

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI  
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS - MEMARH

JÉSSICA ANDRADE VILAS BOAS

**MICROEUCARIOTOS CILIADOS (ALVEOLATA: CILIOPHORA) EM UM SISTEMA  
LÓTICO URBANO NEOTROPICAL E USO POTENCIAL EM ENSAIOS  
ECOTOXICOLÓGICOS**

ITAJUBÁ-MG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI  
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS – MEMARH

JÉSSICA ANDRADE VILAS BOAS

**MICROEUCARIOTOS CILIADOS (ALVEOLTA: CILIOPHORA) EM UM SISTEMA  
LÓTICO URBANO NEOTROPICAL E USO POTENCIAL EM ENSAIOS  
ECOTOXICOLÓGICOS**

Dissertação aprovada por banca examinadora em 02 de setembro de 2016, conferindo ao autor o título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Ecologia Aplicada  
(2.05.03.00-8)

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca  
Co-orientador: Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

ITAJUBÁ-MG

2016



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
Criada pela Lei nº 10.435, de 24 de abril de 2002

**ANEXO I**

**FOLHA DE JULGAMENTO DA BANCA EXAMINADORA  
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

Título da Dissertação: **“Microeucariotos Ciliados (Alveolata: Ciliophora) em um Sistema Lótico Urbano Neotropical e Uso Potencial em Ensaio Ecotoxicológicos”**

Autor: **Jéssica Andrade Vilas Boas**

**JULGAMENTO**

Examinadores	Conceito	Rubrica
	A = Aprovado - R = Reprovado - I = Insuficiente	
1º	A	
2º	A	
3º	A	
4ª	A	

**Observações:**

- (1) O Trabalho será considerado Aprovado se todos os Examinadores atribuírem conceito A.
  - (2) O Trabalho será considerado Reprovado se forem atribuídos pelos menos 2 conceitos R.
  - (3) O Trabalho será considerado Insuficiente (I) se for atribuído pelo menos um conceito R. Neste caso o candidato deverá apresentar novo trabalho. A banca deve definir como avaliar a nova versão da Dissertação.
- Este documento terá a validade de 30 (trinta) dias a contar da data da defesa da Dissertação.

Resultado Final: Conceito: A ou seja, APROVADA

Observações: \_\_\_\_\_

Itajubá, 02 de Setembro de 2016

Prof. Dr. Marcus Vinicius Xavier Senra  
1º Examinador – UFJF

Prof. Dr. Rogério Melloni  
2º Examinador - UNIFEI

Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias  
3º Examinador (Co-orientador)- UFJF

Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Fonseca  
4ª Examinadora (Orientadora)- UNIFEI

*Dedico este trabalho aos meus pais Silvete e Célio.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** que é minha base e fortaleza, por me mostrar em todo momento que estava comigo: “Sem Mim nada podeis fazer “ (João 15, 5).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa concedida.

A minha **família** pelo amor, apoio, incentivo e por serem meu maior exemplo de simplicidade, humildade, determinação e coragem.

A minha orientadora professora **Ana Lúcia Fonseca**, pelo apoio, confiança e incentivo.

Ao meu co-orientador professor **Roberto Dias** pela confiança, incentivo, amizade e paciência ao me ensinar tudo o que precisava para a realização do projeto. Por ter me acolhido e ensinado não só coisas relacionadas ao projeto, mas também por ensinamentos de vida. Por me mostrar que um sorriso pode amenizar qualquer problema e que com luta se chega aos lugares mais sonhados que o nosso coração almeja.

Ao professor **Marcus Senra** pelo apoio, amizade e paciência ao me ensinar e ajudar com as técnicas moleculares e os testes ecotoxicológicos realizados diversas vezes até atingir o resultado esperado.

A minha grande amiga **Franciane Cedrola** que além de me ensinar muita coisa sobre taxonomia, me ajudar nas técnicas moleculares, me acolheu na sua vida e em sua casa e se tornou uma pessoa essencial para que eu seguisse meus dias com mais alegria e confiança. Sua amizade pra mim foi um dos maiores presentes que ganhei durante essa caminhada.

A toda equipe do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, **Rafaela Venançoni, Roberto Marchesini, Alessandra Lozada, Luisa Oliveira, Elen Furtado, Talys, Felipe Santo, Suyane Bordim** pela amizade, colaboração e ajuda com as técnicas utilizadas no projeto, agradeço imensamente pela convivência e pelos dias divertidos que passamos juntos.

As alunas de Iniciação Científica do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, **Yasmine** e **Fabiola** por me ajudarem a cuidar dos cultivos e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao professor **Rogério Melloni** pela compreensão e por me mostrar que sempre devemos fazer aquilo que amamos.

Ao técnico de laboratório **Paulo Marques** pela amizade e pelo fornecimento dos materiais utilizados no projeto.

Ao meu amigo **Lincon** pela ajuda com a parte de química utilizada no projeto.

Ao **Tio Beló** pelo carinho e pela ajuda com a tradução dos artigos em alemão.

A meus tios **Janete** e **Marcos** e aos meus primos **Alexandre Santos** e **Ana Paula** pelo carinho e por sempre torcerem por mim.

A minha amiga **Carol Lanza** que acompanhou a minha luta durante os dois anos de mestrado, agradeço pela paciência e compreensão, por fazer com que minha caminhada fosse mais leve, por me fazer companhia via whatsapp durante os meses que estive fora, sua amizade foi e sempre será essencial em minha vida.

Ao meu amigo **Rafael Albo** que sempre me colocou pra cima, que vivenciou comigo os extremos durante essa jornada, agradeço infinitamente por me fazer acreditar em mim mesma.

A minha amiga **Ana Camila** pela companhia, por tudo que vivemos durante os dois anos de mestrado, as disciplinas que ramos juntas pra passar, pela ajuda nas coletas, pela amizade construída em tantos dias de convivência.

A minha amiga **Vivi Souza** que tive a alegria de reencontrar no meio da minha caminhada depois de tantos anos, agradeço por me ouvir, por se alegrar com minhas vitórias, por me apoiar e oferecer seu bom humor para tornar meus dias mais felizes.

Ao meu professor e amigo **Flávio Vasconcelos** por me ensinar durante a graduação a importância de lutar pelos meus sonhos, agradeço pela amizade que construímos e pelo incentivo que sempre me deu.

A minha professora e amiga **Liliana Pasin** que durante a graduação foi minha referência e me estimulou a seguir no caminho da pesquisa, agradeço pelo incentivo e pelo carinho.

Aos amigos (as) **Leonardo Silva, Mábele Ferreira, Marieny Vilela, Selma Oliveira, Maria Fernanda, Adriano Salomon, Ágatha Santos**, pelas palavras de conforto, pelo apoio, por me acompanharem e me encorajarem a seguir firme até o fim.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*Santa Madre Teresa de Calcutá*

**RESUMO** – O presente estudo teve como objetivos principais <sup>1</sup>realizar inventário das espécies de protozoários ciliados presentes em um trecho do ribeirão José Pereira (Itajubá, Minas Gerais), <sup>2</sup>selecionar espécies (cultivo e curva de crescimento) para uso em ensaios ecotoxicológicos e <sup>3</sup>realizar ensaios de exposição aguda preliminares com duas substâncias de referências (NaCl e NH<sub>4</sub>Cl) para duas espécies que melhor se mantiveram nos cultivos Laboratoriais. As coletas foram realizadas mensalmente durante o período de outubro de 2014 a outubro de 2015. As amostras foram levadas para o laboratório para posterior montagem dos cultivos e observação das espécies. Foram registrados 48 morfotipos de ciliados ao longo de um ano de estudo e manteve-se duas espécies do gênero *Paramecium* em meio de cultivo Cerophyl por todo o período experimental. A espécie *Euplotes* cf. *affinis* foi caracterizada utilizando observações *in vivo*, técnica do prata a seco, protargol, bem como sua posição filogenética foi elucidada, pela primeira vez na literatura, com base em informações do marcador molecular 18S-rDNA. Dados obtidos ressaltam a necessidade de se aumentar o esforço amostral em ecossistemas neotropicais para melhor entendimento da diversidade de ciliados. Foram selecionados as espécies *Paramecium caudatum* e *Paramecium bursaria* para cultivo em laboratório e informações sobre as curvas de crescimento, por serem espécies de fácil manutenção. Além disso, com base na literatura, estes organismos tem sido utilizados como organismos-teste nos ensaios ecotoxicológicos. A curva de crescimento mostrou que são necessários cerca de dois para triplicar a quantidade de *P. caudatum* e dois dias e meio a três dias para triplicar a quantidade de *P. bursaria*. Nos testes de toxicidade, os resultados demonstraram que *P. caudatum* é mais tolerante comparado à *P. bursaria* à ambas as substâncias (NaCl e NH<sub>4</sub>Cl) utilizadas, sendo consideradas neste estudo ótimas espécies para estudos ecotoxicológicos.

**Palavras-chave:** Brasil, ciliados, Ciliophora, sistema lótico, exposição aguda.

**ABSTRACT** – This study had as mains aims to <sup>1</sup>realize inventory of species of ciliates protozoa found in site of the José Pereira river (Itajubá, Minas Gerais), <sup>2</sup>to select species (cultivation and growth curve) for use in testing ecotoxicological and, <sup>3</sup>to realize preliminary acute exposure tests with two reference substances (NaCl and NH<sub>4</sub>Cl) for two species best remained in laboratory crops. The samples were collected monthly during the period from October 2014 to October 2015. The samples were taken to the laboratory for later assembly of crops and observations of species. Were recorded 48 morphotypes of ciliate along an year of study and remained two species of the *Paramecium* genus in culture medium Cerophyl for all the experimental period. The *Euplotes* cf. *affinis* species was characterized using *in vivo* observations, dry silver technique, protargol as well as its phylogenetic position was elucidates for the first time in the literature, based on information from the molecular marker 18S-rDNA. Data obtained highlights the need to increase the sampling effort in neotropical ecosystems for better understanding of ciliates diversity. Were selected the *Paramecium caudatum* and the *Paramecium bursaria* species for cultivation in the laboratory and information on the growth curves, being easy maintenance. Moreover, based on the literature, these organisms have been used as test organisms in ecotoxicological assays. The growth curve showed that are necessary about two triple the amount of *P. caudatum* and two and a half days to three days to triple the amount of *P. bursaria*. In toxicity tests, the results showed that *P. caudatum* is more tolerant compared to *P. bursaria* to both substances (NaCl and NH<sub>4</sub>Cl) used, being considered in this study great species for ecotoxicological studies.

**Key words:** Brazil, ciliates, Ciliophora, lotic system, acute exposure.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1 - Pontos de coleta no ribeirão José Pereira, município de Itajubá, Minas Gerais, Brasil; a, b, c e d= pontos utilizados ao longo do trecho..... 34
- Figura 2 - Mapa mostrando a região de Itajubá (MG) e toda sub-bacia do ribeirão José Pereira (Thomaz da Silva, 2015) indicando o trecho utilizado para as coletas (45°27'31" e 45°20' 57W e 22°23'18" e 22°26'57"S)..... 35
- Figura 3 - Protozoários ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG..... 41
- Figura 3 - Protozoários ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG (continuação) .. 41
- Figura 4 - Soma de valores do nível sapróbio (p= polissapróbio; a=alfa-mesossapróbio; b=beta-mesossapróbio; das espécies encontradas no Ribeirão José Pereira, Itajubá, Minas Gerais ..... 46
- Figura 5 - *Euplotes* cf. *affinis* *in vivo*, com destaque para vacúolo contrátil (1), cirros fronto-ventrais (2), zona adoral de membranela e macronúcleo (3), cirros transversos (4), cirros caudais e cirros marginais (5). ..... 50
- Figura 6 - *Euplotes* cf. *affinis* impregnado pela prata a seco (1-2), DAPI (3) e protargol (4), evidenciando plasticidade do argiroma dorsal (1-2) e aparato nuclear (3-4). Setas em (2) indicam cinetossomos das cinécia dorsal. Legenda: MA= macronúcleo, MI=micronúcleo ..... 51
- Figura 7 - Árvore filogenética com base no gene 18S-rDNA, mostrando a posição de *Euplotes* cf. *affinis* com base na reconstrução por meio da máxima verossimilhança (ML). Números próximos nos ramos denotam ML valor de bootstrap. Números de acesso GenBank são dados para cada espécie..... 54

### Capítulo II

- Figura 1 - Curva de crescimento médio de *P. caudatum* e *P. bursaria* cultivados em meio Cerophyl (SONNEBORN, 1957) a 27°C..... 59
- Figura 2 - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium.caudatum* após exposição aguda (24h) ao NaCl. DP=desvio padrão ..... 60
- Figura 3 - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium.caudatum* após exposição aguda (24h) de NH<sub>4</sub>Cl. DP=desvio padrão. .... 60
- Figura 4 - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium bursaria* após exposição aguda (24h) NaCl. DP=desvio padrão..... 61
- Figura 5 - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium.bursaria* após exposição aguda (24h) ao NH<sub>4</sub>Cl. DP=desvio padrão. .... 61

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### Capítulo I

Tabela 1 - Caracterização da área em amostras de água do trecho estudado na sub-bacia do Ribeirão José Pereira-Itajubá/MG (THOMAZ DA SILVA, 2015). ..... 37

Tabela 2 - Lista das espécies de ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira, Itajubá, Minas Gerais, níveis sapróbios (S) e principal fonte de alimento (MF). ..... 45

Tabela 3 - Comparação entre *Euplotes affinis* e seus congêneres. .... 49

Quadro 1 - Espécies de protistas ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira, município de Itajuba/MG. .... 39

### Capítulo II

Tabela 1 - Concentração letal (CL50%) encontrada a partir do método de Probit (BLISS, 1934a, 1934b e 1935). .... 61

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1 Microeucariontes unicelulares ciliados (Alveolata: Ciliophora) .....	14
2.2 Ciliados de vida livre ocorrentes no Brasil.....	16
2.3 Classificação dos ciliados.....	19
2.4 Biomonitoramento em ambientes lóticos: protozoários ciliados.....	23
2.5 Ensaio ecotoxicológico utilizando protozoários como organismos-teste .....	24
<b>CAPÍTULO I</b> .....	30
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 METODOLOGIA.....	33
2.1 Área de Estudo .....	33
2.2 Coletas e processamento de amostras.....	36
2.3 Inventário dos protozoários ciliados.....	37
2.4 Caracterização multidisciplinar do euplotídeo <i>Euplotes affinis</i> .....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1 Composição da microfauna de ciliados .....	39
3.2 Caracterização multidisciplinar de <i>Euplotes</i> cf. <i>affinis</i> (figs. 6-8, tab. 4).....	47
<b>CAPÍTULO II</b> .....	56
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 METODOLOGIA.....	57
2.1 Curvas de crescimento.....	57
2.2 Ensaio ecotoxicológico.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1 Curvas de crescimento.....	59
3.2 Ensaio ecotoxicológico.....	60
Considerações finais.....	65
Apêndice A .....	67
Referências .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

Protozoários ciliados são organismos eucariontes unicelulares, heterótrofos, com cerca de 8.000 espécies conhecidas, sendo 5.600 de vida livre, das quais algumas apresentam distribuição restrita a certas regiões geográficas. Dentre os grupos de microeucaritos unicelulares, os ciliados são os mais especializados e diversificados e os que apresentam maior complexidade em sua organização. Compartilhando uma origem comum, são organismos monofiléticos, cujas autoapomorfias são o dimorfismo nuclear, o tipo de reprodução sexuada por conjugação e a complexa infraciliatura (PUYTORAC, 1994; ADL et al., 2012). Os ciliados de vida livre ocupam diversos ambientes tais como os marinhos, os dulciaquícolos e os terrestres (SLEIGH, 1988).

Estudos sobre inventários e sistemática de microeucariotos ciliados (Alveolata, Ciliophora) são tradicionalmente baseados em caracteres morfológicos. Entretanto, ferramentas moleculares (18S-rDNA) têm sido utilizadas para auxiliar a compreensão sobre diversidade e sistemática destes organismos (UTZ et al., 2010). Estudos sobre inventários de ciliados, principalmente aqueles que utilizam uma abordagem multidisciplinar (morfologia, ecologia e informações genéticas) (MODEO et al., 2003), são importantes para futura aplicação em programas de monitoramento e conservação do ambiente (REGALI-SELEGHIM; GOLDINHO; MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

Os protozoários ciliados são encontrados em grande quantidade em ambientes dulcícolas naturais e artificiais tais como sistemas de tratamento biológico de água e esgoto (MADONI et al., 1993, 1996; AMANN; LEMMER; WAGNER, 1998). Além disso, respondem mais rapidamente às contaminações ambientais que outros organismos, devido à sua alta taxa reprodutiva, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, alta sensibilidade às mudanças do meio, e grande variedade de ocupação de nichos (MADONI; BASSANINI, 1999; MADONI, 2005). Alguns estudos têm investigado a eficiência desses organismos como indicadores de qualidade de água em diversos ecossistemas límnicos (SOLA et al., 1996; PRIMC, 1998; MADONI, 2005), sendo raro estudos deste âmbito no Brasil (DIAS; WIELOCH; D'AGOSTO, 2008).

A escassez de água, a recuperação de sua qualidade e o desenvolvimento de tecnologias para o gerenciamento dos recursos hídricos são alguns dos grandes desafios que o desenvolvimento econômico enfrentará neste século. Portanto, faz-se necessário investigar maior número possível de novas metodologias de avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos brasileiros, tal como o uso dos ciliados dulcícolas, a fim de se avaliar e de se propor métodos para sua conservação e recuperação (MARQUES; BARBOSA, 2001).

A abordagem ecotoxicológica é utilizada como uma ferramenta para o monitoramento da qualidade da água, sendo a ciência que estuda os efeitos causados pelos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos, particularmente sobre as populações e comunidades em seus

ecossistemas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). A avaliação dos efeitos tóxicos de vários compostos sobre os organismos-teste permite a mensuração dos efeitos antropogênicos nos ecossistemas aquáticos (CALLISTO; MORENO; BARBOSA, 2001; MADONI; ROMEO, 2006). Neste contexto, os experimentos com protozoários ciliados tornam-se uma ferramenta valiosa para se inferir sobre os possíveis distúrbios provocados por ações antropogênicas nos ecossistemas aquáticos (FERNANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1995). Estudos utilizando protozoários ciliados como organismos-teste nos ensaios ecotoxicológicos (MADONI, 2000; NALECZ-JAWECKI, 2004; MADONI; ROMEO, 2006; MIRANDA; MARTINS, 2013) demonstraram a necessidade de se realizar mais experimentos com intuito de se estabelecer com maior precisão as faixas de mortalidade dos ciliados, com a finalidade de utiliza-los como descritores das características ambientais. Portanto, conhecer a diversidade e a estrutura funcional das comunidades de protozoários ciliados nos permite avaliar os efeitos que as atividades antrópicas exercem sobre o ecossistema, a heterogeneidade das espécies e o equilíbrio da cadeia alimentar (HENEGBRY; RIDGEWAY, 1979).

O uso de protozoários ciliados em estudos ecotoxicológicos vem aumentando devido à capacidade destes organismos em refletir rapidamente os efeitos causados pela poluição em ecossistemas aquáticos. A obtenção dos dados do ciclo de vida, com base nas curvas de crescimento em condições controladas de laboratório, nos permite conhecer o exato momento em que a população protozoários de ciliados poderá ser utilizada nos ensaios, bem como avaliar a sensibilidade destas espécies frente a diferentes substâncias, com base nos valores de efeito letal (Concentração letal à 50% da população – CL50%). Nesse sentido, a presente proposta inicialmente constou de um inventário das espécies de protozoários ciliados encontradas num sistema lótico neotropical no Sul do Estado de Minas Gerais, bem como de curvas de crescimento dos ciliados *Paramecium caudatum* e *Paramecium bursaria* os quais se mantiveram nos cultivos laboratoriais e posteriormente a utilização destes em ensaios de exposição aguda.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Microeucariontes unicelulares ciliados (Alveolata: Ciliophora)

Os protozoários foram observados pela primeira vez no início do século XVIII pelo holandês Anthony van Leeuwenhoek, com auxílio de um microscópio primitivo que ele mesmo construiu. Leeuwenhoek chamou estes organismos de “animáculos” e, mesmo não possuindo formação científica foi ele o responsável pelas primeiras observações sobre protozoários ciliados (DOBELL, 1960; FORD, 1991). Na época, os protozoários já haviam sido classificados como plantas e animais pelo fato de apresentarem características atribuídas a ambos. O termo Protozoa, como táxon, foi introduzido por Goldfuss (1818) para denominar o sub-reino que incluía os protozoários. Inicialmente englobava alguns organismos como os briozoários e posteriormente, após modificação por von Siebold (1845), passou a incluir apenas organismos unicelulares.

Esses organismos anteriormente constituíam o Reino Protista (HAECKEL, 1866). Atualmente apresentam uma classificação diferente devido às análises moleculares que os levaram a serem inseridos num grupo polifilético contendo diversos grupos inseridos no superfilo Alveolata Cavalier-Smith (1991), dentre os quais os ciliados, dinoflagelados e os apicomplexa são caracterizados pela presença de alvéolos na estrutura da membrana (ADL et al., 2012). O filo Ciliophora Doflein (1901) constitui um agrupamento monofilético de microeucariotos, reunidos pelo dimorfismo nuclear, infraciliatura complexa e reprodução por conjugação (LYNN, 2008). Possui alta diversidade e todo tipo de simetria, grande e variável complexidade estrutural e adaptações para todos os tipos de ambientes e suas respectivas condições. Existem muitas espécies parasitas, comensais e mutualistas. Embora grande parte dos protozoários exista como um indivíduo solitário há variadas formas em colônia, variando em tamanho de um micrometro até uns poucos milímetros em alguns dinoflagelados, amebas e ciliados (FOISSNER, 1988, 1996; LYNN; CORLISS, 1991; FOISSNER; HAWKSWORTH, 2009). De acordo com Kudo (1966), os ciliados são o grupo de protistas mais diversificado e especializado, sendo estes os que apresentam maior complexidade em sua organização.

O filo Ciliophora possui 14 classes e cerca de 8.000 morfo-espécies descritas, incluindo aproximadamente 200 formas fósseis e 3.000 espécies simbióticas que podem variar entre 10µm e 4.500µm (GAO et al., 2016). Estes autores reorganizaram apenas as classes, não havendo alterações nas ordens e subclasses, mantendo-se a classificação proposta por Lynn (2008).

As estruturas ciliadas são organelas celulares estruturalmente idênticas aos flagelos, utilizadas para locomoção. Estas podem cobrir a superfície do corpo ou estarem restritas à região peristomial (citóstoma) ou a certas faixas. Em quase todas as espécies, os cílios são fundidos em uma membrana ondulante ou em membranelas menores, sendo ambas usadas para impulsionar os

alimentos para o citóstoma. Algumas espécies apresentam cílios fundidos, formando tubos enrijecidos, os cirros, que são freqüentemente usados pelos ciliados rastejantes para a locomoção (HAUSMANN; HÜLSMANN, 1996). Os cílios podem ser também empregados de maneira menos usual, numa forma tigmotáctil de adesão a superfícies (CORLISS, 1979). A ciliatura somática e a ciliatura oral passaram a possuir grande valor taxonômico na identificação de gêneros e espécies entre os Ciliophora devido às técnicas de impregnação pela prata propostas por Chatton e Lwoff (1930), Klein (1958), Tuffrau (1967), Foissner (1991) e Dieckmann (1995). Juntamente com a infraciliatura, outros caracteres tais como: forma do corpo, morfologia do citóstoma, presença ou não de extrussomas, tipo de extrussoma, morfologia do aparato nuclear, formato e número de vacúolos pulsáteis, película, coloração e pigmentos do citoplasma, inclusões citoplasmáticas, padrão de reorganização cortical (morfogênese) tem sido amplamente utilizados na taxonomia do grupo (CORLISS, 1979, 1986; FOISSNER, 1992, 1993, 1994; FOISSNER; BERGER, 1996; LYNN, 2008). Os ciliados possuem vacúolos contrácteis com poros permanentes para a realização de balanço hídrico e um citoprocto por onde são excretados resíduos celulares. Alguns ciliados apresentam coloração, que é determinada por pigmentos citoplasmáticos, algas simbiontes, alimentos recentemente ingeridos ou grânulos de reserva. A forma do corpo varia do esférico ao alongado, geralmente com a região ventral plana e a dorsal abaulada, podendo ocorrer também formas assimétricas (CORLISS, 1979; PUYTORAC et al., 1987). Segundo Corliss (1979), Lynn e Small (2002), o macro e o micronúcleo encontram-se separados por um invólucro nuclear. O macronúcleo possui a função de regular o metabolismo do organismo, seu formato pode variar de ovóide, que ocorre geralmente em ciliados menores, a moniliforme ou, até mesmo subdividido em dois ou mais nódulos através do citoplasma, a perda deste é considerada letal para o organismo, no entanto, alguns amiconucleados podem se reproduzir por fissão binária (RAIKOV, 1996). O micronúcleo tem por função as atividades genéticas, podendo variar em tamanho de 1,5 e 5µm e podem apresentar formato esférico ou ovóide (CORLISS, 1979; LYNN; SMALL, 2002).

A reprodução assexuada nos ciliados, que ocorre por fissão binária é um processo que resulta em duas células-filhas semelhantes. Já na reprodução sexuada, por conjugação, ocorre a reversibilidade da união entre os conjugantes e a substituição do macronúcleo, sendo esta uma característica exclusiva dos ciliados (GRELL, 1973; CORLISS, 1979). De acordo com Puytorac et al. (1994); Lynn e Small (1997), o processo de conjugação envolve uma troca direta de genes sem que estes estejam acondicionados em óvulos. Posteriormente, dois ciliados compatíveis se fundem ao longo de uma superfície compartilhada, a membrana entre eles desaparece e ocorre a troca mútua de material genético. A conjugação é precedida por divisões meióticas de um micronúcleo e é seguida pela reconstituição da condição nuclear normal, que pode ou não envolver uma fissão.

Os ciliados são, em sua maioria, de vida livre (PUYTORAC et al., 1994), podendo ser

encontrados em diferentes ambientes aquáticos (água doce, salobra, salgada, bromélias) e edáficos (solos superficiais, musgos, líquens) (CORLISS, 1979, JOPPERT et al., 1995; FOISSNER; AGATHA; BERGER, 2002; FOISSNER, 2003a; LYNN, 2008). São organismos atuantes na cadeia trófica como predadores de bactérias e de outros protistas como, diatomáceas, flagelados, tecamebas, outros ciliados e até mesmo micrometazoários (FENCHEL, 1987). O registro destes organismos em diversos habitats é influenciado por sua notável tolerância ou adaptabilidade às várias condições físicas e químicas apresentadas pela natureza em seus ambientes. Se os fatores ecológicos, tais como temperatura, teor de oxigênio dissolvido, pH, salinidade, luminosidade e condutividade elétrica estão dentro do limite tolerado por determinada espécie de ciliado, sua existência e abundância dependerá da quantidade de alimento disponível (NOLAND, 1925; SLEIGH, 1988).

Diversos autores como Taylor (1981), Finlay et al., (1996), Finlay (2002), Esteban e Finlay (2003), Fenchel e Finlay (2004) justificam o cosmopolitismo para grande parte dos ciliados devido à elevada abundância de indivíduos por população, curto tempo entre gerações, e alta capacidade de dispersão dos cistos que podem ser transportados pelo vento, água, insetos, entre outros animais. Segundo Foissner (1999), cerca de 30.000 espécies de ciliados ainda não foram descobertas, sugerindo que a distribuição geográfica de grande parte destes organismos é endêmica. Foissner (2006) resalta inúmeras razões do porque é tão difícil a obtenção de dados confiáveis sobre a diversidade e distribuição geográfica de protistas: subamostragem (muitos encistados), pouco volume de amostras e escassez de taxonomistas bem treinados.

## **2.2 Ciliados de vida livre ocorrentes no Brasil**

Estudos sugerem que 89% da diversidade de protozoários permanece desconhecida e ressaltam a necessidade de conhecer estes organismos visto que possuem importantes funções nos diversos ecossistemas e são negligenciados em programas de conservação (COTTERILL; AL-RASHEID; FOISSNER, 2008; FOISSNER; HAWKSWORTH, 2009). Os primeiros trabalhos sobre levantamento de ciliados realizados no Brasil referem-se a ciliados marinhos planctônicos encontrados entre grãos de areia (FARIA; CUNHA, 1917; CUNHA; FONSECA, 1918; FARIA, CUNHA; PINTO, 1922; PINTO, 1925). Foissner (1997) encontrou 139 espécies de ciliados em localidades brasileiras, entre as quais, descreveu uma nova espécie encontrada em amostras de solo *Lamtostyla granulifera* (Spirotrichea).

Dentre os estudos de levantamento de protozoários ciliados desenvolvidos em ambientes dulciaquícolas, destacam-se os trabalhos de Hardoim e Heckman (1996) realizado no Pantanal mato-grossense, e de Arantes et al. (2004), no reservatório de Salto Grande no município de Americana, São Paulo. Paiva e Silva-Neto (2004a) contribuíram com um trabalho de cunho



taxonômico em estudo realizado as margens da lagoa de Cabiúnas, no estado do Rio de Janeiro, onde descreveram uma nova espécie, *Oxytricha marcili*. Em amostras de sedimento de um rio localizado no Estado de Minas Gerais, Paiva e Silva–Neto (2004b) descreveram uma nova espécie *Apoamphisiella foissneri*.

Dias e D’Agosto (2006) realizaram estudo no córrego São Pedro, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, onde registraram e descreveram alterações morfológicas, bem como os mecanismos de ingestão de acordo com o tipo de alimento em *Frontonia leucas* (Hymenostomatida). Os autores relacionaram o tipo de alimento ingerido às diferentes condições ambientais. Dias (2007), no mesmo local, identificou 42 espécies de ciliados e caracterizou morfologicamente uma espécie nova *Apoamphisiella* sp. (Spirotrichea, Amphisiellidae).

Regali-Seleghim, Goldinho e Matsumura-Tundisi (2011) fizeram levantamento de protozoários ciliados de água doce no estado de São Paulo, registrando um total de 417 espécies. Dentre os organismos encontrados, observaram-se dois novos registros para o Brasil e América do Sul respectivamente: *Neobursaridium gigas* Balech, 1941 e *Loxodes rex* Dragesco, 1970. No mesmo ano Buosi et al. (2011) realizaram estudo de identificação do impacto do enriquecimento de nutrientes na diversidade da comunidade de ciliados associados as raízes das macrófitas aquáticas. Os autores encontraram um total de 85 espécies, dentre as quais cerca de 25% ocorreram exclusivamente no tratamento fertilizado. Bagatini et al. (2013) inventariaram táxons de ciliados em corpos d’água doce do estado de São Paulo, associando a variação na abundância dos gêneros/espécies de maior incidência em relação às variáveis ambientais. Foram identificados 74 gêneros, sendo o Ciliophora dominante. A subclasse Stichotrichia ocorreu em todos os ambientes, predominando em cinco deles, especialmente pela ocorrência o gênero *Halteria*. Chitolina et al. (2013) realizaram a caracterização morfológica de duas espécies de ciliados encontrados em um riacho na cidade de Alvorada, Rio Grande do Sul, *Tokophrya lemnarum* e *Multifasciculatum elegans*.

Safi et al. (2014), em estudo realizado no lago de Guaíba, localizado ao Sul do Brasil, próximo à cidade de Porto Alegre, registraram 22 morfotipos de ciliados peritríqueos, sendo os gêneros *Epystilis* e *Vorticella* os mais diversos e abundantes.

Debastiani et al. (2016) investigaram padrões de diversidade e abundância na comunidade de protozoários ciliados em córregos urbanos pertencentes à bacia do alto rio Paraná, onde foram encontrados 84 espécies distribuídas em 24 ordens.

Ciliados epibiontes possuem um importante papel ecológico nos ecossistemas de água doce (BALDOCK, 1986). Dias, D’Ávila e D’Agosto (2006) fizeram um levantamento da presença de ciliados peritríqueos e suctória associados à espécie de molusco *Pomacea lineata*. Este molusco constitui de um micro-habitat para a comunidade de protozoários ciliados, demonstrando uma

complexa relação trófica.

Dias et al. (2009a) registraram a ocorrência do ciliados peritríquios *Rhabdostyla* sp. colonizando oligoquetas da espécie *Limnodrilus hoffmeisteri* encontrados em um córrego poluído ao sudeste do Brasil. Em outro trabalho desenvolvido por Dias et al. (2009b), no córrego da fazenda do Sagrado Coração de Jesus, município de Juiz de Fora, Minas Gerais, foi relatado o primeiro registro do ciliado *Trichodina heterodentata* infestando girinos da espécie *Rhinella pombali*. Dias et al. (2010), realizaram um estudo ecológico em um riacho urbano no Sudeste do Brasil da relação de ciliados peritríquios (*Carchesium polypinum*) associado a uma espécie de molusco. O estudo mostrou que a alta infestação pode estar relacionada à preferência desses ciliados por locais com alto grau de eutrofização, sugerindo que estes organismos podem ter uma importância ecológica em sistemas aquáticos.

Cabral et al. (2010) investigaram a ocorrência de ciliados em larvas de Chironomidae em um córrego localizado ao sudeste do Brasil. A ocorrência de epibiontes sobre as larvas foi considerada espacial e temporalmente heterogênea, onde os possíveis fatores relacionados partem de uma compreensão de fatores ecológicos que se associam a esta ocorrência, sendo necessário o estabelecimento desta relação como indicador de qualidade de água em sistemas lóticos.

Mendonça (2012) identificou 32 táxons de ciliados epibentônicos, dos quais 28 foram identificados em nível de espécie, descrevendo uma nova espécie *Strobilidium longicinetium* e um novo registro da espécie *Diaxonella trimarginata* para região neotropical.

Sartini (2012) avaliou a influência da poluição orgânica sobre a composição e estrutura da comunidade de protozoários ciliados em um sistema lótico no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. Foram encontrados 19 espécies de peritríqueos, sendo que a espécie *Carchesium polypinum* ocorreu com maior frequência e abundância em locais com elevado grau de poluição. Além disso, avaliou em outra etapa do estudo a composição e estrutura da comunidade, e a distribuição espacial de peritríqueos epibiontes sobre a concha de moluscos da espécie *Physa acuta*, onde 60% dos organismos analisados estavam colonizados por pelo menos 7 espécies de peritríqueos, sendo a espécie *Epistylis* sp. considerada mais dominante.

Azevedo et al. (2014) registraram pela primeira vez um protozoário epibionte *Epistylis* sp. aderido uma espécie de crustáceo *Ergasilus chelangulatus* coletado no Rio dos Veados no estado de São Paulo. O crustáceo foi registrado pela primeira vez neste local, ampliando sua distribuição geográfica.

## 2.3 Classificação dos ciliados

Neste estudo foi utilizada classificação proposta por Lynn (2008), visto que os protozoários ciliados têm sido classificados de maneiras diferentes à medida que aumenta o conhecimento sobre suas características juntamente com o aprimoramento das técnicas ciliatólogicas. Tal classificação é descrita em seguida.

Filo Ciliphora Doflein, 1901

Sub-filo Postciliodesmatophora Gerassimova e Seravin, 1976

Classe Karyorelictea Corliss, 1974

Ordem Trachelocercida Jankowski, 1978

Ordem Loxodida Jankowski, 1980

Ordem Protoheterotrichida Nouzarede, 1977

Classe Heterotrichea Stein, 1859

Ordem Heterotrichida Stein, 1859

Sub-ordem Heterotrichina Stein, 1859

Sub-ordem Coliphorina Jankowski, 1964

Ordem Peritromida Jankowski, 1978

Sub-filo Intramacronucleata Lynn, 1996

Classe Spirotrichea Butschli, 1889

Sub-classe Protocruziidia de Puytorac, Grain e Mignot, 1987

Ordem Protocruziida Jankowski, 1980

Sub-classe Phacodiniidia Small e Lynn, 1985

Ordem Phacodiniida Small e Lynn, 1985

Sub-classe Hypotrichia Stein, 1859

Ordem Stichotrichida Faure-Fremiet, 1961

Ordem Euplotida Jankowski, 1980

Sub-ordem Kiiitrichida Tuffrau e Fleury, 1994

Sub-ordem Discocephalina Wicklow, 1982

Sub-ordem Euplotina Jankowski, 1979

Ordem Plagiotomida Albaret, 1974

Sub-classe Licnophoria Lynn, 2003

Ordem Licnophorida Corliss, 1957

Sub-classe Oligotrichia Butschli, 1887

Ordem Halteriida Petz e Foissner, 1992

Ordem Strombidiida Jankowski, 1980

Ordem Strobilidiida Jankowski, 1980

Ordem Tintinnida Kofoid e Campbell, 1929

Classe Armophorea Lynn, 2002

Ordem Metopida Jankowski, 1980

Ordem Armophorida Jankowski, 1964

Ordem Odontostomatida Sawaya, 1940

Ordem Clevelandellida de Puytorac e Grain, 1976

Classe Litostomatea Small e Lynn, 1981

Sub-classe Haptoria Corliss, 1974

Ordem Haptorida Corliss, 1974

Ordem Cyclotrichiida Jankowski, 1980

Ordem Pleurostomatida Schewiakoff, 1896

Sub-classe Trichostomatia Butschli, 1889

Ordem Vestibuliferida de Puytorac et al., 1974

Ordem Archistomatida de Puytorac et al., 1974

Ordem Blepharocorythida Wolska, 1971

Ordem Entodiniomorphida Reichenow Doflein e Reichenow, 1929

Ordem Reikostomatida Jankowski, 2007

Classe Phyllopharyngea de Puytorac et al., 1974

Sub-classe Hypostomatia Schewiakoff, 1896

Ordem Gymnozoida Jankowski, 2007

Ordem Chlamydodontida Deroux, 1976

Ordem Dysteriida Deroux, 1976

Sub-classe Rhynchodia Chatton e Lwoff, 1939

Ordem Rhynchodida Chatton e Lwoff, 1939

Sub-ordem Ancistrocomina Jankowski, 1980

Sub-ordem Sphenophyrina Jankowski, 1980

Sub-ordem Hypocomatina Deroux, 1976

Sub-classe Chonotrichia Wallengren, 1895

Ordem Chilodochonida Batisse, 1994

Ordem Exogemmida Jankowski, 1972

Sub-ordem Lobochochonia Jankowski, 1967

Sub-ordem Spirochonina Jankowski, 2007

Ordem Cryptogemmida Jankowski, 1978

Sub-classe Suctoria Claparede e Lachmann, 1859

Ordem Vermigemmida Jankowski, 1980

Ordem Podophryida Jankowski, 1967

Ordem Exogenida Collin, 1912

Ordem Tachyblastonida Jankowski, 1978

Ordem Ephelotida Raabe, 1964

Ordem Endogenida Collin, 1912

Ordem Evaginogenida Jankowski, 1978

Ordem Neotenea Jankowski, 1978

Classe Nassophorea Small e Lynn, 1981

Ordem Synhymeniida de Puytorac et al., 1974

Ordem Nassulida Jankowski, 1968

Sub-ordem Nassulopsina de Puytorac, 1994

Sub-ordem Parahymenostomatina Grain et al., 1976

Ordem Colpodidiida Foissner, Agatha e Berger, 2002

Ordem Microthoracida Jankowski, 1967

Classe Colpodea Small e Lynn, 1981

Sub-classe Colpodia Foissner, 1985

Ordem Colpodida de Puytorac et al., 1974

Ordem Bursariomorphida Fernandez-Galiano, 1978

Ordem Sorogenida Foissner, 1985

Ordem Bryophryida de Puytorac, Perez-Paniagua e Perez-Silva, 1979

Ordem Cyrtolophosidida Foissner, 1978  
 Sub-classe Bryometopia Foissner, 1985  
     Ordem Bryometopida Foissner, 1985  
 Classe Prostomatea Small e Lynn, 1985  
     Ordem Prostomatida Schewiakoff, 1896  
     Ordem Prorodontida Corliss, 1974  
 Classe Contofragmea Jankowski, 1980  
     Ordem Plagiopylida Jankowski, 1978  
     Ordem Trimyemida Jankowski, 1980  
 Classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974  
 Sub-classe Peniculia Faure-Fremiet in Corliss, 1956  
     Ordem Peniculida Faure-Fremiet in Corliss, 1956  
         Sub-ordem Frontoniina Jankowski, 1980  
         Sub-ordem Lembadionina Jankowski, 1980  
         Sub-ordem Urocentrina Jankowski, 1980  
         Sub-ordem Parameciina de Fromentel, 1874  
 Sub-classe Hymenostomatia Delage e Herouard, 1896  
     Ordem Tetrahymenida Faure-Fremiet in Corliss, 1956  
     Ordem Ophryoglenida Canella, 1964  
     Ordem Scuticociliatida Small, 1967  
         Sub-ordem Loxocephalina Jankowski, 1980  
         Sub-ordem Philasterina Small, 1967  
         Sub-ordem Pleuronematina Faure-Fremiet Corliss, 1956  
     Ordem Parastomatida Jankowski, 2007  
     Ordem Hysterocinetida Jankowski, 1973  
     Ordem Thigmotrichida Chatton e Lwoff, 1922  
 Sub-classe Apostomatia Chatton e Lwoff, 1928  
     Ordem Foettingeriida Jankowski, 1980  
     Ordem Colliniida Jankowski, 1980  
     Ordem Conidophryida Jankowski, 1980

Sub-classe Astomatia Schewiakoff, 1896

Ordem Hoplitophryida Jankowski, 1980

Ordem Anopliphryida Poche, 1913

Ordem Haptophryida Jankowski, 1980

Sub-classe Peritrichia Stein, 1859

Ordem Sessilida Kahl, 1933

Sub-ordem Vorticellina de Fromentel, 1875

Sub-ordem Operculariina Jankowski, 1980

Ordem Mobilida Kahl, 1933

Sub-ordem Urceolariina Jankowski, 2007

Sub-ordem Trichodinina Jankowski, 1980

## **2.4 Biomonitoramento em ambientes lóticos: protozoários ciliados**

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados em diferentes escalas como consequência negativa de atividades antrópicas (ex.: mineração, canalização, construção de represas, eutrofização artificial) (POMPEU et al., 2005; CASATTI et al., 2006). Os rios integram tudo o que acontece nas áreas de entorno, considerando-se o uso e ocupação do solo (CALLISTO; MORETTI; GOULART, 2001).

A escassez de água, a recuperação de sua qualidade em função dos respectivos usos e o desenvolvimento de tecnologias para o gerenciamento dos recursos hídricos são alguns dos grandes desafios que o desenvolvimento econômico enfrentará no próximo século. Portanto, faz-se necessária a utilização de programas de biomonitoramento com diferentes abordagens, a fim de se avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos brasileiros e de propor métodos para sua conservação e recuperação (MARQUES; BARBOSA, 2001). Dados biológicos juntamente com variáveis físicas e químicas representam um instrumento importante para avaliar a qualidade da água em rios e córregos e têm contribuído para controlar as emissões de poluentes orgânicos e outros contaminantes presentes em sistemas lóticos urbanos (SUEHIRO; TEZUKA, 1981; GROLIÈRE et al., 1990; SPARAGANO; GROLIÈRE, 1991; MADONI, 1993; FERNANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1996; SOLA et al., 1996; MADONI; BASSANINI, 1999; MADONI, 2005; MADONI; BRAGHIROLI, 2007).

Neste sentido faz-se necessário analisar não só as mudanças nas características físicas e químicas da água, mas também as respostas a essas mudanças por parte dos organismos que vivem nesses ambientes (MADONI; BASSANINI, 1999; MADONI, 2005). Os métodos que se baseiam nas respostas das comunidades biológicas têm sido considerados como as melhores formas de

monitoramento e avaliação do grau de deterioração dos recursos hídricos. O biomonitoramento analisa, portanto, comunidades biológicas que dependem das condições ambientais e são sensíveis o bastante para mostrar os efeitos da poluição (GROLIÈRE et al., 1990; MARQUES; BARBOSA, 2001).

Os organismos considerados indicadores de poluição em ambientes dulcícolas variam desde bactérias, algas bentônicas, protozoários, invertebrados a peixes (STRUBLE; KRAUTER, 1987). As comunidades de protozoários ciliados de vida livre surgem como uma ferramenta fundamental no auxílio e determinação da qualidade de água e podem ser usados como bioindicadores robustos em ecossistemas de água doce (JIANG et al., 2007; SHI et al., 2009; TAN et al., 2010; SHI et al., 2012). O seu curto ciclo de vida permite a detecção de impactos em curta escala de tempo. Esses organismos respondem diretamente a mudanças no perfil químico e são sensíveis a dosagens muito pequenas de contaminantes (SPARAGANO; GROLIÈRE, 1991). Além disso, apresentam relativa e ampla distribuição geográfica, sendo componentes essenciais de ambientes aquáticos-dulcícolas e podem ser obtidos em quantidades estatisticamente aceitáveis (PICCINNI; GUTIÉRREZ, 1995). Estes organismos apresentam exigências específicas em relação às características do meio, como a quantidade de matéria orgânica dissolvida, temperatura, pH, condutividade elétrica e concentração de oxigênio dissolvido (SLEIGH, 1988).

A maioria das espécies de protozoários ciliados apresenta predileção por ecossistemas que recebem elevada carga de esgoto doméstico (HENEGBRY; RIDGEWAY, 1979). Entretanto, algumas espécies são encontradas somente em áreas que são referência. Portanto, estudos que investiguem a diversidade destes protistas são de grande interesse em estudos de biomonitoramento.

O uso de organismos como descritores das características ambientais passa primeiramente pelo conhecimento das espécies e das condições ambientais de seus respectivos habitats, informações essas que podem ser obtidas por meio de um estudo taxonômico e ecológico mais detalhado. Posteriormente, estudar a sensibilidade dos protozoários ciliados a um grande número de substâncias tóxicas, pode fornecer um padrão de medida para identificar a intensidade e o potencial de danos ecológicos causados por descargas antropogênicas de poluentes nas águas de superfície (MADONI; ROMEO, 2006).

## **2.5 Ensaios ecotoxicológicos utilizando protozoários como organismos-teste**

O termo ecotoxicologia foi utilizado pela primeira vez pelo francês Rene Truhaut (1969 apud Moriarty, 1983), sendo definida, inicialmente, como a ciência que estuda os efeitos dos poluentes nos organismos e suas consequências na estrutura e funcionamento das populações, comunidades e ecossistemas.



Nem sempre um poluente se comporta como um agente tóxico, muitas vezes é necessário supor a geração de níveis indesejáveis de uma determinada substância no ambiente. As mudanças biológicas expressas por diversos organismos, populações ou até mesmo comunidades são utilizadas como sinais de possíveis alterações que o ambiente sofre devido às atividades humanas (ESPINAS; VANEGAS 2005; ORREGO et al., 2005; CAPÓ, 2007).

Os primeiros ensaios ecotoxicológicos foram realizados entre 1863 e 1917, mas somente na década de 1930 foram implementados com organismos aquáticos, tendo por objetivo estabelecer a relação de causa e efeito de substâncias químicas e despejos líquidos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). No Brasil, a primeira iniciativa dos estudos na área de ecotoxicologia iniciaram-se partindo do trabalho realizado por Rocha et al. (1971) no qual a tilápia foi utilizada como organismo-teste para avaliar os efeitos do efluente de uma indústria na região do Rio Atibaia no estado de São Paulo (FESB - CETESB, 1971).

Os ensaios de toxicidade podem ser classificados como de efeitos agudos ou crônicos, sendo que estes se caracterizam quanto aos efeitos que uma determinada substância pode causar no organismo em um determinado tempo de exposição. O efeito agudo é um ensaio de curta duração em altas concentrações, em que se avalia normalmente a mortalidade ou imobilidade dos organismos. Já os de exposição crônica tratam-se de um ensaio com exposição prolongada em concentrações subletais, que abrange parte do ciclo de vida do organismo onde é possível avaliar efeitos nos parâmetros reprodutivos, crescimento e deformidade dos organismos (BORRELY, 2001).

Uma forma utilizada para estimar se um ou mais agentes contaminantes causam efeitos tóxicos sobre os organismos vivos nos ecossistemas aquáticos é realizar os ensaios ecotoxicológicos com amostras ambientais dos diferentes compartimentos (água ou sedimento). Em paralelo, realiza-se a quantificação dos possíveis contaminantes, mediante análises químicas e, posteriormente, conforme os resultados pode-se comparar os efeitos e teores com os limites permitidos pela Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005, em que determina o enquadramento dos corpos aquáticos, bem como estabelece os padrões de lançamento para efluentes industriais e domésticos.

O compartimento sedimento tem se mostrado como um importante indicador da saúde dos ecossistemas aquáticos. Segundo Zagatto e Bertolotti (2008) três abordagens têm sido utilizadas para a avaliação da qualidade dos sedimentos: análises físicas e químicas (informa o grau de contaminação), análises da estrutura das comunidades bentônicas, e os bioensaios de toxicidade (efeitos do contaminante sobre a biota). Análises químicas oferecem poucas informações sobre os possíveis efeitos sobre as comunidades biológicas. Por sua vez, os ensaios ecotoxicológicos permitem avaliar os efeitos interativos de misturas complexas presentes no sedimento sobre os

organismos aquáticos que por vezes não são detectados pelas quantificações químicas como prejudiciais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A elevada complexidade deste compartimento ambiental, por exemplo, em relação à composição mineralógica, tamanho de partícula, distribuição e o teor de matéria orgânica faz com que a caracterização química muitas vezes não consiga estimar corretamente o potencial tóxico dos sedimentos, pois podem afetar a disponibilidade dos contaminantes presentes nos corpos d'água. Mediante tal situação, faz-se necessária a realização de uma abordagem química-biológica as quais podem fornecer informações valiosas sobre a biodisponibilidade de poluentes, bem como dos efeitos tóxicos das misturas presentes no ambiente (CAJARAVILLE et al., 2000).

Programas de biomonitoramento têm realizado bioensaios de exposição aguda ou crônica utilizando organismos que se caracterizam por ciclos de vida relativamente complexos. No Brasil, por exemplo, ensaios com amostras de água e sedimento contaminados são realizados com os microcrustáceos *Daphnia similis* ABNT-NBR 12713 (ABNT, 2016) e *Ceriodaphnia silvestrii* ABNT-NBR 13373 (ABNT, 2011), algas ABNT- NBR 12648/2011 (ABNT, 2011) e peixes ABNT-NBR 15088/2011 (ABNT, 2011). Tais resultados são eficazes, porém existe a necessidade de aperfeiçoamento no que se refere ao tempo de duração destes ensaios.

Em 2011, a resolução CONAMA 375/2005 foi alterada e completada pela resolução CONAMA 430/2011 que dispõe de condições e padrões de lançamento de efluentes e, trás em seu artigo 4º, parágrafo XIII a definição de testes ecotoxicológicos e os métodos utilizados para detectar e avaliar o efeito de um agente tóxico sobre as comunidades presentes nos ambientes aquáticos.

O uso de organismos-teste com curto ciclo de vida, tal como protozoários ciliados, poderá fornecer resultados mais rápidos (ROMEO et al., 2005; MADONI; ROMEO, 2006). Estes organismos são considerados como importante componente do ambiente aquático, tendo por função a ponte entre o fluxo de substâncias biológicas e de energia a partir de um nível da cadeia trófica para outros mais superiores (SHERR et al., 1988; HAUSMANN; HULSMANN; RADEK, 2003; REHMAN et al., 2008), desempenhando um papel importante na purificação e regulação global da comunidade aquática. Tem sido demonstrado, por exemplo, que os ciliados melhoram a qualidade dos efluentes por meio do seu envolvimento na regulação da biomassa bacteriana, pela remoção da maior parte das bactérias dispersas (MADONI, 1994, 2002, 2003; SALVADO et al., 1995). No entanto, apesar de sua reconhecida importância nos ecossistemas aquáticos, poucos trabalhos tem sido realizados para identificar as espécies adequadas para uso nos ensaios ecotoxicológicos uma vez que os protozoários são considerados modelos biológicos confiáveis e, conseqüentemente ótimos candidatos para esta finalidade (GILRON; LYNN, 1998; NENDZA, 2002; BELKIN, 2003; GUTIERREZ et al., 2003; DELMONTE CORRADO et al., 2005). No Brasil, os trabalhos utilizando protozoários ciliados são escassos, ressaltando assim a necessidade de investigação da

diversidade biológica de protozoários ciliados em ambientes pouco explorados e posterior estudo dos mesmos para uso potencial em ensaios de toxicidade (WANICK et al., 2008; ALVES, 2010; MIRANDA; MARTINS, 2013; BITENCOURT, 2014; MANSANO et al., 2016).

Este complexo conjunto de organismos interage, muitas vezes incluindo espécies que são sensíveis, resistentes ou intermediárias em sua tolerância a poluentes. Este grau de tolerância pode fornecer um critério para identificação da intensidade e do potencial de dano ecológico causado pela ação antrópica de poluentes descarregados em águas de superfície.

Alguns estudos realizados em amostras de águas poluídas por metais pesados têm revelado mudanças na dinâmica das comunidades de protozoários (CAIRNS et al., 1980; FERNANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1993, 1996). Neste contexto, ensaios ecotoxicológicos utilizando protozoários ciliados tornou-se uma ferramenta valiosa para a detecção de distúrbios ambientais e para a avaliação do estado trófico (CAIRNS; PRATT, 1989). Parker (1979) utilizando cloreto de mercúrio, chumbo e zinco, avaliou o efeito de toxicidade aguda de *Uronema marinum*. Posteriormente, Chapman e Dunlop (1981) expôs o ciliado *Tetrahymena pyriformisa* à concentrações de cádmio e zinco associada a adição de cálcio e magnésio. Neste estudo os autores realizaram os experimentos após conhecimento das taxas de crescimento das populações ao final da fase log. Yoshioka, Ose e Sato (1985), utilizando o mesmo organismo avaliou o efeito tóxico de 57 produtos químicos que são normalmente encontradas em ambientes aquáticos no Japão. Os autores demonstraram que *T. pyriformis* poderia ser utilizado para detectar os produtos químicos de baixas concentrações com rapidez e eficácia. Twagilimana et al. (1998) avaliaram a sensibilidade do ciliado *Spirostomum teres* em 14 produtos químicos puros, sendo oito substâncias orgânicas e seis inorgânicas. Os autores constataram que bioensaios são de fáceis e adequados para avaliação de risco e detecção precoce de efeitos tóxicos sobre a comunidade em ambientes de água doce.

Trabalhos realizados por Madoni (1994, 2000, 2003), Madoni et al. (1992), Madoni et al. (1996), Madoni e Romeo (2006) salientam a importância do uso dos protozoários ciliados em ensaios de toxicidade. Tal grupo de organismos possui um elevado potencial de aplicação como organismos-teste em estudos ecotoxicológicos de ecossistemas aquáticos e efluentes contaminados. Por isso são utilizados como bioindicadores de qualidade de água por possuírem algumas vantagens sobre outros organismos. Como por exemplo, a alta sensibilidade destes organismos às mudanças em seus arredores, aliado com o seu tempo de geração curto, nos permite revelar a resposta à contaminação ambiental muito mais rapidamente (SPARAGANO; GROLIÈRE, 1991; PICCINNI; GUTIÉRREZ, 1995; FERNANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1996).

Henglong Xu et al. (2004) verificaram a toxicidade da amônia e seus efeitos sobre a inibição do crescimento do ciliado *Euplotes vannus*. A tolerância de *E.vannus* foi considerada maior quando comparada a larvas ou juvenis de outros metazoários sendo que, os resultados também

demonstraram que ciliados, como predadores bacterianos são susceptíveis a desempenhar um papel positivo na manutenção e melhoria da qualidade da água em ambientes aquáticos com altos níveis de amônia. Martin-Gonzalez et al. (2006) estudaram o efeito citotóxico dos metais pesados como cádmio, zinco e cobre nos ciliados *Drepanomonas revoluta*, *Uronema nigricans* e *Euplotes sp.* isolados a partir de uma estação de tratamento de águas residuais de um centro urbano na Espanha. Rao et al. (2006) avaliaram a toxicidade rápida de um inseticida orgânico fosforado em *Paramecium caudatum* com ênfase na morfologia, comportamento e tempo de geração. Alves (2010) realizou um estudo biológico de linhagens desta mesma espécie avaliando também seu efeito tóxico quando exposto a diferentes concentrações do agrotóxico Fipronil.

Estudo realizado por Wanick et al. (2008) com a espécie *Paramecium bursaria* expondo os ciliados a seis diferentes concentrações de cádmio mostrou que, estes organismos são sensíveis à este metal, quando comparado a outros ciliados já estudados. Amanchie e Hussain (2010) estudaram os efeitos tóxicos de agrotóxicos em *Paramecium caudatum* e *Oxytricha fallax*, demonstrando que o efeito agudo em concentrações mais elevadas dessas substâncias causa um aumento acentuado na mobilidade das células nos dois primeiros minutos de exposição, mas diminuem após 30 minutos. Os autores mostraram que houve mudanças na forma, tamanho, cor e largura das espécies, deformidades tais como inchaço, encurtamento do eixo longitudinal com escurecimento de citoplasma, bem como o alargamento do vacúolo contrátil, destacando a redução do comprimento de *P. caudatum*. Klimek et al. (2012) realizaram um estudo sobre o efeito tóxico do nitrogênio amoniacal em *Stentor coeruleus* e *Coleps hirtus* isolados a partir de uma estação de tratamento de lodo ativado no sul da Polônia. *S. coeruleus* é raramente encontrado no lodo ativo. Tal observação demonstra que a concentração de íons de amoníaco é aparentemente um fator que evidencia a ocorrência destes protozoários sem lama ativada.

Miranda e Martins (2013) isolaram o ciliado *Paramecium caudatum* da represa do Monjolinho, na cidade de São Carlos, São Paulo. Os organismos cultivados em laboratório foram utilizados em ensaios ecotoxicológicos preliminares com 17 metais pesados sob a forma de íons de cloreto (alumínio, arsênio, bário, cádmio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, estanho, estrôncio, ferro (II), lítio, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, e zinco). O resultado indicou que *P. caudatum* possui baixa tolerância às substâncias utilizadas, destacando-se apenas pela maior tolerância ao Lítio. Os autores sugerem a necessidade de continuidade com intuito de estabelecer com maior precisão as faixas de mortalidade. Bitencourt (2014) avaliou a sensibilidade de duas espécies de ciliados marinhos, *Euplotes vannus* e *Euplotes crassus* e a atividade de biorremediação em consórcios bacterianos quando expostos concentrações elevadas de cobre e zinco. Os organismos se mostraram resistentes às substâncias, entretanto a resistência dos mesmos está associada a atividade bacteriana e aumento da biomassa na presença de nitrogênio.

Diante da importância dos protozoários ciliados para os ecossistemas aquáticos e a capacidade que possuem em refletir os efeitos da poluição, faz-se necessário o aumento de estudos que avaliem a sensibilidade e estabeleçam com maior precisão as faixas de concentração letal que afetam a comunidade de protozoários ciliados, sendo assim possível estabelecer um padrão de medida capaz de identificar o potencial e a intensidade dos danos causados pelas ações antrópicas sobre os ecossistemas aquáticos (MADONI, 2000; NALECZ-JAWECKI, 2004; MADONI; ROMEO, 2006; WANICK et al., 2008; MIRANDA; MARTINS, 2013; MANSANO et al., 2016).

## CAPÍTULO I

### INVENTÁRIO DE CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) BENTÔNICOS EM UM ECOSISTEMA LÓTICO NEOTROPICAL E CARACTERIZAÇÃO MULTIDISCIPLINAR DE *Euplotes cf. affinis* Dujardin 1841 (SPIROTRICHEA, EUPLOTIDAE)

**RESUMO:** Ao longo de um ano de estudo em três pontos amostrais em um ecossistema lótico neotropical (Ribeirão José Pereira-Itajubá-MG) foram registradas 48 morfoespécies de ciliados, sendo que *Paramecium caudatum* e *Paramecium bursaria* foram cultivadas em laboratório. Este estudo constitui o primeiro inventário de ciliados dulcícolas na região Sul do estado de Minas Gerais. A espécie *Euplotes cf. affinis* foi caracterizada usando dados morfológicos (observações *in vivo* e impregnação pela prata), ecológicos e moleculares (18S-rDNA). A espécie apresenta tamanho médio de 40-70µm *in vivo*, possui forma elíptica, macronúcleo em forma de 3 e micronúcleo posicionado na extremidade anterior do macronúcleo, vacúolo contrátil localizado a direita do corpo, zona adoral de membranela composta de 18-30 fileiras abrangendo aproximadamente 70% do comprimento do corpo, nove cirros frontoventrais, cinco cirros transversos, dois cirros caudais e dois cirros marginais. Nas análises moleculares *Euplotes cf. affinis* se agrupou em um clado juntamente com *Euplotes octacarinatus*. As topologias obtidas para espécies do gênero *Euplotes* sugerem que o número de cirros frontoventrais, padrão de argiroma dorsal e padrão de morfogênese divisional não refletem divergência evolutiva no grupo. O presente estudo corrobora para ampliação do conhecimento da diversidade de protozoários ciliados em ambientes lóticos no Brasil.

**Palavras-chave:** Brasil, biodiversidade, checklist, ciliados, *Euplotes affinis*.

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse em se estudar a biodiversidade microbiana nos ecossistemas aquáticos aumentou muito nos últimos anos. Isto pode ser justificado pelas mudanças aceleradas na paisagem causadas, muitas vezes, por danos relevantes, associadas aos benefícios e importância que essa microfauna possui para o ecossistema (FANO; MISTRI; ROSSI, 2003; CUNICO, 2012). Entre as comunidades aquáticas, os protozoários ciliados estão inseridos dentro dos primeiros níveis tróficos e são considerados essenciais na transferência de matéria e energia (FENCHEL, 1987).

Os protozoários ciliados possuem ampla distribuição geográfica e podem ser encontrados em diversos tipos de ambientes, tais como água doce, água salobra, associados a outros organismos, ambientes marinhos, regiões polares, desérticas, solos e tanques de bromélia (FENCHEL 1987;

FOISSNER; AGATHA; BERGER, 2002; LYNN 2008; PETZ et al. 2007; ORSI et al., 2012), sendo que grande parte da diversidade destes organismos ainda é desconhecida (FOISSNER; HAWKSWORTH, 2009).

A utilização dos protozoários ciliados como ferramenta de avaliação tem se destacado em programas de biomonitoramento, pois estes possuem a capacidade de refletir os efeitos das atividades antrópicas sobre o ambiente (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI; RODRÍGUEZ, 2003; DEBASTIANI et al., 2016). Participam de uma complexa rede alimentar e atuam como um elo entre a produção bacteriana e os produtores secundários, desempenhando funções no processo de remineralização, controlando a densidade de bactérias e sua composição morfológica e taxonômica por meio da predação (BERNINGER et al., 1991; BERNINGER et al., 1993; JURGENS; GUDE 1994; JURGEN; ARNDT; ZIMMERMANN, 1997). Os ciliados tem a capacidade de acumular íons metálicos como zinco, cádmio e cobre que se ligam as proteínas e podem ser utilizados em processos de biorremediação e são também utilizados como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos (TWAGILIMANA et al., 1998; NALECZ-JAWECKI, 2004; MADONI; ROMEO, 2006; GUTIÉRREZ et al., 2011). Segundo Petrelli et al. (2012) os ciliados podem também ser uma fonte de metabólitos secundários, uma vez que suas moléculas podem desenvolver atividades antivirais e antimicrobianas. Os ciliados são ainda considerados organismos fundamentais nos processos de purificação em águas residuárias e em sistemas de tratamento biológico, pois suas funções são semelhantes a processos de despoluição de sistemas naturais (CURDS, 1992).

Os estudos taxonômicos de protozoários ciliados permitem o conhecimento da diversidade biológica destes organismos (FOISSNER; BERGER 1996; REISS; SCHMID-ARAYA, 2008; DOPHEIDE et al., 2009) associado ao seu potencial biotecnológico de fornecer informações sobre a saúde dos ecossistemas devido seu curto ciclo de vida que permite respostas rápidas a mudanças ocorridas dentro do sistema aquático (MADONI; GHETTI, 1981; FOISSNER, 1988; MADONI, 1993; FOISSNER, 1997; PASCOE et al., 2000; NICOLAU et al., 2001; XU et al., 2002).

Estudos voltados para identificação desses organismos são importantes, pois seus resultados apresentam não só valores de cunho científico, mas também educacional e econômico (CORLISS, 2001). Desta forma, diversos autores ressaltam a necessidade de melhoria nos estudos que envolvem a taxonomia de protozoários ciliados, pois muitos trabalhos de cunho ecológico que incluem esses organismos apresentam identificações superficiais (FOISSNER, 1994, 1999; FINALY; FENCHEL, 1999; MITCHEL; MEISTERFELD, 2005). Esta questão pode ser resolvida por meio do aperfeiçoamento da taxonomia de ciliados de vida livre associado a suas características morfológicas e moleculares, bem como aumentar o esforço amostral em locais pouco estudados levando em consideração a especificidade de algumas espécies quanto ao seu habitat (MITCHEL; MEISTERFELD, 2005). Regali-Selegim, Goldinho e Matsumura-Tundisi(2011) afirmam que

grande parte dos trabalhos de levantamento da microfauna de protozoários de ambientes lóticos foram feitos na América do Norte e na Europa, sendo assim, há desconhecimento desses organismos em muitas outras partes do mundo. Nesse sentido, o aumento de estudos que envolvam o levantamento da fauna de ciliados são necessários para o conhecimento das características consideradas essenciais para a diferenciação de espécies que possam ser utilizadas em estudos que demonstrem as relações tróficas existentes, permitindo assim, a sustentabilidade dos ecossistemas (MEDEIROS; ARAÚJO, 2013; ARAÚJO; LOBATO JÚNIOR, 2013).

Estudos como os de Wiackowski (1981), Czapik (1982), Hul (1987), Primc (1988), Fernandez-Leborans e Novilo (1996), Madoni e Bassanini (1999), Madoni (2005) demonstram os efeitos da poluição sobre as comunidades de diferentes níveis tróficos presentes em águas correntes, entre elas os protozoários ciliados. A determinação de zonas de poluição está relacionada com a quantidade de oxigênio dissolvido e de matéria orgânica associada com as espécies de protozoários que podem indicar os níveis de poluição (FOISSNER; BERGER, 1996). Streble e Krauter (1987), Foissner e Berger (1996) definem essas zonas: polissapróbia (água extremamente poluída), alfa-mesossapróbia (água muito poluída); betamesossapróbia (água moderadamente poluída) e oligossapróbia (água não poluída ou levemente poluída).

De acordo com Kolkwitz e Marsson (1908; 1909), Madoni e Bassanini (1999), Madoni (2005) o sistema sapróbio é uma importante ferramenta para avaliar a qualidade da água por meio da poluição orgânica, sendo altamente utilizada para classificar biologicamente águas correntes. Nesse sentido, ao propor um sistema de grupos funcionais permite-se analisar as mudanças na estrutura da comunidade de protozoários apontando vantagens na utilização deste método, pois o reconhecimento dos grupos funcionais elimina a confusão decorrente da identificação de alguns grupos taxonômicos (PRATT; CAIRNS, 1985).

Os protozoários ciliados do gênero *Euplotes* Ehrenberg, 1830 constituem um grupo bastante diverso, contendo cerca de mais de 150 espécies descritas (BERGER, 2001). Podem ser encontrados em ambientes diversificados, são organismos onívoros, mas há também o relato de que os ciliados deste gênero se alimentam de outros ciliados (BEERS, 1954; DOLAN; COATS, 1991; JIANG et al., 2010). São caracterizados pelo tamanho e forma do corpo, os números e disposição dos cirros ventrais (divididos em cirros frontoventrais, transversos e caudais), número e arranjo da zona adoral de membranela, forma do macronúcleo, número de cinércias dorsais e tipo de argiroma (KLEIN, 1926; TUFFRAU, 1960; BORROR, 1972; CARTER, 1972). Com base nessas características, mais de 30 novas espécies foram descritas dentro deste grupo nas últimas décadas (BERGER; FOISSNER 1989; AGATHA et al., 1990;. VALBONESI; LUPORINI, 1990; SONG,1995; COPPELLOTTI; CISOTTO, 1996; SONG; BRADBURY, 1997; SONG; PACKROFF, 1997; SONG; WILBERT, 1997, 2002; VALBONESI; APONE; LUPORINI, 1997;



LOBBAN et al., 2005; SCHWARZ; STOECK 2007; WILBERT; SONG, 2008; JIANG et al., 2010; SHAO et al., 2010; PAN et al., 2012) dentre essas espécies, a espécie *Euplotes affinis* encontrado no presente estudo, em países como Áustria e Eslováquia (Europa Central). Atualmente, dados moleculares, em especial sequências do gene 18S-rDNA, têm sido utilizados para correta identificação dos ciliados (CHEN; SONG; WARREN, 2000; BERNHARD et al. 2001; PETRONI et al., 2002; LI; SONG, 2006) e em estudos filogenéticos (SCHLEGEL; ELWOOD; SOGIN, 1991; KUSCH; HECKMANN 1996; JEROME; LYNN 1996; LYNN et al., 1999).

O presente estudo teve por objetivo identificar as espécies de protozoários ciliados encontradas em um ecossistema lótico na região Sul do estado de Minas Gerais e apresentar a caracterização morfológica (observações *in vivo*, prata a seco, DAPI e protargol) e molecular (18S-rDNA) de *Euplotes cf. affinis*. Este estudo constitui o primeiro registro de ciliados na região Sul do Estado de Minas Gerais e a primeira investigação da posição filogenética de *Euplotes affinis*.

## 2 METODOLOGIA

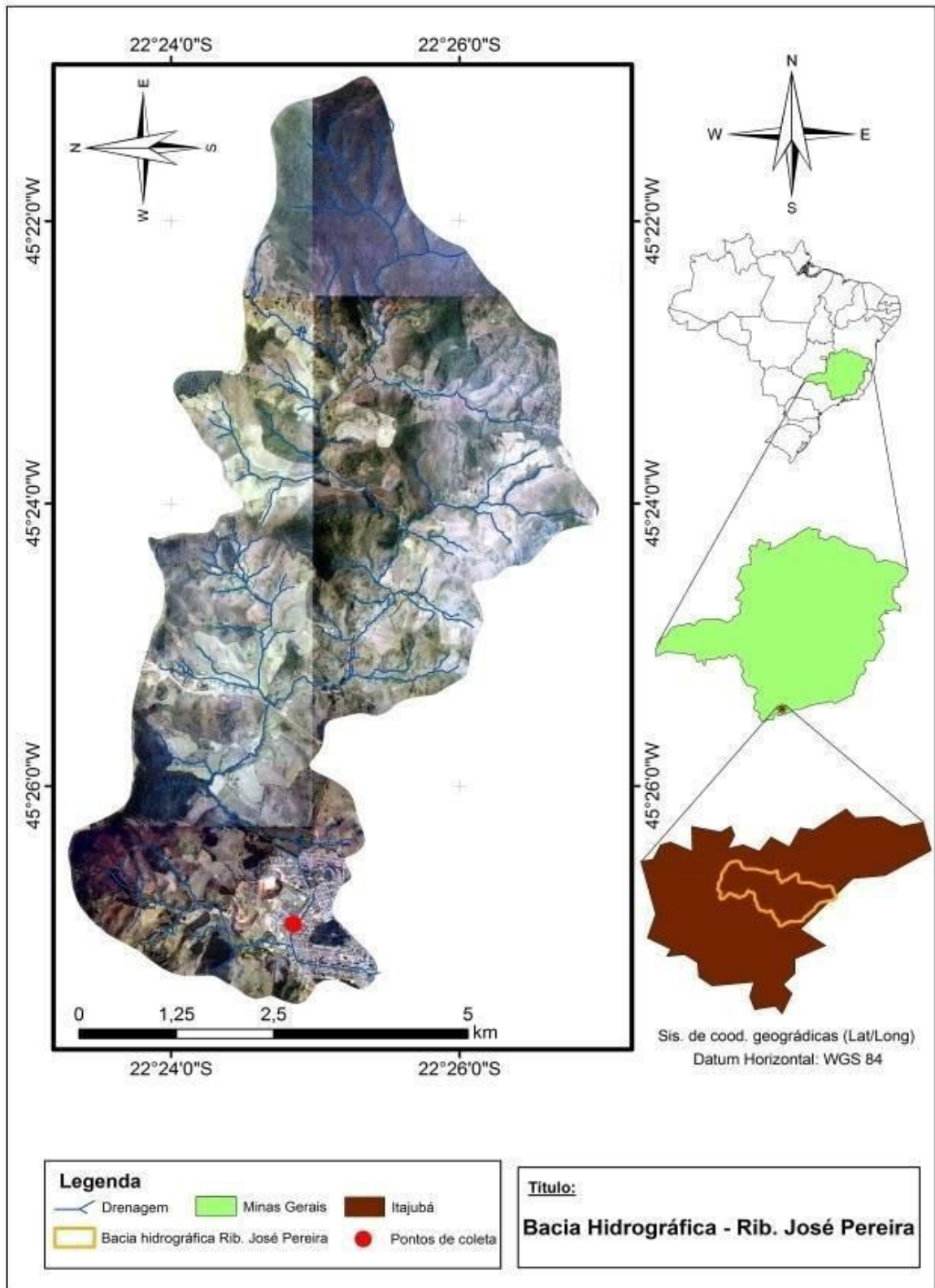
### 2.1 Área de Estudo

As coletas de sedimento foram realizadas na sub-bacia do ribeirão José Pereira inserida na bacia do Rio Sapucaí que ocupa uma área total de 3.671 ha, localizada ao sul do estado de Minas Gerais, no município de Itajubá/Minas Gerais/Brasil (Figura 1). O ribeirão faz parte de um importante manancial hídrico caracterizado por serras com vegetação típica de Mata Atlântica que abriga a Reserva Biológica Serra do Toledos, considerado um dos mais importantes remanescentes florestais protegidos da região. Segundo Lima (2012), a região oeste da sub-bacia abrange parte da zona urbana do município de Itajubá e a região leste a zona rural. A bacia do Rio Sapucaí já sofreu um total de 74 eventos de cheia, tendo o maior deles ocorrido no ano de 1874 e o último em 2000, atingindo as planícies de inundação da cidade de Itajubá e demais municípios localizados a jusante (PINHEIRO, 2005).

Para a realização do estudo, foram selecionados três pontos de coleta (45°27'31" e 45°20'57"W e 22°23'18" e 22°26'57"S) ao longo de um trecho de 1 km na área urbana do ribeirão José Pereira, região com intensa poluição orgânica com despejo de esgoto doméstico *in natura* (Figura 2). As coletas foram realizadas neste trecho do ribeirão com intuito de se obter maior número possível de espécies de protozoários ciliados, visto que ambientes enriquecidos com matéria orgânica constituem intensa fonte de bactérias que é a principal fonte de alimento para estes organismos. Tal informação pode ser comprovada pelos dados obtidos por Thomaz da Silva (2015) contidos na Tabela 1, com ênfase aos valores de coliformes totais.



**Figura 1** - Pontos de coleta no ribeirão José Pereira, município de Itajubá, Minas Gerais, Brasil; a, b, c e d= pontos utilizados ao longo do trecho.



**Figura 2** - Mapa mostrando a região de Itajubá (MG) e toda sub-bacia do ribeirão José Pereira (Thomaz da Silva, 2015) indicando o trecho utilizado para as coletas (45°27'31" e 45°20' 57W e 22°23'18"e22°26'57"S).

## 2.2 Coletas e processamento de amostras

Para estudo do inventário de ciliados no ribeirão José Pereira/Itajubá/MG, foram realizadas coletas mensais de amostras de sedimento entre os meses de outubro de 2014 a outubro de 2015, todas pela manhã. Foram coletadas tréplicas, com o auxílio de uma draga de Van Veen. As amostras foram transferidas para frascos plásticos de 500 mL devidamente identificados e transportados para o Laboratório de Microscopia da Universidade Federal de Itajubá para o seu processamento e análise.

Das amostras conduzidas ao laboratório, três alíquotas de cada ponto amostral, de aproximadamente 20 mL, foram colocadas em placas de Petri para observação dos ciliados *in vivo*. Tal procedimento foi realizado no dia da coleta. Os organismos foram triados com a utilização de uma micropipeta e, posteriormente, observados sob microscópio óptico para realização das fotomicrografias. De acordo com Foissner e Berger (1996), a observação dos ciliados *in vivo* é de grande importância para classificação de gêneros e espécies.

Parte das amostras referentes a cada sub-amostra foram separadas em três placas de Petri para realização de culturas. O meio de cultivo foi composto de água mineral e grãos de arroz com casca macerados. O arroz é utilizado como fonte de carbono para as bactérias que são fonte de alimento para numerosas populações de ciliados (MADONI, 2005).

Posteriormente, os organismos que apresentaram maior número nas culturas foram triados para cultivo em placa de polipropileno de 24 poços contendo meio Cerophyl (SONNEBORN, 1957) e à medida que houve aumento populacional, foram transferidos para placas de Petri (fundo plano, parede simples 1,2mm – 100 x 15mm), contendo água mineral e arroz com casca, permitindo assim o aumento no número de organismos. Os cultivos foram mantidos em sala livre de contaminação, em bancadas sob temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ).

O trecho amostrado do ribeirão José Pereira possui elevada carga orgânica (poluição por esgoto doméstico *in natura*) tal como demonstrado pelos dados físicos e químicos da água obtido em estudo recente desenvolvido na mesma estação amostral (THOMAZ DA SILVA, 2015) (Tabela 1). No presente estudo não foram aferidas variáveis físicas e químicas da água em virtude de já terem sido aferidas no trabalho de Thomaz da Silva (2015).

**Tabela 1** - Caracterização da área em amostras de água do trecho estudado na sub-bacia do Ribeirão José Pereira-Itajubá/MG.

<b>Variáveis físicas, químicas e biológicas</b>	<b>Dados obtidos em outubro de 2014</b>
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	5,4
pH	7,3
Temperatura (°C)	20
Condutividade ( μS.cm <sup>-1</sup> )	80
Sólidos Totais dissolvidos - idem, unidade. mg.L <sup>-1</sup>	40
DBO (mg L <sup>-1</sup> )	1
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	5,3
Clorofila a (μg L <sup>-1</sup> )	0,008
Fósforo dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	102,3
Fósforo total (μg L <sup>-1</sup> )	0,93
Amônia (mg L <sup>-1</sup> )	0,02
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0,35
Sólidos totais (mg L <sup>-1</sup> )	275
Carbono total (mg L <sup>-1</sup> )	20,5
Nitrogênio total (mg L <sup>-1</sup> )	1,9
Coliformes. Total - NMP/(1:100ml)	6867

Fonte: Thomaz da Silva (2015)

### **2.3 Inventário dos protozoários ciliados**

A identificação dos ciliados encontrados no ribeirão José Pereira foi realizada com base no guia ilustrado elaborado por Foissner e Berger (1996) e literatura complementar (FOISSNER, 1991, 1992; FOISSNER, BERGER; KOHMANN, 1994; FOISSNER et al., 1995). Os registros fotográficos dos espécimes *in vivo* foram realizados com auxílio de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio Olympus BX 51. Para confirmação de algumas espécies foram realizadas medidas *in vivo*, coloração do macro e micronúcleo com DAPI – DNA specific fluorescent probe (KAPUSCINSKI, 1995) e técnicas ciliatológicas, como prata a seco (KLEIN, 1958) e protargol (DIECKMANN, 1995). As principais características usadas na identificação dos ciliados foram: forma do corpo, posição e número de vacúolos contráteis, ciliaturas oral e somática, posição e forma do macronúcleo e inclusões e coloração do citoplasma.

## 2.4 Caracterização multidisciplinar do eplotídeo *Euplotes affinis*

Para caracterização multidisciplinar do ciliado eplotídeo (*Euplotes affinis*), além das observações *in vivo* realizadas com auxílio de microscópio Olympus BX 51, foram utilizadas as técnicas de impregnação prata a seco (KLEIN, 1958), impregnação pelo proteinato de prata (DIECKMANN, 1995) e sequência do marcador molecular 18S-rDNA (Anexos A, B e C). A referida etapa foi desenvolvida no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As amostras de ciliados para extração de DNA total foram fixadas em etanol absoluto e, posteriormente, a extração foi realizada com o kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN) seguindo as orientações do fabricante. O DNA genômico extraído foi estocado em freezer -20°C. As reações de amplificação do 18S-rDNA foram realizadas em termociclador “Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700”, em eppendorfs de 200µL, em um volume final de 25µL, contendo 16,125µL de H<sub>2</sub>O; 5µL de tampão 10X; 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 0,25µL de dNTP (10mM); 0,5µL de cada iniciador (10µM); 0,125µL de Taq Platinum® (5U/µL); 1,0µL de DNA genômico purificado. Os primers utilizados para amplificação dos genes foram euk A e euk B (MEDLIN et al., 1988). A ciclagem utilizada foi: 1) um ciclo de 94°C por 2min; seguido de 2) 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA), 3) um ciclo de 50°C por 30 segundos (anelamento dos iniciadores) e um ciclo de 72°C por 2 min (polimerização da fita de DNA); terminando com 4) um ciclo de 72°C por 7 minutos para a finalização na polimerização de eventuais fitas inacabadas. As reações de sequenciamento foram montadas utilizando o fluido das reações de PCR utilizando o Kit “GFX PCR DNA and gel band purification” e sequenciadas em um 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante.

Os *data sets* para as análises filogenéticas foram gerados a partir de sequências do gênero *Euplotes* presentes no GenBank (NCBI). O alinhamento foi realizado no programa ARB (LUDWIG et al., 2004) e posteriormente, inspecionado manualmente para a exclusão de regiões de natureza ambígua e de sequências correspondentes aos iniciadores. As reconstruções filogenéticas foram realizadas empregando-se o método de reconstrução filogenética máxima verossimilhança, realizada no programa PhyML versão 3.0 (GUINDON et al., 2010) usando o modelo evolutivo GTR+G+I, como sugerido pela análise realizada usando o programa modeltest 2.0 (DARRIBA et al., 2012;GUINDON;GASCUEL,2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição da microfauna de ciliados

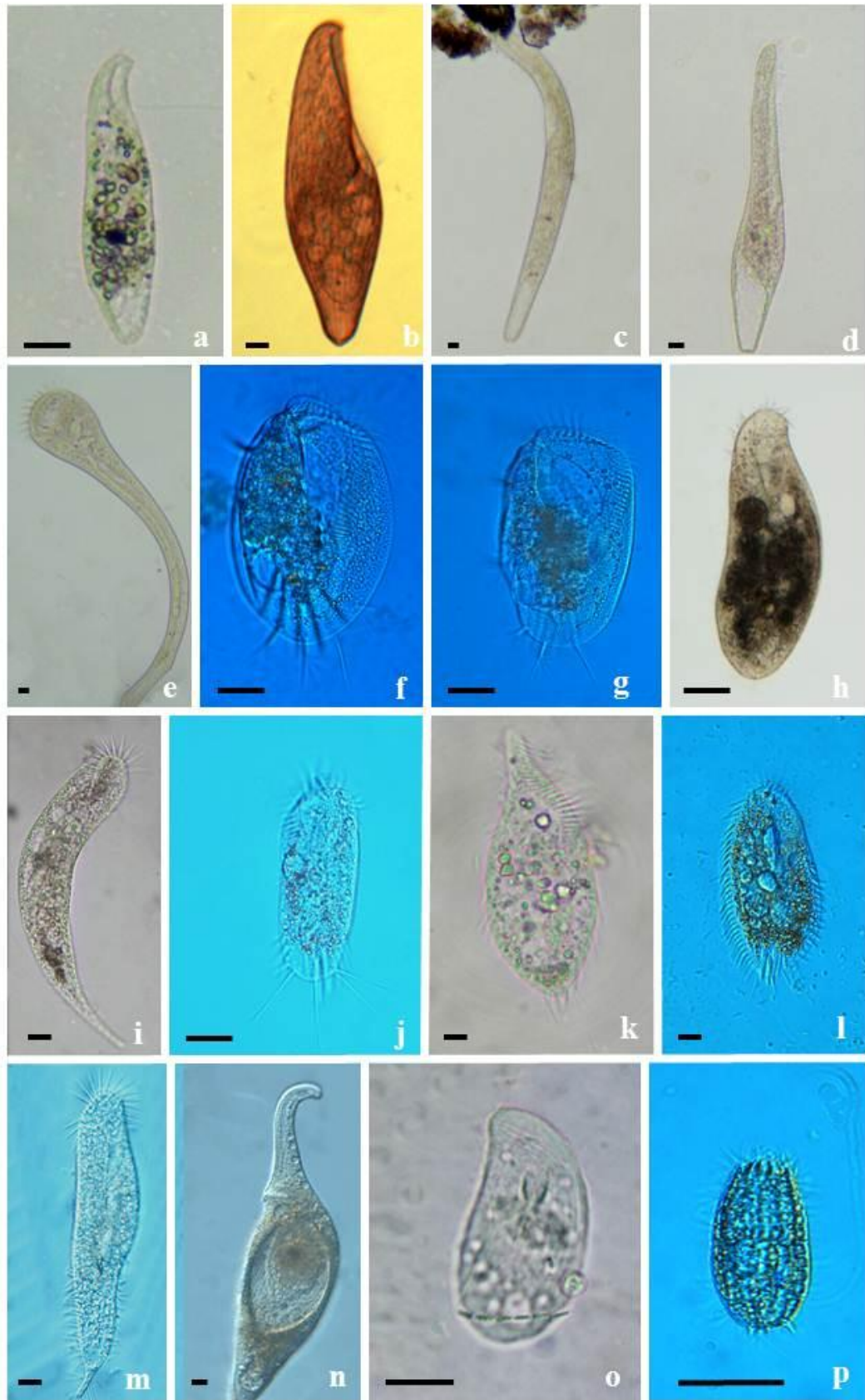
Foram registrados nas amostras do sedimento do ribeirão José Pereira distintos grupos de micro-organismos, tais como: amebas nuas e com carapaça, flagelados, microalgas, ciliados, rotíferos, tardígrados, microcrustáceos, anelídeos e larvas de insetos. Dentre estes micro-organismos, foram inventariadas 48 morfoespécies de ciliados em amostras visualizadas no dia de coleta e nos cultivos mantidos em laboratório (Figura 3). Estes organismos foram classificados de acordo com Lynn (2008) e estão distribuídos nas classes Karyorelictea (n=1), Heterotrichea (n=6), Spirotrichea (n=15), Litostomatea (n=2), Phyllopharyngea (n=2), Colpodea (n=1), Prostomatea (n=1), Oligohymenophorea (n=20) (Quadro 1). A classe Oligohymenophorea apresentou maior número de espécies distribuídas nas sub-classes: Peniculia, Hymenostomatia e Peritrichia. A composição da ciliatofauna nos três trechos do ribeirão José Pereira foi a mesma em todo o período amostral, por isso foi apresentada lista única com as espécies encontradas.

**Quadro 1** - Espécies de protistas ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira, município de Itajubá, Minas Gerais.

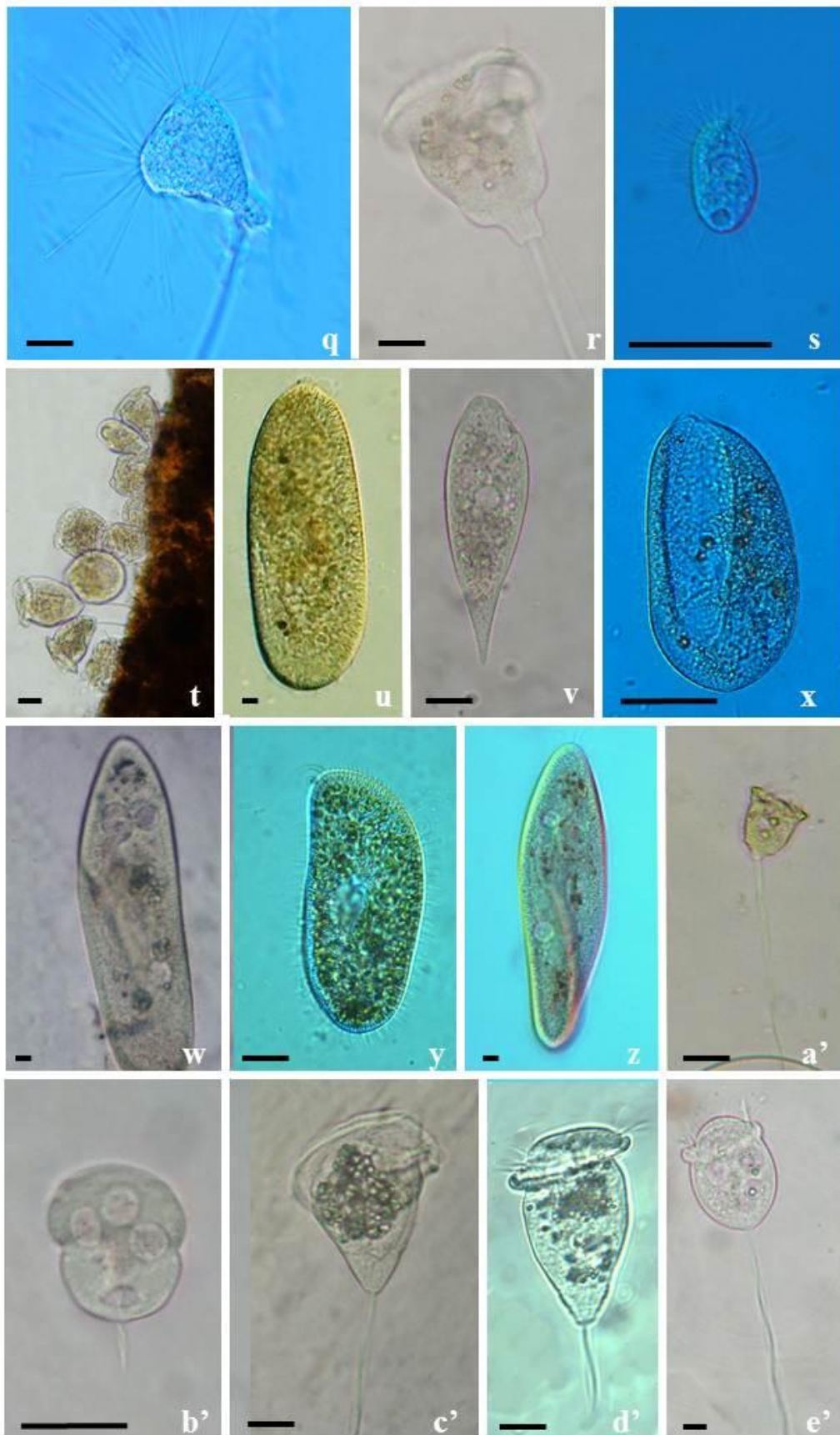
Classe Karyorelictea Corliss, 1974	
	Ordem Loxodida Jankowski in Small e Lynn, 1985
	<i>Loxodes striatus</i> Engelmann, 1862
Classe Heterotrichea Stein, 1859	
	Ordem Heterotrichida Stein, 1859
	<i>Blepahrismma sinuosum</i> Padmavathi, 1959
	<i>Spirostomum minus</i> Roux, 1901
	<i>Spirostomum teres</i> Claparède e Lachmann, 1858
	<i>Stentor polymorphus</i> Müller, 1773
	<i>Stentor roeselii</i> Ehrenberg, 1835
	<i>Stentor</i> sp. 1
Classe Spirotrichea Bütschli, 1889	
	Sub-classe Hypotrichia Stein, 1859
	<i>Aspidisca cicada</i> Ehrenberg, 1830
	<i>Euplotes aediculatus</i> Pierson, 1943
	<i>Euplotes eurytomus</i> Wrzesniowski, 1870
	<i>Euplotes</i> sp. 1
	Sub-classe Stichotrichia Small e Lynn, 1985
	<i>Tetmemena pustulata</i> Müller, 1786
	Morfotipos 1-9
	Sub-classe Oligotrichia Bütschli, 1887
	<i>Halteria</i> cf. <i>grandinella</i> Dujardin, 1841
Classe Litostomatea Small e Lynn, 1981	
	Ordem Haptorida Corliss, 1974

	<i>Dileptus</i> sp.
	Ordem Pleutostomatida Schewiakoff, 1896
	<i>Litonotus</i> sp.
Classe Phyllopharyngea de Puytorac et al., 1974	
	Sub-classe Suctoria Claparède e Lachmann, 1859
	Ordem Endogenida Collin, 1912
	<i>Tokophrya lemnae</i> Stein, 1859
	Morfotipo 1
Classe Colpodea Small e Lynn, 1981	
	Sub-classe Colpodia Foissner, 1985
	Ordem Colpodida de Puytorac et al., 1974
	<i>Colpoda</i> sp.
Classe Prostomatea Schewiakoff, 1896	
	<i>Coleps hirtus</i>
Classe Oligohymenophorea de Puytorac et al., 1974	
	Sub-classe Peniculia Fauré-Fremiet in Corliss, 1956
	<i>Frontonia leucas</i> Ehrenberg, 1833
	<i>Lembadium lucens</i> Maskell, 1887
	<i>Paramecium aurelia</i> -complex O.F. Müller, 1773
	<i>Paramecium bursaria</i> Ehrenberg, 1831
	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg, 1833
	<i>Urocentrum turbo</i> Müller, 1786
	Sub-classe Hymenostomatia Délage e Hérouard, 1896
	<i>Glaucoma frontata</i> Ehrenberg, 1830
	Morfotipo 1
	Morfotipo 2
	Ordem Scuticociliatida Small, 1967
	<i>Cyclidium</i> cf. <i>glaucoma</i> O. F. Müller, 1773
	Sub-classe Peritrichia Stein, 1859
	<i>Carchesium polypinum</i> Linnaeus, 1758
	<i>Epistylis</i> sp.
	<i>Opercularia</i> sp.
	<i>Pseudovorticella</i> sp.
	<i>Vorticella convallaria</i> -complex Linnaeus, 1758
	<i>Vorticella campanula</i> Ehrenberg, 1831
	<i>Vorticella</i> sp.1-4





**Figura 3** - Protozoários ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG. a) *Loxodes striatus*; b) *Blepharisma sinuosum*; c) *Spirostomum minus*; d) *Spirostomum teres*; e) *Stentor roeseli*; f) *Euplotes aediculatus*; g) *Euplotes eurystomus*; h) *Hypotrichia* morfotipo 4; i) *Hypotrichia* morfotipo 1; j) *Hypotrichia* morfotipo 7; k) *Hypotrichia* morfotipo 8; l) *Tetmemena pustulata*; m) *Hypotrichia* morfotipo 9; n) *Dileptus* sp.; o) *Cyrtophorida* morfotipo 1; p) *Coleps hirtus*. Barras: 20 µm.



**Figura 3** - continuação. q) *Tokophrya lemnae*; r) *Carchesium polypinum*; s) *Cyclidium* cf. *glaucoma*; t) *Epistylis* sp. 1; u) *Frontonia leucas*; v) *Glaucoma frontata*; x) *Lembadium lucens*; w) *Paramecium aurelia*-complex; y) *Paramecium bursaria*; z) *Paramecium caudatum*; a') *Pseudovorticella* sp.; b') *Urocentrum turbo*; c') *Vorticella campanula*; d') *Vorticella convallaria*-complex; e') *Vorticella* sp.1. Barras: 20  $\mu$ m.

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre protozoários ciliados de ambientes dulcícolas foram realizados por Cunha no início do século XX (CUNHA, 1913; 1915; 1916; 1918), havendo poucos estudos recentes sobre inventário destes micro-organismos em águas continentais (WIELOCH, 2007; DIAS; WIELOCH; D'AGOSTO, 2008; MENDONÇA, 2011; REGALI-SELEGHIM, GOLDINHO E MATSUMURA-TUDISI, 2011). O presente estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre a diversidade de protozoários ciliados no Brasil, visto que, como já mencionado, este é o primeiro trabalho realizado na região sul do estado de Minas Gerais. Ainda, estudos desta natureza podem ser úteis, pois além de permitirem o entendimento das relações tróficas nos ambientes aquáticos, podem subsidiar programas de biomonitoramento que avaliam a qualidade da água, bem como a manutenção e conservação das espécies que podem ser utilizadas em estudos com aplicações potencialmente úteis (MADONI; ROMEO, 2006; REGALI-SELEGHIM; GOLDINHO; MATSUMURA-TUDISI, 2011).

Coterill, Al-Rasheid e Foissner (2008) estimam existir cerca de 40.000 espécies de ciliados de vida livre, sendo que apenas 4.500 espécies (~11%) foram descritas. Fenchel e Finaly (2004), Foissner (2006), Foissner e Hawksworth (2009) ressaltam que não há investigação detalhada sobre a diversidade de ciliados na América do Sul havendo a necessidade de se aumentar o esforço amostral quanto aos estudos taxonômicos de protozoários ciliados, visto que ainda existem muitos ambientes que não foram explorados e que tais estudos podem contribuir para as atividades de monitoramento ambiental e possam ser utilizados para a conservação dos protozoários e o manejo adequado dos ecossistemas (MITCHELL; MEISTERFELD, 2005; COTERILL; AL-RASHEID; FOISSNER; CHAO; KATZ, 2008; REGALI-SELEGHIM, GOLDINHO E MATSUMURA-TUDISI, 2011; ARAÚJO; LOBATO JÚNIOR, 2013; MEDEIROS; ARAÚJO, 2013).

Atualmente, estudos sobre monitoramento ambiental usando abordagem integrada, ou seja, aquela que integra características físicas, químicas e biológicas da água, tem sido considerada método mais eficiente na investigação da qualidade da água (FAUSTINO, 1996; BRAGA et al., 2005). O esforço amostral por meio do levantamento de dados sobre a diversidade de protozoários ciliados associado com o desenvolvimento de métodos que avaliem a qualidade da água são utilizados para classificar e caracterizar o ambiente quanto a seu nível de poluição (LOBO et al., 1995; NAVAS-PEREIRA; HENRIQUE, 1996; SOUZA; SPERLING, 1999; BICUDO; BICUDO 2004; LÉVÊQUE; BALIAN; MARTENS, 2005). Os protozoários ciliados podem refletir rapidamente os efeitos causados pelas contaminações ambientais, sendo altamente sensíveis às mudanças no meio, possuem alta taxa reprodutiva e facilidade de cultivo em laboratório, caracterizando os protozoários ciliados como ótimos indicadores de qualidade de água (SOLA et al., 1996; PRIMC-HABDIJA et al., 1998; MADONI; BASSANINI, 1999; MADONI, 2005).

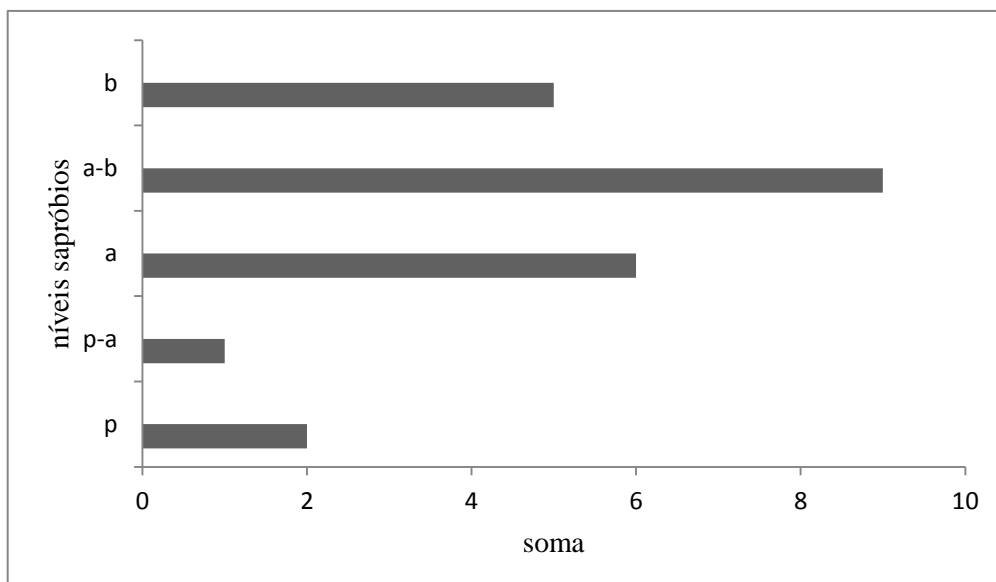
O índice sapróbio consiste em avaliar a tolerância dos organismos em relação à carga orgânica do ambiente, no intuito de indicar diferentes níveis de qualidade de água (MADONI; BASSANINI, 1999; MADONI, 2005; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2007). Desenvolvido por Kolkwitz e Marsson (1908; 1909) e modificado por Kolkwitz (1950) é utilizado para classificar e caracterizar águas continentais em zonas de poluição: oligossapróbica (água saudável, não adversamente afetada pela poluição),  $\beta$ -mesossapróbica (água levemente poluída),  $\alpha$ -mesossapróbica (poluição forte), polissapróbica (água muito poluída com intensa atividade bacteriana). A lista de espécies de ciliados utilizada na classificação das zonas de poluições foi revisada por Sládeck (1973). Estudos recentes no Brasil utilizaram valência sapróbia dos ciliados para investigar qualidade de águas continentais (PAIVA; SILVA-NETO, 2004; DIAS, WIELOCH; D'AGOSTO, 2008). Dentre as 48 morfoespécies encontradas no ribeirão José Pereira, a maioria indica as classes  $\alpha$  e  $\beta$  mesossapróbico (Figura 5), destacando-se as espécies *Loxodes striatus* Engelmann, 1862, *Spirostomum teres* Claparède e Lachmann, 1858 e *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 com predileção a ambientes enriquecidos organicamente (Tabela 2).

Em estudo recente sobre qualidade da água em quatro estações amostrais do Ribeirão José Pereira, Thomaz da Silva (2015) classificaram águas deste sistema lótico como classe II (CONAMA 357/05). O trecho amostral do nosso estudo foi amostrado pela autora que ressaltou ser o trecho com os mais elevados valores de temperatura da água, condutividade elétrica, coliformes totais, fósforo, nitrogênio total, amônia, clorofila a, e menores valores de pH e oxigênio dissolvido, trecho com maior nível de poluição da sub-bacia, dados estes corroborados pelo estudo da ciliatofauna (Figura 4). Os valores de coliformes totais do trecho em estudo quando comparado ao ponto controle do estudo de Thomaz da Silva (2015) mostra que o trecho utilizado no presente estudo recebe elevada carga de esgoto doméstico.

**Tabela 2** - Lista das espécies de ciliados encontrados no Ribeirão José Pereira, Itajubá, Minas Gerais, níveis sapróbios (S) e principal fonte de alimento (MF).

Espécies de ciliados	S	MF
<i>Loxodes striatus</i> Engelmann, 1862	p	Al, Ki, Cy
<i>Spirostomum teres</i> Claparède e Lachmann, 1858	p	Sb, Ba, Al, Ki
<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg, 1833	p-a	Ba, Al
<i>Euplotes aediculatus</i> Pierson, 1943	a	O
<i>Euplotes eurystomus</i> Wrzesniowski, 1870	a	O
<i>Tokophrya lemnae</i> Stein, 1859	a	R
<i>Cyclidium</i> cf. <i>glaucoma</i> O.F. Müller, 1773	a	Ba
<i>Carchesium polypinum</i> Linnaeus, 1758	a	Ba
<i>Vorticella convallaria-complex</i> Linnaeus, 1758	a	Ba
<i>Spirostomum minus</i> Roux, 1901	a-b	Ba
<i>Stentor polymorphus</i> Müller, 1773	a-b	O
<i>Stentor roeselii</i> Ehrenberg, 1835	a-b	O
<i>Stentor</i> sp. 1	a-b	**
<i>Aspidisca cicada</i> Ehrenberg, 1830	a-b	Ba
<i>Coleps hirtus</i>	a-b	O
<i>Halteria</i> cf. <i>grandinella</i> Dujardin, 1841	b-a	Ba, Al
<i>Lembadium lucens</i> Maskell, 1887	b-a	O
<i>Paramecium aurelia-complex</i> O.F. Müller, 1773	b-a	Ba
<i>Tetmemena pustulata</i> Müller, 1786	b	O
<i>Frontonia leucas</i> Ehrenberg, 1833	b	O
<i>Paramecium bursaria</i> Ehrenberg, 1831	b	Ba, Al, Ki
<i>Urocentrum turbo</i> Müller, 1786	b	Ba, Ki
<i>Vorticella campanula</i> Ehrenberg, 1831	b	Ba, Al
<i>Blepahrismma sinuosum</i> Sawaya, 1940	**	**
<i>Euplotes</i> sp. 1	**	**
<i>Dipleptus</i> sp.	**	**
<i>Litonotus</i> sp.	**	**
<i>Colpoda</i> sp. 1	**	**
<i>Glaucoma frontata</i> Ehrenberg, 1830	**	**
<i>Epistylis</i> sp.	**	**
<i>Opercularia</i> sp.	**	**
<i>Pseudovorticella</i> sp. 1	**	**
<i>Vorticella</i> sp.1-4	**	**

Classificação de acordo com Foissner e Berger (1996). *Legenda:* p= polissapróbio; a=alfa-mesossapróbio; b=beta-mesossapróbio; Al= algas; Ba=bactérias; Cy=cianobactérias; Ki= diatomáceas; O=onívoros; R=predador; Sb=bactéria sulfurosa; \*\*=não há classificação.



**Figura 4** - Soma de valores do nível sapróbio (p= polissapróbio; a=alfa-mesosapróbio; b=beta-mesosapróbio; das espécies encontradas no Ribeirão José Pereira, Itajubá, Minas Gerais.

Segundo Walsh et al. (2005) córregos urbanos estão frequentemente expostos à degradação, por meio de atividades poluidoras tais como, despejo de esgoto doméstico e industrial. O esgoto doméstico contém compostos orgânicos biodegradáveis, nutrientes e micro-organismos patogênicos; os efluentes industriais possuem uma diversidade maior de contaminantes que são lançados nos cursos d'água devido aos variados tipos de matéria-prima utilizados nos processos industriais (MENDONÇA, 2012). Curds (1992) ressalta que os locais que recebem grande quantidade de matéria orgânica podem apresentar elevada quantidade de bactérias das quais os protozoários ciliados se alimentam, sendo a disponibilidade de alimento um fator importante para o controle das populações de ciliados nos ecossistemas aquáticos.

A eutrofização artificial em corpos d'água proveniente de atividades antrópicas pode acarretar em alterações na ecologia dos sistemas aquáticos. O aumento da concentração de nitrogênio e fósforo são as principais causas desse processo, que podem levar ao desenvolvimento de algas e o crescimento desordenado de cianobactérias que podem conter cianotoxinas (THOMAZ; BINI, 1999; TUNDISI, 2003). De acordo com Richter e Netto (2005) a eutrofização gera aumento nos custos de tratamento da água de abastecimento público, pois todos os elementos utilizados na desinfestação da água terão que ser usados em maior quantidade, o que pode ocasionar em prejuízos à saúde humana.

Portanto, avaliar de forma integrada os diversos fatores que afetam os sistemas aquáticos permite conhecer os efeitos das contaminações provenientes de atividades antrópicas, de forma a contribuir para o controle de emissões dos diversos poluentes em sistemas lóticos urbanos e garantir a conservação e proteção dos recursos hídricos

(SUEHIRO; TEZUKA, 1981; GROLIÈRE et al., 1990; SPARAGANO; GROLIÈRE, 1991; MADONI, 1993; FERNANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1996; SOLA et al., 1996; MADONI; BASSANINI, 1999; MADONI, 2005; MADONI; BRAGHIROLI, 2007).

Em vista do exposto, estudos sobre a diversidade de protozoários ciliados em sistemas lóticos são necessários devido a seu enorme potencial para avaliação da qualidade da água, que permite conhecer as condições de poluição e possíveis alterações nos corpos hídricos (MADONI; GHETTI, 1981; WIACKOWSKI, 1981; CZAPIK, 1982; HUL, 1987; PRIMC, 1998; GROLIÈRE et al., 1990; SOLA et al., 1996; MADONI; BASSANINI, 1999; SOUZA; SPERLING, 1999; MADONI, 2005).

O presente estudo corrobora para a ampliação do conhecimento sobre a fauna de ciliados em águas continentais brasileiras. Entretanto, ainda é essencial aumentar o esforço amostral no intuito de ampliar os dados sobre a diversidade biológica de ciliados no Brasil, visto que tais estudos podem contribuir para programas de biomonitoramento que visem à conservação, preservação e recuperação de sistemas aquáticos. Além disso, por meio do conhecimento de sua diversidade, é possível conhecer as espécies existentes, o seu ciclo de vida e estabelecer as melhores condições e formas de cultivo, bem como espécies potenciais para serem utilizadas em testes ecotoxicológicos como organismo-teste.

### **3.2 Caracterização multidisciplinar de *Euplotes cf. affinis* (figs. 6-8, tab. 3)**

#### **Diagnose**

Euplotídeo de água doce, medindo *in vivo* 40-70 µm x 24-28 µm, corpo ovóide; zona adoral de membranela (ZAM) ocupando 2/3 do comprimento do corpo, contendo entre 20-30 membranelas; nove cirros fronto-ventrais (CFV) localizados na região anterior do corpo, cinco transversos (CT), dois cirros caudais (CC) e dois cirros marginais (CM) localizados na região posterior do corpo; macronúcleo é alongado e apresenta formato de três e micronúcleo arredondado posicionado na extremidade frontal do macronúcleo; vacúolo contrátil posicionado direita do corpo próximo aos cirros transversos; argiroma dorsal com padrão *double-patellae double-eurystomus* e ventral com polígonos largos; cinécias dorsais não observadas em detalhe.

#### **Caracterização morfológica e comparação com congêneres**

Corpo *in vivo* medindo 40-70 µm x 24-28 µm, formato ovóide com região anterior algumas vezes arredondada e região posterior classicamente arredondada. Corpo dorsoventralmente achatado, com razão comprimento largura 2:1. Abertura do infundíbulo

triangular ocupando 1/3 a 2/3 do corpo. Região dorsal contendo conspícuas cristas, observadas *in vivo* em microscópio com contraste interferencial diferencial. Citoplasma transparente e/ou ligeiramente esverdeado, com pequenos grânulos corticais (2 µm), bem com pequenos grânulos semelhantes a corpúsculos lipídicos (1-2 µm) e vários vacúolos alimentares na região equatorial do corpo (3-4 µm). Possui um vacúolo pulsátil (6-7 µm) posicionado sob cirros transversos. Locomoção rápida e rastejante comum em euplotídeos.

Zona adoral de membranela (ZAM) ocupando 2/3 do comprimento do corpo e contendo entre 20-30 membranelas. Membrana paraoral (7 µm) cotendo cinetossomos arrajandos de forma irregular, finalizando próxima à zona adoral de membranelas. Apresentam nove cirros fronto-ventrais (CFV) localizados na região anterior do corpo, cinco transversos (CT), dois cirros caudais (CC) e dois cirros marginais (CM) localizados na região posterior do corpo. Aparato nuclear composto por um macronúcleo alongado em formato de três, com inúmeros nucléolos esféricos observados em organismos impregnados pelo proteinato de prata e um micronúcleo arredondado posicionado em uma depressão na extremidade frontal/anterior do macronúcleo. O sistema de linhas de prata (argiroma), evidenciado pelo nitrato de prata, na região dorsal em alguns espécimes foi *double-patella* e outra parte dos espécimes impregnados *double-eurystomus*, já na região ventral observou-se polígonos largos.

A espécie *Euplotes affinis* foi originalmente descrita por Dujardin (1841) e estudada em detalhe por Curds (1974) e Foissner et al. (1992). No presente estudo foi caracterizada uma população com várias características semelhantes àquelas apresentadas por Curds (1974) e Foissner et al. (1992), entretanto, detalhes do argiroma dorsal, formato do corpo e posição de alguns cirros que compõem região ventral diferem ligeiramente das outras populações, assim sendo, utilizou-se cf. para ressaltar que são necessárias melhores evidências da morfologia de espécimes impregnados pela prata para correta identificação da população encontrada no ribeirão José Pereira (Figuras 6-7).

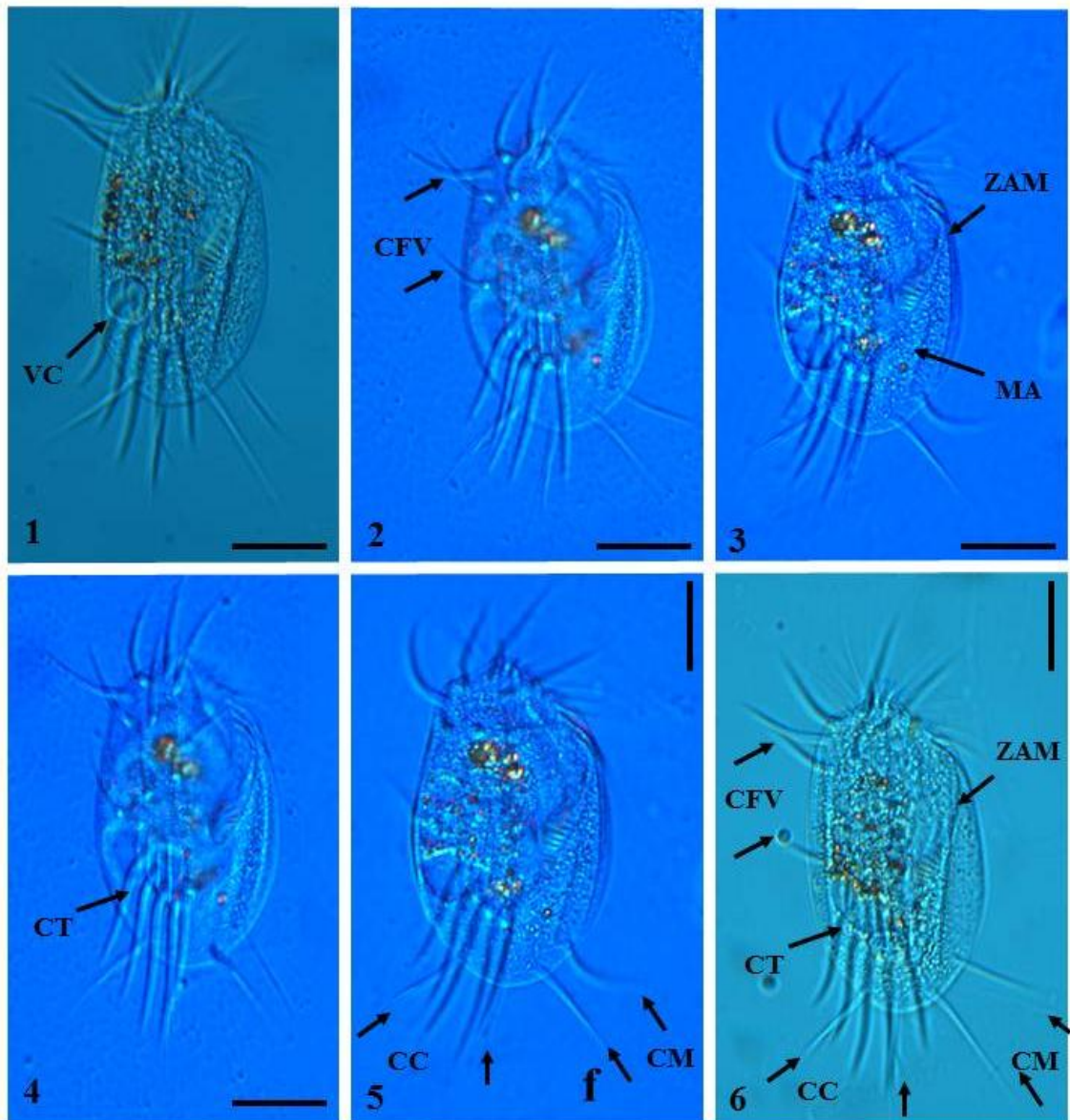
Segundo Tuffrau (1960), *E. affinis* possui grande semelhança morfológica com *Euplotes charon* Muller (1773), e que macronúcleo de *E. affinis* se assemelha com aquele das espécies *Euplotes harpa* Stein, 1959 e *Euplotes plumipes* (Stokes, 1884). Curds (1974) ressalta a grande similaridade entre *E. affinis* com *E. moebiusii*: 3-4 cirros caudais, macronúcleo em forma de três, dulcícolas com predileção para ambientes enriquecidos organicamente e semelhantes dimensões corporal. Entretanto o autor ressaltou diferenças que distinguem estas espécies: número de cirros fronto-ventrais, número de membranelas na zona adoral de membranela e argiroma dorsal. Na tabela 4 são apresentados dados comparativos entre *Euplotes affinis* e seus congêneres.



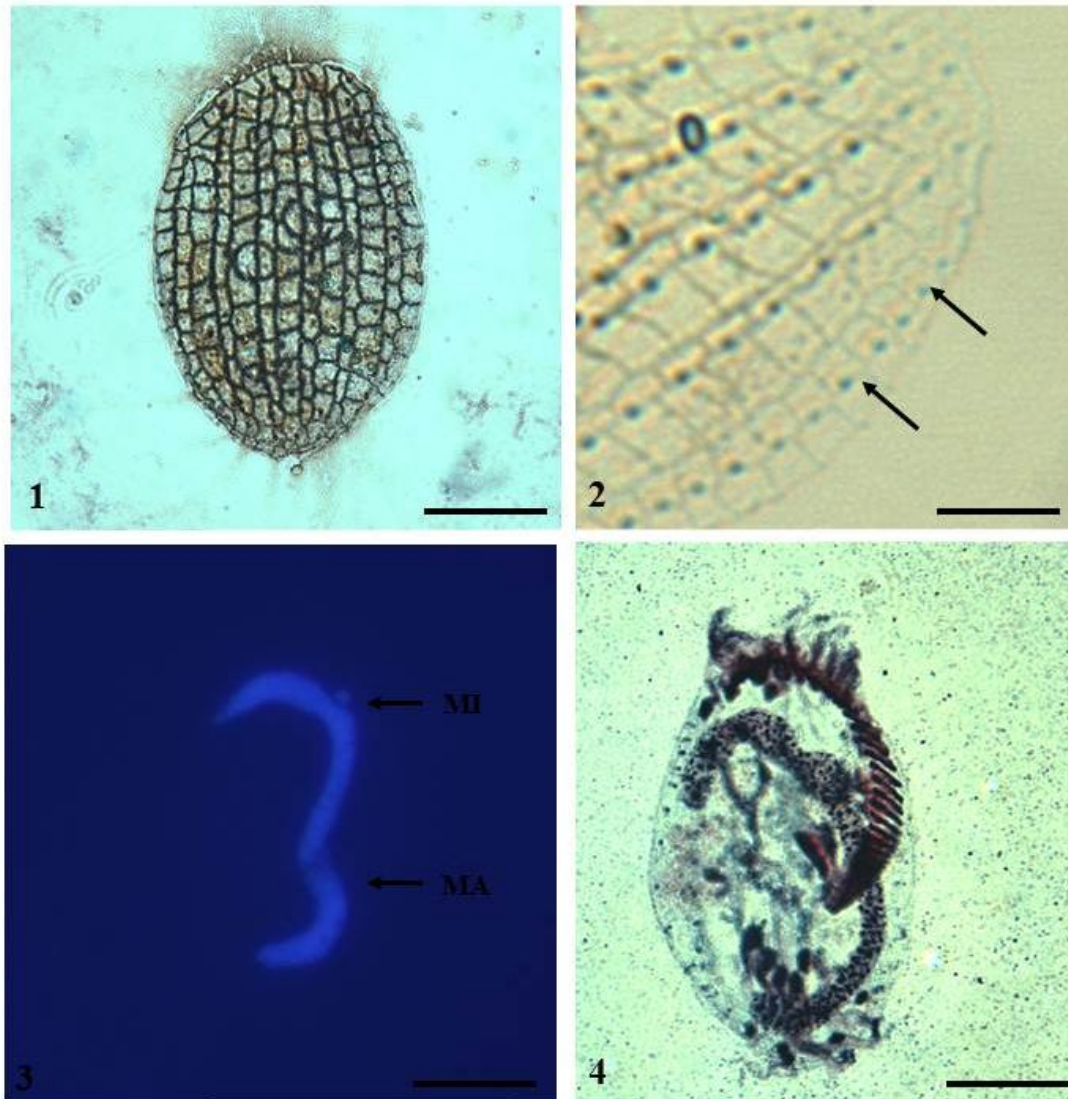
**Tabela 3** - Comparação entre *Euplotes affins* e seus congêneres.

Espécies	Ciliatura ventral	Segmentação dos FVC	Tipo	Sistema Silverline	Gênero	Habitat	Alimentação	Referências
<i>E. affinis</i>	9-5-2-2	3:3:3:2:1	<i>eurystomus/patella</i>	double	<i>Euplotopsis</i>	água doce	F	Kuhl, 1932; Tuffrau, 1960; Curds, 1974; Dujardin, 1841
<i>E. eurystomus</i>	9-5-2-2	3:3:3:2:2	<i>eurystomus</i>	double	<i>Euplotoides</i>	água doce	O	Bonner, 1954; Wise, 1965; Shimomura, 1967; Ruffolo 1976; Voss, 1989
<i>E. patella</i>	9-5-2-2	3:3:3:2:2	<i>eurystomus</i>	double	<i>Euplotoides</i>	água doce	O	Hammond, 1937; Hammond et al., 1937; Chatton et al., 1940; Voss, 1989
<i>E. charon</i>	10-5-2-(2-4)	3:3:3:3:2	<i>charon</i>	double	<i>Euplotes</i>	marinho	**	Wang et al., 1995; Bi et al., 2000; Chen et al., 2010
<i>E. moebiusi</i>	10-5-2-2	3:3:3:3:2	<i>charon</i>	múltiplo	<i>Euplotes</i>	euriálico	B, D, F	Klein, 1936, 1938, 1943
<i>E. plumipes</i>	9-5-2-2	3:3:3:2:2	<i>eurystomus</i>	double	<i>Euplotoides</i>	água doce	**	Hufnagel et al., 1967

**Nota:** considerando a sinonímia proposta por Curds (1975). *Legenda:* F=flagelados; O=onívoros; B=bactérias; D=diatomáceas (Foissner e Berger, 1996).



**Figura 5** - *Euplotes* cf. *affinis* *in vivo*, com destaque para vacúolo contrátil (1), cirros fronto-ventrais (2), zona adoral de membranela e macronúcleo (3), cirros transversos (4), cirros caudais e cirros marginais (5). Barras:20µm.



**Figura 6** - *Euplotes* cf. *affinis* impregnado pela prata a seco (1-2), DAPI (3) e protargol (4), evidenciando plasticidade do argioma dorsal (1-2) e aparato nuclear (3-4). Setas em (2) indicam cinetossomos das cinécia dorsal. Legenda: MA= macronúcleo, MI=micronúcleo. Barras:20µm.

*Euplotes affinis* foi redescrito por Curds (1975) com um euplotídeo medindo entre 38 µm x 26 µm, com nove cirros fronto-ventrais, cinco cirros transversos, 3-4 cirros caudais, 18-20 membranelas na zona adoral de membranela, macronúcleo em forma de 3, argioma dorsal do tipo *double-eurystomus*, entretanto, Foissner (1992) ampliou o estudo morfológico desta espécie descrevendo a morfologia de uma população presente em amostras de água doce na Áustria. O autor ressaltou que o argioma dorsal de muitos espécimes possui padrão *double-patellae* o que confere maior variabilidade em relação ao número de membranelas na zona adoral de membranela (18-30).

O gênero *Euplotes* possui em torno de 150 espécies, entretanto, apenas 70 são consideradas válidas (TUFFRAU et al., 2000; FOISSNER; AGATHA; BERGER, 2002; LOBBAN et al., 2005; BERGER 2006; DAI; XU; HE, 2013), o que ressalta grande polimorfismo apresentado por este grupo de ciliados. O aprimoramento das técnicas de impregnação ao longo dos últimos anos permitiu a descoberta e a redescritção de inúmeras espécies desse grupo (PAN et al., 2012; CHEN et al., 2014; JIANG et al., 2013). A taxonomia das espécies do gênero se baseia na forma e tamanho do corpo, organização e número de cirros ventrais, forma do macronúcleo, número de membranelas na zona adoral de membranelas e tipo de argiroma dorsal (TUFFRAU, 1960; CARTER, 1972; CURDS, 1975; FOISSNER et al., 1991).Entretanto, autores ressaltam que identificar um euplotídeo não é uma tarefa fácil visto a variação das características morfológicas e a insuficiência de descrições originais para o grupo (JONES; GATES, 1994), e apresentam como solução o cultivo em laboratório e estudos moleculares. Estudos moleculares tem se demonstrado bastante úteis no estudo dos ciliados, incluindo os euplotídeos (FOISSNER; CHAO; KATZ, 2008).

### **Caracterização molecular e posição filogenética**

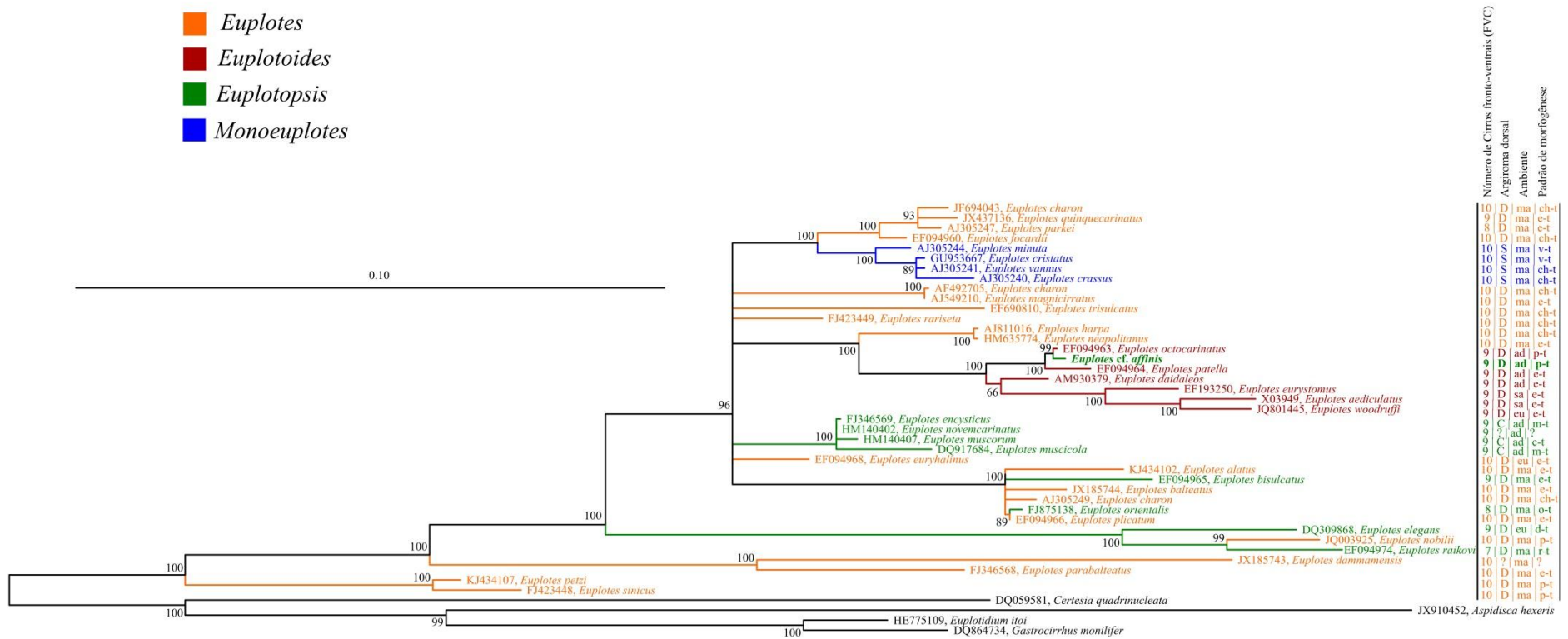
A sequência do gene SSU rRNA de *Euplotes* cf. *affinis* será depositada no GenBank (NCBI) e constitui a primeira informação molecular desta espécie. A sequência possui 1900pb (pares de base), sendo que o conteúdo de GC (guanina-citosina) representa 43% desse total. O presente estudo apresenta pela primeira vez a posição filogenética de *Euplotes affinis* (Figura 8).

Borror e Hill (1995) propuseram a reorganização da família Euplotidae dividindo o grupo em quatro gêneros: *Euplotes* Ehrenberg, 1830, *Euplotopsis*, *Euplotoides* e *Monoeuplotes* Jankowski, 1979, usando como características importantes: número de cirros fronto-ventrais, argiroma dorsal, presença de endossimbíotes, ambiente e presença de cristas dorsais. A proposta filogenética apresentada na figura 8 não recupera a clara separação do grupo em quatro gêneros, entretanto, os gêneros *Monoeuplotes* (em azul) e *Euplotoides* (em vermelho) parecem constituir grupos naturais, o que não aconteceu com representantes dos gêneros *Euplotopsis* e *Euplotes*. A hipótese filogenética sugere que *Euplotes* cf. *affinis*, designada como espécie-tipo do gênero *Euplotopsis*, provavelmente constitui uma espécie do gênero *Euplotoides*, o que pode ser corroborado pelo padrão de argiroma dorsal (*duble-eurystomus*). A proposta filogenética recuperada neste estudo ressalta a necessidade de investigar novas

características para separar grupos de euplotídeos, visto que número de cirros fronto-ventrais, hábitat, argiroma e padrão de morfogênese divisional paracem não refletir genuína divergência evolutiva em Euplotidae.

Gêneros:

- *Euplotes*
- *Euplotoides*
- *Euplotopsis*
- *Monoepulotes*



**Figura 7** - Árvore filogenética com base no gene 18S-rDNA, mostrando a posição de *Euplotes cf. affinis* com base na reconstrução por meio da máxima verossimilhança (ML). Números próximos nos ramos denotam ML valor de bootstrap. Números de acesso GenBank são dados para cada espécie.

Os gêneros *Monoeplothes* (10 FVC, argiroma single e marinhos) e *Euplotoides* (9 FVC, argiroma double-*eurystomus* e todos de água doce) foram recuperados na hipótese apresentada, entretanto, este estudo ressalta necessidade de investigar novas características para separação dos gêneros dentro da família Euplotidae. Dentre as espécies que possuem esse tipo de padrão no sistema *Silverline* estão: *Euplothes aediculatus*, *E. daidaleos*, *E. eurystomus*, *E. patella*, *E. woodruffi* e *E. plumipes* (HAMMOND, 1937; HAMMOND; KOFOID, 1937; CHATTON et al., 1940; BONNER, 1954; WISE, 1965; DILLER; KOUNARIS, 1966; HUFNAGEL; TORCH, 1967; SHIMOMURA, 1967; DILLER, 1974; RUFFOLO, 1976; WATANABE, 1982; VOSS, 1989; FLEURY, 1991a, b; PANG; WEI, 1999). A presente proposta sugere ainda nova combinação para espécie *Euplotoides affinis* n. comb.

## CAPÍTULO II

### INVESTIGAÇÃO DO USO POTENCIAL DE CILIADOS (PROTISTA, CILIOPHORA) EM ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS: CURVA DE CRESCIMENTO E EXPOSIÇÃO AGUDA

**RESUMO:** A comunidade de protozoários é considerada ótima bioindicadora de qualidade de água. Neste sentido, foram realizados ensaios preliminares de efeito agudo (24 h de exposição) com duas espécies de ciliados: *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 e *Paramecium bursaria* Ehrenberg, 1831, com intuito de investigar a potencialidade destas duas espécies atuarem como organismos-teste. Para tanto, inicialmente, estas espécies foram cultivadas em laboratório em meio Cerophyl e estabelecidas as devidas curvas de crescimento. Posteriormente, organismos adultos foram expostos a duas substâncias de referência: NaCl e NH<sub>4</sub>Cl. Os resultados demonstraram, por meio da construção da curva de crescimento, que ambas as espécies são facilmente cultiváveis em condições laboratoriais e apresentam quantidade suficiente de organismos em um curto período de tempo para ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos. Após exposição aguda a diferentes concentrações de NaCl e NH<sub>4</sub>Cl, *P. caudatum* se mostrou mais tolerante enquanto que *P. bursaria* é mais sensível às duas substâncias.

**Palavras-chave:** Ciliophora, concentração letal, *Paramecium*, substâncias de referência, sensibilidade.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados em diferentes escalas como consequência negativa de atividades antrópicas. A constante preocupação para esta questão tem requerido constante investimento em estudos para avaliar e manter a qualidade dos recursos hídricos (COELHO, 2006). A detecção dos impactos depende de estudos das comunidades biológicas, associada à evolução da diversidade de habitats e a mensuração de parâmetros abióticos (POMPEU; ALVES; CALLISTO, 2005; CASATTI et al., 2006).

Indicadores biológicos têm sido utilizados em programas de monitoramento da qualidade de água por um longo período de tempo, o que permite a mensuração dos efeitos antropogênicos nos ecossistemas aquáticos (CALLISTO; MORETI; GOULART, 2001; CAMARGO; ALONSO; DE LA PUENTE, 2004). Os poluentes presentes nos corpos d'água podem afetar os organismos vivos de duas formas: sendo tóxicos diretamente ou causando mudanças adversas no habitat (SMITH, 1986). Os organismos em um ecossistema apresentam diferentes níveis de tolerância aos efeitos dos poluentes tóxicos que estão condicionados ao grau de exposição de cada organismo, à sua susceptibilidade aos agentes tóxicos, ao ciclo de vida, entre outras causas (ALLOWAY, 1993;



BRITISH, 1991).

Estudos ecotoxicológicos são realizados para se avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos adversos nos organismos vivos. Sendo assim, a avaliação da toxicidade de vários compostos pode ser feita por meio dos organismos-teste, que são usados como modelos das respostas de outros seres vivos a esses compostos, devido à relação trófica existente (ZAGATTO, 2006). No Brasil, a primeira iniciativa de utilização de métodos ecotoxicológicos se deu em 1975 por meio de um programa que visava padronizar testes de toxicidade aguda em peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das águas da CETESB, e no ano 2000, fundou-se a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O conhecimento da biologia e fisiologia de espécies que podem ser utilizadas em testes ecotoxicológicos é essencial para a padronização de protocolos, que contribuirão para a mensuração dos impactos ambientais em ecossistemas aquáticos (ANDRADE, 2003; SARMA et al., 2005; BIANCHI et al., 2010).

Os protozoários ciliados são numerosos em ambientes aquáticos e em todos os tipos de sistemas de tratamento biológico de água e esgoto (MADONI; DAVOLI; CHIERICI, 1993; MADONI et al., 1996; AMANN et al., 1998). O estudo da sensibilidade destes organismos a um grande número de substâncias tóxicas pode fornecer um padrão de medida para identificar a intensidade e o potencial de danos ecológicos causados por descargas antropogênicas de poluentes nas águas de superfície (MADONI; ROMEO, 2006). Conhecer a diversidade e a estrutura funcional destas comunidades permite avaliar os efeitos que as atividades antrópicas possuem sobre o ecossistema, a heterogeneidade das espécies e o equilíbrio da dinâmica da cadeia alimentar. Neste contexto, os experimentos com ciliados tornam-se uma ferramenta valiosa para se inferir sobre os possíveis distúrbios provocados por ações antropogênicas nos ecossistemas aquáticos (FERANDEZ-LEBORANS; NOVILLO, 1995). Na presente proposta foram isoladas duas espécies de ciliados do gênero *Paramecium* encontradas no ribeirão José Pereira que se mantiveram em meios de cultivo específicos para construção de suas respectivas curvas de crescimento e realização de ensaios preliminares de exposição aguda.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Curvas de crescimento**

Para realização da curva de crescimento as espécies *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 e *Paramecium bursaria* Ehrenberg, 1831 foram mantidas em placas de polipropileno de 24 poços contendo 0,75 mL de meio Cerophyl (SONNEBORN, 1957) (detalhes no anexo D). Cinco ciliados de cada espécie foram isolados do meio de cultivo, usando micropipetas fabricadas no laboratório, e

inseridos em cada poço, sendo utilizadas cinco repetições para cada espécie de ciliado. As amostras foram mantidas em câmara incubadora BOD a 27°C.

O crescimento dos organismos foi acompanhado em intervalo de 24 h durante o período de cinco dias. Em cada intervalo de 24 h, ciliados de um poço foram fixados em Bouin aquoso para posterior quantificação em uma câmara de Sedgewick-Rafter (VELHO et al., 2013). Para a construção da curva de crescimento foram realizados cálculos de média aritmética do número de organismos encontrados diariamente e o devido desvio padrão.

## 2.2 Ensaios ecotoxicológicos

As espécies *Paramecium caudatum* e *P. bursaria* foram aquelas que melhor se mantiveram no meio de cultura Cerophyl e, portanto, foram selecionadas para realização dos testes. A literatura utiliza água mineral para cultivar os organismos que serão posteriormente utilizados nos testes, porém, esta não se demonstrou satisfatório para obtenção de grande quantidade de organismos, já o meio Cerophyl (SONNEBORN, 1957), utilizado em cultivos de organismos que se alimentam de bactérias, foi eficiente para obtenção de grande quantidade das espécies (*P. caudatum* e *P. bursaria*).

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados com as substâncias de referência NaCl nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 mg L<sup>-1</sup> e NH<sub>4</sub>Cl a 10, 25, 50, 100 e 250 mg L<sup>-1</sup>, além do tratamento controle, sendo estas escolhidas com base na literatura. Foram feitas cinco repetições para cada concentração utilizada.

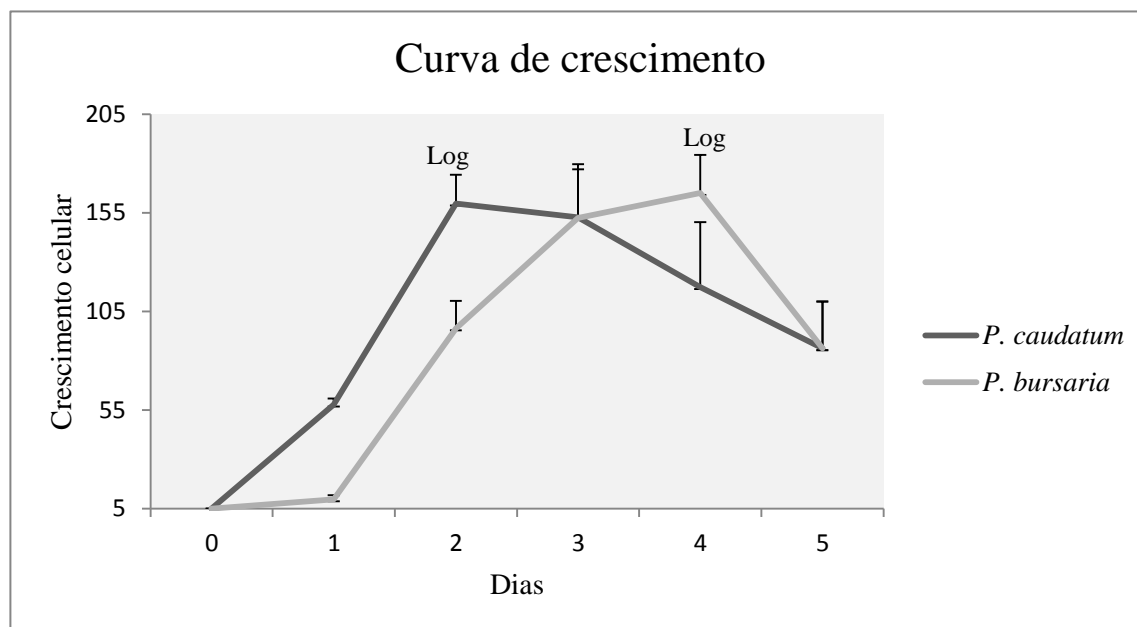
Os testes foram realizados em placas polipropileno de 24 poços contendo 180µL do meio de cultura Cerophyl sem bactéria e 20µL da solução a ser testada de acordo com a concentração final desejada. Foram inseridos dez protozoários ciliados, sendo estes transferidos para as placas com auxílio de micropipetas de vidro confeccionadas em laboratório.

As placas foram mantidas em incubadora BOD com fotoperíodo 12/12 h à 25°C, e os organismos não foram alimentados durante os testes. Os valores de mortalidade foram obtidos após exposição aguda (24 h). Os organismos imóveis ou não observados em cada poço foram considerados mortos. Para obtenção da CL50% (concentração letal a 50% da população) utilizou-se o método Probit (BLISS, 1934a, 1934b e 1935) onde o valor de P- igual a zero com um intervalo de confiança de 95%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Curvas de crescimento

Na figura 1 estão apresentadas as curvas de crescimento das espécies *Paramecium caudatum* e *P. bursaria* mantidas em meio Cerophyl por cinco dias consecutivos.



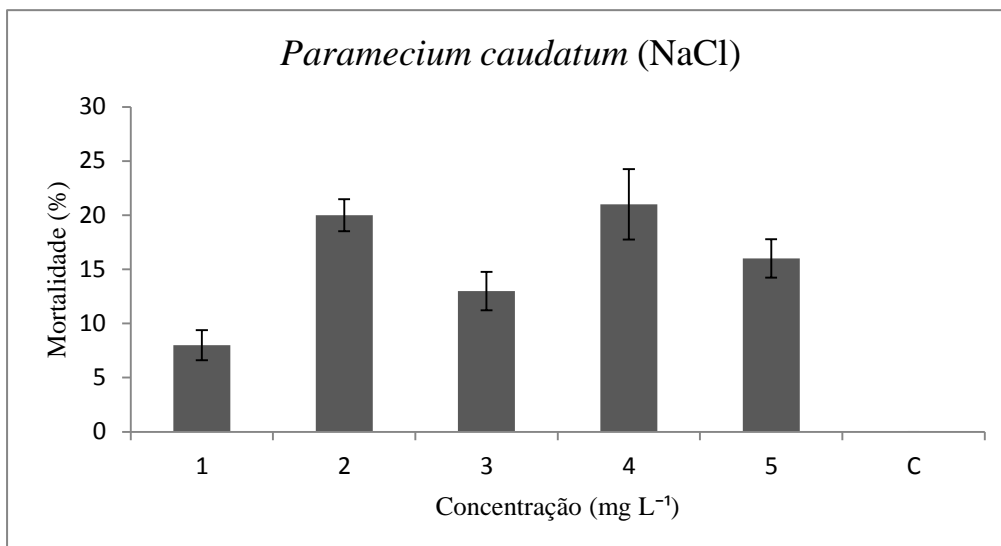
**Figura 1** - Curva de crescimento médio de *Paramecium caudatum* e *Paramecium. bursaria* cultivados em meio Cerophyl (SONNEBORN, 1957) a 27°C.

As curvas apresentadas para as duas espécies ressaltam que em *Paramecium caudatum* são necessários cerca de dois dias para triplicar a quantidade de ciliados, enquanto em *P. bursaria* são necessários cerca de quase três dias. Os resultados ressaltam que ambas as espécies se multiplicam em quantidades suficientes para uso nos ensaios ecotoxicológicos, visto à necessidade de grande número de organismos utilizado nestes ensaios, com melhor desempenho para *P. caudatum*.

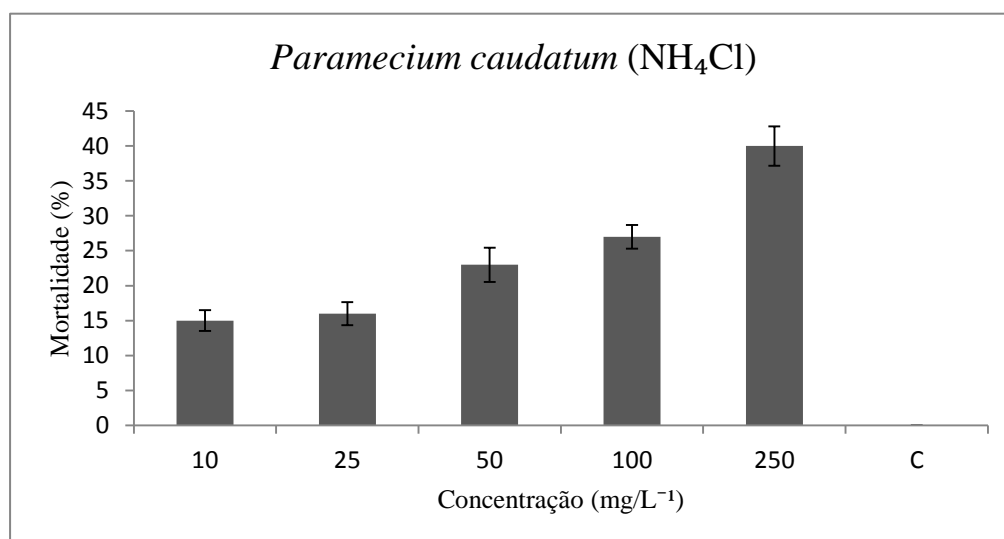
A fase log é considerada o momento em que os organismos crescem em velocidade máxima diante da disponibilidade de alimento e de condições adequadas para a sobrevivência. Segundo Tortora et al. (2000) a fase log é caracterizada pelo início do processo de divisão, período de crescimento logarítmico, isto é, momento em que a reprodução celular se encontra extremamente ativa e sensível às mudanças ambientais. Estudos recentes usando *Paramecium caudatum*, Alves (2010) e Miranda e Martins (2013) demonstraram a importância de se estabelecer as melhores formas de cultivo em laboratório com intuito de se obter maior quantidade destes organismos em um curto período de tempo e conhecer a fase ideal do crescimento para posterior utilização em testes ecotoxicológicos.

### 3.2 Ensaios ecotoxicológicos

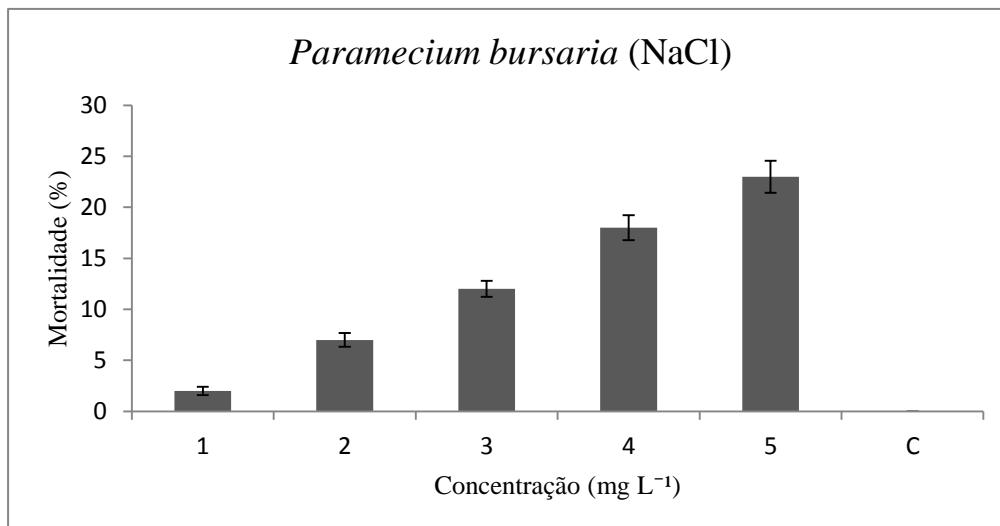
Os resultados da mortalidade das espécies *P. caudatum* e *P.bursaria* após exposição aguda a NaCl e NH<sub>4</sub>Cl estão representados nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Os dados ressaltam que a espécie *P. caudatum* é mais tolerante e *P. bursaria* mais sensível a exposição de NaCl (figuras 2 e 4) e NH<sub>4</sub>Cl (figuras 3 e 5).



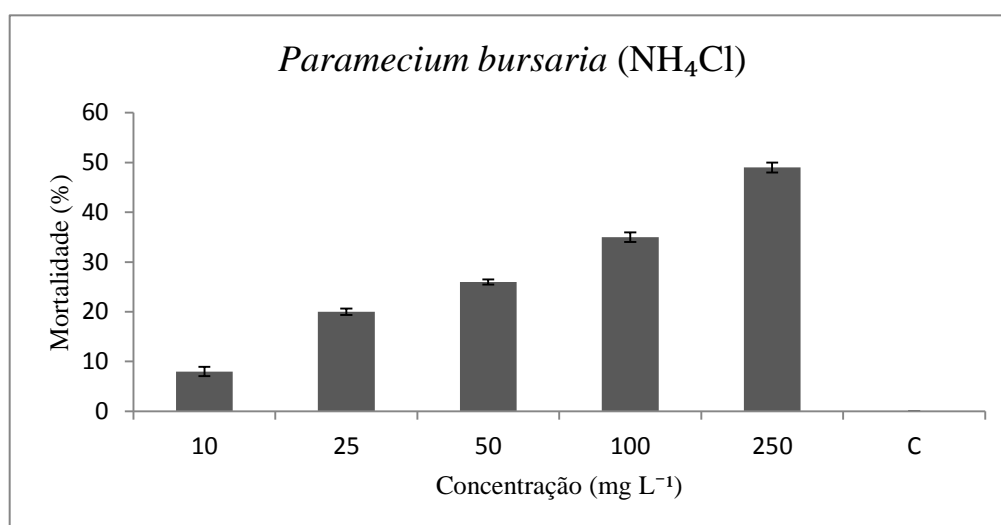
**Figura 2** - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium.caudatum* após exposição aguda (24 h) ao NaCl. DP=desvio padrão.



**Figura 3** - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium.caudatum* após exposição aguda (24h) de NH<sub>4</sub>Cl. DP=desvio padrão.



**Figura 4** - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium bursaria* após exposição aguda(24 h) NaCl. DP=desvio padrão.



**Figura 5** - Valores médios (DP) de mortalidade para *Paramecium.bursaria* após exposição aguda (24 h) ao NH<sub>4</sub>Cl. DP=desvio padrão.

Os valores da CL50 encontrados para as espécies de ciliados *P.caudatum* e *P.bursaria* estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Concentração letal encontrada a partir do método de Probit (BLISS, 1934a, 1934b e 1935).

Espécies	NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> Cl (mg L <sup>-1</sup> )
<i>P. caudatum</i>	216	866
<i>P. bursaria</i>	52	254

Os dados preliminares de CL50 obtidos neste estudo ressaltam a necessidade de se ampliar testes usando concentrações acima dos valores de CL50 encontrados e expor estas duas potenciais espécies em mais ensaios ecotoxicológicos com outras substâncias ainda não testadas. Embora *P. caudatum* e *P. bursaria* já tenham sido utilizados em testes de toxicidade (MADONI, 2000;RAO; HUSSAIN, 2010; MANSANO et al., 2016) os resultados deste estudo usando, meio de cultivo mais eficiente, ressaltam grande potencial de uso deste meio para testes com outras espécies de ciliados bacterívoros.

Estudos ressaltam a sensibilidade e potencial da espécie *Paramecium bursaria* como indicadora de qualidade ambiental em ensaios ecotoxicológicos (MADONI, 2000; XU et al., 2005; WANICK et al., 2008). Em estudo expondo *P. bursaria* a diferentes concentrações de níquel, Madoni (2000) ressaltou a grande sensibilidade desta espécie bem como seu potencial como bioindicadora. Xu et al. (2005), avaliando tolerância à amônia e nitritos de algumas espécies ciliados de água doce, destacaram elevada sensibilidade de *P. bursaria*. O valor de CL50 encontrado para amônia neste estudo para *P. bursaria* foi de 72,86 mg L<sup>-1</sup> após um período de 12 h de exposição. Os autores explicaram, ainda, que ciliados predadores de bactérias desempenham um importante papel na manutenção da qualidade da água em ambientes aquáticos onde há elevado nível de amônio, tal como ocorre em estações de tratamento de esgoto. Wanick et al. (2008) determinaram o efeito agudo de *P. bursaria* frente à exposição em diferentes concentrações de cádmio destacando elevado potencial desta espécie como organismo-teste.

A espécie *Paramecium caudatum* também tem sido alvo de diversos estudos sobre ciclo de vida e ensaios ecotoxicológicos (MADONI; ESTEBAN; GORBI, 1992; RAO; HUSSAIN, 2010; MIRANDA; MARTINS, 2013; MANSANO et al., 2016) visto sua ampla distribuição geográfica em ambientes dulcícolas e facilidade de cultivo, sendo organismos modelos usados em diversas pesquisas. Dos estudos que utilizaram *P. caudatum* em testes ecotoxicológicos destaca-se o trabalho realizado por Madoni, Esteban e Gorbi (1992), em que *P. caudatum* demonstrou ser a espécie mais tolerante às diferentes concentrações de zinco dentre sete espécies de ciliados coletadas em estações de tratamento de esgoto expostas ao metal. Rao e Hussain (2010) observaram deformidades (inchaço, deformação no vacúolo contrátil, escurecimento de citoplasma) na espécie *P. caudatum* quando exposta a diferentes concentrações de um pesticida (monocrotófos). Miranda e Martins (2013), após padronização do cultivo e realização da curva de crescimento de *P. caudatum*, expuseram esta espécie a diferentes concentrações de dezessete metais de íons cloreto e nitrato de prata e verificaram grande sensibilidade deste ciliado aos metais testados e uma maior tolerância ao lítio. Os autores sugerem que novos estudos são necessários a fim de se estabelecerem com maior precisão, as faixas de mortalidade e tolerância desta espécie. Mansano et al. (2016) avaliaram os efeitos tóxicos de dois herbicidas (formas pura e comercial) sobre ciliados da espécie *P. caudatum*.

Os testes indicaram que a toxicidade da fórmula comercial foi mais tóxica do que a sua forma pura, e autores recomendaram inclusão destes micro-organismos em futuros estudos ecotoxicológicos.

As substâncias de referência mais usadas em estudos com ciliados são NaCl e KCl, visto que garantem a qualidade analítica dos efeitos agudos e determinam confiabilidade dos testes (BOHRER, 1995; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). De acordo com Knie e Lopes (2004) o cloreto de sódio é uma substância quimicamente estável na água e atua nos mecanismos de osmorregulação. Em concentrações elevadas, mesmo não sendo considerada uma substância potencialmente tóxica, pode causar problemas na osmorregulação, tornando as espécies que realizam este mecanismo mais vulneráveis, podendo assim, prejudicar a sua reprodução e sobrevivência (UTZ, 1994). Os testes com NaCl demonstraram que *P. bursaria* é mais sensível que *P. caudatum*, entretanto, dados apresentados neste estudo para *P. caudatum* ressaltam necessidade de novos testes com maior número de réplicas para melhor acurácia dos testes futuros com outras substâncias usando esta população de *P. caudatum*.

A maioria dos estudos presentes na literatura que informam os efeitos da amônia em organismos aquáticos utilizam peixes (ARTHUR et al., 1987; CONNON et al., 2011; CAMPOS et al., 2012; BALDISSEROTTO et al., 2014; SCHRAM et al., 2014), crustáceos (CHINNI; KHAN; SARMA; MANGAS-RAMÍREZ, NANDINI, 2003; DUTRA et al., 2016), moluscos, insetos (ZHEN; LEUNG, 2015) para realização de testes ecotoxicológicos. Os estudos que avaliam a toxicidade da amônia sobre a comunidade de protozoários ciliados são escassos, o que leva a necessidade da realização de testes, visto que a presença da amônia nos ambientes aquáticos é evidente. A amônia é considerada um dos poluentes mais importantes presentes nos ambientes aquáticos provenientes de fontes naturais, decomposição de material orgânico, excreções animais e fontes antropogênicas, resultante de poluição industrial, efluentes doméstico, urbano e sedimento contaminado (THURSTON; RUSSO, 1986; MARTIN; FEDERICO, 2001; ABEL, 2000; SPENCER et al., 2008). As concentrações variam de acordo com a temperatura e o pH da água, podendo elevar os valores da forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) e diminuir a forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ), sendo ambas as formas tóxicas para os organismos nos ambientes aquáticos (CAMARGO; ALONSO, 2006). Estudos comprovam que a forma não ionizada é mais tóxica para os organismos aquáticos devido a sua capacidade de difundir através da membrana celular, causando danos no epitélio branquial de peixes, prejudicando trocas gasosas, alterando mecanismos osmorregulatórios de crustáceos e pode até mesmo ser letal para outros invertebrados menores (PASSEL; DAHM; BEDRICK, 2007; IP; CHEW, 2010; CHEN et al., 2011; KLIMEK et al., 2012; ROMANO; DUTRA et al., 2016). As alterações causadas aos organismos aquáticos pela exposição à amônia pode indicar o nível desse estresse no ambiente aquático (SMITH; TILMAN; NEKOLA, 1999; ISRAELI-WEINSTEIN; KIMMEL, 1998).

Puigragut et al. (2005) realizaram testes de toxicidade sobre efeitos do nitrogênio amoniacal sobre a microfauna presente em estações de tratamento de esgoto por lodo ativado. O estudo demonstrou que a capacidade de resistência dos ciliados à toxicidade do nitrogênio amoniacal deve ser reavaliada para que o monitoramento em sistemas de tratamento de esgoto seja mais eficiente, visto que algumas espécies são sensíveis às concentrações de nitrogênio amoniacal geralmente em excesso nestes sistemas de tratamento. Klimek et al. (2012) utilizaram duas espécies de protozoários ciliados *Stentor coeruleus* e *Coleps hirtus* isolados a partir de estações de tratamento de águas residuais de lodo ativados em testes ecotoxicológicos utilizando nitrogênio amoniacal. Os valores de CL50 encontrados para as espécies *Stentor coeruleus* e *Coleps hirtus* foram 43,03 mg L<sup>-1</sup> e 441,12 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. O estudo demonstrou que o ciliado *Stentor coeruleus* foi mais sensível à exposição, considerado um ótimo bioindicador de qualidade de água.

O presente estudo mostra elevada sensibilidade das duas espécies ciliados (*P. caudatum* e *P. bursaria*) a níveis de NH<sub>4</sub>Cl e ressalta necessidade de trabalhos futuros detalhados sobre efeito da amônia sobre outras espécies de protozoários ciliados, espécies estas com importância na eficiência de estações de tratamento de esgoto, tal como *P. caudatum*, bem como no controle das populações bacterianas em diversos sistemas naturais.

A liberação da amônia no ambiente aquático é controlada por meio de normas e critérios pré-estabelecidos no intuito de proteger e conservar o ambiente e os organismos nele presentes. Em governos como o da Nova Zelândia e Austrália o controle é realizado por meio do conjunto da qualidade da água (WQG) onde o valor permitido é de 30mg/L de nitrogênio amoniacal total em pH 8,0, o que garante a proteção de 95% das espécies (ANZECC; ARMCANZ, 2000). No Brasil este controle é feito por meio da Resolução CONAMA 357/2005, sendo que o valor de nitrogênio amoniacal total permitido em parâmetros inorgânicos na água doce varia de acordo com o valor do pH: 13,3 mg L<sup>-1</sup> N (pH ≤ 7,5), 5,6 mg L<sup>-1</sup> N (7,5 < pH ≤ 8,0), 2,2 mg L<sup>-1</sup> N (8,0 < pH ≤ 8,5); 1,0 mg L<sup>-1</sup> N (pH > 8,5). A complexidade dos compostos presentes nos ambientes aquáticos e a interação dos mesmos induzem a necessidade de se caracterizar os efeitos biológicos através de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas, o que permite a avaliação do risco ambiental de maneira mais eficiente (BERTOLETTI, 1990; PINHEIRO, 2010).

O uso de protozoários ciliados como organismos-teste em programas de biomonitoramento demonstra o grande potencial desses organismos para avaliação da qualidade da água (FOISSNER; BERGER, 1996; MADONI; ROMEO, 2006; MADONI, 2000; MANSANO et al., 2016). Sua importância na cadeia trófica, o fácil cultivo e manutenção em laboratório, a estabilidade genética, a ampla distribuição geográfica, o seu curto ciclo de vida permitem a detecção de impactos em curta escala de tempo, a capacidade de responder a alterações no perfil químico, a sensibilidade a dosagens muito pequenas de contaminantes caracterizam estes micro-organismos como



organismos-teste e os classificam como bioindicadores de qualidade de água (SPARAGANO; GOILIÈRE, 1991; PICCINNI; GUTIÉRREZ, 1995). No anexo A estão listadas as espécies de protozoários ciliados já utilizadas em testes ecotoxicológicos.

Visto à necessidade de aumentar os estudos que avaliem os efeitos de substâncias encontradas nos ecossistemas aquáticos sobre a comunidade de protozoários ciliados, o presente estudo contribui para ampliação do conhecimento das espécies de protozoários ciliados potenciais que podem ser utilizados como organismo-teste, bem como seu ciclo de vida, cultivo de espécies em laboratório e as faixas de mortalidade em testes preliminares de toxicidade, a fim de estabelecerem critérios para mensuração de danos causados pelos impactos gerados nos sistemas aquáticos.

### **Considerações finais:**

As perturbações que afetam os ecossistemas aquáticos provenientes das atividades poluidoras (despejos industriais e domésticos, acidentes e crimes ambientais) são consideradas problemas mundiais que merecem a atenção de programas de conservação. Avaliar a qualidade da água exige estudos que permitam identificar e mensurar os efeitos causados pelas alterações antrópicas no intuito de proteger os sistemas aquáticos e as comunidades biológicas, além do que, a proteção dos sistemas aquáticos afetam o desenvolvimento e a economia do país. Os protozoários ciliados dispõem de características que os classificam como ótimos bioindicadores de qualidade de água e são capazes de refletir os efeitos causados pelas atividades poluidoras que afeta os ecossistemas aquáticos.

A ecotoxicologia é uma ferramenta valiosa para avaliar a qualidade da água e mensurar os efeitos das atividades poluidoras sobre os ecossistemas aquáticos e pode fornecer padrões de medida para identificação da intensidade e do potencial dos danos causados pelos poluentes. Diante do exposto, o presente estudo confirma que as espécies de ciliados *P.bursaria* e *P. caudatum* são considerados ótimos indicadores de qualidade de água e elucida a necessidade de se aumentar o esforço amostral quanto ao conhecimento da diversidade biológica de protozoários ciliados em sistemas lóticos brasileiros. Além disso, demonstra a necessidade de aperfeiçoamento dos estudos que forneçam informações mais completas sobre os ciliados utilizados como organismos-teste, tais como as melhores condições e formas de cultivo em laboratório e construção da curva de crescimento para posterior uso em testes ecotoxicológicos. Em uma perspectiva futura, aprimorar e refinar os testes ecotoxicológicos utilizando protozoários ciliados de forma a se conhecer com maior precisão as faixas de mortalidade (CL50) permitirá a padronização de protocolos que servirão de ferramenta para mensuração dos danos causados nos ecossistemas aquáticos, contribuindo para

programas de monitoramento que visem à recuperação, conservação e proteção dos ecossistemas aquáticos.

## APÊNDICE A

Lista de protozoários ciliados utilizados em testes ecotoxicológicos:

<b>Protistas ciliados</b>	<b>Referências</b>
<i>Aspidisca cicada</i>	[3];[5]
<i>Aspidisca lynceus</i>	[5]
<i>Blepharisma americanum</i>	[3]
<i>Carchesium</i> sp.	[5]
<i>Coleps hirtus</i>	[14]
<i>Chilodonella uncinata</i>	[5]
<i>Colpidium campylum</i>	[3]
<i>Colpodium colpoda</i>	[6];[7]
<i>Dexiostoma campylum</i>	[6]
<i>Dexiotricha granulosa</i>	[7]
<i>Drepanomonas revoluta</i>	[5];[9]
<i>Epistylis</i> sp.	[5]
<i>Euplotes</i> sp.	[5]
<i>Euplotes aediculatus</i>	[7]
<i>Euplotes affinis</i>	[3]
<i>Euplotes crassus</i>	[16]
<i>Euplotes patella</i>	[3]
<i>Euplotes vannus</i>	[8];[16]
<i>Glaucoma scintillans</i>	[6]
<i>Halteria grandinella</i>	[7]
<i>Loxodes striatus</i>	[6]
<i>Opercularia coarctata</i>	[5]
<i>Opercularia minima</i>	[5]
<i>Oxytricha fallax</i>	[13]
<i>Paramecium bursaria</i>	[6];[12]
<i>Paramecium caudatum</i>	[3];[6];[10];[11];[13];[15]
<i>Paramecium putrinum</i>	[6]
<i>Podophrya</i> sp.	[5]
<i>Spirostomum teres</i>	[3];[4];[6]
<i>Stentor coeruleus</i>	[14]
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	[2]
<i>Tokophrya quadripartita</i>	[5]
<i>Trochilia minuta</i>	[5]
<i>Uronema marinum</i>	[1]
<i>Uronema nigricans</i>	[3];[9]
<i>Vorticella convallaria</i>	[5]
<i>Vorticella octava</i>	[5]

## Referências

- A. PARKER, J.G. Toxic effects of heavy metals upon cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Uronematidae). **Marine biology**, Alemanha, v.54, p.17-24. 1979.
- B. YOSHIOKA, Y; OSE, Y; SATO, T. Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam -- Printed in The Netherlands. **The science of the Total Environment**, Países baixos, v.43, p.149-157.1985.
- C. MADONI, P; ESTEBAN, G; GORBI, G. Acute Toxicity of Cadmium, Copper, Mercury, and Zinc to Ciliates from Activated Sludge Plants. **Environmental Contamination and Toxicology**, Estados Unidos da América, v.99, p.900-905. 1992.
- D. TWAGILIMANA, L; BOHATIER, J; GROLIERE, C.A; BONNEMOY, F; SARGOS, D. New Low-Cost Microbiotest with the Protozoan *Spirostomum teres*: Culture Conditions and Assessment of Sensitivity of the Ciliate to 14 Pure Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Estados Unidos da América, v.41, p.231-244. 1998.
- E. MADONI, P; DAVOLI, D; GORBI, G; VESCOVI, L. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. **Water Research**, Reino Unido, v.30, n.1, p.135-141.1996.
- F. MADONI, P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. **Environmental Pollution**, Londres, v.109, n.1, p.53-59. 2000.
- G. MADONI, P; ROMEO, M. G.; Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental Pollution**, Londres, v.141, n.1, p.1-7. 2006.
- H. HENGLONG XU; SONG, W; WARREN; WARREN, A. An investigation of the tolerance to ammonia of the marine ciliate *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). **Hydrobiologia**, Irlanda, v.519, p.189-195. 2004.
- I. MARTÍN-GONZÁLEZ, A; DÍAZ, S; BORNIQUEL, S; GALLEGO, A; GUTIÉRREZ, J.C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology**, Países baixos, v.157, p. 108-118. 2006.
- J. RAO, J.V; SRIKANTH, K; AREPALLI, S.K; GUNDA, V.G. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Estados Unidos da América, v.86, p.131-137.2006.
- K. ALVES, H.C. **Estudo biológico de linhagens do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 e avaliação experimental do efeito tóxico do agrotóxico Fipronil**. 85p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade de São Carlos, São Paulo. 2010.
- L. WANICK, R.C; PAIVA, T.S; DE CARVALHO, C.N; SILVA-NETO, I.D. Acute Toxicity of Cadmium to Freshwater Ciliate *Paramecium bursaria*. **Biociências**, Porto Alegre, v.16, n.2, p.104-109. 2008.
- M. AMANCHI, R.N; HUSSAIN, M.M. Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. **Journal of Environmental Biology**.v.31, n.5, p.603-607. 2010.

**N. KLIMEK, B; FYDA, J; PAJDAK-STO, A; KOCERBA, W; FIALKOWSKA, E; SOBCZYK, M.** Toxicity of Ammonia Nitrogen to Ciliated Protozoa *Stentor coeruleus* and *Coleps hirtus* Isolated from Activated Sludge of Wastewater Treatment Plants. **Bull Environmental Contamination and Toxicology**, Estados Unidos da América, v.89, p.975-977. 2012.

**O. MIRANDA, M.M.P; MARTINS, N.F.** Avaliação experimental do efeito tóxico de metais em *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833. **Revista Verde**, Rio Grande do Norte, v.8, n.3, p.247-262. 2013.

**P. BITENCOURT, J.A.P.** **Avaliação da sensibilidade de *Euplotes vannus* e *Euplotes crassus* a metais pesados e atividade de biorremediação de consórcios bacterianos.** 87p. Tese de doutorado (Pós-graduação em Biologia Marinha) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 2014.

## Referências

- ABEL, P. D. 'TBT-towards a better way to regulate pollutants', **The Science of the Total Environment**, Países Baixos, v.258, p.1-4. 2000.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: água – ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* spp. Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2016.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: toxicidade crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustácea, Cladóceras), Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: ecotoxicologia aquática – método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR15088**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.
- ADL, S.M; SIMPSON, A.G; LANE, C.E; LUKES, J; BASSE, D; BOWSER, S.S; BROWN, M; BURK, F; DUNTHORN, M; HAMPL, V; HEISS, A; HOPPENRATH, M; LARA, E; IEGALL, L; LYNN, D.H; MC MANUSO, H; MITCHELL, E; MOZLEY-STANRIDGE, S; PARFREY, L.W; PAWLOWSKI, J; RUECKERT, S; SHADWICK, L; SCHOCH, C; SMIRNOV, A; SPIEGEL, F.W. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Nova Jersey (EUA), v.59,n.5, p. 429-514.2012. 2012.
- AGATHA, S; WILBERT, N; SPINDLER, M; ELBRÄCHTER, M. Euplotidae ciliates in sea ice of the Weddell Sea (Antarctica). **Acta Protozoologica**, Polônia, v.29, p.221- 228. 1990.
- ALVES, H.C. **Estudo biológico de linhagens do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 e avaliação experimental do efeito tóxico do agrotóxico Fipronil**. 85p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo. 2010.
- ALLOWAY, B. J; HARRISON, R. M. **Understanding our environment (3 nd edition) Royal Society of Chemistry**.Cambridge; Chaper 5, p.335-400. 1993.
- AMANCHI, R.N; HUSSAIN, M.M. Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. **Journal of Environmental Biology**.v.31, n.5, p. 603-607. 2010.
- AMANN, R; LEMMER, H; WAGNER, M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: A comparison of old and new techniques. **FEMS Microbial Ecology**, Reino Unido, v.25, n.3, p.205-215. 1998.
- ANDRADE, A.M.S. **Estudos sobre a biologia de *Macrothrix elegans* Sars 1901(Crustacea: Amonopoda) e uma avaliação sobre sua sensibilidade ao dicromato de potássio**. 49p. Monografia. (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal da Bahia, Salvador.2003.
- ANZECC; ARMCANZ. **Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality**.Australian and New Zealand Environment and Conservation Council (ANZECC). 2000.
- ARANTES, JR, J. D; RIETZLER, A. C; ROCHA, O; REGALI-SELEGHIM, M. H. R. Caracterização das populações de protozoários (Ciliophora e Rhizopoda) no Reservatório de Salto Grande, Americana, SP. In: SPÍNDOLA, E. L., LEITE, M. A., DORNFELD, C. B. (Org). **Ecologia do Reservatório de Salto Grande Americana SP**. São Carlos, p.155-177. 2004.

ARTHUR, J.W; WEST, C.W; ALLEN, K.N; HEDTKE, S.F. Seasonal Toxicity of Ammonia to Five Fish and Nine Invertebrate Species. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, Estados Unidos da América, v.38, p.324-331. 1987.

ARAÚJO, M. F. F; LOBATO JÚNIOR, W. S. Percepção sobre protozoários no ensino fundamental: um diagnóstico em escolas de uma região litorânea do Nordeste brasileiro. **Acta Scientiae**, Brasil, v.15, n.2, p.339-347. 2013.

AZEVEDO, R.K; BRANDÃO, H; ABDALLAH, V.D; SILVA, R.J. First record of an epibiont protozoan *Epistylis* sp. (Ciliophora, Peritrichia) attached to *Ergasilus chelangulatus* (Ergasilidae) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.74, n.2, p. 460-463. 2014.

BAGATINI, I.L; SPÍNOLA, A.L.G; PERES, B.M; MANSANO, A.S; RODRIGUES, M.A.A; BATALHA, M.A.P.L; DE LUCCA, J.V; GOLDINHO, M.J; MATSUMURA TUNDISI, .T; REGALI-SELEGHIM, M.H. Protozooplankton and its relationship with environmental conditions in 13 water bodies of the Mogi-Guaçu basin - SP, Brazil. **Biota Neotropica**, Campinas, v.13, n.4, p.152-163. 2013.

BALDISSEROTTO, A. B; MARTOS-SITCHAB, J.A; MENEZESE, C.C; PRATID, C.T.R.L; GARCIAD, L.O; SALBEGOA, J; MANCERAC, J.M; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. The effects of ammonia and water hardness on the hormonal, osmoregulatory and metabolic responses of the freshwater silverside *Rhamdia quelen*. **Aquatic Toxicology**, Países baixos, v.152, p.324-352. 2014.

BALDOCK, B.M. Peritrich ciliates epizoic on larvae of *Brachycentrus subnubilus* (Trichoptera): importance in relation to the total protozoan population in streams. **Hydrobiologia**, v.132, p.125-131. 1986.

BELKIN, S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. **Curr. Opin. Microbiology**, Reino Unido, v.6, p.206-212. 2003.

BERGER, H. Catalogue of ciliate names 1. Hypotrichs. Verlag Helmut Berger, Salzburg, p.206. 2001.

BERGER, H; FOISSNER, W. Morphology and biometry of some soil hypotrichs (Protozoa, Ciliophora) from Europe and Japan. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, Estados Unidos da América, v.55, p.19-46. 1989.

BERNINGER, V.W; MIZOKAWA, D.T.; BRAGG, R. Theory-based diagnosis and remediation of writing disabilities. **Journal of Educational Psychology**, Estados Unidos da América, v.29, p.57-59. 1991.

BERNINGER, U.G; WICKHAM, S.A; FINLAY, B.J. Trophic coupling within the microbial food web: a study with fine temporal resolution in a eutrophic freshwater ecosystem. **Freshwater Biology**, Reino Unido, v.30, p.419-432. 1993.

BERNHARD, D; STECHMANN, A; FOISSNER, W; AMMERMANN, D; HEHN, M; SCHLEGEL, M. Phylogenetic relationships within the class Spirotrichea (Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Estados Unidos da América, v.21, p.86-92. 2001.

BEERS, C. D. *Plagiopyla minuta* and *Euplotes balteatus*, ciliates of the sea urchin *Strongylocentrotus dribachiensis*. **Journal Protozoologica**, v.1, p.86-92. 1954.

- BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Ciencia e Cultura**, Brasil, v.42, p.271-277. 1990.
- BIANCHI, M.O; CORREIA, M.E.F; RESENDE, A.S; CAMPELLO, E.FC. **Importância de estudos ecotoxicológicos em invertebrados do solo**. Embrapa, Seropédica, Rio de Janeiro. 2010.
- BITENCOURT, J.A.P. **Avaliação da sensibilidade de *Euplotes vannus* e *Euplotes crassus* a metais pesados e atividade de biorremediação de consórcios bacterianos**. 87p. Tese de doutorado (Pós-graduação em Biologia Marinha) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 2014.
- BLISS, C.I. "The Method of Probits". **Science**, Estados Unidos da América, v.79, p.38-39. 1934a.
- BLISS, C.I. "The Method of Probits a Correction". **Science**, Estados Unidos da América, v.79, p.409-410.1934b.
- BLISS, C.I. The calculator of the dosage-mortality curve. **Annals of Applied Biology**, Reino Unido, v.22, p. 134-167. 1935.
- BORRELY, S.I. **Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixes de elétrons, avaliada com a espécie *V. fischeri*, *D. similis* e *P. reticulata***. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2001
- BOHRER, M.B.C. **Biomonitoramento o das lagoas de tratamento terciario do s efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do Sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplancônica**. São Carlos, UFSCar. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 1995.
- BORROR A.C. Tidal marsh ciliates (Protozoa): morphology, ecology, systematics. — **Acta Protozoologica** Polônia, v.10, p.29-72. 1972.
- BRITISH MEDICAL ASSOCIATION HAZARDOUS WASTE AND HUMAN HEALTH. Oxford University Press, Oxford. 1991.
- BUOSI, P.R.B; PAULETO, G.M; LANSAC-TÔHA, F.A; VELHO, L.F.M. Ciliate community associated with aquatic macrophyte roots: Effects of nutrient enrichment on the community composition and species richness. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.47, n.2, p. 86-102. 2011.
- CABRAL, A.F; DIAS, R.J.P; UTZ, L.R.P; ALVES, R.G; D'AGOSTO, M. Spatial and temporal occurrence of *Rhabdostyla* cf. *chironomi* Kahl, 1933 (Ciliophora, Peritrichia) as an epibiont on chironomid larvae in a lotic system in the neotropics. **Hydrobiologia**, Reino Unido, v.644, n.1, p.351-359. 2010.
- CAIRNS, Jr; HART, K.M; HENEERY, M. S. The effects of a sublethal dose of copper sulfate on the colonization rate of freshwater protozoan communities. **The American Midland Naturalist**, Estados Unidos da América, v.104, p.93-101. 1980.
- CAIRNS, Jr; PRATT, J.R. The scientific basis of bioassays. **Hydrobiologia**, Reino Unido, v.188, p.5-20. 1989.
- CAJARAVILLE, M.P; BEBIANN, M.J; BLASCO, J; PORTE, C; SARASQUETE, C; CIARENCO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, Países Baixos, v.247, n.2-3, p. 295-311. 2000.



- CALLISTO, M; MORETTI, M; GOULART, M. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v.6, n.1, p.71-82. 2001.
- CAMARGO, J. A; ALONSO, A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. **Environment International**, Reino Unido, v.32, p.831-849. 2006.
- CAMARGO J.A; ALONSO A.; DE LA PUENTE M. Mulmetric assesement of nutriente enrichment in impunded rivers based on bentic macroinvertebrates.**Enviornmental Monitoring and assesement**, Dordrecth, v.96, p.233-249. 2004.
- CAPÓ, M. **Princípios da Ecotoxicologia. Diagnóstico, tratamento y gestion Del meio ambiente**. Ed Tebar. Espanha.p.320. 2007.
- CARTER, H.P. Infraciliature of eleven species of the genus *Euplotes*. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.91, p.466-492. 1972.
- CASATTI, L; SILVA, A.M; LANGEANI, F; CASTRO, R.M.C. Stream fishes, water and habitat quality in a pasture dominated basin, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Brasil, v.66, p.681-696. 2006.
- CHAPMAN, G; DUNLOP, S. Detoxication of zinc and cadmium by the freshwater protozoan *Tetrahymena pyriformis*..The effect of water hardness.**Environmental Research**,Estados Unidos da América, v.26, p.81-86. 1981.
- CHATTON, E; LWOFF, A. Imprégnation par diffusion argentine de l'infra-ciliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. **Society of Biology**, v.104, p.834-836. 1930.
- CHEN, Z; SONG, W; WARREN, A. Studies on six *Euplotes* spp. (Ciliophora: Hypotrichida) using RAPD fingerprinting, including a comparison with morphometric analyses. **Acta Protozoologica**, Polônia, v.39, p.209-216. 2000.
- CHITOLINA, L.S; ARAÚJO, G.O; SILVA, M.P; UTZ, L.R.P. Caracterização Morfológica de duas espécies de ciliados suctórios (Ciliophora, Suctoria) encontradas no sul do Brasil. **Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica**. PUC, Rio Grande do Sul. 2013.
- COPPELLOTTI, O; CISOTTO, P. Description of *Euplotes margherensis* nov. spec. (Ciliophora, Hypotrichida) from the Lagoon of Venice.**Italy Journal of Zoology**, Reino Unido, v.63, p.163-167.1996.
- CORLISS, J.O. Have the Protozoa been overlooked.**BioScience**, Estados Unidos da América, v.51, p.424-425. 2001.
- CONAMA. **Resolução CONAMA 357/2005, de 17 de Março de 2005**. Brasília, Ministério do Meio ambiente, 27p. 2005.
- CONAMA. **Resolução CONAMA 430/2011, de 13 de Maio de 2011**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 9p. 2011.
- COELHO, R.S. **Avaliação da toxicidade de fluídos de usinagem através da ecotoxicologia aquática**. 156p. Tese de Doutorado. (Doutorado em Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

- CONNOR, R.E; DEANOVIC, L.A; FRITSCH, E.B; ABRONZO, L.S.D; WERNER, I. Sublethal responses to ammonia exposure in the endangered delta smelt; *Hypomesus transpacificus* (Fam. Osmeridae). **Aquatic Toxicology**, Países baixos, v.105, p.369-377. 2011.
- CORLISS, J.O. The ciliated protozoa. **Pergamon Press**, London, p.455. 1979.
- CORLISS, J.O. Progress in protistology during the first decade following reemergence of the field as a respectable interdisciplinary area in modern biological research. **Progress in Protistology**, Michigan, v.1, p.11-63. 1986.
- COTTERILL, F.P.D; AL-RASHEID, K.A.S; FOISSNER, W. Conservation of protists: is it needed at all. **Biodiversity and Conservation**, Países baixos v.17, n.2, p.427-443. fev. 2008.
- CHINNI, S; KHAN, R.N; RAO, P.Y.P. Acute Toxicity of Lead on Tolerance, Oxygen Consumption, Ammonia-N Excretion, and Metal Accumulation in *Penaeus indicus* Postlarvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Estados Unidos da América, v.51, p.79-84. mai. 2002.
- CUNHA, A; FONSECA, O. O microplâncton das costas meridionais do Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.10, p.99-103. 1918.
- CUNICO, A.M; E.A. FERREIRA, A.A; AGOSTINHO, A.C. Beaumord and R. Fernandes. The effects of local and regional environmental factors on the structure of fish assemblages in the Pirapó Basin, Southern Brazil. **Landscape and Urban Planning**, Países baixos, v.105, n.3, p.336-344. 2012.
- CURDS, C.R.A Guide to the species of the genus *Euplotes*. **Bulletin of the British Museum of Natural History**, v.28, n.1, p.1-59. 1975.
- CURDS, C.R. **Protozoa and the Water Industry**. Cambridge University Press, Cambridge. 1992.
- CZAPIK, A. The effect of waste water on ciliate communities in the Biata Przemsza River. **Acta Hydrobiologica**, Polônia, v.24, n.1, p.29-37. 1982.
- DEBASTIANI, C; MEIRAB, B.R; LANSAC-TÔHA, F.M; VELHO, L.F.M; LASACTÔHA, F.A. Protozoa ciliates community structure in urban streams and their environmental use as indicators. **Brazilian Journal of Biology**. 2016.
- DELMONTE CORRADO, M.U; TRIELLI, F; AMAROLI, A; OGNIBENE, M; FALUGI, C. Protists as tools for environmental biomonitoring: importance of cholinesterase enzyme activities. In: Columbus, F. (Ed.), **Water Pollution**, New Researc, Hauppauge, Nova York, USA, p.1-20. 2005.
- DIAS, R.J.P; D'ÁVILA, S; M. D'AGOSTO. First Record of Epibionts Peritrichids and Suctorians (Protozoa, Ciliophora) on *Pomacea lineata* (Spix, 1827). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, Brasil, v.49, n. 5, p.807-812. 2006.
- DIAS, R.J.P; WIELOCH, A.H.B; D'AGOSTO, M.A. The influence of environmental characteristics on the distribution of ciliates (Protozoa, Ciliophora) in an urban stream of southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.2, p.287-295. 2008.
- DIAS, R.J.P; CABRAL, A.F; MARTINS, R.T; STEPHAN, N.N; SILVA-NETO, I.D; ALVES, R.G.A; D'AGOSTO, M. Occurrence of peritrich ciliates on the limnic oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta, Tubificidae) in the neotropics. **Journal of Natural History**, v.43, p.1-15. 2009a.

- DIAS, R.J.P; FERNANDES, N.M; SILVA-NETO, I.D; D'AGOSTO, M. Occurrence of *Trichodina heterodontata* (Ciliophora: Trichodinidae) infesting tadpoles of *Rhinella pombali* (Anura: Bufonidae) in the Neotropical area. **Parasitology International**, Japão, v.58, p.471-474. 2009b.
- DIAS, R.J.P; CABRAL, A.F; SIQUEIRA-CASTRO, I.C.V; SILVA-NETO, I.D; D'AGOSTO, M. Morphometric study of a Brazilian strain of *Carchesium polypinum* (Ciliophora: Peritrichia) attached to *Pomacea figulina* (Mollusca: Gastropoda), with notes on a high infestation. **Zoologia**, Brasil, v.27, n.3, p.483-488. 2010.
- DIECKMANN, J. An improved protargol impregnation for ciliates yielding reproducible results). **European Journal of Protistology**, Alemanha.v.31, p.372-382.1995.
- DOBELL, C. Antony van Leeuwenhoek and his 'Little Animals'. Dover Publications Inc, New York. 1960.
- DOLAN, J. R; AND D. W. COATS. Preliminary prey digestion in a predacious estuarine ciliate and the use of digestion data to estimate ingestion. **Limnology and Oceanography**, Estados Unidos da América, v.36, p.558-565. 1991.
- DOPHEIDE, A; LEAR, G; STOTT, R; LEWIS, G. Relative diversity and community structure of ciliates in stream biofilms according to molecular and microscopy methods. **Appl. Environmental Microbiology**, Inglaterra, v.75, n.16, p.5261-5272.2009.
- FANO, E.A; MISTRI, M; ROSSI, R. The ecofunctional quality index (EQI): a new tool for assessing lagoonal ecosystem impairment. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, Estados Unidos da América, v.56, p.709-716. 2003.
- FENCHEL, T. The Ecology of the Protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists. **Springer Verlag**, New York. 1987.
- ESPINAS, S; VENEGAS, C. Ecotoxicología y contaminación, p.79-120. 2005.
- ESTEBAN, G.F; FINLAY, B.J. Cryptic freshwater ciliates in a hypersaline lagoon. **Protistology**, v.154, p.411-418. 2003.
- FARIA, J.G; CUNHA, A.M.. Estudos sobre o Microplankton da baía do Rio de Janeiro e suas imediações. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p.68-92. 1917.
- FARIA, J.G; CUNHA, A.M; PINTO, C. Estudos sobre Protozoários do mar. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.15, p.186-208. 1922.
- FERNANDEZ-LEBORANS, G; NOVILLO, A. Sublitoral protistan communities of the shores of the sea of Cantabria (Bay of Biscay). **Hydrobiologia**, Países Baixos, v.78, p.201-218.1993.
- FERNANDEZ-LEBORANS, G; NOVILLO, A. The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater protozoa community. **Ecotoxicology Environmental Safety**, Inglaterra, v.31, n.1, p.29-36. 1995.
- FERNANDEZ-LEBORANS, G; NOVILLO, A. Protozoan communities and contamination of several fluvial systems. **Water Environmental Research**, Estados Unidos da América, v.68, n.3, p.311-319. 1996.
- FINLAY, B.J; FENCHEL, T. Divergent perspectives on protist species richness. **Protistology**, Alemanha, v.150, p.229-233. 1999.
- FENCHEL, T; FINLAY, B.J. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. **Bio Science**, Estados Unidos da América, v.54, p.777-784. 2004.

- FESB – CETESB. Estudos efetuados na represa de Americana e no rio Atibaia, a montante do reservatório. **Relatório Técnico**. São Paulo. p.66.1971
- FINLAY, B.J. “Outing” the Researcher: The Provenance, Principles and Practice of Reflexivity’. **Qualitative Health Research**, Estados Unidos da América, v.12, n.4, p.531-45. 2002.
- FINLAY, B.J; CORLISS, J.O; ESTEBAN, G; FENCHEL, T. Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere. **Quartely Review Biology**, Chicago, v.71, n.2, p.221-237.1996.
- FOISSNER, W. Gemeinsame Arten in der terricolen Ciliatenfauna (Protozoa: Ciliophora) von Australien und Afrika. **Stapfia**, v.17, p.85-133. 1988.
- FOISSNER, W. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.27, n.4, p.313-330. 1991.
- FOISSNER, W. Evaluating water quality using protozoa and saprobity indexes. In: **Protocols in protozoology**. Society of Protozoologists.Ed. LEE, J.J. e SOLDO, A.T. v.2. 1992.
- FOISSNER, W. *Corticocolpoda kaneshiroae* n. g., n. sp., a new colpodid ciliate (Protozoa, Ciliophora) from the bark of Ohia trees in Hawaii. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.40, n.6, p.764-775.1993.
- FOISSNER, W. Morphology and morphogenesis of *Circinella arenicolanov.* gen., nov. spec., a cephalized hypotrich (Ciliophora, Hypotrichida) from sand dunes in Utah, USA. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.30, n.2, p.156-170. 1994.
- FOISSNER, W. Faunistics taxonomy and ecology of mossandsoil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Antarctica, with description of new species, including *Pleuroplitoides smithigen.* n., sp. n. **Acta Protozoologica**, Polônia, v.35, p.95-123 . 1996.
- FOISSNER, W. Faunistic and taxonomic studies on ciliates (Protozoa, Ciliophora) from clean rivers in Bavaria (Germany), with description of a new species and cological notes. **Limonologica**, v.27, n.2, p.179-238. 1997.
- FOISSNER, W. Protist diversity: estimates of the near-imponderable. **Protistology**, v.150, p.363-368. 1999.
- FOISSNER, W. Morphology and ontogenesis of *Bromeliophyra brasiliensis* gen. n., sp. n., a new tetrahymenid ciliate (Protozoa: Ciliophora) from Brazilian tank bromeliads (Bromeliaceae). **Acta Protozoologica**, Polônia, v.42, p.55-70. 2003a.
- FOISSNER, W. Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. **Acta Protozoologica**, Polônia, v.45, p.111-136. 2006.
- FOISSNER, W; AGATHA, S; BERGER, H. Soil ciliates (Protozoa,Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha Region and the Namib Desert. **Denisia**, v.5, p.1-1459. 2002.
- FOISSNER, W; H. BERGER. A user-friendly guide to ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. **Freshwater Biology**, Inglaterra, v.35, p.375-498. 1996.
- FOISSNER, W; HAWKSWORTH, D.L. **Protist Diversity and Geographical Distribution**.Springer, Dordrecht. 2009.
- FORD, B. J. **The Leeuwenhoek Legacy**. Biopress, Bristol, and Farrand Press, London. 1991.

- GAO, F; WARREN, A; ZHANG, Q; GONG, J; MIAO, M; SUN, P; XU, D; HUANG, J; YI, Z; SONG, W. The All-Data-Based Evolutionary Hypothesis of Ciliated Protists with a Revised Classification of the Phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). **Nature/Scientific Reports**, Inglaterra, v.29, n.6, p.1-14.2016.
- GILRON, G.L; LYNN, D.H. Ciliate protozoa as test organism in toxicity assessment, in P.G Wells, K. Lee and See Blaise(ed). **Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice**. CRC Press, Boca Ranton, FL, p.323-336.1998.
- GUTIERREZ, J. C; MARTIN-GONZALEZ, A; DIAZ S; ORTEGA, R. Ciliates as potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. **European Journal of Protistology**, Alemanha.v.39, p.461-7. 2003.
- GUTIÉRREZ, J. C; AMARO, F; DIAZ, S; DE FRANCISCO, P; CUBAS, L.L., MARTIN-GONZALEZ, A. Ciliate metallothioneins: unique microbial eukaryotic heavy-metal-binder molecules. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Alemanha, v.16, p.1025-1034. 2011.
- GRELL, K.G. **Protozoology**. Springer-Verlag, New York, 554p. 1973.
- GROLIÈRE, C.A; CHAKLI, R; SPARAGANO, O; . PEPIN, D. Application de la colonisation d'un substrat artificiel par les ciliés à l'étude de la qualité des eaux d'une rivière. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.25, n.4, p.381-390. 1990.
- HAECKEL, L. E. **Generell e Morphologi e der Organismen**. 2 vols. G. Reimer , Berlin. 1866.
- HARDOIM, E.L; C.W. HECKMAN. The seasonal sucession od biotic communities in wetlands of the wet-and-dry climatic zone: IV. The free-living sarcodines and ciliates of the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie**, Berlin, v.81, p.367-384. 1996.
- HAUSMANN, K; HÜLSMANN, N; RADEK, R. **Protistology**, 3.rd ed. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. 2003.
- HENEGBRY, M.S; RIDGEWAY, B.T. Epizoic ciliated protozoa of planktonic copepods and cladocerans and their possible use as indicators of organic water pollution. **Trans. American Microscopical Society**, Washington, v.98, p.495-508. 1979.
- HENGLONG XU; SONG, W; WARREN; WARREN, A. An investigation of the tolerance to ammonia of the marine ciliate *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). **Hydrobiologia**, Reino Unido, v.519, p.189-195. 2004.
- HUL, M. The effect of domestic sewage on the structure of the microbenthic ciliate communities in the Lyna River. **Polskie Archiwum Hydrobiologia**, v.34, p.567-578. 1987.
- IP, Y.K.; CHEW, S.F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. **Frontiers in Physiology**, Suiça, v.1, p.1-20. 2014.
- ISRAELI-WEINSTEIN, D; KIMMEL, E. Behavioural response of carp, *Cyprinus carpio* to ammonia stress. **Aquaculture**, Países Baixos, v. 165, n.1, p. 81-93. 1998.
- JEROME, C. A; LYNN, D. H. Identifying and distinguishing sibling species in the *Tetrahymena pyriformis* complex (Ciliophora, Oligohymenophorea) using PCR-RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA. **Journal of Eukariotic Microbiology**, Reino Unido, v.43, p.492- 497. 1996.
- JIANG, J; ZHANG, Q; HU, X; SHAO, C; AL-RASHEID, K.A.S; SONG, W. Two new marine ciliates, *Euplotes sinicus* sp. nov. and *Euplotes parabalteatus* sp. nov., and a new small subunit rRNA gene sequence of *Euplotes rarisseta* (Ciliophora, Spirotrichea, Euplotida). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reino Unido, v.60, p.1241-1251. 2010.

- JOPPERT, F; GUEDES, L.H.C; SILVA-NETO, I.D. Qualitative study of the ciliated protozoa in tanks of *Aechmea nudicalis* (Bromeliaceae) at Barra de Maricá, Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.90, p.251. 1995.
- JURGENS, K; ARNDT, H; ZIMMERMANN, H. Impact of metazoan and protozoan grazers on bacterial biomass distribution in microcosm experiments. **Aquatic Microbial Ecology**, Alemanha, v.12, p.131-138. 1997.
- KLEIN B. M. Über eine neue Eigentümlichkeit der Pellicula von *Chilodon uncinatus* Ehrbg. **Zoologischer Anzeiger**, Alemanha, v.67, p.1-2.1926.
- KLEIN, B.N. The “dry” silver method and its proper and use. **The Journal of Protozoology**, Japão, v.5, n.2, p.99-103.1958.
- KNIE, J.L.W; LOPES, E.W.B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. 20. ed. Florianópolis: Gráfica Coan. p.289. 2004.
- KLIMEK, B; FYDA, J; PAJDAK-STO, A; KOCERBA, W; FIALKOWSKA, E; SOBCZYK, M. Toxicity of Ammonia Nitrogen to Ciliated Protozoa *Stentor coeruleus* and *Coleps hirtus* Isolated from Activated Sludge of Wastewater Treatment Plants. **Bull Environmental Contamination and Toxicology**, Estados Unidos da América, v. 89, p.975-977. 2012.
- KOLKWITZ, R; MARSSON, K. **Ökologie der pflanzlichen Saprobien**. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, v.26, p.505-519. 1908.
- KOLKWITZ, R; MARSSON, K. **Ökologie der tierischen Saprobien. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v.2, p.126-152. 1909.
- KUSCH, J; HECKMANN, K. Population structure of *Euplotes* ciliates revealed by RAPD fingerprinting. **Ecoscience**, Canadá, v.3, p.378-384. 1996.
- LI, L; SONG, W. Phylogenetic position of the marine ciliate, *Certesias quadrinucleata* (Ciliophora; Hypotrichia; Hypotrichida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.42, p.55-61. 2006.
- LIMA, O. **Distribuição de solos em catenas e mapeamento pedológico de sub-bacia hidrográfica piloto na região de Itajubá-MG**. 139p. Dissertação de mestrado. (Meio Ambiente Recursos Hídricos). Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, Minas Gerais. 2012.
- LYNN, D.H. **The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature**, 3 ed. Springer Press, New York. 2008.
- LYNN. D.H; SMALL, E.B. A revised classification of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. **Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural**, México, v.47, p.65-78. 1997.
- LYNN, D.H; WRIGHT, A.D.G; SCHLEGEL, M; FOISSNER, W. Phylogenetic relationships of orders within the class Colpodea (phylum Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Estados Unidos da América, v.48, p.605-614. 1999.
- LYNN. D.H; SMALL, E.B. An illustrated Guide to the Protozoa, pp. 371-656. In: LEE, J.J; P.C. BRADBURY e G.F. LEEDALE (Eds.). **Phylum Ciliophora. Society of Protozoologists**, Lawrence, Kansas. 2002.
- LYNN, D.H; CORLISS, J.O. Ciliophora, In: HARRISON, W. (Ed.) **Microscopic anatomy of invertebrates**. Wiley-Liss, New York, p.333-467. 1991.
- MADONI, P. Ciliated protozoa and water quality in the Parma River (Northern Italy): long-term changes in the community structure. **Hydrobiologia**, Irlanda, v.264, p.129-135. 1993.

- MADONI, P. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. **Water Research**, Reino Unido, v.28, n.1, p.67-75. 1994.
- MADONI, P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. **Environmental Pollution**, Londres, v.109, n.1, p.53-59. 2000.
- MADONI, P. Protozoa in activated sludge. In: BITTON, G. (Ed.), **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, New York, p.2605-2612. 2002.
- MADONI, P. Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. In: Mara, D., Horan, N. (Eds.), **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, Amsterdam, p. 361-371. 2003.
- MADONI, P. Ciliated protozoans communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of the Po River (northern Italy). **Hydrobiologia**, Irlanda, v.541,n.1, p.55-69. 2005.
- MADONI, P; BASSANINI, N. Longitudinal changes in the ciliated protozoa communities along a fluvial system polluted by organic matter. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.35, p.391-402. 1999.
- MADONI, P; BRAGHIROLI, S. Changes in the ciliate assemblage along a fluvial system related to physical, chemical and geomorphological characteristics. **European Journal of Protistology**, Alemanha, v.43, n.2, p.67-75. 2007.
- MADONI, P; DAVOLI, D; GORBI, G; VESCOVI, L. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. **Water Research**, Reino Unido, v.30, n.1, p.135-141. 1996.
- MADONI, P; ROMEO, M. G.; Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental Pollution**, Londres, v.141, n.1, p.1-7. 2006.
- MANSANO, A.S; MOREIRA, R.A; PIEROZZI, M; OLIVEIRA, T.M.A; VIEIRA, E.M; ROCHA, O; REGALI-SELEGHIM, M.H. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, Reino Unido, v.213, p.160-172. 2016.
- MARQUES, M.M; BARBOSA, F. Na fauna do fundo, o retrato da degradação. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.175, p.72-75. 2001.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A; DÍAZ, S; BORNIQUEL, S; GALLEGO, A; GUTIÉRREZ, J.C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology**, Países baixos, v.157, p.108-118. 2006.
- MEDLIN, L; ELWOOD, H.J; STICKEL, S; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like ribosomal RNA-coding regions. **Gene**, Países Baixos, v.71, p.491-500. 1988.
- MENDONÇA, H.S.S. **Ciliados planctônicos e epibentônicos do rio das Velhas e Tributários, MG: ecologia e uso potencial para bioindicação da qualidade das águas**. 319p. Dissertação de Mestrado. (Biologia Aquática). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. 2012.
- MIRANDA, M.M.P; MARTINS, N.F. Avaliação experimental do efeito tóxico de metais em *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833. *Revista Verde*, Rio Grande do Norte, v. 8, n. 3, p. 247-262. 2013.

- MITCHELL, E.A.D; MEISTERFELD, R. Taxonomic confusion blurs the debate on cosmopolitanism versus local endemism of free living protists. **Protistology**, Alemanha, v.156, p.263-267. 2005.
- NALECZ-JAWECKI, G. Spirotox- *Spirostomum ambiguum* Acute Toxicity Test- 10 years of experience. **Environmental Toxicology**, Estados Unidos da América v.19, n.4, p.359-364. 2004.
- NENDZA, M. Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. **Chemosphere**. Reino Unido, v.48, n.8, p.865-83. 2002.
- NICOLAU, A; DIAS, N; MOTA, M; LIMA, N. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. **Research in Microbiology**, Países Baixos, v.152, p.621-630. 2001.
- NOLAND, L.E. Factors influencing the distribution of fresh water ciliates. **Ecology**, New York, v.6, n.4, p.437-452. 1925.
- ORSI, W; EDGCOMB, V; FARIA, J; FOISSNER, W; FOWLE, W.H; HOHMANN, T, SUAREZ, P; TAYLOR, C; TAYLOR, G.T; VD'ACNY, P; EPSTEIN, S.S. Class Ciliacotrichea, a novel ciliate taxon from the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reino Unido, v.62, n.6, p.1425-1433.2012.
- ORREGO, R; MORAGA-CID, G.; GONZALEZ, M.; BARRA, R.; VALENZUELA, A; BURGOS, A; GAVILAN, J.F. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Estados Unidos da América, v.24, p.1935-1943. 2005.
- PAN, Y; LI, L.Q; SHAO, C; HU, X.Z; MA H.G; AL-RASHEID, K.A.S, WARREN, A. Morphology and ontogenesis of a marine ciliate, *Euplotes balteatus* (Dujardin, 1841) Kahl, 1932 (Ciliophora, Euplotida) and definition of *Euplotes wilberti* nov. spec. **Acta Protozoologica**, Polônia, v.51, p.29-38. 2012.
- PAIVA, T.S; SILVA-NETO, I.D. Ciliate protists from Cabiúnas lagoon (Restinga de Jurubatiba, Macaé, Rio de Janeiro) with emphasis on water quality indicator species and description of *Oxytricha marcili* sp.n. **Brazilian Journal of Biology**, Brasil, v.64, n.3, p.465-478. 2004a.
- PAIVA, T.S; SILVA-NETO, I.D. Comparative morphometric study of three species of *Apoamphisiella* Foissner, 1997 (Ciliophora: Hypotrichea) from Brazilian locations, including a description of *Apoamphiseilla foissneri* sp. n. **Zootaxa**, Nova Zelândia, v.505, p.1-26. 2004b.
- PARKER, J.G. Toxic effects of heavy metals upon cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Uronematidae). **Marine biology**, Alemanha, v.54, p.17-24. 1979.
- PASSEL, H.D; DAHM ,C.N; BEDRICK, E.J. Ammonia modeling for assessing potential toxicity to fish species in the Rio Grande. **Ecological Applications**, Estados Unidos da América, v.17, p.2087-2099. 2007.
- PASCOE, D; WENZEL, A; JANSSEN, C; GIRLING, A.F; JQTTNER, I; FLIEDNER A. The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. **Water Research**, Reino Unido, v.34, p.2323-2329.2000.
- PETRELLI, D; BUONANNO, F; VITALI, L.A; ORTENZI, C. Antimicrobial activity of the protozoan toxin climacostol and its derivatives, *Biologia*, v.67, n.3, p.525-529. 2012.
- PETRONI, G; DINI, F; VERNI, F; ROSATI, G.A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Estados Unidos da América, v.22, p.118-130. 2002.



- PETZ, W; VALBONESI, A; SCHIFTNER, U; QUESADA, A; CYNAN ELLISEVANS, J. Ciliate biogeography in Antarctic and Arctic freshwater ecosystems: endemism or global distribution of species. **Microbiology and Ecology**, v.59, p.396- 408. 2007.
- PICCINNI, E; GUTIÉRREZ, J. Protists as bioindicators in the environment. **Protistology Actualities**, v.1, p.173-184. 1995.
- PINHEIRO, J.N; FREITAS, B.M. Efeitos letais dos pesticidas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agrossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Brasil, v.14, p.266-281. 2010.
- PINTO, C. Protozoários observados no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.18. p.211-215. 1925.
- POMPEU, P.S; ALVES, C.B.M; CALLISTO, M. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas basin, Brazil. **American Fisheries Society Symposium Series**, v.47, p.11-22. 2005.
- PRIMC, B. Trophic relationships of ciliated Protozoa developed under different saprobic conditions in the periphyton of the Sava River. **Periodicum Biologorum**, Croácia, v. 90, n.3, p.349-353. 1998.
- PUYTORAC, P; GRAIN, J; MINGNOT, J.P. **Précis de protistologie Boubéé**, Paris. 1987.
- PUYTORAC, P. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: *Traité de Zoologie*, Tome II, Infusoires Ciliés, Fasc. 2, Systématique (Ed. P. de Puytorac). Masson, Paris, p.1-15. 1994.
- PUIGRAGUT, A.J; SAVADO', H; GARCIA, J. Short-term harmful effects of ammonia nitrogen on activated sludge microfauna. **Water Research**, Reino Unido, v.39, p.4397-4404. 2005.
- RAIKOV, I.B. Nuclei of ciliates, In: HAUSMANN, K.; P. BRADBURY (Eds.). **Ciliates: cells as organisms**. Gustav Fischer, Stuttgart, p.221-242. 1996.
- RAO, J.V; SRIKANTH, K; AREPALLI, S.K; GUNDA, V.G. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Estados Unidos da América, v.86, p.131-137. 2006.
- RAO, A.N; HUSSAIN, M.M. Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. **Journal of Environmental Biology**, Índia, v.31, n.5, p.603-607. 2010.
- REGALI-SELEGHIM, M.H; GOLDINHO, M.J.L; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist dos “protozoários” de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, Brasil, v.11, n.1. p.135-172. 2011.
- REHMAN, A; SHAKOORI, F.R; SHAKOORI, A.R. Uptake of heavy metals by *Stylonychia mytilus* and its possible use in decontamination industrial wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Países Baixos, v.24, p.47-53. 2008.
- REISS, J; SCHMID-ARAYA, J. M. Existing in plenty: patterns of density, biomass and diversity of benthic ciliates, rotifers and meiofaunal groups in small streams. **Freshwater Biology**, Reino Unido, v.53, p.652-668. 2008.
- ROMEO M; FRASILA, C; GNASSIA-BARELLI, M; DAMIENS, G; MICU, D; MUSTATA, G. Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*. **Water Research**, Reino Unido, v.39, p.596-604. 2005.
- SAFI, L.S.L; FONTOURA, N.F; SEVERO, H.J; UTZ, L.R.P. Temporal structure of the peritrich ciliate assemblage in a large Neotropical lake. **Zoological Studies**, China, v.53, n. 17. 2014.

- SALVADO, H; GRACIA, M.P; AMIGO, J.M. Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. **Water Research**, Reino Unido, v.29, p.1041-1050. 1995.
- SARMA, S.S.S; MANGAS-RAMÍNEZ, E; NANDINI, S. Effect of ammonia toxicity on the competition among three species of Cladocerans (Crustacea:Cladocera). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Estados Unidos, da América, v.55, p.227-235.2003.
- SARTINI, B.E.S. **Composição e estrutura da taxocenose de ciliados peritríqueos (Ciliophora, Peritrichia) em ambientes lóticos com gradiente de poluição orgânica e aspectos ecológicos da relação epibiótica de peritríqueos e moluscos gastrópodes.** 95 p. Dissertação de Mestrado. (Comportamento de Biologia Animal). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais. 2012.
- SCHRAM, E; JONATHAN, A.C.R; KUIJK, T.V; ABBINK, W; VAN DE HEUL, J; VRIES, P; BIERMAN, S; VAN DE VIS, H; FLIK, G. The impact of elevated water ammonia and nitrate concentrations on physiology, growth and feed intake of pikeperch (*Sander lucioperca*). **Aquaculture**, Países Baixos, v.420, p.95-104. 2014.
- SCHWARZ, J; STOECK, T. *Euplotes pseudoelegans* n. sp. (Hypotrichida; Euplotidae): description of a new species previously mis identified as *Euplotes elegans* Kahl, 1932. **Acta Protozoologica**, v.46, p.193-200. 2007.
- SCHLEGEL, M; ELWOOD, H. J; SOGIN, M. L. Molecular evolution in hypotrichous ciliates: sequence of the small subunit RNA genes from *Onychodromus quadricornutus* and *Oxytricha granulifera* (Oxytrichidae, Hypotrichida, Ciliophora). **Journal of Molecular Evolution**, Estados Unidos da América, v.32, p.64-69. 1991.
- SHAO, C; MA, H; GAO, S; AL-RASHEID, A.K; SONG, W. Reevaluation of cortical developmental patterns in *Euplotes* (s.l.), including a morphogenetic redescription of *E. Charon* (Protozoa, Ciliophora, Euplotida). **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, China, v.28, n.3, p.593-602. 2010.
- SHERR, N.H; SPIELBERG, S.P; CANNON, M; MILLER, M. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: *in vitro* risk assessment. **Journal Clinical Investigation**, Estados Unidos da América, v.82, p.1826-1832. 1988.
- SLEIGH, M. **Protozoa and other Protists**. Chapman and Hall, New York, 399p. 1988.
- SOLA, A; LONGÁS, J.F; SERRANO, S; GUINEA. A Influence of environmental characteristics on the distribution of ciliates in the River Henares (Central Spain). **Hydrobiologia**, Países baixos, v.324, n.3, p.237-252. 1996.
- SMITH, S. Chapter 5 in Hester, R. E. (ed) Understanding Our Environment (1st edition), **Royal Society of Chemistry**, London. 1986.
- SMITH, V.H; TILMAN, G.D; NEKOLA, J.C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, Reino Unido, v.100, p.179-196. 1999.
- SPARAGANO, O.; GROLILÈRE, CA. Evaluation de la qualité des eaux d'une rivière avec les protozoaires ciliés comme bioindicateurs de pollution. Comparaison avec La physico-chimie. **Hydroecology Applique**, França, v.1, p.43-62. 1991.

- SONNEBORN, T.M. Breeding systems, reproductive methods and species problems in Protozoa. In The Species Problem (E. Mayr, ed.) Amer. **Association for the Advancement of Science**, Washington, p.155-324. 1957.
- SONG, W. Preliminary studies on the phylogenetic relationship of genera within the family Euplotidae (Ciliophora, Hypotrichida). **Oceanology and Limnology**, Alemanha, v. 26, p.527-534.1995.
- SONG, W; BRADBURY, P.C. Comparative studies on a new brackish water *Euplotes*, *E. parawoodruffi* n. sp., and a redescription of *Euplotes woodruffi* Gaw, 1939 (Ciliophora; Hypotrichida). **Arch. Protistenkd**, v.148, p.399-412. 1997.
- SONG, W; PACKROFF, G. Taxonomische Untersuchungen an marinen Ciliaten aus China mit Beschreibungen von 2 neuen Arten, *Strombidium globosaneum* nov. spec. und *Strombidium platum* nov. spec. (Protozoa, Ciliophora).**Arch. Protistenkd**. v.147, p.331-360. 1997.
- SONG, W; WILBERT, N. Morphological investigation on some free living ciliates (Protozoa, Ciliophora) from China Sea with description of a new hypotrichous genus, *Hemigastrostyla* nov. gen. **Arch. Protistenkd**, v.148, p.413-444.1997.
- SPARAGANO, O; GROLIÈRE, C. A. Evaluation de la qualité des eaux d'une rivière avec les protozoaires ciliés comme bioindicateurs de pollution.Comparaison avec la physico-chimie. **Hydroecologie Applique**, França, v.1, p.43-62.1991.
- SPENCER, P; POLLOCK, R; DUBÉ, M. Effects of un-ionized ammonia on histological, endocrine, and whole organism endpoints in slimy sculpin (*Cottus cognatus*). **Aquatic Toxicology**, Países Baixos, v.90, p.300-309. 2008.
- SUEHIRO, S; TEZUKA, Y. Seasonal change in ciliate populations in the bottom sediment of a polluted river. **Limnology**, Japão, v.42, p.1-7. 1981.
- STRUBLE, H; KRAUTER, D. **Atlas de los microorganismos de agua dulce**. Ediciones Omega, Barcelona, 367 p. 1987.
- TAYLOR, W.D. Temporal heterogeneity and the ecology of lotic ciliates, p. 209-223. In: LOCK, M.A. e WILLIAMS D.D. (Eds.). Perspectives in Running Water Ecology. **Plenum Publishing Corporation**, Ontario.1981.
- THOMAZ DA SILVA, S.C.M. **Caracterização dos efeitos genotóxicos induzidos por amostras de água provenientes do ribeirão José Pereira, sul de Minas Gerais: subsídio para monitoramento da qualidade da água**. 70p. Dissertação de Mestrado. (Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, Minas Gerais. 2015.
- TORTORA, G.J. **Microbiologia**.6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 827. Número de páginas total, por ser um livro. 2000.
- THURSTON, R.V; RUSSO, R.C; PHILLIPS, G.R. Acute toxicity of ammonia to fathead minnows.**Transactions of the American Fisheries Society**, Estados Unidos da América, v.112, p.705-711.1986.
- TUFFRAU, M. Révision du genre *Euplotes*, fondée sur la comparaison des structures superficielles. **Hydrobiologia**, Irlanda, v.15, p.1-77. 1960.
- TUFFRAU, M. Perfectionnement et pratique de la technique d'impregnation au protargol des infusoires ciliés. **Protistologica**, v.3, n.1, p. 91-98. 1967.

- TUNDISI, J. G; MATSUMURA-TUNDISI, T; RODRÍGUEZ, S. L. **Gerenciamento e Recuperação das Bacias Hidrográficas dos Rios Itaqueri e do Lobo e da Represa Carlos Botelho (Lobo-Broa)**. IIE, IIEGA, PROAQUA, ELEKTRO. 2003.
- TWAGILIMANA, L; BOHATIER, J; GROLIÈRE, C.A; BONNEMOY, F; SARGOS, D. New Low-Cost Microbiotest with the Protozoan *Spirostomum teres*: Culture Conditions and Assessment of Sensitivity of the Ciliate to 14 Pure Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Estados Unidos da América, v. 41, p.231- 244. 1998.
- UTZ, L.R.P. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica de acetato e cloreto de potássio para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera) com fins a sua utilização em fluidos de perfuração de poços de petróleo e determinação da faixa de sensibilidade de cloreto de sódio para *Daphnia similis* Claus, 1876**. . Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1994.
- UTZ, L.R.P; SIMÃO, T.L.L; SAFI, L.S.L; EIZIRIK, E. Expanded phylogenetic representation of genera *Opercularia* and *Epistylis* sheds light on the evolution and higher-level taxonomy of Peritrich Ciliates (Ciliophora: Peritrichia). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Nova Jersey (EUA), v.57, n.5, p.415-420. 2010.
- VALBONESI, A; LUPORINI, P. Description of two new species of *Euplotes* and *Euplotes rariseta* from Antarctica. **Polar Biology**, Alemanha, v.11, p.47-53. 1990.
- VALBONESI, A; APONE, F; LUPORINI, P. Morphology and biology of a new species of *Euplotes*, *Euplotes plicatum* sp. n. (Ciliophora: Euplotidae). **Acta Protozoologica**, Polônia, v.36, p.287-294. 1997.
- WANICK, R.C; PAIVA, T.S; DE CARVALHO, C.N; SILVA-NETO, I.D. Acute Toxicity of Cadmium to Freshwater Ciliate *Paramecium bursaria*. **Biociências**, Porto Alegre, v.16, n.2, p.104-109. 2008.
- WIACKOWSKI, K. Analysis of Ciliata from polluted sector of the River Drwinka on the basis of binary data. **Acta Hydrobiologica**, v.23, n.4, p.319-329. 1981.
- WILBERT, N; SONG, W.B. A further study on littoral ciliates (Protozoa, Ciliophora) near King George Island, Antarctica, with description of a new genus and seven new species. **Journal of Natural History**, Reino Unido, v.42, p.979-1012. 2008.
- YOSHIOKA, Y; OSE, Y; SATO, T. Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam Printed in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, Países baixos, v.43, p.149-157.1985.
- XU, H; SONG, W; LU, L; WARREN. Tolerance of ciliated protozoan *Paramecium bursaria* (Protozoa, Ciliophora) to ammonia and nitrites. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Alemanha, v.23, n.3, p.349-353.2005.
- ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima. p.1-13.2006.
- ZAGATTO, P.A; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2008.
- ZHEN, W; LEUNG, K.M.Y. Effects of unionised ammonia on tropical freshwater organisms: Implications on temperate-to-tropic extrapolation and water quality Guidelines. **Environmental Pollution**, v.205, p.240-249. 2015.