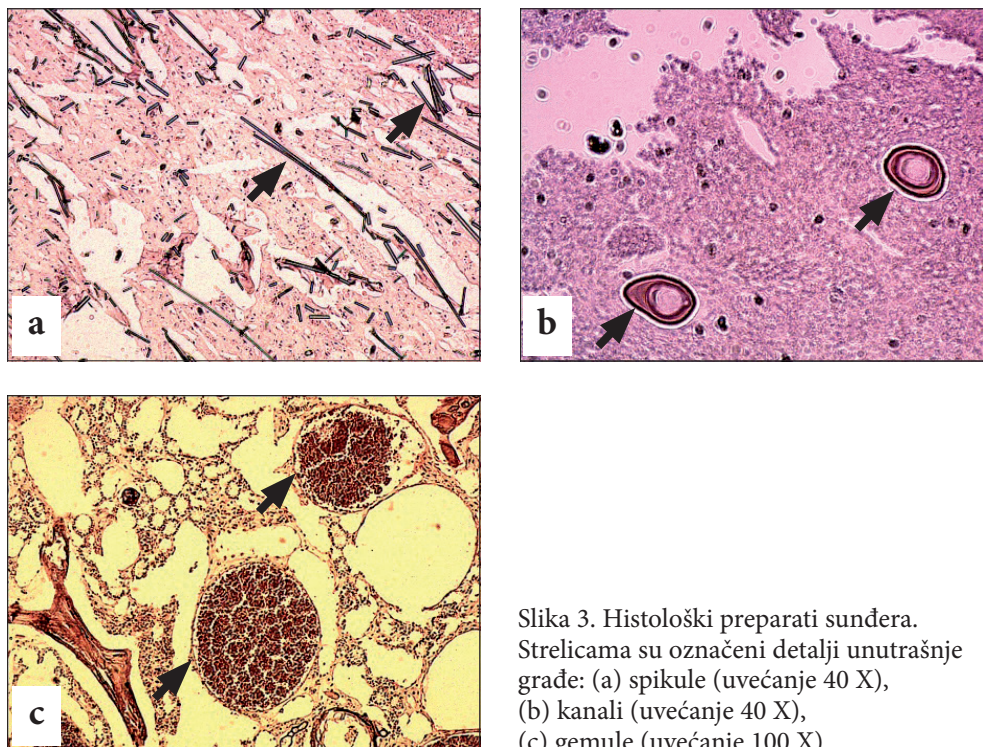
Fragmenti sundera stavljeni su direktno na predmetno staklo. Na njih je napakano nekoliko kapi koncentrovane azotne kiseline (HNO<sub>3</sub>), i pločica je zagrevana na tihoj vatri alkoholnog plamenika dok sva kiselina nije isparila. Proces je ponavljan do potpune razgradnje organskog materijala, što se vizuelno utvrđuje. Spikule se tokom ove procedure fiksiraju za predmetno staklo, pa je ovako pripremljen preparat odmah spreman za posmatranje pod mikroskopom, iako je dodavanje fiksativa i pokrovne ljuspice preporučljivo.

### 3. REZULTATI

Na lokalitetu zarona prikupljeno je 11 različitih uzoraka sundera. Prilikom njihove analize pouzdano je identifikovano nekoliko različitih vrsta, kao npr. *Acanthella canabina*, *Axinella damicornis*, *Ircinia muscarum*.

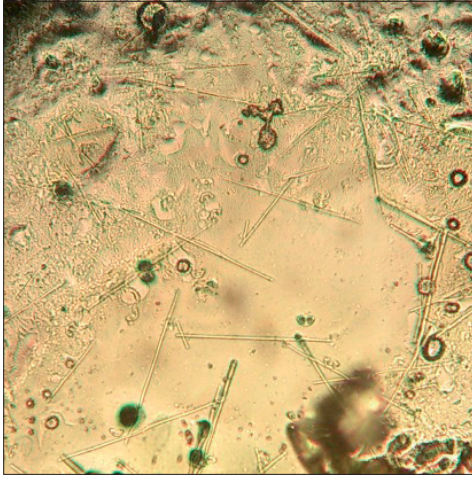
Za mikroskopsku analizu odabrano je nekoliko vrsta sundera, koje su se razlikovale po čvrstoći „tkiva“.

Analiza preseka delova sundera pokazala je veliku raznovrsnost preparata (Slika 3), manje ili više prepoznatljivih struktura. Uočeni su kanali, vezikule, različiti oblici spikula, gemule i dr.



Slika 3. Histološki preparati sundera. Strelicama su označeni detalji unutrašnje građe: (a) spikule (uvećanje 40 X), (b) kanali (uvećanje 40 X), (c) gemule (uvećanje 100 X)

Za determinaciju, najznačajniju strukturu u građi sundera predstavljaju spikule, čije suptilne razlike u simetriji, obliku ili reljefu omogućavaju distinkciju na izgled identičnih vrsta [7]. Mogu biti sačinjene od kalcijum-karbonata ili silicijuma. Osnovna podela je na megasklere, mikrosklere i gemulosklere.

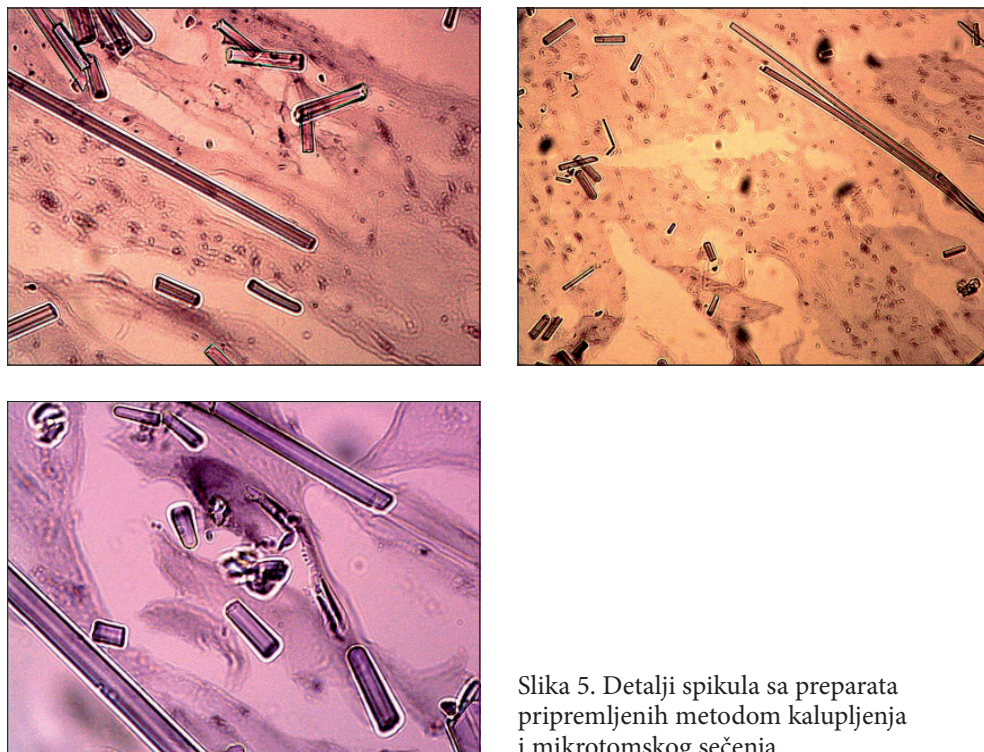


Slika 4. Detalji preparata spikula pripremljenih metodom izlaganja sunčera koncentrovanoj azotnoj kiselini

#### 4. DISKUSIJA

Prvi podaci o sunđerima zabeleženi su tokom ekspedicija iz druge polovine 19. veka [8]. U prvoj polovini 20. veka rađene su taksonomske studije, analize skeletnih struktura i fiziologija sunđera [9]. Jednu od prvih i najkompleksnijih histoloških studija, na vrstama *Reniera elegans* i *Reniera simulans* iz familije *Chalinidae*, objavio je Tuzet 1938. godine [10].

Interesovanje za detaljnijim istraživanjima sunđera nesumnjivo je poraslo u poslednjih par decenija zbog potencijalnog korišćenja u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Proporcionalno je poraslo i naše razumevanje biologije sunđera i poznavanje neverovatnog biodiverziteta ovih jednostavnih metazoa [11].



Slika 5. Detalji spikula sa preparata pripremljenih metodom kalupljenja i mikrotomskog sećenja

Činjenica je da su sunđeri manje eksploatisani od drugih organizama kao indikatori zagađenja (manje čak i od njihovih simbionata). Jedno od objašnjenja je nepostojanje metode za brzu procenu promena (fizioloških ili strukturnih) usled zagađenja. Ova pilot studija predstavlja pokušaj primene metodologije koja je u standardnoj upotrebi u medicinskim patohistološkim laboratorijama, uz izvesne modifikacije i prilagođavanja specifičnostima uzorka. Metoda fiksiranja u alkoholu, kalupljenja i sećenja, omogućila je dobijanje relativno kvalitetnih preparata, čak i kada je reč o tvrđem sunđerskom materijalu. Skelet sunđerā može biti izgrađen od supstance organskog porekla, spongina, ili od mineralnih igala od silicijum-dioksida ili kalcijum-karbonata. Mineralne iglice grade čvrstu mrežu koja može otežati pripremu preparata, ali i poslužiti kao bioindikator kiselosti morske vode.

U nekim slučajevima, prilikom pravljenja preparata, došlo je do izvesnog oštećenja spikula, ali je zato preporučljivo da se za svaki uzorak rade i histološki preseki i izolovane spikule. Prednost korišćenog histološkog pristupa leži u obezbeđivanju većeg broja informacija o unutrašnjoj morfologiji sunđerā i eventualnim promenama izazvanim uticajima sredine. Nedostatak primenjene metode je potencijalno oštećenje spikula u procesu sećenja i gubitak mogućnosti da se na osnovu istih obavi i determinacija sunđerā.

U cilju integrisanja sundera u programe biomonitoringa i ekotoksikoloških testova neophodno je usavršiti metode za njihovu brzu i što informativniju analizu, u koje spada i osnovna histologija.

## ZAHVALNICA

Studija je finansirana sredstvima projekta broj 176018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Autori izražavaju zahvalnost Verici Petrović na izradi histoloških preparata i prof. dr Zvezdani Tepavčević na snimcima.

## LITERATURA

- [1] A. P. Covich, M. A. Palmer & T. A. Crowl: „The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems” *BioScience* vol. 49, 1999. p. 119–127.
- [2] M. L. Mahaut, O. Basuyaux, E. Baudinière, C. Chataignier, J. Pain, C. Caplat: „The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring” *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*; vol. 20. No 5. 2013. p. 2984–2992.
- [3] R. J. Venkateswara, K. Srikanth, R. Pallela, R. T. Gnaneshwar: „The use of marine sponge, *Haliclona tenuiramosa* as bioindicator to monitor heavy metal pollution in the coasts of Gulf of Mannar, India” *Environ. Monit. Assess.*; vol. 156. Vol. 1–4. Sep. 2009. p. 451–459.
- [4] B. Berthet, C. Mouneyrac, T. Pérez, C. Amiard-Triquet: „Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination” *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* vol. 141. No 3. Jul 2005. p. 306–313.
- [5] J. L. Carballo, S. Naranjo: „Environmental assessment of a large industrial marine complex based on a community of benthic filter-feeders” *Mar. Pollut. Bull.* vol. 44. No 7. Jul 2002. p. 605–610.
- [6] ISO 7828: 1985 (BS EN 27828: 1994): „Water Quality – Methods of biological sampling – Guidance on handnet sampling of aquatic benthic macroinvertebrates”.
- [7] J. N. A. Hooper & R. W. M. Soest Van (eds): „Systema Porifera. A Guide to the classification of sponges” *Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, Vols 1 & 2, xlviii* 2002. p. 1708.
- [8] Y. Delage: „Embryogenie des éponges” *Arch. Zool. Expér. Gén.* vol. 10. No 1892. p. 345–498.
- [9] A. V. Ereskovsky: „Sponge embryology: the past, the present and the future” *Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G. (eds). Porifera Research – Biodiversity, Innovation and Sustainability. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2007. p. 41–52.*
- [10] O. Tuzet: „Recherches sur l’histologie des éponges *Reniera elegans* et *Reniera simulans*” *Archs. Zool. Exp. Gen.* vol. 74. 1938. p. 169–192.
- [11] S. M. Efremova, V. B. Itskovich, V. Parfenova, V. V. Drucker, W. E. Müller, H. C. Schröder: „Lake Baikal: a unique place to study evolution of sponges and their stress response in an environment nearly unimpaired by anthropogenic perturbation” *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, vol. 48. No 4. Jun 2002. p. 359–371.



---

Stefan ANĐUS, Zoran KLJAJIĆ, Momir PAUNOVIĆ

BIOINDICATOR POTENTIAL OF MARINE SPONGES – PREPARATION  
OF SPECIMEN FOR HISTOLOGICAL STUDY (PILOT STUDY)

*Summary*

The aim of this paper is to present the procedure of obtaining histological and microscopic slides of marine sponges to be used for the identification of these organisms to the species level. These procedures are a prerequisite for the inclusion of this group of organisms in biomonitoring programs of marine ecosystems. Samples were collected in 2013 at sites in the vicinity of Jaz by SCUBA diving. The samples were later analyzed by adapting the classical histological methods at the Faculty of Dentistry, University of Belgrade. The obtained samples showed adequate quality necessary for further taxonomic work.

*Key words:* Marine sponges, histological slides, spicules, light microscopy