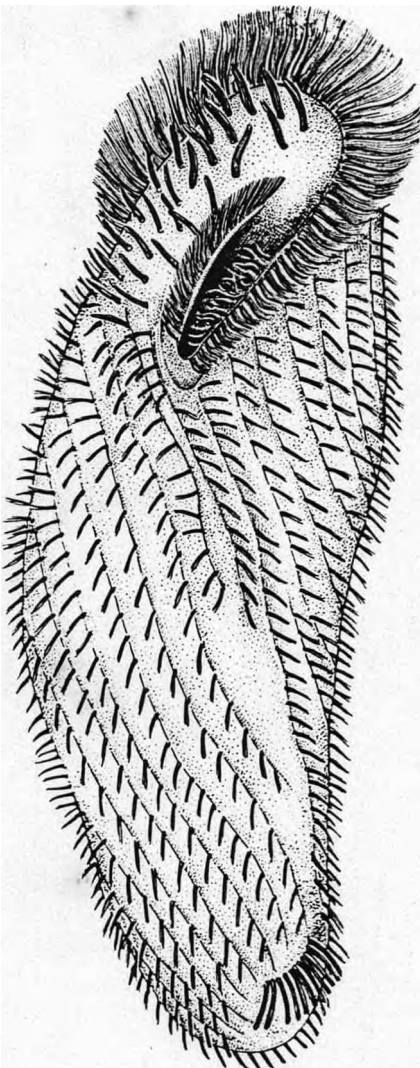


ISABELLA CANHA DOS SANTOS

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE TRÊS CILIADOS DE
MUSGOS DA LOCALIDADE DE CORRÊAS, PETRÓPOLIS, RIO DE JANEIRO.



DISSERTAÇÃO APRESENTADA À COOR-
DENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUA-
ÇÃO EM ZOOLOGIA DO MUSEU NACIO-
NAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTEN-
ÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊN-
CIAS BIOLÓGICAS - ZOOLOGIA

RIO DE JANEIRO
1991

ISABELLA CANHA DOS SANTOS

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE TRÊS CILIADOS DE
MUSGOS DA LOCALIDADE DE CORRÊAS, PETRÓPOLIS, RIO DE JANEIRO.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À COOR-
DENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUA-
ÇÃO EM ZOOLOGIA DO MUSEU NACIO-
NAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTEN-
ÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊN-
CIAS BIOLÓGICAS - ZOOLOGIA

RIO DE JANEIRO
1991

ISABELLA CANHA DOS SANTOS

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE TRÊS CILIADOS DE
MUSGOS DA LOCALIDADE DE CORRÊAS, PETRÓPOLIS, RIO DE JANEIRO.

Banca Examinadora:

Profa. Ina Nilce da Silva Brum
(Presidente da Banca)

Prof. Monir Ragel Kattar

Profa. Lycia de Brito Gitirana

Rio de Janeiro, 14 de novembro de 1991.

Trabalho realizado no Setor de Microscopia
Eletrônica do Instituto de Microbiologia
da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Milden Rodrigues de
Santa Rosa.

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Isabella Canha dos

Aspectos morfológicos e ultraestruturais de três ciliados de musgos da localidade de Corrêas, Petrópolis, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, UFRJ, Museu Nacional, 1991. xiv, 103f.

Tese: Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia)

1. Ciliados Muscícolas
2. Morfologia
3. Ultraestrutura
4. Teses

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

"É necessário olhar-se para uma colheita futura, não importa quão distante possa estar, na qual se haverá de colher algum bom fruto, algum bom resultado."

Charles Darwin

A meu pai por me haver despertado o gosto pela ciência e pelo contínuo incentivo a perseverar neste caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar o presente trabalho, desejo registrar minha profunda gratidão a todas as pessoas e instituições que colaboraram,- das mais diversas maneiras, para sua realização.

Ao Prof. Dr. Milden Rodrigues de Santa Rosa, meu orientador, pela confiança e oportunidade concedidas sem as quais não poderia iniciar esta pesquisa.

Ao Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, especialmente através da pessoa de seu Chefe, Prof^a. Dr^a. Maria Evangelina Ferreira Fonseca, pelas facilidades e recursos materiais e científicos oferecidos, pela afetuosa acolhida e constante apoio proporcionados.

A meus pais pelo esmero em educar-me, pela consagração ao norteamento dos caminhos para a segura edificação de uma consistente formação humana, pela prestimosidade e amor infindos, lhes lego os méritos do êxito aqui alcançado.

A meu marido Mario José Banaggia Olivieri pelo auxílio nas coletas de campo e trabalho de datilografia, por seu carinho, amor e verdadeira amizade que continuamente presentes ao longo desses anos de convívio têm propiciado o sustento aos anseios, o amparo as dificuldades e o impulso para a conquista dos ideais almejados.

Aos sinceros amigos Deise Dias Rêgo Henriques, Rita de Cassia Martins Rodrigues Martha, Roxana Patrícia Belido Bernedo, Terezinha Teixeira Alves, Luiz Henrique Stowas-

ser Santos , Edivar Heeren de Oliveira, José Mauro Lopes dos Reis, Jorge da Conceição Marques e José Lionello Manuzi que, unificados na mesma profissão, encorajam-me com seu intenso carinho e permanente estímulo.

Aos biólogos Inácio Domingos da Silva Neto e Venício Féo da Veiga pelas incontáveis horas dispensadas ao ensinamento de técnicas e manuseio de aparelhos, pela realização das micrografias eletrônicas de varredura, pelas críticas e sugestões e, finalmente, pela estima a mim dedicada.

Aos colegas do Setor de Microscopia Eletrônica Marcos De Bonis e Joana Aparecida dos Santos pela convivência agradável que contribuiu para um melhor desenvolvimento deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer a Profa. Elizabeth Baldo Correia, dedicada amiga, pelo repetido empenho em assistir-me, com presteza e cuidado, em tantos momentos.

À Profa. Dra. Lycia de Brito Gitirana do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que gentilmente dispôs de seu tempo na tradução da bibliografia em alemão, sem a qual teria-se comprometido o entendimento de grande parte deste estudo, pelo uso do equipamento para microfotografia, pelo exemplo e incentivo profissionais e, conjuntamente com Katia Regina Motta de Oliveira, pelo abrolhar de harmoniosa amizade.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na pessoa de seu Chefe Prof. Dr. Wanderley de Souza, pelo auxílio concedi-

do através do acesso e da utilização de suas instalações nas preparações para microscopia eletrônica de varredura, com especial menção ao técnico Sebastião da Cruz pela amabilidade e atenção.

Ao Prof. Dr. Pierre de Puytorac Diretor do Laboratório de Zoologia e Protistologia da Universidade Blaise Pascal Clermont II (França) pelas sugestões, esclarecimentos e envio de diverso material bibliográfico que concorreram para o enriquecimento desta dissertação.

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na pessoa da Profa. Dra. Rosa da Glória Brito Oliveira, pela cessão do equipamento para microfotografia.

Às biólogas Lilian Paglarelli Bergqvist, Márcia Gomide da Silva Mello e Maria de Fátima Knaippe Dibe pelas inúmeras recomendações e elucidações das muitas dúvidas, que tanto ajudaram para a melhor execução deste trabalho.

Aos técnicos Paulo Roberto de Andrade Rios e Celso Fanssini pelo desvelo durante a confecção das figuras aqui apresentadas.

Ao desenhista Luiz Antônio da Costa Alves pelo zelo na elaboração dos desenhos deste trabalho.

À bióloga Denise Pinheiro Costa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro que amavelmente identificou os espécimes de musgos ora utilizados.

Aos professores, funcionários e colegas alunos do Curso de Pós-graduação em Zoologia, que de variadas

formas participaram e cooperaram para o aprimoramento de minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro conferido sob a forma de bolsa de mestrado.

RESUMO

Exemplares de alguns dos ciliados mais representativos e abundantes foram selecionados da massa d'água obtida, a partir da coleta e hidratação em laboratório de dois musgos, *Sematophyllum subsimplex* e *Barbula* sp., da localidade de Corrêas (Petrópolis, Rio de Janeiro). Para seu estudo lançamos mão de observações dos organismos vivos, assim como de preparações para microscopia fotônica (Protargol de Bodian e Reação Nuclear de Feulgen) e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão convencionais. Foram analisados e descritos caracteres morfológicos e alguns aspectos ultraestruturais, sendo estes então comparados com os já expostos na literatura. Com os resultados assim alcançados, três espécies de ciliados puderam ser reconhecidas: *Epispathidium amphoriforme* (Greeff, 1888); *Urostyla grandis* Ehrenberg, 1838 e *Steinia quadrinucleata* Dragesco & Njiné, 1971.

ABSTRACT

Specimens of some of the most representative and abundant ciliates were selected from the water mass obtained through the collection and hydration in laboratory of two mosses, *Sematophyllum subsimplex* and *Barbula* sp., found in Corrêas (Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil). Observations of life organisms, as well as of preparations for light microscopy (Bodian's Protargol and Feulgen's Nuclear Reaction), standard scanning and transmission electron microscopy were employed. Morphological characteristics and some ultrastructural aspects have been analysed, described and compared with those already presented in the literature. In this way, the results obtained brought us the recognition of three ciliate species: *Epispathidium amphoriforme* (Greeff, 1888); *Urostyla grandis* Ehrenberg, 1838 and *Steinia quadrinucleata* Dragesco & Njiné, 1971.

INDICE

	Página
AGRADECIMENTOS -----	vii
RESUMO -----	xi
ABSTRACT -----	xii
INTRODUÇÃO -----	1
1 - Considerações Gerais -----	1
1.1 - Condições de Vida- -----	1
1.2 - Aspectos Morfológicos -----	3
2 - Méritos-----	11
3 O Trabalho -----	14
MATERIAL E MÉTODOS -----	17
1 - Material -----	17
2 - Métodos -----	18
2.1 - Coleta e Estocagem dos Musgos -----	18
2.2 - Desencistamento e Triagem dos Ciliados -----	18
2.3 - Observação dos Organismos Vivos -----	21
2.4 - Técnicas Empregadas -----	22
a) Em Microscopia Fotônica -----	24
a.1) Protargol de Bodian -----	24
a.2) Reação Nuclear de Feulgen -----	28
b) Em Microscopia Eletrônica -----	30
b.1) Microscopia Eletrônica de Varredura -----	30
b.2) Microscopia Eletrônica de Transmissão -----	32
2.5 - Análise e Registro das Preparações -----	36
O AMBIENTE MUSCÍCOLA -----	40

POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO -----	47
ESTUDO MORFOLÓGICO -----	48
1 - <i>Epispathidium amphoriforme</i> (Greeff, 1888) -----	48
1.1 - Descrição -----	48
1.2 - Discussão e Conclusão -----	50
2 - <i>Urostyla grandis</i> Ehrenberg, 1838 -----	66
2.1 - Descrição -----	66
2.2 - Discussão e Conclusão -----	69
3 - <i>Steinia quadrinucleata</i> Dragesco & Njiné, 1971 -----	80
3.1 - Descrição -----	80
3.2 - Discussão e Conclusão -----	82
COMENTÁRIOS FINAIS -----	92
BIBLIOGRAFIA -----	93

INTRODUÇÃO

1 - Considerações Gerais:

Excetuando-se um número comparativamente pequeno de formas grandes, os protistas não podem ser observados a simples vista. Devido a este fato, estes organismos só vieram a ser conhecidos posteriormente a invenção do microscópio fotônico (KUDO, 1985). Muitos foram os pesquisadores que se empenharam no estudo da protistologia. Autores como Antoni van Leeuwenhoek, que a partir de 1674 investigou os primeiros protistas livres de água doce entre os quais muitos ciliados (KUDO, 1985), foram pioneiros em trabalhos elaborados com figuras e descrições válidas até a atualidade.

Tendo aparecido sobre a superfície de nosso planeta aos 2 bilhões de anos e nela permanecido durante pelo menos mais 1 bilhão de anos sozinhos com as bactérias, os protistas puderam diversificar suas formas, seus ciclos e seu metabolismo e ocupar todos os nichos ecológicos possíveis de se encontrar. Posteriormente, com o surgimento e o desenvolvimento dos organismos pluricelulares novos nichos foram criados e puderam ser explorados. Os protistas atuais são representantes de diferentes grupos de seres unicelulares que não evoluíram para formas pluricelulares. (PUYTORAC *et al.*, 1987).

1.1 - Condições de Vida:

Os ciliados constituem um notável grupo de organismos protistas com quase 8.000 espécies que, como tais, estão dotados de uma estrutura eucariótica, unicelular e microscópica. Encontrados nos mais variados tipos de habitat e com ampla distribuição geográfica, desde as regiões polares até as equatoriais e do nível do mar até as altas montanhas, parecem possuir uma ampla tolerância e intensa potencialidade para adaptar-se às impostas mudanças dos fatores ambientais. Abundantes são os ciliados que vivem nas massas de água doce, água salobra e água salgada, onde participam como seres planctônicos, epibentônicos ou intersticiais. Há os que habitam meios inóspitos como as fontes termais e as salinas. Destacam-se ainda os edáficos e os sapróbios, tendo outros por moradia a manta das florestas, a casca de árvores, os musgos, os líquens e as turfas.

Possuidores de uma incrível diversidade evolutiva (CORLISS, 1979a), seus representantes são na grande maioria seres de vida livre vágéis, somente alguns vivendo fixados a corpos inertes. Não são poucas as espécies que residem sobre ou no interior dos corpos de outros organismos sob a condição de comensais, simbiontes e até mesmo parasitas. Estas, como formas epizóicas e epifíticas, podem ter natação própria ao modo sedentário e prender-se a seu substrato por meio de botões, discos ou ventosas adesivas. Ainda podem fixar-se permanentemente de maneira séssil ou utilizando-se habitualmente de pedúnculos únicos ou ramificados, contráteis ou rígidos, de sorte que desfrutam de estágios larvares migratórios livre natantes. Muitas das últimas são indivíduos solitários, contudo há aquelas que estabelecem colônias mono-

mórficas ou polimórficas nas quais pode-se evidenciar a divisão de tarefas. Alojaram-se em invertebrados e vertebrados pertencentes a variados grupos zoológicos como: turbelários, cnidários, moluscos, anelídeos, crustáceos, insetos, equinodermos, protocordados, peixes, anfíbios e numerosos mamíferos (cobaias, capivara, anta, cavalo, porco, hipopótamo, ovelha, boi, elefante, gorila, homem etc.). Algumas foram observadas vivendo como endoparasitas de outros ciliados, enquanto outras em relações de hiperparasitismo. Os conhecidos como parasitas podem possuir estruturas desenvolvidas para a fixação e para a nutrição, e ter um ou mais hospedeiros que servem as diferentes etapas de seu ciclo de vida. Notadamente, certos ciliados abrigam bactérias endobiontes ou epibiontes e clorelas ou xantelas simbiotes.

Sendo heterótrofos e frequentemente predadores vorazes, diversificaram suas fontes de obtenção de alimento onde assinalam-se: os carnívoros, vez por outra canibais; os fitófagos; os histiófagos; os bacteriófagos e os saprozóicos. A captura do alimento manifesta-se por ingestão direta do nutriente através da boca, por endocitose (fagocitose ou pinoctose) ou, à feição osmotrófica, mediante a simples absorção das partículas alimentares dissolvidas no meio.

1.2 - Aspectos Morfológicos:

Usufruem os ciliados de uma célula-corpo inteiro que efetua todas as funções comumente inseparáveis da concepção de vida. Análogas aos órgãos dos demais organismos pluricelulares viventes são suas organelas. Estas se diferen-

ciaram e aperfeiçoaram-se através de um longo processo de evolução orgânica, culminando em um estágio de organização corporal excepcional.

Ostentando inúmeras formas (CORLISS, 1979b; DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS, 1986; KAHL, 1930 - 1935 e SMALL & LYNN, 1985), seu corpo pode estar comprimido dorsoventralmente ou lateralmente; ser cilíndrico, elipsóide, ovóide, esférico, piriforme, reniforme, vermiforme, campanuliforme entre outros; exibir tentáculos apreensores e suctoriais, ora digitados ou fasciculados; desenvolver ligeira ou forte "cefalização" e ter colorido característico produzido pela presença de corpúsculos pigmentares. Usualmente ocorrem revestimentos de natureza proteica ou gelatinosa, como tubos e loricas, ou carapaças de placas calcáreas que podem estar ornamentados e se modificar com o decorrer do ciclo de vida. Surgem, também, membranas exteriores à plasmalema e endoesqueletos de placas polissacarídicas ou de espículas calcáreas.

Os cílios, característica do grupo, constituem estruturas de função locomotora, captadora de alimentos e receptora de estímulos. Raros são aqueles ciliados destituídos deles na superfície de seu corpo. Ainda assim os indivíduos glabros só o são durante determinadas fases de seu ciclo de vida, quando nestas tornam-se imóveis e nutrem-se, entre outras maneiras, graças ao uso de organelas suctoriais.

O conjunto de cílios do corpo compõe a chamada ciliatura somática. Esta, sempre refletindo a conformação distintiva de cada espécie, pode se diferenciar em menor ou maior grau. Pode ser densa e uniforme, revelando a presença de fileiras longitudinais, as cinécias, que recobrem toda a

extensão da célula (Figura 1). Pode ser desigualmente distribuída e com marcada tendência a redução do seu quantitativo, seja pela sua fragmentação a pequenos agregados ciliares de estrutura bem definida, os cirros, que consistem de pequenas placas de várias fileiras curtas e paralelas de cílios que funcionam como uma unidade, ou pela simples restrição de seu panorama a diminutas e esparsas cerdas sensitivas. Por conseguinte há o surgimento de amplas áreas desnudas e uma inerente delimitação das porções ciliadas (Figura 2).

Para a melhor compreensão do alto grau de complexidade estrutural alcançado pela ciliatura, devemos considerar que cada cinécia ou cirro não abrange somente os cílios que os compõem, mas também estruturas subpelículas (a infraciliatura) como o cinetosomo, dito corpo basal do cílio, (Figuras 1, 3 e 4) e seus derivados fibrilares (Figuras 1 e 4). De cada um dos vários cinetosomos, estrutura cilíndrica formada por 9 triplets longitudinais de microtúbulos numerados no sentido horário (na sua extremidade proximal) ou anti-horário (na sua extremidade distal) (Figura 1), partem, de modo geral, 3 tipos básicos de derivados. Dos triplets 3 e 4 (até o 5) saem as fibras transversas; do 5 ao 8 parte a fibra cinetodesmal; e do 9 as fibras pós-ciliares (CORLISS, 1979b; GRAIN, 1969 e PUYTORAC, 1970) (Figura 1). Estes se espalham em caminhos definidos através do córtex (ectoplasma) da célula formando, abaixo da película (membrana plasmática), uma rede ou sistema fibrilar ectoplasmático (Figura 4). Nas várias espécies estes derivados podem se desenvolver diferentemente, classificando o tipo de sistema fibrilar encontrado. Por exemplo, a presença de um sistema do tipo cinetodesmal ou

de um tipo pós-ciliar é registrada quando há o desenvolvimento de um destes derivados longitudinais (SERAVIN & GERASSIMOVA, 1978).

A ciliatura oral tende a aperfeiçoar-se com o incremento de sua eficácia para a apreensão do alimento. Podendo ser em alguns casos inexistente, é, em verdade, pouco a pouco diferenciada a partir da ciliatura somática (Figura 1). Ocorre dos cílios proximais à área oral se arranjam de modo mais ou menos distinto daquele de suas cinécias (Figura 1), quando então promovem o estabelecimento de muitas variáveis que estendem-se desde a criação de uma ou mais cinécias periorais (Figura 1), por sua simples compactação ou por sua diferenciação a nível estrutural, até a formação, em estágios mais complexos, de organelas ciliares altamente elaboradas que tornam nítida e indubitável a presença de um singular aparato de ingestão (Figura 2).

De quando em vez ausente, a boca ou citóstoma expõe-se como uma estrutura apical superficial, permanentemente aberta, também virtual, ou, de outro modo, disposta ao fundo de uma invaginação de uma parte da porção anterior do corpo, o vestíbulo. Propensa à ventralização, desenvolveu-se até compor uma cavidade bucal verdadeira, bem configurada, o perístoma. Seguindo-se a ela, em umas tantas espécies, toma lugar uma cavidade adornada com elementos esqueléticos, a citofaringe. Da mesma forma, em determinados grupos, foi assinalada a existência de um tipo de trato digestivo portador de esôfago, saco digestivo e divertículo retal. Este conectaria o citóstoma ao citoprocto (PUYTORAC *et al.*, 1987). É através do citoprocto, o ânus celular, que os ingestos são expelidos

ao meio circundante.

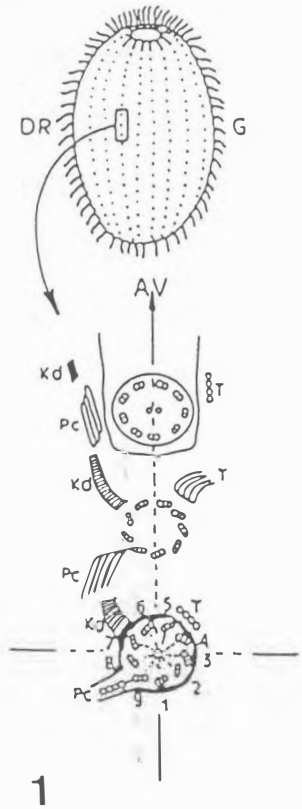
Habitualmente, acham-se, subjacentes à plasma-
lema, um grande número de organelas secretoras, os extruso-
mas. Estes, de papel e estrutura diversificados, produzem e
eliminam, entre outras, substâncias paralizantes e citolíti-
cas (como nos toxicistos) para proteção, defesa e captura de
presas, e muco (nos mucocistos) cuja ação parece igualmente
contribuir para a elaboração de cistos (CORLISS, 1979b e PUY-
TORAC *et al.*, 1987). Seus tipos e distribuição têm um valor
potencial na sistemática e filogenia dos ciliados (CORLISS,
1979a).

Sendo, em geral, heterocarióticos, os protistas
ciliados exibem a coexistência de dois tipos de núcleo, o ma-
cronúcleo e o micronúcleo, que podem estar separados ou reu-
nidos em um envoltório comum. O macronúcleo (núcleo somático
ou vegetativo) mostra-se tipicamente como uma estrutura de
grande proporções dentro da célula, constituindo uma massa
única ou multipartida. Algumas das muitas feições adotadas
por ele são: a forma esférica; de fita; de rosário; de ferra-
dura; de coroa; de foice; de X ou de H. Rico em RNA, graças a
uma síntese ativa, tem configuração heterômera ou homômera,
podendo haver ou não a formação de bandas de reorganização
durante a replicação do DNA. Sua guarnição cromossômica é di-
plóide ou poliplóide. Atua sobre a vida vegetativa do ciliado
e estabelece seus caracteres fenotípicos. Dividi-se em alguns
grupos por uma falsa mitose (com a repartição desigual do
DNA) enquanto, em outros, origina-se a partir da diferencia-
ção de certos micronúcleos. Ainda que existam espécies ami-
cronucleadas, o micronúcleo difundiu-se copiosamente por en-

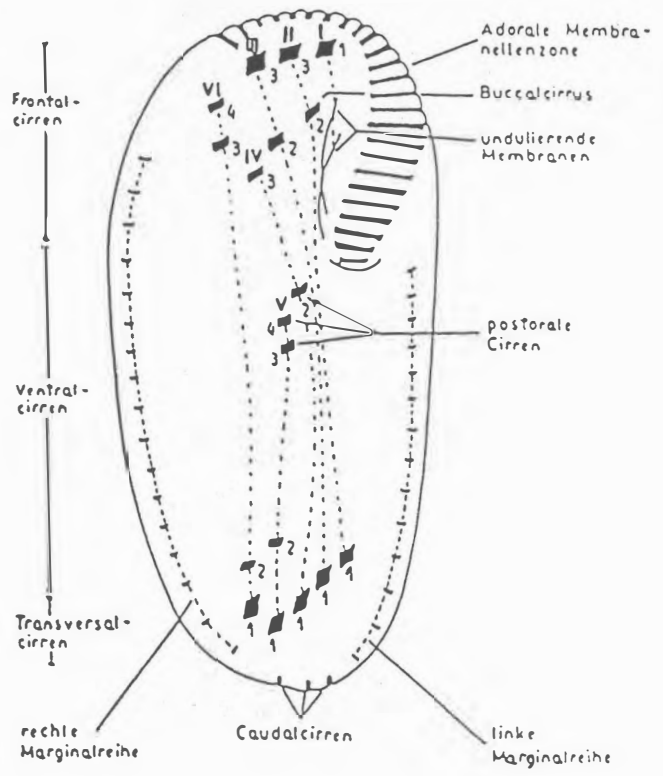
tre os ciliados, sempre como uma ou mais pequeninas esferas parcas em RNA. De constituição hereditária diplóide, incomumente poliplóide, o micronúcleo (núcleo gamético ou reprodutor) se divide por criptomitose acêntrica ou por meiose. Tem assinalado valor no decorrer da reprodução sexuada, quando garante a perpetuação do patrimônio genético original. Por outro lado, serve em diferentes graus a reprodução assexuada e ao desenrolar da vida vegetativa.

Disseminada entre todos os ciliados e condição única para alguns, a reprodução assexuada processa-se por bipartição igual ou desigual através de uma constrição perpendicular ao eixo antero-posterior do corpo que marca o aparecimento de um tomito anterior, o proter, e outro posterior, o opisto, homotéticos ou heterotéticos entre si. Outrossim, manifesta-se por palintomia, estrobilação ou brotamento. A reprodução sexuada, efetuada por muitos, se dá por autogamia e, mais frequentemente, por conjugação.

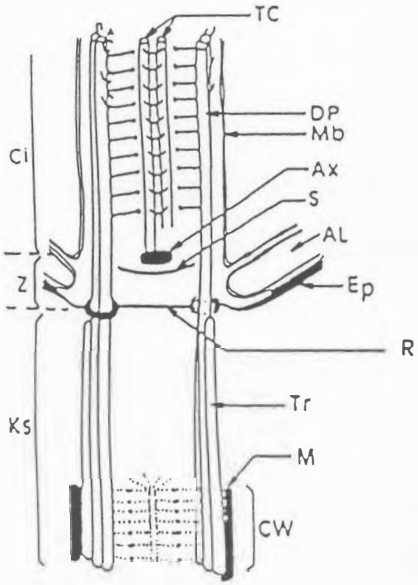
Há, com elevada frequência, um vacúolo contrátil, na maioria das vezes posterior, que rejeita os líquidos corporais através de um ou mais poros vacuolares. Os aspectos ultraestruturais destas organelas podem ter significância na taxonomia dos ciliados (CORLISS, 1979a).



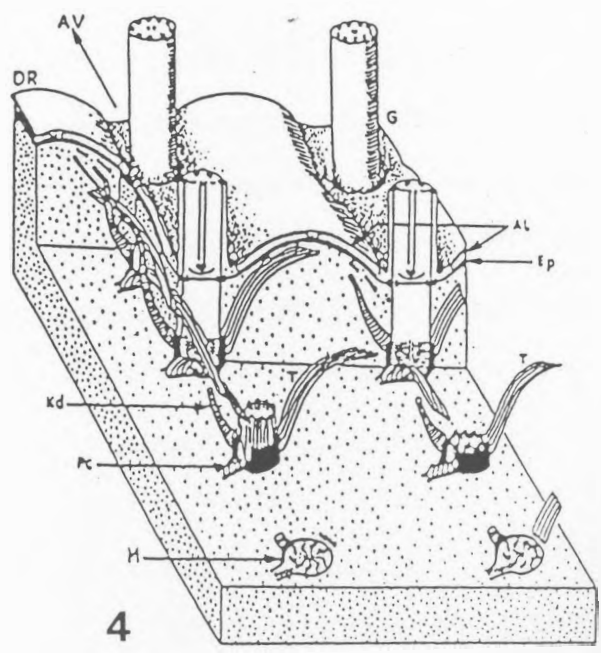
1



2



3



4

Figura 1: Esquema geral da organização da ciliatura em um ciliado. Vista geral do percurso das cinécias (no alto) e dos sistemas fibrilares associados aos cinetosomos (embaixo). AV - anterior; DR - direita; G - esquerda; Kd - fibra cinetodesmal; Pc - fibras pós-ciliares; T - fibras transversas. (PUYTORAC *et al.*, 1987).

Figura 2: Designação e caracterização da ciliatura de um *Hypotrichida*. I - VI: caracterização e numeração da disposição dos cirros. 1 - 4: numeração dos cirros em cada disposição. Lê-se de cima para baixo e da esquerda para direita: cirros frontais; cirros ventrais; cirros transversais; fileira marginal direita; cirros caudais; zona adoral de membranelas; cirros bucais; membranas ondulantes (parorais); cirros pós-orais; fileira marginal esquerda. (HEMBERGER, 1982).

Figura 3: Corte longitudinal do cílio e do cinetosomo. AL - alvéolo cortical; Ax - axosomo; Ci - cílio; CW - zona do cartwheel; DP - diplet periférico; Ep - epiplasma; Ks - cinetosomo; M - capa densa; Mb - membrana celular; R - placa em roseta; S - septo; TC - túbulos centrais; Tr - triplet; Z - zona de transição. (PUYTORAC *et al.*, 1987).

Figura 4: Reconstituição espacial dos sistemas fibrilares cinetosomianos de *Tetrahymena piriformis*. AL - alvéo-

los; AV - anterior; DR - direita; Ep - epiplasma; G - esquerda; Kd - fibra cinetodesmal; M - capa densa; Pc - fibras pós-ciliares; T - fibras transversas. (PUYTORAC *et al.*, 1987).

2 - Méritos:

Os ciliados demonstram sob os olhos mais despercebidos uma fictícia simplicidade que dissimula sua verdadeira complexidade estrutural. Conhecer apropriadamente sua biologia não é um fim por si só, mas, muito além disto, é um meio de se alcançar o discernimento mais amplo em muitas outras áreas da pesquisa científica.

Em uma percepção mais clara vemos que o próprio conhecimento da história evolutiva da vida na Terra e da origem dos organismos pluricelulares pode ser apoiado, em diferentes graus, no estudo dos protistas. Através de pesquisas no campo das relações entre epibiontes e endobiontes comuns a espécies hospedeiras diferentes, muitas vezes de distintos habitats, são reunidas informações sobre as possíveis relações filogenéticas existentes e características ambientais do planeta no passado (KUDO, 1985).

Dentro das comunidades vivas a importância dos ciliados tem se refletido sobre as cadeias tróficas onde servem de alimento a inumeráveis grupos, contribuindo, entre outras maneiras, para a manutenção da dinâmica de variados ecossistemas e para o incremento de seus recursos. Sua utilização como indicadores biológicos dos solos (FOISSNER, 1987), da poluição das águas (BICK, 1972; FOISSNER, 1987 e PUYTORAC *et al.*, 1987), do pH e umidade de ambientes muscícolas (WENZEL, 1953); sua ampla distribuição nos corpos de água doce - fontes de abastecimento de água potável ao homem; assim como o seu papel indireto na purificação de águas estagnadas, quando controlam a densidade das bactérias saprófagas, impe-

dindo que altos níveis populacionais cessem a reprodução destas e gerem o conseqüente aumento das taxas de matéria orgânica em decomposição (KUDO, 1985), comprovam algumas das aplicações práticas das investigações sobre estes organismos.

Por manifestarem em sua célula-corpo toda a gama de fenômenos inerentes à vida, pelo seu rápido ciclo biológico, pelo breve espaço de tempo entre gerações subsequentes e por sua fácil manipulação e conservação em laboratório, prestam-se como modelos experimentais em miniatura de densa amostragem populacional.

Ao imaginar-se que alguns ciliados são causadores de doenças, não se deve descartar o indispensável conhecimento daqueles que vivem livremente. Para KUDO (1985) no âmbito da parasitologia faz-se necessário o entendimento do contexto global em que se inserem os protistas, uma vez que se crê serem as formas parasíticas originárias das formas livres.

Finalmente, a lembrança das palavras de PUYTORAC (1988) nos faz repensar nos caminhos da protistologia no Brasil: " Indispensable est donc l'étude des Protistes dans toutes les disciplines de la biologie Le protistologue a pour tâche première de connaitre ce que sont les Protistes et de prendre conscience de ce qu'ils représentent par rapport aux organismes pluricellulaires, dans l'évolution du Monde vivant. Il a à rechercher les milliers d'espèces qui sont encore à découvrir, à multiplier le nombre d'espèces cultivables *in vitro*, à observer les particularités de telle ou telle espèce qui peuvent la rendre intéressante pour facili-

ter l'analyse de tel phénomène ou tester l'universalité de tel modèle. Molécularistes, physiologistes, généticiens, écologistes ont ensuite à en tirer parti A l'occasion de certaines 'catastrophes naturelles' telles que la récente prolifération en fleur d'eau du Protiste *Chrysochromulina polylepis* sur les côtes de la mer du Nord, on n'aura pas alors la surprise de constater qu'il n'y a en France que 'deux ou trois spécialistes seulement' capables de le déterminer et qu'on ignore tout de sa biologie".

3 - O Trabalho:

Longe de ser o presente trabalho um levantamento pormenorizado e extensivo dos grupos de ciliados encontrados em musgos, e muito menos uma análise sistemática que sem sombra de dúvida é talento para bem poucos, desejamos apenas estabelecer um reconhecimento de alguns indivíduos. Em verdade, eles representam uma pequena parcela do universo de protistas ciliados viventes em musgos. Não houve o intento de se limitar a este ou a aquele grupo, mas sim reunir informações sobre a morfologia e a ultraestrutura de algumas das espécies mais representativas e abundantes em nossas amostras. Procuramos alcançar a compreensão, se possível, de parte da totalidade das bases da existência destes organismos tão ricos em características e o aprendizado de algumas das metodologias empregadas em sua investigação.

Neste espaço estaremos melhor compondo umas tantas informações, acrescentando novos elementos e atenuando quaisquer deficiências expressas anteriormente em notas preliminares (CANHA *et al.*, 1988 e SANTOS & SANTA ROSA, 1989), elaboradas durante o desenvolver desta dissertação. Julgamos que uma vasta quantidade de frutíferos resultados são ainda viáveis, e sob nossa consideração estará a busca dos diversos outros aspectos da biologia dos ciliados aqui apresentados.

O conhecimento sobre os protistas, e em especial sobre os ciliados, é ainda bastante incompleto e obscuro nas muitas partes do mundo e mais particularmente no Brasil. Sabemos que inúmeros são aqueles habitats colonizado por ciliados e que muitos se mantêm ainda inexplorados pela ciên-

cia. A perscrutação destes ambientes, vários dos quais considerados inabitáveis, pode depender do entusiasmo e dedicação de cada pesquisador. Estamos convencidos de que um grande volume de espécies antes ignoradas poderão ser descobertas e servirão como objeto de estudos, os mais variados, abrindo o caminho para novas fronteiras do conhecimento. Há a potencialização de se revolucionar áreas como a citologia, a citoquímica e a biologia molecular. Poder-se-á reconsiderar muito do que foi feito no passado, principalmente após o avanço de técnicas como a microscopia eletrônica de transmissão, quando os ganhos alcançados se tornaram tão significativos que transformaram numerosos conceitos.

Durante longo tempo e fundamentalmente na atualidade, quando a maioria dos recursos financeiros têm sido concedidos às ciências ditas aplicadas, o interesse dos estudiosos tem permanecido sob a ótica dos méritos das pesquisas sobre protistas parasitas causadores de doenças ao homem e aos seres dos quais ele tira proveito. Esta concepção tem freado a curiosidade e o gosto por outros domínios da protistologia, e por que não dizer de quase todos os campos das ciências básicas. Porém, é fato indubitável que há neste imenso planeta uma extraordinária diversidade taxonômica a aflorar e com ela a compreensão de insólitas feições morfológicas, fisiológicas, ecológicas ou etológicas que jamais poderia supor a mente humana.

Nos anos vindouros a investigação no campo dos ciliados mostrará o quanto haverá de se revelar dados e de se instituir hipóteses, aplicando-os na inovação ou aprimoramento de técnicas e métodos ou na simples aquisição de conclu-

sões inéditas.

Nunca cessará a adição do novo aos conceitos já avaliados. Talvez seja esta a razão por que continuamente querem os cientistas saber mais quando começam a conhecer um pouco. A briga será sempre contra o tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Material:

O material de nosso estudo consistiu em três espécies de ciliados dulcícolas que vivem em musgos (Tabela 1). Vários representantes de cada espécie foram coletados, submetidos a variadas técnicas, analisados, caracterizados e então identificados.

Os musgos obtidos a partir de 12 coletas realizadas entre agosto de 1987 e dezembro de 1990 e reconhecidos como *Sematophyllum subsimplex* (família Sematophyllaceae) e *Barbula* sp. (família Pottiareae), foram encontrados na localidade de Corrêas (Petrópolis - RJ) sobre uma pedra protegida e sobre uma superfície acimentada ao nível do chão, respectivamente. O primeiro de coloração pouco viva, verde oliva, mostrou-se por muitas vezes bastante ressecado e pouco desenvolvido. O segundo, ao contrário, verde brilhante e frequentemente úmido, espalhava-se abundantemente formando um revestimento mais extenso.

O emprego de musgos como fonte de coleta de ciliados não foi prerrogativa nossa. Predecessores desta idéia foram CHACHARONIS (1956), DRAGESCO (1970), DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), FOISSNER (1986), FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975), GROLIÈRE (1974-1975, 1975, 1975-1976, 1977 e 1978), GROLIÈRE & NJINÉ (1973), KAHL (1930), MERMOD (1914), PENARD (1922) e WENZEL (1953). Muitos outros já haviam se dedicado, desde meados do século passado, a observação de ciliados em musgos do gênero *Sphagnum* constituintes das turfeiras (Ehren-

berg, 1838; Claparede & Lachmann, 1858; Stein, 1859 e 1867; Stokes, 1888; Dalla Torre, 1891; Levander, 1900; Godet, 1900 e 1901; Thiebaud & Favre, 1906; Schlenker, 1908 e Kleiber, 1911 *apud* GROLIÈRE, 1975-1976).

2 - Métodos:

2.1 - Coleta e Estocagem dos Musgos:

Várias porções dos musgos eram adquiridas despreendendo-as de seu substrato, cuidadosamente, com o auxílio de uma espátula pequena, sendo acondicionadas em sacos plásticos devidamente fechados ao término de cada coleta.

Os musgos trazidos ao laboratório eram então acomodados em recipientes plásticos numerados e posteriormente lacrados com filme transparente de PVC. Este procedimento tinha por finalidade propiciar a estocagem dos musgos pelo espaço de algumas semanas.

Dois números eram expressos a seguir da letra M (indicativa da palavra musgo). O primeiro identificava a espécie do musgo (M20 = *Sematophyllum subsimplex* e M21 = *Barbula* sp.) e o segundo a data de sua obtenção, determinando com precisão o tempo de sua estocagem no laboratório. Todos os dados referentes a cada número constam de uma caderneta de coleta.

2.2 - Desencistamento e Triagem dos Ciliados:

Sempre que necessário pequenas partes dos mus-

gos estocados eram retiradas e distribuídas no interior de diversos jogos de placas de Petri enumerados seguindo o modelo respectivo já estabelecido para o recipiente de estoque. Assim depositadas, a elas era acrescentado um pouco de água mineral (marca Petrópolis) suficiente para embebê-las e formar um filme de água com cerca de 5mm de altura. Estes jogos eram datados na ocasião da embebição para se determinar o período exato do surgimento e permanência da biocenose na massa d'água. Mantidos constantemente tampados (para evitar contaminações por cistos contaminantes), só eram abertos para permitir novos acréscimos de água mineral (à fim de preservar o volume inicial) ou durante as observações e triagens dos ciliados.

Após o decorrer de algumas horas os primeiros organismos podiam ser evidenciados. Procuramos continuamente acompanhar a evolução da comunidade muscícola para nos beneficiar do surgimento gradativo de novos ciliados e de seus "blooms" populacionais. Objetivamos otimizar o trabalho de triagem dos ciliados e possibilitar a apreensão do maior número possível de indivíduos. Obtínhamos um quantitativo expressivo de exemplares que dariam o respaldo e a validade diagnóstica aos caracteres encontrados, uma vez que aumentávamos a probabilidade da evidenciação das diferentes regiões do corpo do organismo estudado. Compensávamos, desta maneira, a grande perda inerente ao preparo dos espécimes para as técnicas de microscopia fotônica e eletrônica e o insucesso na maioria das tentativas de estabelecimento de meios de cultura. Estes foram elaborados com misturas de água mineral fervida durante alguns minutos com grãos de arroz com casca ou

de água mineral acrescida de: pedaços de alface causticado; flocos de aveia; arroz integral; ou um pouco de meio Eagle estéril (sem soro, sem antibiótico e com glutamina). Apenas com a última mistura obtivemos resultados razoáveis.

Muito embora o aproveitamento dos períodos de maior abundância de indivíduos representasse o que se considerava como o ideal para o melhor desenvolvimento de nosso trabalho de triagem, isto não invalidou o estudo daqueles que se apresentavam ocasionalmente pouco numerosos. Esta situação pôde ser facilmente contornada através do lançamento de várias porções dos musgos coletados em diferentes jogos de placas de Petri e sua imersão em água mineral em uma mesma época. Embora houvesse considerável acréscimo de tempo para que se processassem as muitas triagens ora necessárias, aumentávamos assim o número de fontes dos organismos desejados.

A triagem dos ciliados se deu por micropipetagem (com o uso de micropipetas, pipetas capilares, confeccionadas por nós pouco antes do uso) feita sob o microscópio estereoscópico American Optical 570. Os exemplares eram aspirados do interior da placa de Petri e transferidos a uma gota de água mineral contida em uma pequena saleira.

À medida que os exemplares de uma mesma espécie iam sendo micropipetados e presumíamos ter o número de espécimes almejado, a saleira era então colocada sob o microscópio estereoscópico para que procedêssemos a quantificação e observação do estado geral dos organismos apreendidos, e a certificação da ausência de dejetos ou de indivíduos pertencentes a outras espécies. Caso existissem corpos indesejáveis, efetuávamos a sua imediata retirada. Assim, repetidas ve-

zes os ciliados eram passados e repassados para novas saleiras com água mineral, até a total isenção de quaisquer impurezas.

Ao final, estando de posse de uma amostra bastante abundante em ciliados e livre das partículas inconvenientes, procuravamos concentrá-la ao máximo reduzindo o volume de água mineral disponível. Somente desta forma poderíamos pôr em execução as variadas formas de fixação inerentes as técnicas de preparação de lâminas permanentes para a microscopia fotônica ou técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Devemos assinalar que todo o material empregado na coleta e estocagem dos musgos, assim como no desencistamento e triagem dos ciliados (micropipetas, peras de aspiração, saleiras e outros) eram conservados bem limpos, livres de resíduos orgânicos que naturalmente pudessem dificultar o bom empreendimento destas etapas. Considerando-se que os ciliados são organismos muito suscetíveis ao contato com substâncias químicas tóxicas, cada utensílio foi separado segundo o seu devido uso: para amostras vivas ou para amostras a serem fixadas.

2.3 - Observação dos Organismos Vivos:

Se concretiza cada vez mais o fato de que precisam ser evitadas descrições baseadas unicamente na utilização de preparações fixadas e coradas. A pesquisa sistemática atual deve se fundamentar também em observações sobre o vivo (BERGER & FOISSNER, 1987), complementadas e precisadas por

considerações citológicas, biológicas, ecológicas e fisiológicas (DRAGESCO, 1962).

Nossas observações sobre os exemplares vivos foram realizadas sob o microscópio estereoscópico através do uso direto das placas de Petri portadoras dos musgos e de sua comunidade ou pela triagem dos ciliados para uma saleira. Quando da necessidade de uma prévia observação mais acurada com a ampliação do microscópio fotônico (Wild Leitz HM-Lux), um exame prolongado podia ser realizado utilizando-se o microaquário de TUFFRAU (1959).

2.4 - Técnicas Empregadas:

Durante muitos anos os especialistas que se consagraram à descrição dos ciliados basearam seus estudos unicamente na observação do material vivo. Apesar de ser relativamente mais difícil, devido à mobilidade desses seres e da grande transparência de certas estruturas, é a esta técnica que devemos a enorme soma de conhecimentos que são hoje a base de toda a protistologia. Os processos de fixação geravam insegurança, pois alteravam consideravelmente a forma de espécies particularmente delicadas. As preparações definitivas vieram complementar as observações sobre o organismo vivo e destinavam-se a precisar certos elementos estruturais e conservar indefinidamente as imagens, mesmo que incompletas, de uma espécie rara ou nova. Algumas destas preparações eram insuficientes e foram substituídas por outras mais precisas que tornaram possível a visualização, com nitidez, de detalhes frequentemente não visíveis no organismo vivo. Este aumento

da precisão permitiu a evidenciação dos problemas de sistemática sob um novo ângulo e gerou o entusiasmo cada vez maior pelo estudo dos organismos com o uso de preparações fixadas e coradas. (DRAGESCO, 1962).

Estamos certos de que os profícuos resultados são, em sua maioria, produto de uma coletânea de exaustiva e morosa dedicação as experimentações e a execução fiel das recomendações expressas em cada técnica a ser desenvolvida. Habitualmente nos defrontamos, mesmo que munidos de grande precaução, com fatores que suscitam diferentes respostas ao término de cada ensaio, exigindo sua repetição intensiva (como em um método de tentativa e erro) e uma constante adequação de algumas de suas etapas.

O aprimoramento da qualidade final da preparação ou o seu fracasso total podem advir da influência de elementos como a quantidade de líquido livre na amostra a ser processada, o método de fixação, a proporcionalidade entre o tamanho e o número de exemplares e o volume da substância de inclusão utilizada, o tempo de impregnação ou revelação dos corantes e contrastantes, a osmolaridade, e mesmo da qualidade da fabricação dos produtos empregados. Somam-se a estes os capazes de dissimular os mais esmerados procedimentos como o estado fisiológico dos organismos, seu tamanho e forma, e a variabilidade individual dentro da espécie.

De forma geral, as técnicas aqui empregadas são caprichosas e raramente objetivam a visualização dos mesmos aspectos. Foram então usadas em associação, complementando e esclarecendo informações, que adicionadas formaram o conjunto de dados apresentados.

Todas as técnicas ora descritas foram postas em prática através da micropipetagem dos ciliados sob o microscópio estereoscópico American Optical 570 . Comuns foram as ocasiões onde necessitamos siliconizar as micropipetas e sa- leiras empregadas nas etapas posteriores a fixação dos espécimes. De outro modo estes eram perdidos ao se aderirem vigorosamente à superfície daqueles objetos.

A mistura das substâncias necessárias ao cumprimento de cada uma das etapas constituintes das várias técnicas foi confeccionada por nós seguindo os critérios prescritos na literatura para um melhor aproveitamento de suas propriedades. À medida que, para cada espécie, muitas lâminas deviam ser processadas nas diversas técnicas, apenas as substâncias de alto custo financeiro, de difícil obtenção ou de eficácia prolongada eram reutilizadas ao máximo, sendo as demais descartadas a cada passagem de no máximo três lâminas.

a) Em Microscopia Fotônica:

a.1) Protargol de Bodian:

* Considerações Gerais:

"La technique au Protargol n'est pas destinée à remplacer les imprégnations argentiques classiques. Le protéinate d'argent met en valeur des structures très diverses. C'est certainement la technique de coloration la plus complète, la seule même qui mérite le nom d'universelle" (DRAGESCO, 1962).

Embora frequentemente mostre com clareza organelas como o aparelho nuclear, vacúolos contráteis e digestivos, variadas inclusões citoplasmáticas e até cinetosomos, esta técnica evidencia como um todo a ciliatura somática e oral dos ciliados.

Desenvolvida por BODIAN (1936 e 1937) para impregnação pela prata do tecido nervoso, ela foi modificada por KIRBY (1950) para sua aplicação em protistas e, mais tarde, por diversos autores para ciliados. Foi estabelecido um maior número de substâncias fixadoras, a inclusão de células livres em gelatina, albumina ou gelose e um tratamento de clarificação.

Compreendemos que é difícil controlar completamente o curso da impregnação assim como obter resultados constantes (BODIAN, 1937), embora consideremos que estes são, antes de tudo, dependentes da maneira pela qual o experimenter pode adaptar uma técnica ao caso de cada espécie, da qual as diretrizes permanecem constantes, mas as variantes autorizam uma flexibilidade de aplicação inegável (TUFFRAU, 1967).

Basicamente as alterações realizadas por DRAGESCO (1962) e TUFFRAU (1964 e 1967), foram amplamente executadas em nossos ensaios. Do primeiro, mantivemos o método de clarificação pelo permanganato de potássio e ácido oxálico. Do segundo, o recurso simplificado de suprimir etapas críticas e onerosas como o emprego do proteinato de prata à quente ou ativado com cobre metálico e o banho em cloreto de ouro.

Pudemos alcançar alguns bons resultados, pois tal escolha é para certos casos um tratamento rápido, sim-

ples, eficiente e com menor risco de escurecimento irreversível mesmo que, para outros, seja insuficiente, por não clarificar devidamente, e impróprio por diminuir o contraste e a evidenciação de detalhes finos (TUFFRAU, 1964 e 1967).

*** Procedimento:**

Fixamos os ciliados vertendo a solução fixadora rapidamente e de uma só vez sobre a amostra. O volume de fixador utilizado era cerca de 5 vezes maior que o volume de água da amostra contida na saleira. Como soluções fixadoras foram empregadas o Bouin aquoso, o Bouin alcoólico, o Champy, tetróxido de ósmio à 2% (seus vapores) ou glutaraldeído à 2,5% em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio à 0,1M pH 7,2 (concentrações finais). Este último, em casos do uso de parte da amostra, também no preparo de exemplares para a microscopia eletrônica de varredura. Deixamos fixando por 5 a 10 minutos.

Retiramos os ciliados, pipetando-os e repassando-os para nova saleira contendo água destilada. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, ou até que toda a solução fixadora fosse eliminada.

Os exemplares foram então aspirados com um mínimo de líquido, e depositados ao centro e sobre uma lâmina de vidro bem limpa, desengordurada e atritada.

Após a retirada do excedente de água que circundava os ciliados na gota então formada, acrescentamos a ela uma a duas gotículas de albumina glicerinada. Homogenei-

zamos a mistura promovendo (com a ajuda de um estilete fino) movimentos circulares e agitando a lâmina durante algum tempo. Suprimimos possíveis bolhas de ar e qualquer excesso da albumina glicerinada, inclinando ligeiramente a lâmina e sorvendo-os cuidadosamente.

Para a coagulação da albumina a lâmina foi ligeiramente aquecida em uma placa térmica por uns 10 minutos. Por sobre a amostra foi adicionada uma pequena gota de uma solução de etanol 70°GL com formol P.A. (8:2).

Sem deixar secar completamente, mantivemos a lâmina por mais algum tempo sobre a placa térmica, propiciando a evaporação da mistura etanol-formol. Imediatamente a seguir, ela foi colocada em um Borrel com etanol 95°GL, aí podendo permanecer por vários dias, ou promovemos uma reidratação da amostra através da retirada de todo o etanol-formol com um banho de 5 minutos em água destilada.

Posteriormente iniciamos a etapa de clarificação com um banho em uma solução aquosa de permanganato de potássio à 0,5% por 2 a 5 minutos ou até que a amostra adquiri-se uma coloração amarelo ouro. Depois lavagem em água corrente durante 10 minutos e em água destilada com duas imersões de 2 minutos cada. Demos continuidade à clarificação com um banho em ácido oxálico à 5% por de 1 a 3 minutos ou até atingir a descoloração da albumina, quando esta tornava-se esbraquiçada. Nova lavagem em água corrente por 10 minutos e em água destilada com duas imersões de 2 minutos cada.

A impregnação com sais de prata foi feita com a permanência da lâmina em proteinato de prata à 1% (marca Roques) à temperatura ambiente e na obscuridade por um período

de 12 horas a 16 horas. Depois de breve passagem em água destilada, iniciamos a redução da prata (etapa de revelação), com um banho rápido em hidroquinona em solução aquosa à 1% com sulfito de sódio à 5%, e sua interrupção pela imersão em água destilada. Com o acompanhamento, ao microscópio fotônico, a coloração desejada pôde ser alcançada pela repetição do processo de revelação (para uma cor mais escura) ou pelo uso de tiosulfato de sódio à 5% durante de 5 a 10 minutos ou mais (para a obtenção de uma cor mais clara).

Ao final processamos a desidratação por uma série crescente de etanóis (30°GL, 50°GL, 70°GL, 80°GL, 90°GL, 95°GL, 100°GL, 100°GL), por 5 minutos em cada um. Levamos a lâmina a dois banhos consecutivos de xilol ou toluol por 2 minutos cada. Montamos a amostra entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá, e secamos a preparação na estufa à 60°C durante 2 dias.

a.2) Reação Nuclear de Feulgen:

* Considerações Gerais:

Completando as informações oferecidas pelas preparações para morfologia externa, que mascaram frequentemente o aspecto do aparelho nuclear, a técnica de FEULGEN (1926) evidencia-o claramente. Através da reação com a fucsina básica do reativo de Schiff (ácido fucsínico sulfuroso) há a coloração do ácido ribonucleico constituinte da cromatina fazendo a massa nuclear adquirir uma tonalidade intensa, vermelho violeta.

Nossa metodologia baseou-se naquela narrada por BEÇAK & PAULETE-VANRELL (1970) adaptando-a e controlando o tempo ideal da hidrólise ácida para o uso em células isoladas fixadas e aderidas pelo método de NISSENBAUM (1953).

Para o preparo do reativo de Schiff procedemos segundo o modo exposto por FERNANDES (1949). Excetuou-se o fato de acrescentarmos mais um grama de metabissulfito de potássio e de utilizarmos carvão ativado, como em BEÇAK & PAULETE-VANRELL (1970).

*** Procedimento:**

Uma gota da amostra concentrada de ciliados foi depositada sobre uma lâmina de vidro limpa e desengordurada. Diretamente sobre ela, utilizando uma pipeta Pasteur, despejamos uma farta gota do fixador de Nissenbaum preparado pouco antes do uso. Ao iniciar a movimentação do fixador vertemos o restante deste, agora com a pipeta disposta rente a superfície da lâmina, até inundá-la completamente. Deixamos secar de um dia para outro à temperatura ambiente.

Após um banho em etanol 70°GL iodado por de 3 a 4 minutos e lavagem em etanol 70°GL durante 5 minutos, realizamos a hidrólise branda. Esta foi feita imergindo-se a lâmina por 12 minutos em ácido clorídrico à 1N pré-aquecido em estufa à 60°C.

Interrompemos a hidrólise mergulhando a lâmina em água destilada fria, depois esta foi deixada por 3 horas no reativo de Schiff na obscuridade e à temperatura ambiente.

Com um banho em água destilada eliminamos o ex-

cesso do reativo e prosseguimos com 3 banhos consecutivos em água sulfurosa recém-preparada por 2 minutos em cada passagem.

Posteriormente a uma lavagem prolongada (10 minutos) em água corrente e outra rápida em água destilada (2 minutos), desidratamos através de uma série crescente de etanóis (30°GL, 50°GL, 70°GL, 80°GL, 90°GL, 95°GL, 100°GL, 100°GL) mantendo a lâmina por 2 minutos em cada banho.

Finalizamos com duas passagens no xilol ou toluol durante 3 minutos cada, montagem entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá e secagem da preparação em estufa à 60°C durante 2 dias.

b) Em Microscopia Eletrônica:

b.1) Microscopia Eletrônica de Varredura:

* Considerações Gerais:

A microscopia eletrônica de varredura, com sua imagem estereoscópica e informações detalhadas sobre a superfície do material estudado, acrescentou acuidade à análise dos caracteres morfológicos externos, ressaltando aspectos antes não evidenciados ou simplesmente confirmando a presença daqueles já conhecidos. Propiciou resultados rápidos, eficientes e bastante precisos facilitando a interpretação de figuras artefactuais criadas pela microscopia fotônica, como superposições e sombreamentos que podem confundir o observador.

A parte mais crítica da investigação com o microscópio eletrônico de varredura é a preparação adequada dos espécimes que, frequentemente, representa o fator limitante da qualidade da micrografia (POSTEK *et al.*, 1980). De forma geral o procedimento escolhido seguiu a metodologia e as recomendações empregadas rotineiramente em nosso laboratório, às quais somamos aquelas apregoadas por SILVEIRA (1989).

Servimo-nos no decorrer da preparação das amostras do aparelho de ponto crítico CP-D 020 e do sputtering FL 9496, ambos da Balzers Union.

*** Procedimento:**

Os ciliados foram fixados em saleira com glutaraldeído à 2,5% em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio à 0,1M pH 7,2 (concentrações finais) durante 30 minutos à fim de tornar os exemplares bem resistentes. Um volume abundante do fixador foi derramado de uma só vez sobre a amostra.

Sendo nosso material de estudo células isoladas, após três lavagens com um dos tampões já mencionados, utilizamos como seu substrato definitivo um fragmento de lâmina de vidro cortado com lápis de diamante. Este foi limpo e desengordurado com acetona comercial, seco por evaporação natural. Em seguida sobre ele foi colocada e espalhada uma gota de uma solução aquosa de poli-L-lisina à 0,1% (MARCHANT & THOMAS, 1983). Após o excesso da solução ter sido retirado e devolvido ao frasco de estoque, depositamos uma gota repleta em ciliados sobre o fragmento e por 30 minutos aguardamos

a sedimentação e a adesão dos exemplares. Para evitar qualquer dessecação do líquido circundante ou deposição de partículas de poeira, ele foi mantido no interior de uma pequena placa de Petri, a qual foi acondicionada dentro de uma câmara úmida (confeccionada com porções de algodão embebido em água cobertas por uma pequena campânula de vidro).

Quando aleatoriamente não foi permitido o assentamento dos espécimes em diversas orientações, estes eram então posicionados a nossa vontade com o uso de um estilete feito com pestana.

Passado o período de sedimentação sorvemos, cuidadosamente, o excesso de líquido da amostra com uma micropipeta e recobrimos toda superfície do fragmento com uma solução aquosa de tetróxido de ósmio à 1%, deixando agir este fixador por 5 minutos na obscuridade.

Com uma pipeta Pasteur e cautelosa sucção lavamos por 3 vezes com tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio à 0,1M pH 7,2 e desidratamos com uma série crescente de etanóis (30°GL, 50°GL, 70°GL, 80°GL, 90°GL, 95°GL, 100°GL, 100°GL) passando por duas vezes durante 10 minutos em cada um para uma completa remoção da água.

Seguimos com a secagem pelo método do ponto crítico, adesão do fragmento com cola condutora de prata ao suporte porta-amostra ("Stub") e metalização com ouro pelo processo de "sputtering".

b.2) Microscopia Eletrônica de Transmissão:

*** Considerações Gerais:**

O uso da microscopia eletrônica de transmissão teve impacto sobre as propostas filogenéticas e sistemáticas dos protistas, incrementou o conhecimento de sua estrutura e gerou o crescimento e a sofisticação do número de elementos a serem considerados. É um complemento à microscopia de luz, não substituindo-a. Confirma e amplifica aspectos já sabidos, mostrando seus detalhes com uma precisão antes impossível de se obter, ou, em certos casos, detecta novos caracteres e produz a compreensão efetiva de outros. (CORLISS, 1979a).

A microscopia eletrônica de transmissão legou-nos o conhecimento de parte da estrutura formadora dos organismos estudados. A técnica aqui apresentada constitui o procedimento de rotina realizado em nosso laboratório para os protistas ciliados, acrescida de algumas recomendações para a feitura efetiva de cada etapa e o uso ideal das substâncias empregadas dadas por MACHADO (1989), MEEK (1976) e SESSO (1989). Utilizamos uma variação do método de fixação por mistura de tetróxido de ósmio com glutaraldeído descrito em SHIGENAKA *et al.* (1973) e do de pré-inclusão em ágar-ágar para células isoladas demonstrado no trabalho de HALLER *et al.* (1961). Para sua inclusão definitiva lançamos mão, segundo a disponibilidade, inicialmente da resina Polylyte (COIRO *et al.*, 1972) de grande dureza e difícil microtomia e, mais tarde, do Epon de melhor textura e infiltração no material.

Servimo-nos durante o processamento de nossas amostras do piramitome 11800 LKB e do ultramicrótomo 2088 LKB munido de navalha de diamante.

* Procedimento:

Fixamos na saleira uma amostra abundante dos exemplares estudados, utilizando para tal uma mistura volume a volume de tetróxido de ósmio em solução aquosa à 2% com glutaraldeído à 2,5% em tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio à 0,1M pH 7,2 (estes últimos em concentrações finais anteriores a mistura com o tetróxido de ósmio). Esta foi preparada no momento do uso e deixado um grande volume dela agindo sobre os ciliados por de 3 a 5 minutos na obscuridade. Passado este período o fixador foi retirado e desprezado, sendo nova mistura preparada e adicionada mais uma vez, por cerca de 30 minutos, também na obscuridade.

Retiramos então a mistura fixadora e lavamos a amostra repetidamente com tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio à 0,1M pH 7,2, deixando ao final uma pequena porção de líquido compondo a amostra.

Uma pré-inclusão dos exemplares foi feita em ágar-ágar à 1,5%. Para tal fizemos uso de uma placa de vidro bem limpa sobre a qual acomodamos uma quantidade de ágar-ágar liquefeito, por aquecimento em banho-maria, suficiente para que obtivéssemos uma camada extensa e espessa após sua gelificação. Micropipetando sob o microscópio estereoscópico o maior número de indivíduos que conseguíssemos apreender em um mínimo de líquido, retiramos os exemplares da saleira e os depositamos sobre a camada de ágar-ágar. Sem deixar secar totalmente o material, e munidos de uma alça de cabelo presa a um pequeno bastão de madeira, reunimos, cuidadosamente, os organismos até formar uma massa esférica, compacta e quase

que desprovida de água. Sobre esta, depois de acomodada no interior de uma pequena cavidade escavada com a ajuda de um estilete na superfície do ágar-ágar, foi depositada uma farta gota de ágar-ágar liquefeito. Com um escalpelo pequenino recortamos o ágar-ágar em torno da amostra para que obtivéssemos um cubo bem reduzido. Este imediatamente foi transferido para o interior de um frasco contendo etanol 50°GL, aí permanecendo por 5 minutos. Iniciamos assim a desidratação.

Demos continuidade à desidratação trocando o etanol do frasco, a cada 5 minutos, em uma série crescente (60°GL, 70°GL, 80°GL, 90°GL, 95°GL, 100°GL). O etanol 80°GL foi obtido a partir de uma mistura de 2,7ml de acetato de uranila, em solução aquosa saturada, com 10ml de etanol absoluto. Assim, fizemos uma contrastação prévia durante 15 minutos na obscuridade e aprimoramos a fixação da amostra.

Passamos por dois banhos em acetona absoluta de 5 minutos cada. Após completa retirada da água, infiltramos por uma noite, na geladeira, o material com uma mistura volume a volume de resina recém-preparada com acetona absoluta (resina 50%). Ao final desta etapa, transferimos o cubinho de ágar-ágar contendo o material pré-incluído para ser embebido em resina pura (100%) durante 4 horas, no mínimo, à temperatura ambiente, mantendo o frasco bem fechado sobre uma placa giratória.

Para o emblocamento definitivo, acomodamos uma cápsula de gelatina em um suporte de cortiça, alojamos ao redor de sua borda uma fita estreita de papel vegetal com a identificação respectiva do material e depositamos uma gota farta de resina ao fundo. Com um palito de madeira, em forma

de espátula delicada, transferimos cuidadosamente o material para dentro da cápsula de gelatina, procurando depositá-lo bem ao centro da concavidade. Preenchemos então com resina 3/4 da capacidade da cápsula e, sempre nos certificando da manutenção do bom posicionamento do material (ao fundo e ao centro da cápsula de gelatina), levamo-la à estufa à 60°C por 48 horas para a polimerização.

Após resfriamento total e retirada da cápsula de gelatina, obtivemos um bloco cilíndrico no qual confeccionamos a pirâmide e os cortes ultrafinos. Estes, presos a grades de cobre de 200 mesh, foram contrastados, na obscuridade durante 15 minutos, com uma solução aquosa saturada de acetato de uranila misturada volume a volume com etanol absoluto.

Depois de repetidas lavagens em água destilada e secagem em papel filtro, contrastamos com citrato de chumbo de REYNOLDS (1963) por 1 minutos e novas lavagens e secagem foram efetuadas.

2.5 - Análise e Registro das Preparações:

Todos os aspectos morfológicos e biométricos em exposição, assim como fotomicrografias, micrografias eletrônicas e desenhos representam o resultado final de uma coletânea de dados obtidos e selecionados a partir dos exemplares melhor preservados nas diferentes técnicas empregadas. Nenhum caráter foi negligenciado embora, certamente, uns poucos não sejam figurados. Estes assim o foram por sua ausência total em algumas de nossas preparações ou deficiência em sua ideal evidênciação.

Os números citados ao longo da caracterização de cada espécie foram o resultado dos totais contabilizados em nossas mensurações. Comprimento e largura foram assim medidos com régua milimetrada nas micrografias eletrônicas de varredura e com ocular micrométrica nas preparações em microscopia fotônica, dando-se sempre os menores e os maiores valores alcançados e considerando-se os devidos índices de ampliação para a conversão dos resultados a micrômetros.

Das técnicas utilizadas, as que conferiram-nos o maior contingente de bons resultados foram a reação nuclear de Feulgen e a microscopia eletrônica de varredura. A técnica do Protargol foi particularmente elucidatória para o estudo morfológico de *Urostyla grandis* (Tabela 2).

Utilizamos o microscópio fotônico Wild Leitz HM-LUX para parte do estudo morfológico das espécies, o Zeiss III RS munido de filme Kodacolor Gold ASA 100 e o American Optical Spencer com filme Kodak T-MAX ASA 100 ou PLUS-X ASA 125 para o seu registro fotomicrográfico. O restante da análise dos caracteres morfológicos e o estudo ultraestrutural dos espécimes ocorreram à nível de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, respectivamente. Serviram-nos os microscópios eletrônicos JEOL SM-25SII munido de filme FUJINEOPAN SS 120 e PHILIPS EM-301 com o Kodak 4489 Electron Microscope Film.

Tabela 1 - Distribuição das Espécies de Ciliados Estudadas nos Espécimes de Musgos Coletados.

Espécies de Ciliados Estudadas	Musgos Coletados	
	Sematophyllum subsimplex	Barbula sp.
Epispathidium amphoriforme	*	*
Urostyla grandis	*	
Steinia quadrimucleata	*	

Tabela 2 - Grau de Eficiência das Técnicas Empregadas para Cada Espécie.

Espécies Estudadas	Técnicas Empregadas			
	Protargol de Bodian	Reação Nuclear de Feulgen	Microscopia Eletrônica de Varredura	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<u>Epi spathidiua amphoriforme</u>	+	+++	++	++
<u>Urostyla grandis</u>	+++	+++	+++	++
<u>Steinia quadrinucleata</u>	++	+++	+++	+

+ fraco
 ++ razoável
 +++ muito bom

O AMBIENTE MUSCÍCOLA

Os musgos são plantas herbáceas pequenas desprovidas de raízes, caules e folhas verdadeiros ou de tecidos condutores diferenciados. Largamente difundidos em todo o mundo, são organismos terrestres que comumente habitam locais protegidos, sombreados, quentes e úmidos. Embora o dessecação seja-lhes frequentemente um perigo fatal, alguns estão capacitados a colonizar ambientes áridos como pedras expostas, barrancos escavados e mesmo desertos. Formando densos e extensos revestimentos, agrupamentos de vários indivíduos, podem forrar, à guisa de um tapete macio e aveludado, quase todo o substrato a que se fixam. Além das formas epífitas, amplamente encontradas nos troncos de árvore, o solo abriga vasta densidade de musgos. Estes, graças a sua habilidade de armazenar água absorvendo-a, por capilaridade, diretamente através de seu corpo e funcionando como um reservatório, constituem excelentes reguladores da umidade evitando a evaporação excessiva e atuando como agentes antierosivos.

Representam um biótopo vivo, de estrutura e funcionamento peculiares, que contém os recursos necessários para abrigar e assegurar a continuidade de uma biocenose bastante diversificada. Os inúmeros constituintes desta comunidade, que incluem provavelmente protistas do solo uma vez que os musgos são contaminado com suas partículas (FOISSNER, 1987), estão assim reunidos em face da atração exercida pelos muitos fatores que o ambiente muscícola proporciona. Eles agem sobre os musgos transformando-os e, indiretamente, transformando a si mesmos. Foram selecionados para suportar a

alternância entre regimes de embebição pela água das chuvas e de dessecação pela estiagem, e manifestam uma gama de complexas interações onde a dependência recíproca promove a repercussão sobre o todo da comunidade quando da alteração de um de seus componentes.

Em princípio as faúnulas dos musgos coletados diferenciavam entre si. Em nosso estudo foram assinaladas em *Sematophyllum subsimplex* todas as três espécies de ciliados estudadas e em *Barbula* sp. apenas uma delas (Tabela 1). Vez por outra fomos premiados com a ocorrência de gastrotríquios, tardígrados, colêmbolos e copépodes. Eram numerosos os rotíferos e os nematódeos costumavam abundar nos ensaios mais antigos. Estaria provavelmente estabelecida uma composição específica já modificada desde o momento da coleta, subordinada as variações anuais das populações muscícolas, como bem caracterizaram GROLIÈRE (1977 e 1978) e GROLIÈRE & NJINÉ (1973). Além disto as biocenoses não mostraram-se estáveis em nosso experimento, elas se transformavam no decurso de uma escala de tempo mutável em consonância, ao que presumimos, com as distintas circunstâncias estabelecidas pelo meio que as envolvia. Ainda que o exame desta dinâmica e dos parâmetros que a conduziam não estivessem entre os objetivos de nosso estudo, pudemos constatar, passadas algumas horas da imersão dos musgos em água mineral (menos de 24 horas), a existência de espécies mais representativas e a gradativa substituição desta representatividade com o passar dos dias. Supunhamos haver a interferência de muitos fatores que geravam os fenômenos de surgimento e de supressão dos diferentes organismos, patenteando uma clara sucessão ecológica. O con-

junto destes agia sobre os ciliados muscícolas impondo condições que atuavam sobre seu ciclo de vida determinando diferentes frequências de aparecimento das espécies estudadas, variações na abundância dos indivíduos e o modo de distribuição espacial de suas populações. A adaptabilidade de certas espécies e sua capacidade de fabricar cistos de resistência devem ter tornado exeqüível sua permanência na biocenose durante as alterações do meio.

O ambiente iluminado artificialmente no laboratório emitia a luz, fonte de energia, necessária à fotossíntese. Realizada pelos musgos e por possíveis protistas clorofilados que estivessem presentes na massa d'água, ambos agindo como produtores, constituia uma das bases de sustentação da rede alimentar na biocenose muscícola.

Simultaneamente, estamos convencidos da presença de uma rede alimentar fundamentada nos organismos detritívoros que tem, em detrimento ao processo de assimilação clorofiliana, sua importância gradativamente acentuada com a degradação dos musgos, morte natural de parcela da comunidade e má penetração da luz devido ao aumento das partículas em suspensão.

A ocorrência de períodos fóticos e afóticos, estes muitas vezes prolongados por finais de semana e feriados, deve ter criado fases de maior e menor atividade (comportamento desencadeado pela provável excitação de receptores fotossensíveis), influenciando no ritmo de crescimento e reprodução das espécies.

Talvez a luz seja um atrativo para certos ciliados, mas de forma geral pareceu afugentá-los quando obser-

vados sob o intenso feixe luminoso do microscópio estereoscópico. Refugiavam-se entre os musgos e em detritos. Porventura aí estariam à procura de suprimentos alimentares ou, de outro modo, como fugitivos ao estímulo mecânico produzido pela perturbação da camada de água durante a manipulação das placas de Petri. Quiçá fosse uma resposta ao somatório destes três fatores.

Já foi comprovado por experimentação que muitos protistas acostumam-se às temperaturas elevadas quando a intensidade de calor amplifica-se paulatinamente. Todavia, a despeito do registro de espécies habitantes naturais de águas com até 58°C (PUYTORAC *et al.*, 1987), as altas temperaturas parecem ser mais nocivas do que as demasiadamente baixas, consistindo a porção entre 36° a 40°C como a faixa fatal para a maioria dos protistas de vida livre na natureza (KUDO, 1985).

Acreditamos que no verão, estação mais crítica, a quantidade de calor no interior das placas de Petri se conservava à níveis suportáveis graças ao sistema de refrigeração do laboratório. Em razão do pouco volume de água, uma grande oscilação na temperatura deve de ter ocorrido entre o dia e a noite, atingindo maiores valores nos dias de ausência do resfriamento induzido do ambiente.

O aumento da temperatura foi, ao nosso ver, a razão primordial para os encistamentos e as citólises evidenciadas em muitos indivíduos, principalmente quando confinados a limitadas frações de água e submetidos a delongada iluminação incandescente.

Consideramos que todos os seres vivos suportam

um determinado nível de variação dos diferentes fatores ecológicos que sobre eles agem. Este obedece aos limites de tolerância e estabelece, segundo cada espécie, o ponto ótimo para o seu desenvolvimento. É neste ponto que o espaço de tempo entre sucessivas multiplicações dos indivíduos de uma população é abreviado e há, concomitantemente, um acréscimo no número de ocorrência de novas multiplicações. Segundo KUDO (1985) o ótimo térmico na natureza para a maior parte dos protistas de vida livre estaria entre 16° e 25°C. PUYTORAC *et al.* (1987) estabelece-o como de 20° a 35°C para os protista do solo, e de 12° a 22°C para os ciliados aquáticos. Um melhor progresso na manutenção de nossos ensaios poderia estar subordinado, em muitos casos, à observância desta idéia.

Na realidade sabemos que a temperatura não encontra-se dissociada dos demais fatores que com ela coexistem no ambiente, podendo os limites de tolerância relativos a ela para uma dada espécie serem alterados pela influência das mudanças de outros fatores, como por exemplo o fornecimento de alimento. Por outro lado, o volume de nutrientes consumidos e a velocidade de seu consumo tendem também a variar com o estado térmico local.

Invariável é a predileção específica por pH definido, porém numerosos ciliados suportam índices de até 9,0 e raros são os que resistem aos excessivamente reduzidos (PUYTORAC *et al.*, 1987).

O pH em nossos ensaios foi balanceado pelo uso contínuo da mesma água mineral (pH = 5,9), se bem que durante a decomposição ativa devesse sofrer alterações.

A oferta de nutrientes no meio é um dos condi-

cionadores das particularidades da comunidade viva que nele reside. Nos sistemas de águas doces têm grande valor sais como os carbonatos, os sulfatos e os cloretos de cálcio, magnésio, sódio e potássio (PUYTORAC *et al.*, 1987). A avaliação de sua presença ou ausência poderia influir decisivamente na compreensão da dominância de um dado modelo fisionômico em nossas populações. Cremos na manutenção de boas taxas destes sais com a utilização de água mineral como meio de embebição dos musgos.

A certeza de que o oxigênio se estabelece como fator limitante nos diversos ambientes aquáticos devido a sua baixa solubilidade e a indispensável necessidade de manter as concentrações que permitam o sustento dos processos biológicos, nos fez considerar que sua existência era o resultado do intercâmbio ar - água (de sua propagação pela película superficial) ou, antes de qualquer outra forma, da ação fotossintetizante dos seres clorofilados, em especial o próprio musgo. Sua disponibilidade na coluna d'água estava relacionada com a demanda respiratória, os níveis de decomposição da matéria orgânica, a intensidade luminosa, a pressão atmosférica, a proporção dos diversos outros gases coexistentes e as alterações da temperatura.

Compreendemos ser a variação do oxigênio inversa ao aumento da temperatura, que por sua vez intensifica o metabolismo dos organismos causando uma ainda maior queda no percentual de dissolução deste gás e o incremento dos níveis de dióxido de carbono. Embora a este mostrem-se bastante condescendentes os ciliados de solo (PUYTORAC *et al.*, 1987), cogitamos se decorrida intensa fase de degradação orgânica seus

valores seriam sustentáveis.

A luz, a temperatura, o pH, a disponibilidade dos nutrientes, as taxas de oxigênio e de dióxido de carbono, e, em se tratando de um habitat aquático, o próprio volume disponível de água circundante foram alguns daqueles elementos aqui observados. Provavelmente, sobrepõem-se a estes, na natureza, uns tantos outros não indagados por nós nesta tentativa de depreender as origens dos acontecimentos que submetiam-se a nossa apreciação.

Seja como for, ao final de algumas semanas os aspectos físico-químicos e biológicos sofreram um conjunto tal de modificações que retrocederam nossos ensaios ao panorama despovoado dos primeiros instantes da embebição dos musgos.

POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO

Para os organismos aqui estudados foi utilizada a sistemática proposta por PUYTORAC *et al.* (1987). À vista disto eles estão inclusos na citação que ora se segue.

Filo Ciliophora Doflein, 1901

Subfilo Prostomata Schewiakoff, 1896

Classe Prostomatea Schewiakoff, 1896

Subclasse Probosciphoria Puytorac *et al.*, 1987

Ordem Probosciphorida Puytorac *et al.*, 1987

Família Spathidiidae Kahl, 1929

Gênero *Epispathidium* Foissner, 1984

Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Subfilo Polyhymenophora Jankowski, 1967

Classe Spirotrichea Bütschli, 1889

Subclasse Hypotrichia Stein, 1859

Ordem Euhypotrichida Fleury *et al.*, 1985

Subordem Urostylina Jankowski, 1979

Família Urostylidae Bütschli, 1889

Gênero *Urostyla* Ehrenberg, 1838

Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Subordem Oxytrichina Jankowski, 1979

Família Oxytrichidae Ehrenberg, 1838

Gênero *Steinia* Diesing, 1886

Steinia quadrinucleata Dragesco & Njiné, 1971

ESTUDO MORFOLÓGICO

1 - *Epispathidium amphoriforme* (Greeff, 1888)

1.1 - Descrição:

Os espécimes de *Epispathidium amphoriforme* examinados possuíam um corpo saculiforme, bastante flexível. A região anterior estava comprimida lateralmente e bastante expandida dorsoventralmente, obtendo desta maneira um aspecto espatulado. A região mediana posterior era arredondada e comparativamente mais estreita e extensa que a anterior. Enquanto que a margem dorsal apresentava-se alongada, a margem ventral estava diminuída e truncada anteriormente. (Figuras 5, 6 e 7).

As dimensões dos exemplares fixados variavam de 95 a 110 μ m de comprimento por de 40 a 55 μ m de largura.

A ciliatura somática, simples e quase uniforme em ambos os lados direito e esquerdo do corpo, se constituía por cerca de 38 a 48 cinécias de cílios finos e pequenos dispostas como linhas paralelas ao longo do eixo ântero-posterior do corpo, ditas cinécias meridianas ou somáticas (Figuras 5 e 6).

O citóstoma revelou-se como uma estrutura apical superficial em forma de uma fenda virtual que se estendia ao longo de toda a extremidade anterior do organismo, esta medindo de 60 a 75 μ m (Figura 5). Contornando o citóstoma um distinto rebordo bucal era avistado, abaixo do qual cílios circumorais (mais longos que os somáticos) se assentavam (Fi-

gura 6).

O macronúcleo ocupava a região central do corpo e tinha a forma de um cordel comprido e convoluto, frequentemente, enodado (Figuras 7, 9 e 10). Os micronúcleos eram numerosos, podendo ser avistados na periferia do macronúcleo (Figuras 7 e 8).

Em observações *in vivo* e ao Protargol, constatou-se, caracteristicamente, a presença de um expressivo vacúolo contrátil sempre no extremo posterior do corpo (Figura 7).

A microscopia eletrônica de transmissão conferiu-nos a visualização de um córtex somático com clara delimitação do ectoplasma que, com numerosos mucocistos e raros alvéolos (Figuras 11 e 12), encontrava-se separado do endoplasma por uma zona de transição bem marcada (Figura 11). No endoplasma estavam presentes muitas mitocôndrias (Figuras 11 e 13) e, particularmente na região proximal ao rebordo bucal, abundavam os toxicistos (Figuras 12 e 13). Mais interiormente grandes vesículas mostravam prováveis toxicistos em formação (Figura 16); o aparelho nuclear exibia suas numerosas massas de cromatina espalhadas por todo nucleoplasma e seus muitos nucléolos (Figura 17); e eram comuns as figuras de mielina e um retículo endoplasmático rugoso bem caracterizado (Figura 18).

Também uns poucos pares de cinetosomos foram evidenciados. Nos pertencentes a ciliatura circumoral, que dispõe-se logo abaixo do rebordo bucal, cada par era composto por um cinetosomo cilífero e outro nu. Do primeiro partiam fibras pós-ciliares (Figura 13) e do último originavam-se es-

truturas formadoras da armadura citofaríngea: as fibras transversas (Figura 13), que constituíam, na altura do rebordo bucal, as várias cortinas de microtúbulos (Figura 12); e os nemadesmos (Figura 19). Nos cinetosomos somáticos via-se partirem fibras transversas que interligavam cinécias adjacentes (Figura 20).

Os representantes de *Epispathidium amphoriforme* nadavam preferencialmente junto ao fundo, com movimentos rastejantes bastante lentos. Ao se deslocarem na coluna de água realizavam movimentos circulares, iniciados sempre pela margem dorsal anterior, em torno do eixo longitudinal de seu corpo. Poucos indivíduos eram observados nadando junto a superfície.

1.2 - Discussão e Conclusão:

O gênero *Epispathidium* foi criado por FOISSNER (1984) e agrupou certo número de espécies algumas antes pertencentes ao gênero *Spathidium* Dujardin, 1841, entre elas *S. amphoriforme* Greeff, 1888. Foi com o auxílio de seu trabalho, onde descreveu e diferenciou com precisão 6 gêneros da família Spathidiidae, que pudemos elucidar as dúvidas a respeito de nossas observações. Este dita com minúcias, não antes vistas nos trabalhos de DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975), KAHL (1930) e PENARD (1922), - as características do gênero *Spathidium* distinguindo-o de seu novo gênero *Epispathidium*. No primeiro, o rebordo bucal com formas diversas é pouco inclinado para a margem ventral e as porções anteriores encurvadas das cinécias somáticas, provi-

das de cílios normais ou pouco engrossados, parecem se continuar com a cinécia circumoral, confundindo-se com esta. No segundo, o rebordo bucal de forma ortogonal é inclinado para a margem ventral do corpo e as porções anteriores encurvadas das cinécias somáticas se distinguem claramente da cinécia circumoral e possuem cílios grossos próximos uns aos outros que correm paralelamente a esta última, quase duplicando-a, na face esquerda e tangencialmente na face direita. Em ambos os gêneros as porções anteriores das cinécias somáticas esquerdas encurvam-se para a margem ventral e as das cinécias somáticas direitas encurvam-se para a margem dorsal. É característica também distintiva a presença de um encurtamento da cinécia 3 que compõe a escova, encurtamento este equivalente à metade da extensão encontrada nas cinécias 1 e 2 em *Epispathidium* e, não bem definido em *Spathidium*. (Figuras 21 e 22).

Salientou FOISSNER (1984) ter sido o gênero *Spathidium* inseguramente classificado devido a incompleta descrição de sua espécie tipo, *S. spathula* (O.F. Müller, 1786), tendo se somado, até a atualidade, cerca de 100 espécies que são certamente inclassificáveis para muitos pesquisadores, uma vez que o conjunto de exemplares reunidos como membros deste gênero são resultado, na sua maioria, de observações superficiais, e poucas foram aquelas espécies classificadas com modernos métodos taxonômicos.

Por exemplo, PENARD (1922) descreveu seus exemplares de *Spathidium amphoriforme* sem quantificar o número de cinécias somáticas e de cinécias da escova embora, as mencione e caracterize, assim como a forma e a disposição da boca,

do rebordo bucal, dos toxicistos, do macronúcleo e do vacúolo contrátil. Não observou a cinécia circumoral ou a curvatura das porções anteriores das cinécias somáticas, contudo se refere a presença, também verificada por nós (Figura 6), de cílios particularmente longos na base do rebordo bucal. Através de suas observações, constatou a existência de 5 ou 6 variedades, duas das quais figurou. Sua representação do que chama ser a forma típica de *S. amphoriforme* é comparável a variedade *rectitoratum* de KAHL (1930). As dimensões dadas por ele, de 90 a 140 μ m de comprimento, estão de acordo com as nossas observações e aquelas feitas por FOISSNER (1984) e KATTAR (1986) (Tabela 3).

Segundo a visão de KAHL (1930), a determinação de novas espécies estaria subordinada a atenção a forma do corpo, dos cílios, das cinécias, bem como ao tamanho natural dos indivíduos. Sem ater-se a representações elaboradas dos exemplares encontrados, o que obscureceu a interpretação de parte de suas citações, discriminou em suas investigações a presença diferenciada da curvatura das porções anteriores das cinécias somáticas em relação aos lados direito e esquerdo, as margens ventral e dorsal, e aos cílios circumorais, com os quais ela estaria mais ou menos compactada. Como PENARD (1922) não definiu a existência de cinetosomos duplos na cinécia circumoral ou na escova. Para esta última relatou sua organização em 3 cinécias dorsais, sem distingui-las por extensão. Caracterizou a conformação de suas cerdas com pontas engrossadas e comprimento de cerca de 6 μ m, bem próximo daquele visto por FOISSNER (1984). Nossas medições para o número de cinécias somáticas (Tabela 3), do mesmo modo que, o con-

torno do corpo, a inclinação e dimensão da região oral (Figuras 5, 6 e 7) concorrem para assemelhar nosso material com aquele definido por KAHL (1930) como pertencente a variedade *securiforme*, ainda que esta apresente o percurso de suas cinécias somáticas prematuramente encurvado.

Da mesma forma mais tarde DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986) e FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975) quantificaram o número de cinécias somáticas (Tabela 3) assinalando a presença da curvatura de suas porções anteriores nas proximidades do rebordo bucal. Como para KAHL (1930), para estes autores seria ela forte e voltada para a margem ventral no lado esquerdo e suave e voltada para a margem dorsal no lado direito, o que produziria a ilusão da existência de uma cinécia circumoral autonôma. Esta descrição não foi aceita por FOISSNER (1984) para os gêneros *Spathidium* e *Epispathidium*, para quem a cinécia circumoral é sempre autonôma. Ademais, os outros caracteres apresentados e o típico trajeto realizado pelas cinécias somáticas figurado concorreram para que FOISSNER (*op. cit.*) conclui-se se tratar, em verdade, de um espécime do gênero *Epispathidium* mal determinado por erro na interpretação da infraciliatura.

Compreende-se que, desta maneira, FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975) mencionem não haverem observado qualquer cinetosomo duplo formando a suposta cinécia circumoral e proponham que os longos, muito finos e retos nemadesmos que abundam na região citofaríngea em feixes isolados em *S. amphoriforme* tenham como ponto de partida os últimos cinetosomos anteriores de cada cinécia somática. É interessante ressaltar que apesar de FRYD-VERSAVEL *et al.* (*op. cit.*) terem

visto nemadesmos projetando-se de cinetosomos cíliferos que não possuíam qualquer continuidade com as cinécias somáticas em *S. cultriforme* (hoje *Arcuospathidium cultriforme* nova combinação proposta por FOISSNER, 1984), mantiveram sua interpretação de uma cinécia circumoral não autônoma para as quatro espécies de *Spathidium* estudadas. Parece-nos que o local de onde emergem os numerosos nemadesmos não foi bem caracterizado, uma vez que estes autores figuram em sua representação alguns poucos adentrando o rebordo bucal. De fato, longos nemadesmos partem do cinetosomo nu que compõe os pares de cinetosomos da infraciliatura circumoral (BOHATIER *et al.*, 1978; FOISSNER, 1984; PUYTORAC & GRAIN, 1976 e PUYTORAC *et al.*, 1987) (Figura 19).

Toxicistos foram observados por BOHATIER *et al.* (1978), DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), FOISSNER (1984), FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975), KAHL (1930) e PENARD (1922) sempre adornando o rebordo bucal, tendo os dois últimos autores imprecisamente delimitado a sua localização, superestimando-a, em alguns dos exemplares figurados. Como KAHL (*Op. Cit.*) e PENARD (*Op. Cit.*) não relataram a presença de nemadesmos, talvez tenham expandido demasiadamente, para a região citofaríngea, os toxicistos ("tricocistos") por confundir-los, em suas preparações, com os nemadesmos.

Ultraestruturalmente, a presença de dois tipos de toxicistos foi demonstrada por BOHATIER *et al.* (1978). Classificados segundo o seu tamanho, um curto e um longo, tal caracterização tem sido aplicada usualmente (HAUSMANN, 1978, HAUSMANN & HAUSMANN, 1973 e HOVASSE & MIGNOT, 1975). Em nossos estudos, embora tenhamos observado os toxicistos sob di-

versos aspectos (Figuras 13, 14, 15), houve considerável dificuldade na evidenciação destes tipos (Figura 13).

Claramente a escova foi descrita por BOHATIER *et al.* (1978), DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986) e FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975) como uma estrutura dorsal, sempre disposta longitudinalmente no terço anterior do lado esquerdo do corpo, formada por 3 cinécias de cílios claviformes que emergem de cinetosomos duplos. Estas continuavam a partir das cinécias somáticas, encurvando-se e terminando próximo ao rebordo bucal.

O importante papel da escova na estomatogênese foi salientado por FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975) quando ao surgir antecipadamente ao restante da ciliatura mostrava, provavelmente, ter a função de esboçar a curvatura das porções anteriores das cinécias somáticas esquerdas ao longo do futuro rebordo bucal. Igualmente tem-se conferido a ela um papel sensorial não comprovado (Fauré-Fremiet, 1961 *apud* FRYD-VERSAVEL *et al.*, 1975).

Ainda que não tenhamos observado ao Protargol a ciliatura e infraciliatura somática e circumoral, a presença destas foi-nos parcialmente comprovada pelas preparações em microscopia eletrônica (Figuras 6, 13, 19 e 20). Nas cinécias somáticas, formadas por cinetosomos solitários, e nas da escova, com seus cinetosomos duplos cilíferos, além dos três derivados cinetosomianos habituais aos ciliados, há um derivado suplementar, estabelecido como uma segunda cortina de fibras transversas (BOHATIER *et al.*, 1978 e PUYTORAC *et al.* 1987). Tal peculiaridade pode ser constatada ao nível das cinécias da escova (Figura 19), que revelaram uma estrutura

atípica em torno do axonema de seus cílios claviformes (Figura 19) a qual não foi mencionada pela literatura perscrutada. Para a infraciliatura circumoral ficou-nos evidente a descrição feita por BOHATIER *et al.* (1978), PUYTORAC & GRAIN (1976) e PUYTORAC *et al.* (1987) dos cinetosomos duplos, dos quais saem fibras pós-ciliares no membro cilífero e fibras transversas e nemadesmos no membro nu, inexistindo fibra cinetodesmal (Figuras 13 e 19). São as fibras transversas que se alongam para formar as cortinas de microtúbulos na periferia da zona bucal (BOHATIER *et al.*, 1978) (Figura 12), comuns também a outros Prostomatea (HAUSMANN & HAUSMANN, 1973 e RODRIGUES de SANTA ROSA & DIDIER, 1975).

O macronúcleo tem sido mostrado como uma estrutura em forma de corda ou fita longa, distendida e tortuosa ou entrelaçada, frequentemente preenchendo a maior parte da região mediana do corpo. Também a forma de rosário é empregada por DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), FRYD-VERSAVEL *et al.* (1975) e KAHL (1930), a qual contempla parte de nossas observações (Figuras 7 e 10). Numerosos micronúcleos adjacentes ao macronúcleo foram visualizados por estes autores. Inferimos que o macronúcleo, sempre mais ou menos enovelado, por vezes apresenta constrições (Figura 8) e nodosidades descontínuas (Figuras 7, 8 e 10) que ressaltam o seu contorno criando em alguns pontos a idéia de um rosário. Esta também pareceu ser a interpretação dada por FOISSNER (1984) que, como nós, também destacou a presença de muitos nucléolos (Figura 17).

A existência de muitos poros de excreção (FOISSNER, 1984) pareceu-nos ser a explicação para a detecção de

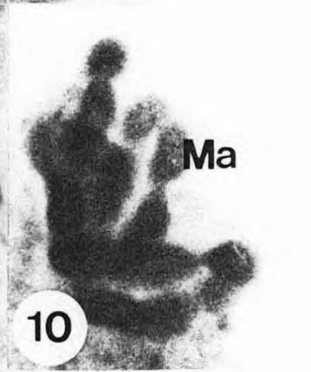
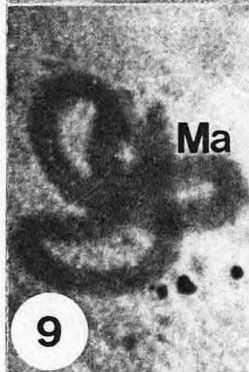
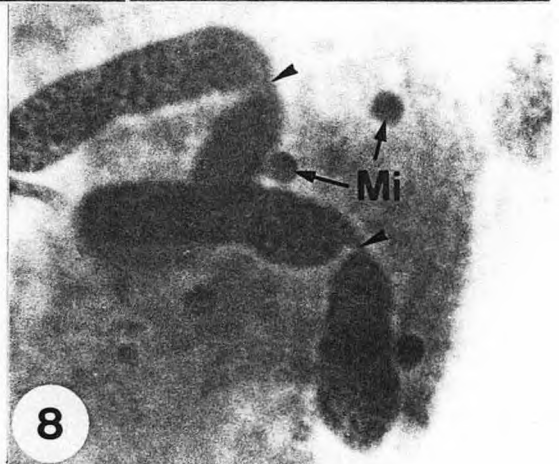
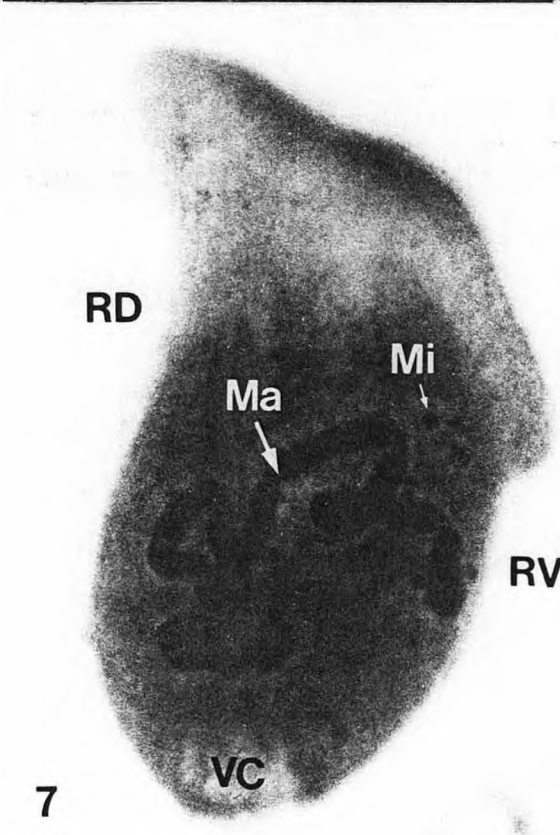
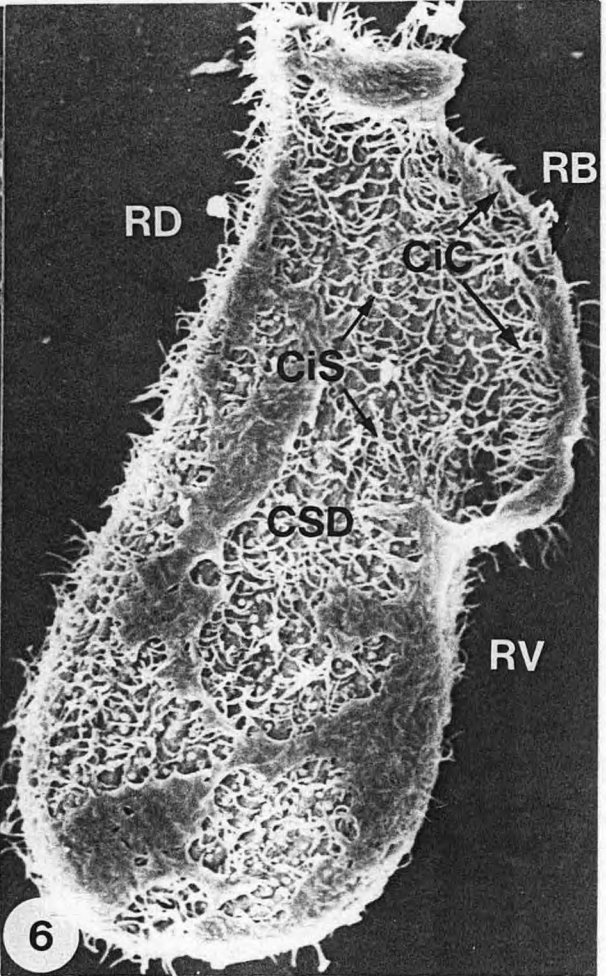
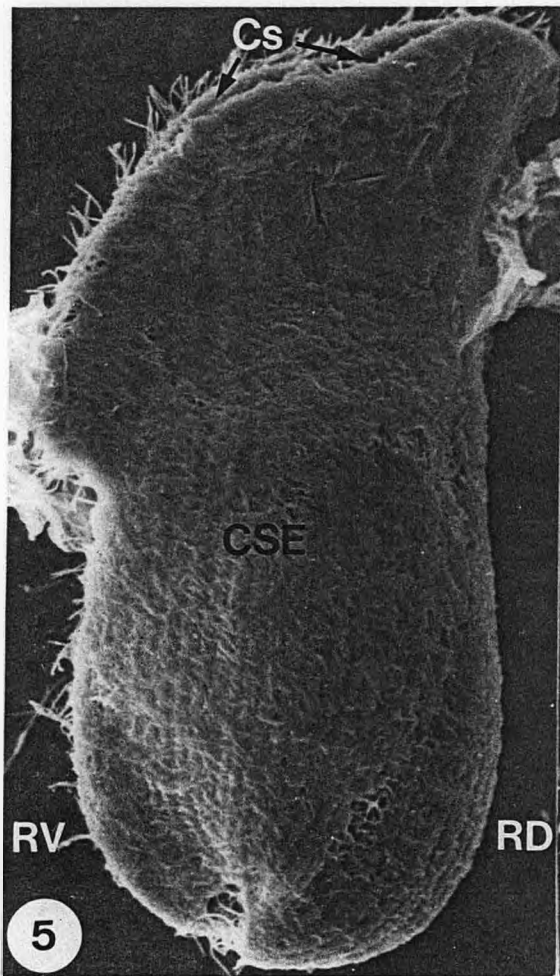
mais de um orifício junto a porção posterior do corpo de alguns exemplares observados por nós.

Outro item passível de desvirtuar os caminhos de uma boa interpretação morfológica é a capacidade da espécie de aumentar suas dimensões, triplicando-as, durante a aquisição do hábito alimentar canibal (KATTAR, 1986). Soma-se a isto o fato de ser o comprimento da boca variável em conformidade com o estado alimentar dos organismos, quando os menos alimentados são possuidores de uma boca maior que a dimensão da área pós-bucal e aqueles mais alimentados apresentam-na diminuída em relação a esta área (FOISSNER, 1984). Com efeito a partir desta consideração torna-se inconsistente qualquer análise distintiva dos dados biométricos da literatura (DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS, 1986; FRYD-VERSAVEL *et al.*, 1975 e KAHL, 1930) com os aferidos por nós em nossa investigação (Tabela 3).

Em verdade, um polimorfismo tem sido sempre relacionado ao gênero *Spathidium* e suas espécies (FRYD-VERSAVEL *et al.*, 1975; Greeff, 1888 *apud* PENARD, 1922; PENARD, 1922 e MERMOD, 1914), e claramente concorre para o falseamento da verdade pelo desconhecimento profundo das características diagnósticas que separam os representantes da família Spathidiidae. A grande maioria das publicações realizadas envolvendo estes organismos possuem descrições superficiais e figurações pouco pormenorizadas que por muitas vezes se repetem sem a adição de novas particularidades que delineiem as análises determinantes de uma identificação consistente e inequívoca. Assim, quando declarou DRAGESCO (1970): "... presque chaque fois qu'un chercheur trouve un *Spathidium* il est extrêmement

difficile de l'identifier (d'où la création, continuelle, de nouvelles espèces)" compreendemos a importância do trabalho de FOISSNER (1984) e seu destaque para a necessidade da elaboração de uma grande revisão com suas conseqüentes profundas modificações sistemáticas.

Desde o início de nosso estudo comparativo dos exemplares aqui descritos com aqueles dispostos na literatura, as características afins sempre nos colocaram como certa a sua identificação dentro de *Spathidium amphoriforme*. Não obstante não termos conseguido evidenciar nas preparações realizadas estruturas da maior significância para a diferenciação genérica proposta por FOISSNER (1984), o trabalho deste autor veio a fortalecer e concretizar, através de seus excelentes desenhos, a similaridade por nós até então admitida. Seria injustificável excluirmos desta dissertação sua nova combinação, uma vez que estamos convictos da substancialidade de sua argumentação. Estudos ulteriores poderão ampliar os aspectos concordantes, não deixando lugar a dúvidas sobre a validade do reconhecimento de nossos espécimes como pertencentes a *Epispathidium amphoriforme*.



Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Figuras 5 e 6 - Micrografias eletrônicas de varredura das faces esquerda e direita, respectivamente. CiC - cílios circumorais; CiS - cílios somáticos; Cs - citóstoma; CSD - cinécias somáticas direitas; CSE - cinécias somáticas esquerdas; RB - rebordo bucal; RD - região dorsal; RV - região ventral.

Aumentos: 2.175X e 2.100X, respectivamente.

Figura 7 - Fotomicrografia da face direita ao Protargol. Ma - macronúcleo; Mi - micronúcleo; RD - região dorsal; RV - região ventral; VC - vacúolo contrátil.

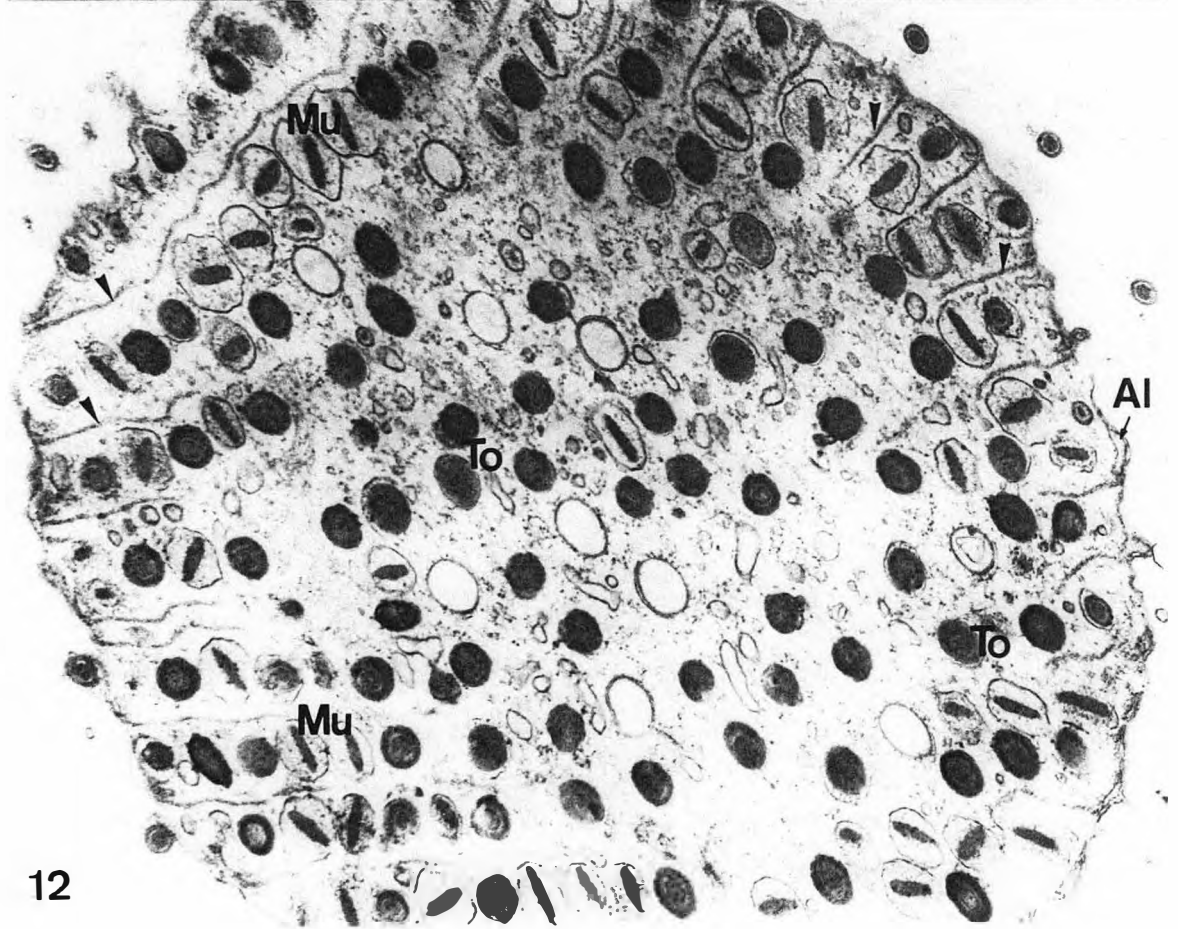
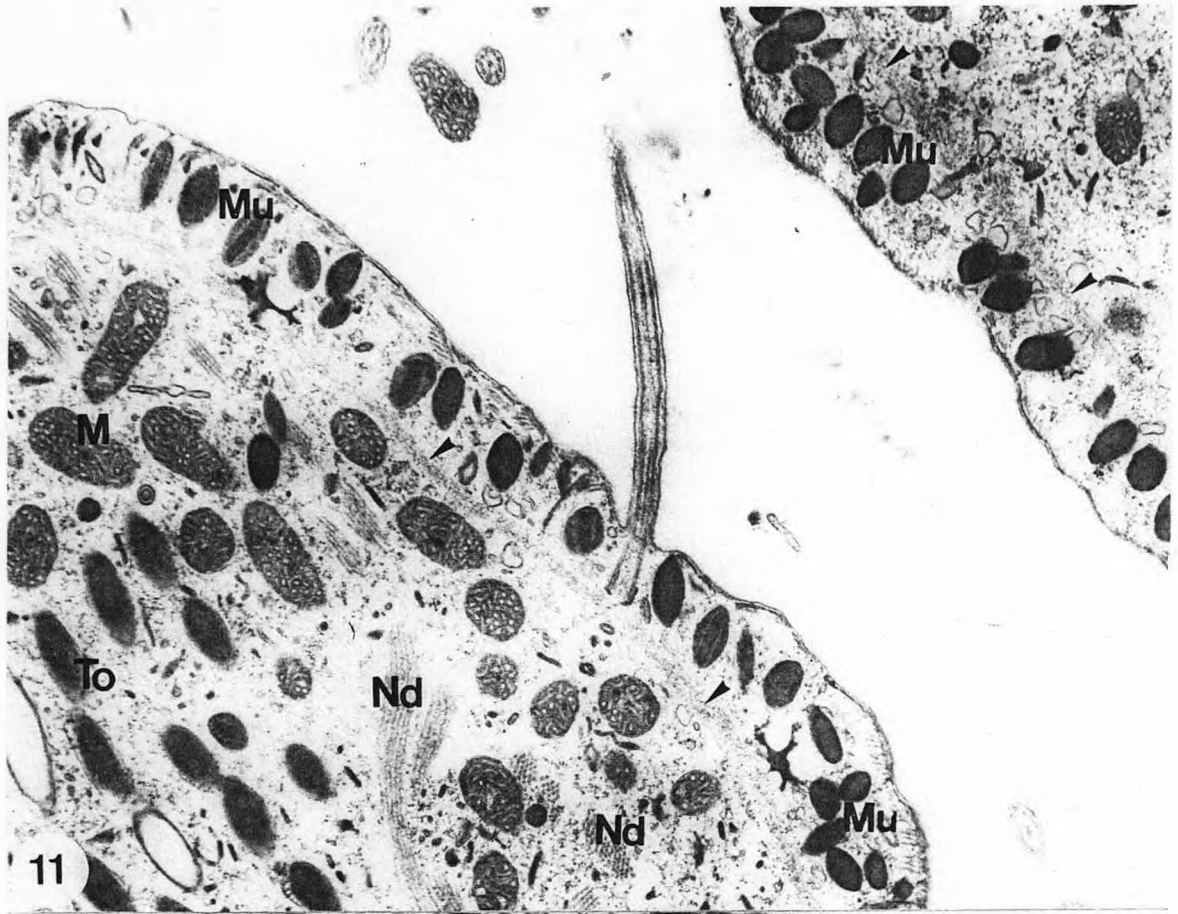
Aumento: 900X.

Figura 8 - Fotomicrografia ao Protargol. Close das constrições do macronúcleo (setas) e dos muitos micronúcleos (Mi) que o circundam.

Aumento: 1.875X.

Figuras 9 e 10 - Fotomicrografias do aparelho nuclear em reação nuclear de Feulgen e ao Protargol, respectivamente. Diferentes aspectos adquiridos pelo macronúcleo (Ma).

Aumentos: 1.350X e 1.465X, respectivamente.



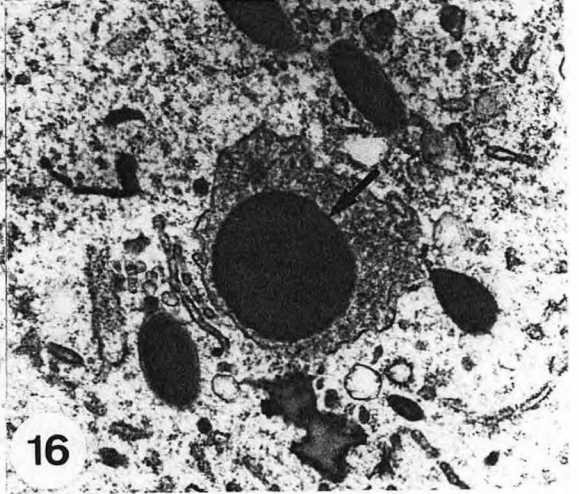
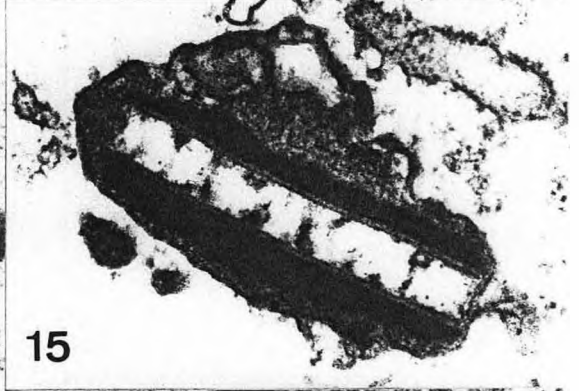
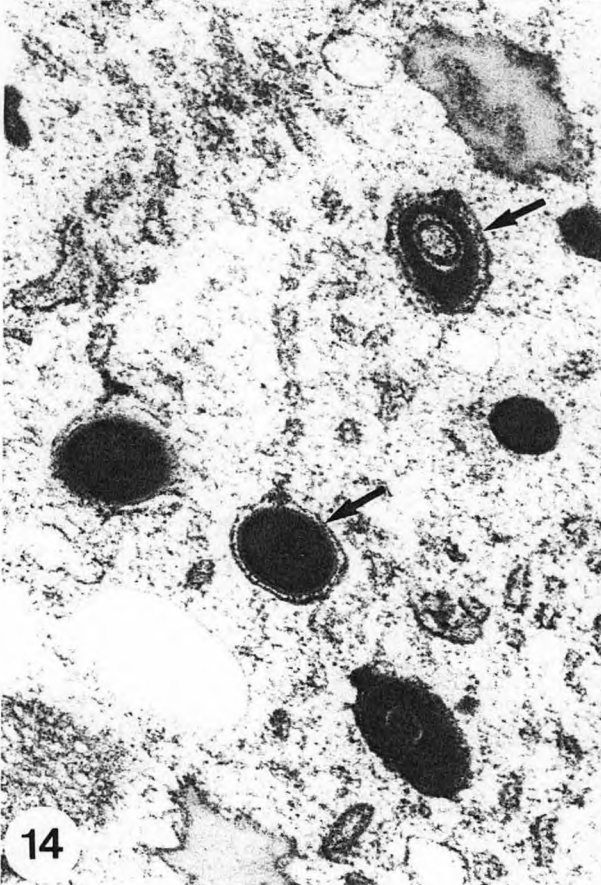
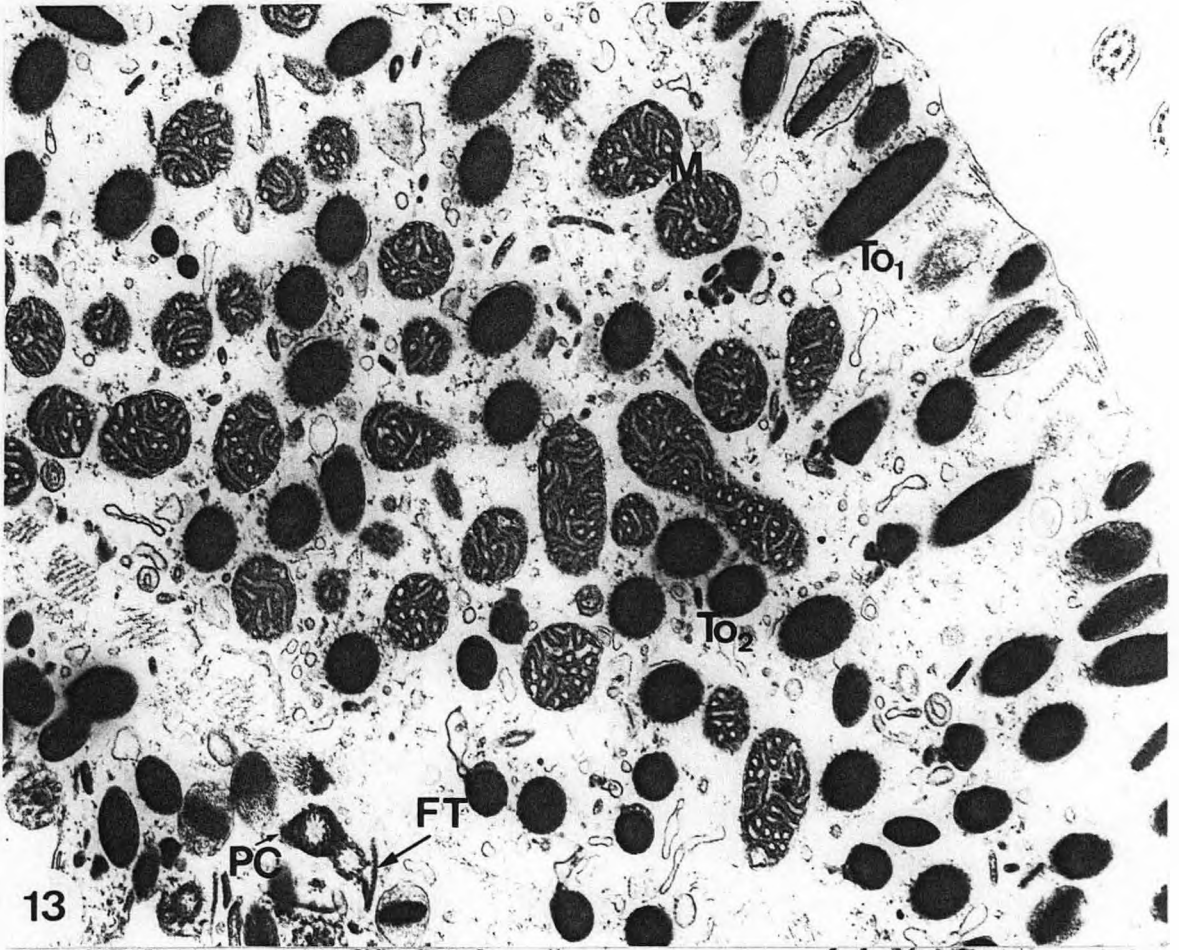
Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Figura 11 - Micrografia eletrônica de transmissão de um corte transversal do córtex somático de duas células. Observar o ectoplasma com numerosos mucocistos (Mu); a zona de transição ecto-endoplasmática (setas); as mitocôndrias (M), os nemadesmos (Nd) e os toxicistos (To) no endoplasma.

Aumento: 18.460X.

Figura 12 - Micrografia eletrônica de transmissão de um corte transversal ao nível do rebordo bucal. Notar as cortinas de microtúbulos (setas); os alvéolos (Al); os mucocistos (Mu) e os muitos toxicistos (To).

Aumento: 21.230X.

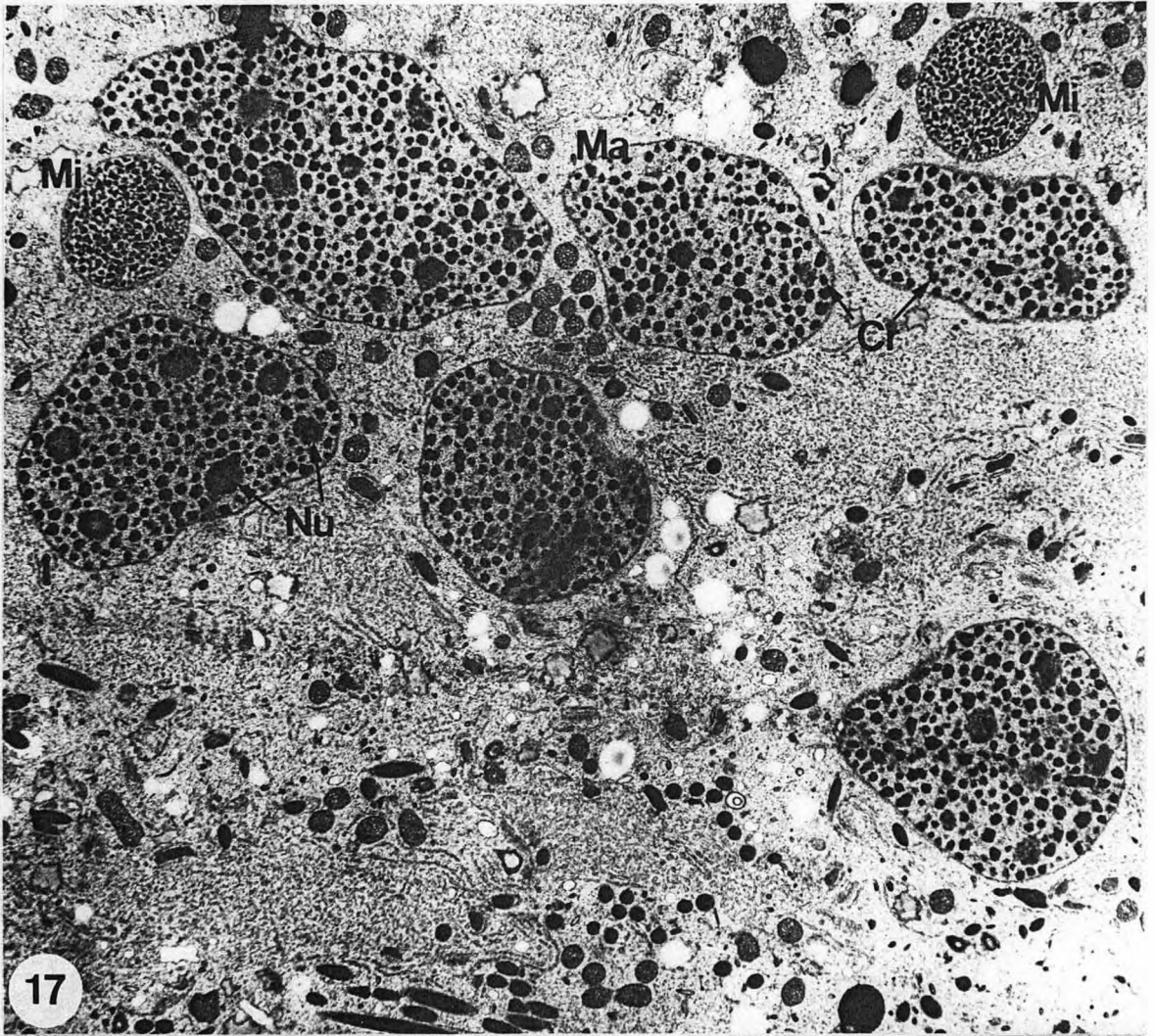


Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Figura 13 - Micrografia eletrônica de transmissão de um corte transversal ao nível da cinécia circumoral. Observar as mitocôndrias (M), os toxicistos longos (To_1) e os toxicistos curtos (To_2) no endoplasma. Notar o par de cinetosomos formado por um membro cilífero com as fibras pós-ciliares (PC) e outro nu do qual partem as fibras transversas (FT).
Aumento: 26.715X.

Figuras 14 e 15 - Micrografias eletrônicas de transmissão de toxicistos em corte transversal (setas) e longitudinal, respectivamente.
Aumentos: 50.665X e 65.215X, respectivamente.

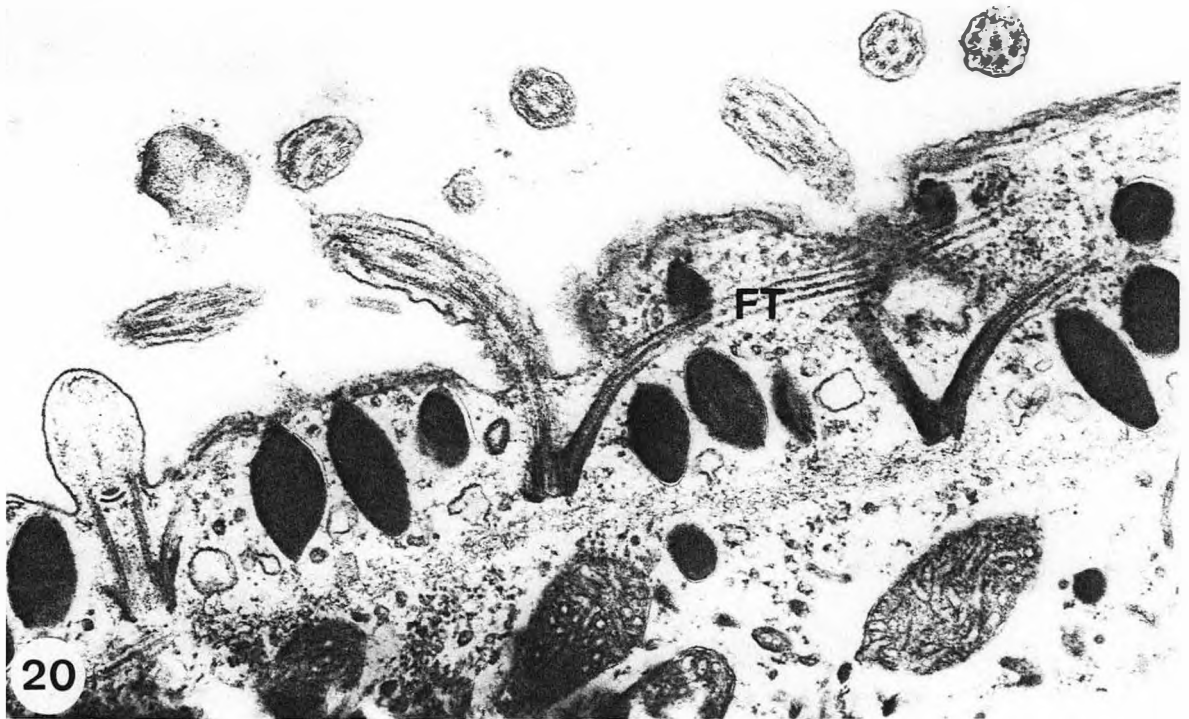
Figura 16 - Micrografia eletrônica de transmissão de um corte transversal de uma vesícula contendo em seu interior um provável toxicisto (seta) em formação.
Aumento: 28.285X.



Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Figura 17 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando aspectos do aparelho nuclear. Cr - cromatina; Ma - macronúcleo; Mi - micronúcleo; Nu - nucléolo.
Aumento: 8.750X.

Figura 18 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando aspectos do endoplasma. FM - figura de mielina; RER - retículo endoplasmático rugoso.
Aumento: 30.470X.



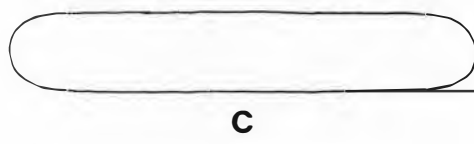
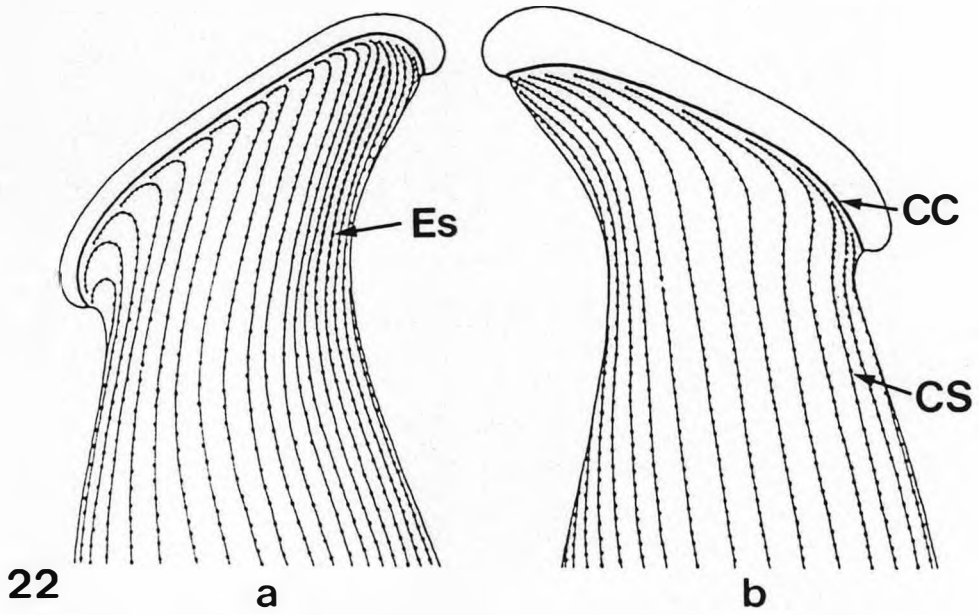
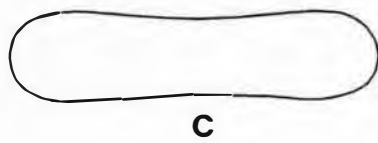
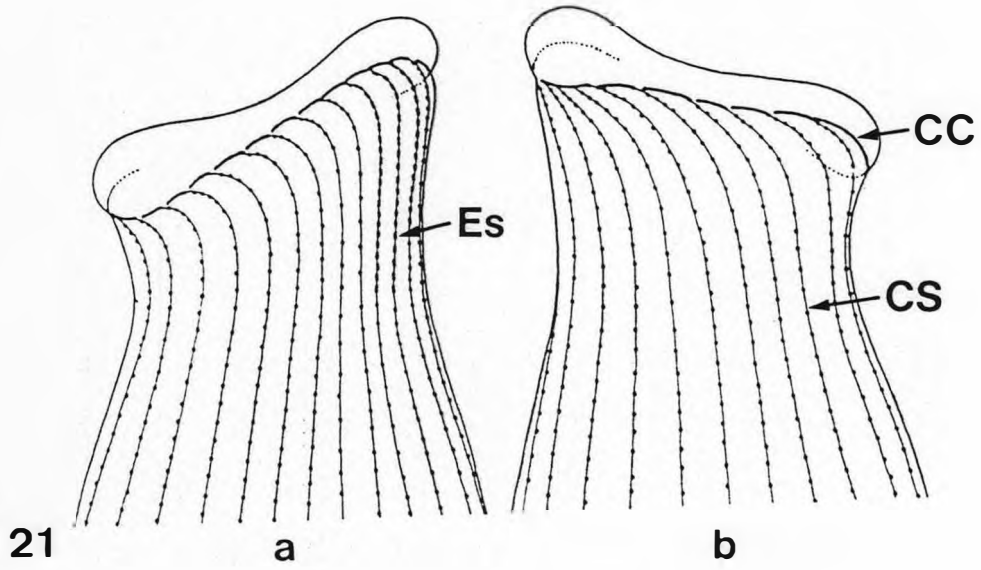
Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Figura 19 - Micrografia eletrônica de transmissão de um corte transversal ao nível da cinécia circumoral e da escova. Observar no par de cinetosomos, o cinetosomo cilífero (CC) e o nu (CN) sob o qual partem os nemadesmos (Nd); o cílio claviforme da escova com uma estrutura atípica (seta grande) em torno de seu axonema; e o derivado cinetosomiano suplementar (setas).

Aumento: 24.270X.

Figura 20 - Micrografia eletrônica de transmissão de um corte transversal ao nível das cinécias somáticas. Observar as fibras transversas (FT) que saem dos cinetosomos e interligam as cinécias adjacentes.

Aumento: 40.000X.



Epispathidium amphoriforme (Greeff, 1888)

Figura 21 - Representação esquemática das características do gênero *Spathidium* com aspectos da infraciliatura da região anterior do corpo. a - vista lateral esquerda; b - vista lateral direita; c - vista superior do rebordo bucal. CC - cinécia circumoral; CS - cinécia somática; Es - escova. (FOISSNER, 1984).

Figura 22 - Representação esquemática das características do gênero *Epispathidium* com aspectos da infraciliatura da região anterior do corpo. a - vista lateral esquerda; b - vista lateral direita; c - vista superior do rebordo bucal. CC - cinécia circumoral; CS - cinécia somática; Es - escova. (FOISSNER, 1984).

Tabela 3 - Aspectos Característicos de *Epispathidium amphoriforme* (Greeff, 1888) com Base na Literatura e nos Resultados Aqui Obtidos.

Autores	Nomenclatura	Dimensões		Número de cinécias somáticas	Macronúcleo	Micronúcleo
		Comprimento	Largura			
DRAGESCO & DRAGESCO-KERNEIS (1986)	<i>Spathidium amphoriforme</i>	50 - 250µm	38 - 80µm	38 - 48	polimórfico fita longa enovelada rosário	numerosos
		98 - 150µm	35 - 65µm	35	corda enovelada e enodada	-
FOISSNER (1984)	<i>Epispathidium amphoriforme</i>	50 - 210µm	38 - 80µm	40 - 50	polimórfico rosário	numerosos
FRYD-JURSSAVEL et al. (1975)	<i>Spathidium amphoriforme</i>	120 - 200µm	-	20	-	-
		200 - 300µm	-	50	fita enovelada e enodada rosário	numerosos
		200 - 250µm 130 - 170µm*	-	20	-	-
KAHL (1938)	<i>Spathidium amphoriforme</i> <i>Spathidium amphoriforme</i> var. <i>securiforme</i> <i>Spathidium amphoriforme</i> var. <i>rectitoratum</i>	120µm 380 - 400µm**	-	-	-	-
		90 - 140µm	-	-	fortemente alongado	-
KATTAR (1986)	<i>Spathidium amphoriforme</i>	95 - 100µm	48 - 55µm	38 - 48	corde! comprido convoluto e enovelado	numerosos
PENARD (1922)	<i>Spathidium amphoriforme</i>					
SANTOS (1991) [#]	<i>Epispathidium amphoriforme</i>					

(*) Formas inoidas

(**) Formas canibais

2 - *Urostyla grandis* Ehrenberg, 1838.

2.1 - Descrição:

Os organismos estudados apresentavam um corpo bastante flexível, de forma elipsóide, comprimido dorsoventralmente e com suas extremidades anterior e posterior arredondadas. (Figuras 23, 24, 25, 26 e 29).

Os exemplares fixados observados mediam de 102 a 253 μ m de comprimento por de 33 a 75 μ m de largura.

A ciliatura somática ventral, pouco diferenciada, estava representada por pelo menos 18 cinécias de cirros finos e pequenos (8,8 μ m), que se estendiam continuamente da margem direita a margem esquerda do ciliado (Figuras 23, 25 e 26). Em um trajeto diagonal estas cinécias tornavam-se mais curtas nos lados esquerdo superior e direito inferior do corpo (Figuras 23 e 25) e algumas destas adentravam a face dorsal (Figuras 24 e 29). Medianamente, a direita e abaixo do perístoma, duas cinécias (cinécias médio-ventrais) se destacavam por interromperem precocemente o seu percurso (Figuras 23 e 25). Seus cirros não posicionavam-se lado a lado como nas demais, porém em ziguezague (Figuras 23 e 25). Estavam particularmente mais próximos uns dos outros à medida que suas cinécias se dirigiam para a região anterior e contornavam o perístoma inferiormente, terminando a altura dos primeiros cirros frontais (Figuras 23 e 25).

Os cirros frontais mostraram-se abundantes, 26, e excetuando um leve engrossamento, principalmente daqueles mais anteriores, apresentavam-se pouco distintos dos outros

cirros que compunham a face ventral (Figuras 23, 25 e 26). Eles tendiam a acompanhar o encurvamento, em direção a margem esquerda, da região anterior do corpo, jamais ultrapassando o limite superior da membrana paroral (Figuras 23, 25 e 26). A primeira cinécia era formada por 3 cirros adjacentes ao lábio peristomático (Figuras 23 e 28). A segunda por outros 3 bem afastados entre si, dois bem mais grossos e anteriores e um terceiro mais delgado e posterior. A terceira e a quarta cinécias possuíam respectivamente 8 e 12 cirros, e representam nitidamente uma continuação das duas cinécias médio-ventrais, mantendo o posicionamento em zigzag de seus cirros (Figura 23).

Eram 11 os cirros transversais, bem posteriores, pouco expressivos, porém algo mais longos ($13\mu\text{m}$) que os demais (Figuras 23, 25, 26 e 27).

A região oral ocupava o quarto anterior ventral do corpo e estava constituída de um pequeno perístoma (de 33 a $51\mu\text{m}$) triangular e estreito (Figuras 23, 25, 26 e 28). Os lábios peristomáticos externo e interno, assim como a membrana paroral revelaram-se pouco acentuados e ligeiramente encurvados para a margem esquerda do corpo (Figuras 23, 25, 26 e 28). A zona adoral de membranelas possuía de 60 a 70 paramebranelas curtas (Figuras 23, 25 e 26). Uma provável membrana endoral foi assinalada, muito embora seu trajeto não tenha sido claramente exposto pelas preparações (Figuras 23, 26 e 28).

Na face dorsal pôde-se constatar a presença de uma ciliatura mais reduzida, formada por 14 cinécias de cerdas e de cirros. Estes, caracteristicamente, demonstraram se-

rem as cinécias mais periféricas uma continuação das porções de algumas das cinécias ventrais que se expandiam até os domínios da face dorsal (Figuras 24 e 29).

O macronúcleo estava fragmentado em uma centena de pequenas porções desiguais, muitas vezes de difícil individualização, que se dispersavam por todo o endoplasma (Figuras 30 e 31). Não foi possível distinguir qualquer micronúcleo em nossas preparações.

Com observações *in vivo* foi possível evidenciar a existência de um vacúolo contrátil junto a margem esquerda. Comumente alguns organismos tinham sua região posterior escurecida e, outros ainda, apresentavam um dilatamento anormal da parte central de seu corpo.

Ultraestruturalmente, pudemos observar um córtex somático rico em mitocôndrias e em vesículas de conteúdo denso (Figuras 32 e 33). Das organelas ciliares somáticas uns poucos cirros com seus cinetosomos organizados em alinhamentos paralelos exibiam seus derivados cinetosomianos e os inúmeros feixes de microtúbulos que deles se dispersavam (Figuras 32 e 33). Das organelas ciliares orais visualizamos a zona adoral de membranelas, caracterizando sua conformação em várias paramembranelas de três fileiras paralelas de cílios, separadas umas das outras por cristas intermembranelares (Figura 34).

Os espécimes, em sua maioria, nadavam junto ao fundo vasculhando vagorosamente qualquer substrato, dobrando-se sobre este e contornando-o seguidamente em busca de alimento. Alguns podiam ser vistos nadando na coluna d'água, quando executavam movimentos circulares em torno do eixo lon-

gitudinal de seu corpo. Outros poucos flutuavam na superfície.

Pudemos assinalar a presença de *Urostyla grandis* em musgos embebidos já a 4 meses e altamente deteriorados, o que poderia indicar um hábito alimentar bacteriófago e/ou saprozáico.

2.2 - Discussão e Conclusão:

Os aspectos diagnósticos do gênero *Urostyla* Ehrenberg, 1838 e de sua espécie tipo *Urostyla grandis* têm sido analisados até bem pouco tempo, sendo novos dados frequentemente acrescentados.

São bem definidos para o gênero caracteres como a presença de uma ciliatura somática ventral formada pelo conjunto de várias cinécias marginais direitas (BORROR, 1979) e esquerdas (HEMBERGER, 1982) ou por muitas cinécias de cirros ventrais (BORROR, 1972 e DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS, 1986); cirros frontais que se continuam a partir dos ventrais e muitas vezes pouco se diferenciam destes; e macronúcleos comumente numerosos. A possível ausência de cirros transversais (BORROR, 1972) parece ser excluída deste gênero por DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), HEMBERGER (1982) e KAHL (1932).

Válida é hoje para *Urostyla* a presença entre a ciliatura ventral de duas cinécias medianas (as cinécias médio-ventrais) que expõem marcado padrão de cirros em ziguezague (Figuras 23, 25 e 35). Tal caráter embora tenha sido primeiramente assinalado por JERKA-DZIADOSZ (1964a) para sua

nova espécie *U. cristata*, foi afastado por BORROR (1972) para um novo gênero *Pseudourostyla*. *U. cristata* e mais duas outras espécies foram assim recombinaadas e levadas para fora da família Urostylidae. Somente mais tarde, baseando-se na descoberta de JERKA-DZIADOSZ (1972) do mesmo padrão zigzague para *U. grandis*, BORROR (1979) devolveu as espécies de *Pseudourostyla* para a família Urostylidae, mantendo contudo a validade de seu gênero. Ainda em 1979 TUFFRAU, e depois HEMBERGER (1982) estabelecem *Pseudourostyla* Borrór, 1972 como novo sinônimo para *Urostyla* Ehrenberg, 1838.

Definidas todas as características para o gênero, umas tantas outras permaneceram confusas para a espécie. A relativa uniformidade de sua ciliatura somática (Figuras 23, 25 e 26) aliada as descrições e representações antigas, na maioria pouco elucidativas e discrepantes entre si, têm dificultado a ideal determinação de *U. grandis*. Ademais, esta parece não possuir caracteres estáveis que, como em outros Euhypotrichida, possam ser utilizados em uma diagnose mais precisa (Tabela 4).

Por exemplo, muitos dos trabalhos existentes nem sequer estabelecem o número de paramembranelas da zona adoral ou dos cirros frontais. Apenas JERKA-DZIADOSZ (1972) quantificou as primeiras (Tabela 4) enquanto, estes últimos, contabilizados a partir dos esquemas propostos pelos autores, podem variar de 22 (BORROR, 1979) até mais de 40 (Ehrenberg, 1838 *apud* KAHL, 1932) (Figuras 35 e 36 e Tabela 4).

Os números para as cinécias de cirros ventrais e para os cirros transversais também não são constantes (Figuras 35 a 40 e Tabela 4) e principalmente estas estruturas

não foram, por muitos, figuradas de forma fiel. Observando a obra de KAHL (1932) pudemos nos confrontar com 5 tipos distintos de *U. grandis*. O tipo originalmente proposto por Ehrenberg (Figura 36), aquele visto por Stein (Figura 37) e outros três de Stokes (*U. trichogaster* Stokes, 1885; *U. elongata* Stokes, 1891 e *U. fulva* Stokes, 1891) (Figuras 38, 39 e 40) que caíram em sinonímia (BORROR, 1972 e HEMBERGER, 1982). Todos eles possuíam trajeto retilíneo das cinécias ventrais e cirros transversais notadamente pronunciados.

BORROR (1979) e JERKA-DZIADOSZ (1963, 1964b e 1972) retrataram muito bem estes últimos, porém não confirmaram nossa visão de cinécias ventrais em diagonal (Figuras 23 e 25). Ao contrário suas cinécias esquerdas estendiam-se continuamente pela superfície ventral. Para as cinécias médio-ventrais ainda que bem caracterizadas em seu prolongamento através dos cirros frontais, jamais pareceu-nos serem tão longas ou distantes do perístoma (Figuras 23 e 25). Estes autores, assim como HEMBERGER (1982), distinguiram cinécias marginais, o que efetivamente não conseguimos.

Das representações para a região anterior do corpo, no que diz respeito ao tamanho e a forma do perístoma e disposição dos cirros frontais aquela introduzida por Ehrenberg (*apud* KAHL, 1932) (Figura 36) é a que melhor se aproxima da figurada por BORROR (1979) (Figura 35). Ambas, entretanto, só nos contemplaram melhor no primeiro aspecto morfológico, sendo menos fidedignas na forma nada encurvada do lábio peristomático e da membrana paroral e, mesmo que infinitamente melhores que as de Stein e Stokes (*apud* KAHL, 1932) (Figuras 37 a 40), também na disposição das cinécias

dos cirros frontais. Mostrou-se bastante distinta, por exemplo, a figuração da primeira cinécia ladeando toda a membrana paroral com seus 8 cirros (BORROR, 1979) (Figura 35) e 10 cirros (Ehrenberg *apud* KAHL, 1932) (Figura 36).

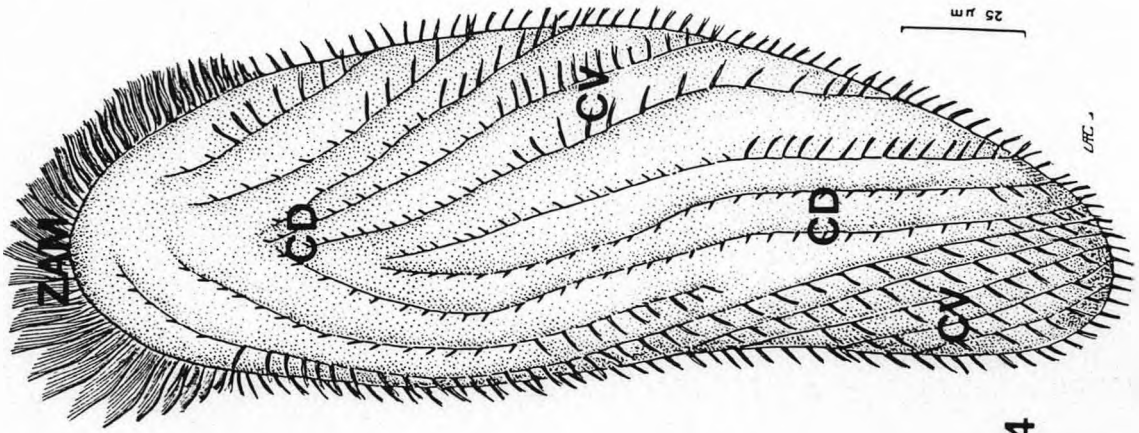
Mesmo JERKA-DZIADOSZ (1972) reinterpretoou o arranjo das cinécias de cirros frontais por ele anteriormente descritas (vide JERKA-DZIADOSZ, 1963 e 1964b). Naquela ocasião, reafirmou a presença de dupla membrana paroral e de 3 cinécias de cerdas dorsais dispostas da extremidade posterior a anterior do corpo do ciliado. Tais características, além de divergirem das observadas por nós, não foram mencionadas por outros autores, aumentando ainda mais as discrepâncias das diagnoses até agora propostas.

A constituição ultraestrutural do córtex somático quanto aos feixes de microtúbulos (Figuras 32 e 33) recordou aquelas vistas por FLEURY *et al.*, 1985; JERKA-DZIADOSZ, 1980; PUYTORAC *et al.*, 1976 e WICKLOW, 1981. Este último encontrou vesículas eletron-densas perto da superfície celular de *Thigmokeronopsis jahodai*, as quais presumiu serem grânulos amarelo esverdeados observados à luz da microscopia fotônica. Se bem que muito similares as por nós avistadas (Figuras 32 e 33), diferentemente não conseguimos estabelecer a natureza destas estruturas.

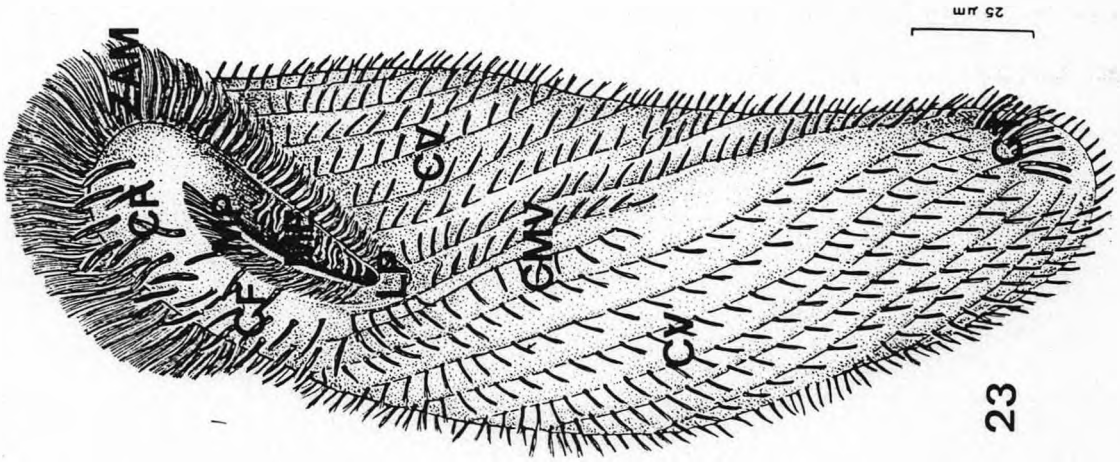
Restaram em nossas comparações ainda dois pontos: o tamanho corporal de *U. grandis*, sempre relatado como de grandes proporções (Tabela 4) e a real presença de micronúcleos referida por JERKA-DZIADOSZ (1963, 1964b e 1972), KAHL (1932) e RIOS *et al.* (1985). Embora a análise de nossas aferições do comprimento de *U. grandis* tenha revelado resul-

tados substancialmente inferiores aos já relatados na literatura (apenas se aproximando aos de Stokes) (Tabela 4) supomos que, provavelmente, tratavam-se de indivíduos jovens ou estes estariam submetidos a condições ambientais pouco favoráveis a seu pleno desenvolvimento. Quanto aos micronúcleos, estes deviam existir, talvez encontrando-se ocultos entre as inúmeras massas macronucleares ou estando ausentes na etapa do ciclo de vida em que os exemplares foram capturados.

Finalmente, tendo-se em conta a ausência de bibliografia portadora de esquemas e descrições mais detalhadas ou boas microfotografias para comparações; a indefinição de muitos aspectos morfológicos importantes (como número de cinécias ventrais e dorsais, de cirros frontais e transversais e de paramembranelas da zona adoral) e a inexistência de qualquer referência a membrana endoral, consideramos que o conjunto de diferenças aqui abordadas, mesmo que significativas (disposição e forma das cinécias ventrais, médio-ventrais e frontais), devem ser relevadas, por cautela, ao plano de variedade intraespecífica e, até que se conheça melhor os caracteres diagnósticos que delimitam esta espécie, devemos colocar como positiva a identificação dos exemplares coletados dentro de *Urostyla grandis*.



24

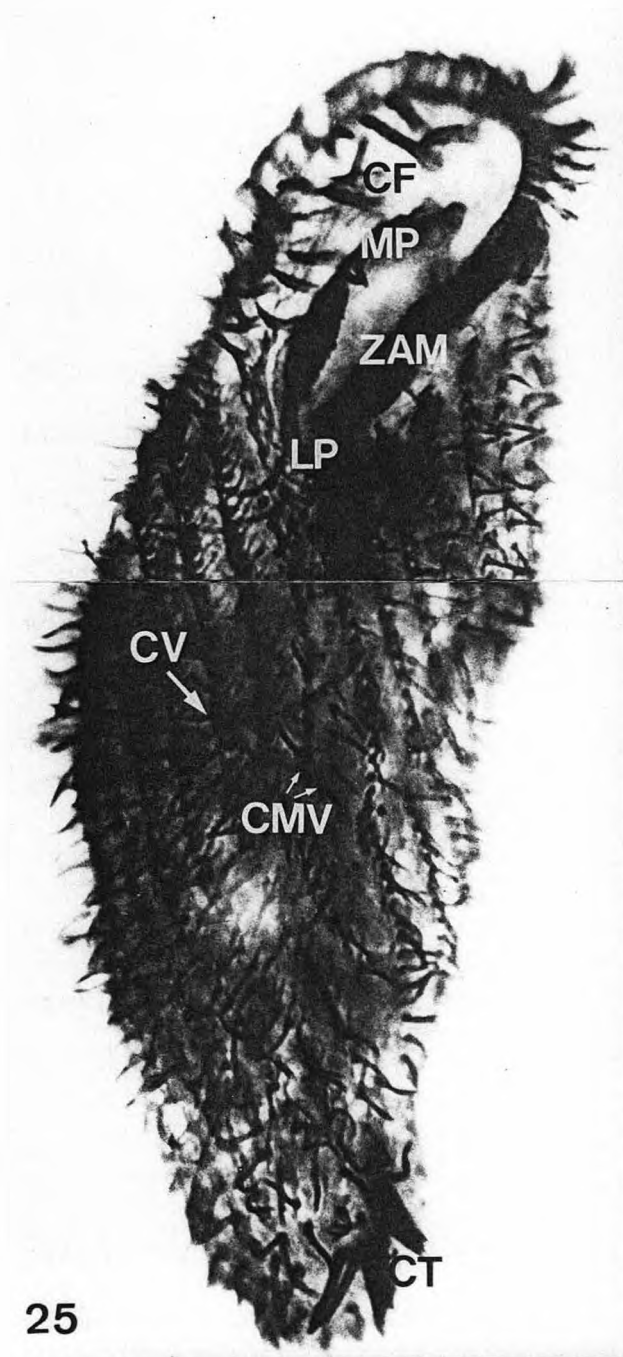


23

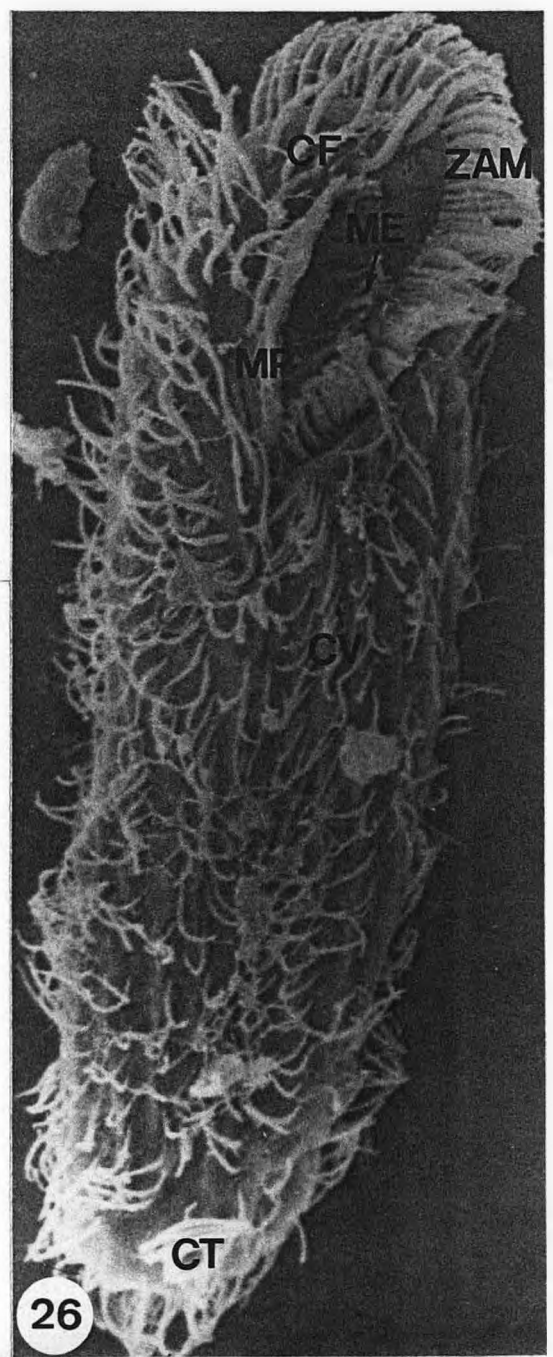
Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figura 23 - Representação mostrando o aspecto geral da face ventral. CF - cirros frontais; CMV - cinécias médio-ventrais; CT - cirros transversais; CV - cirros ventrais; LP - lábio peristomático; ME - membrana endoral; MP - membrana paroral; ZAM - zona adoral de membranelas.

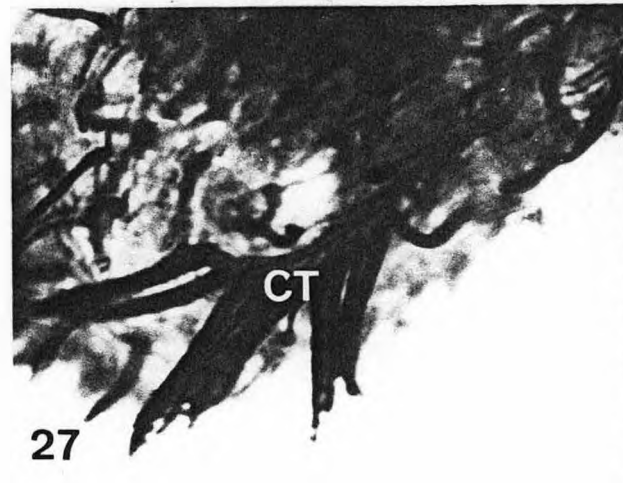
Figura 24 - Representação mostrando o aspecto geral da face dorsal. CD - cerdas dorsais; CV - cirros ventrais; ZAM - zona adoral de membranelas.



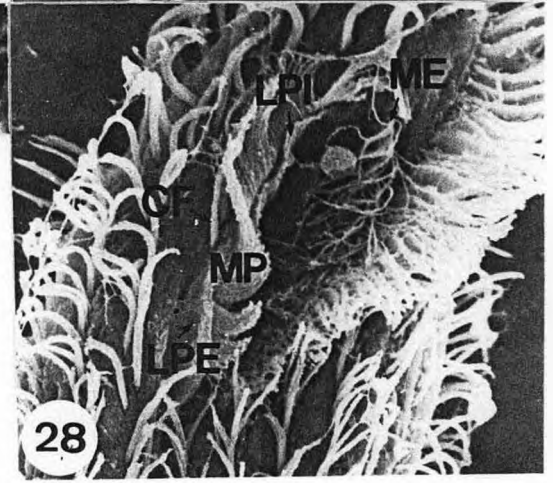
25



26



27



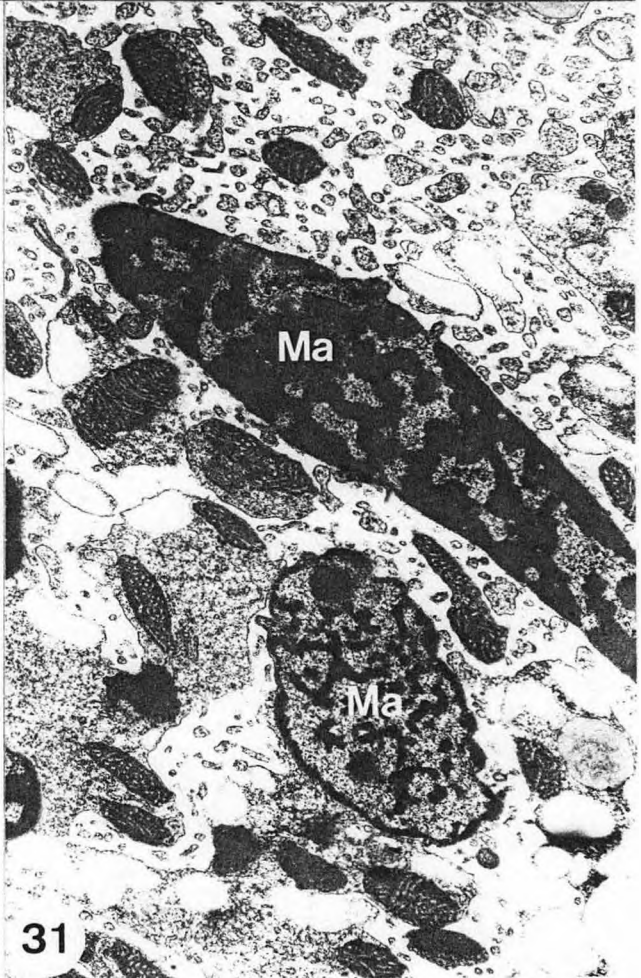
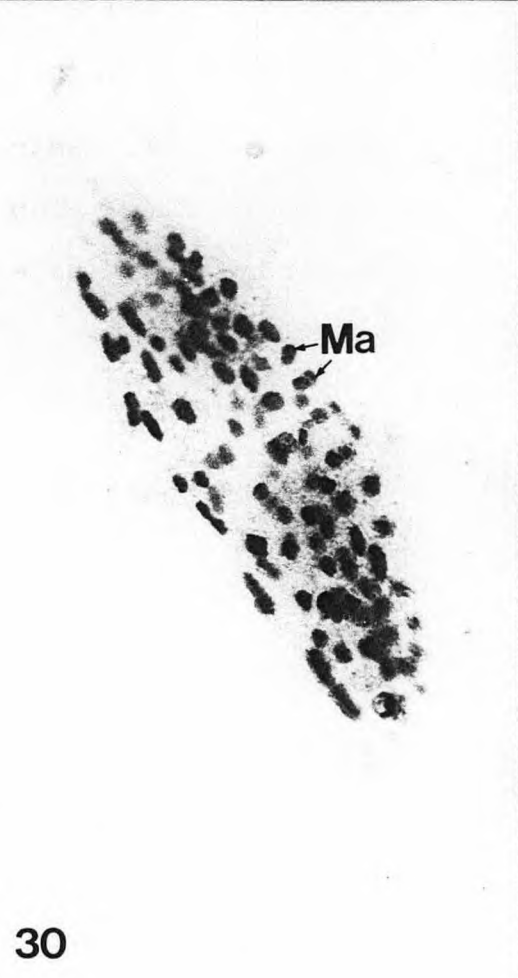
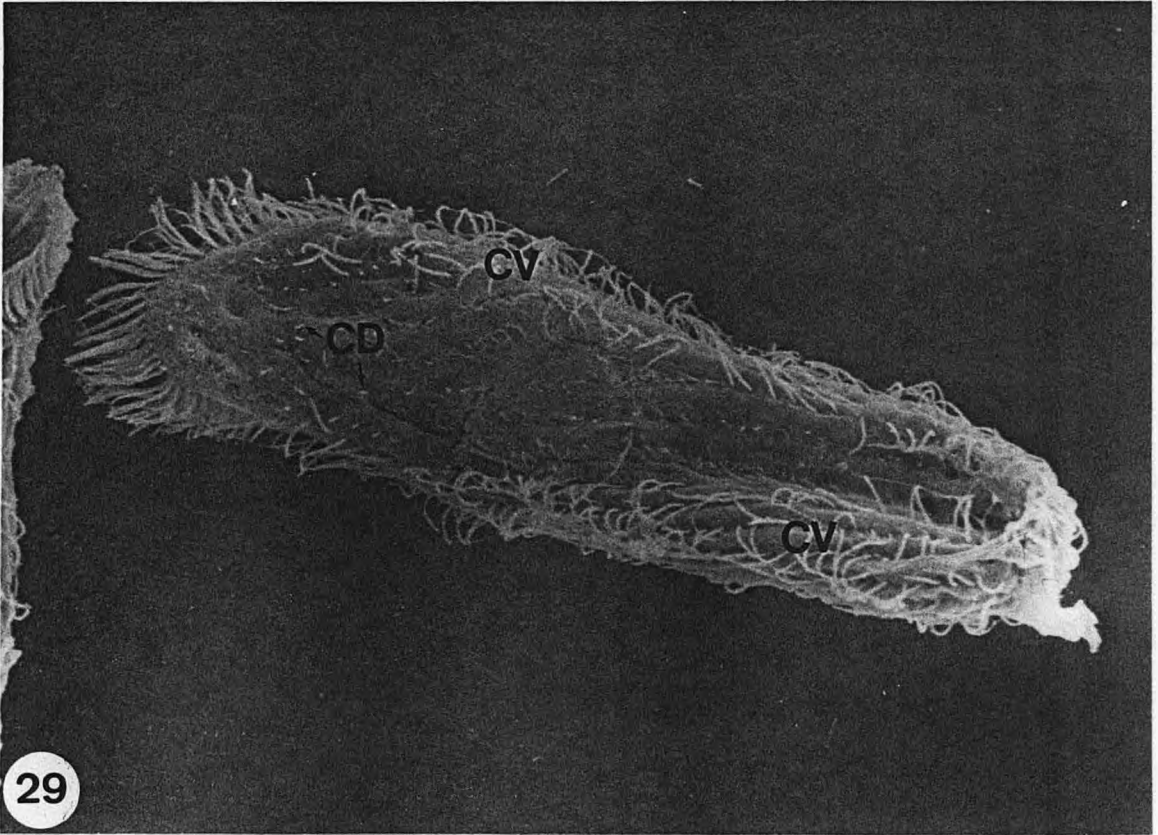
28

Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figuras 25 e 26 - Fotomicrografia ao Protargol e micrografia eletrônica de varredura mostrando aspectos da face ventral, respectivamente. CF - cirros frontais; CMV - cinécias médio-ventrais; CT - cirros transversais; CV - cirros ventrais; LP - lábio peristomático; ME - membrana endoral; MP - membrana paroral; ZAM - zona adoral de membranelas.
Aumentos: 900X e 1.850X, respectivamente.

Figura 27 - Fotomicrografia de um close dos cirros transversais (CT) ao Protargol.
Aumento: 1.950X.

Figura 28 - Micrografia eletrônica de varredura da região oral. Notar a presença de cirros frontais (CF) bem próximos a membrana paroral (MP); dos lábios peristomáticos externo (LPE) e interno (LPI); e da membrana endoral (ME).
Aumento: 2.000X.



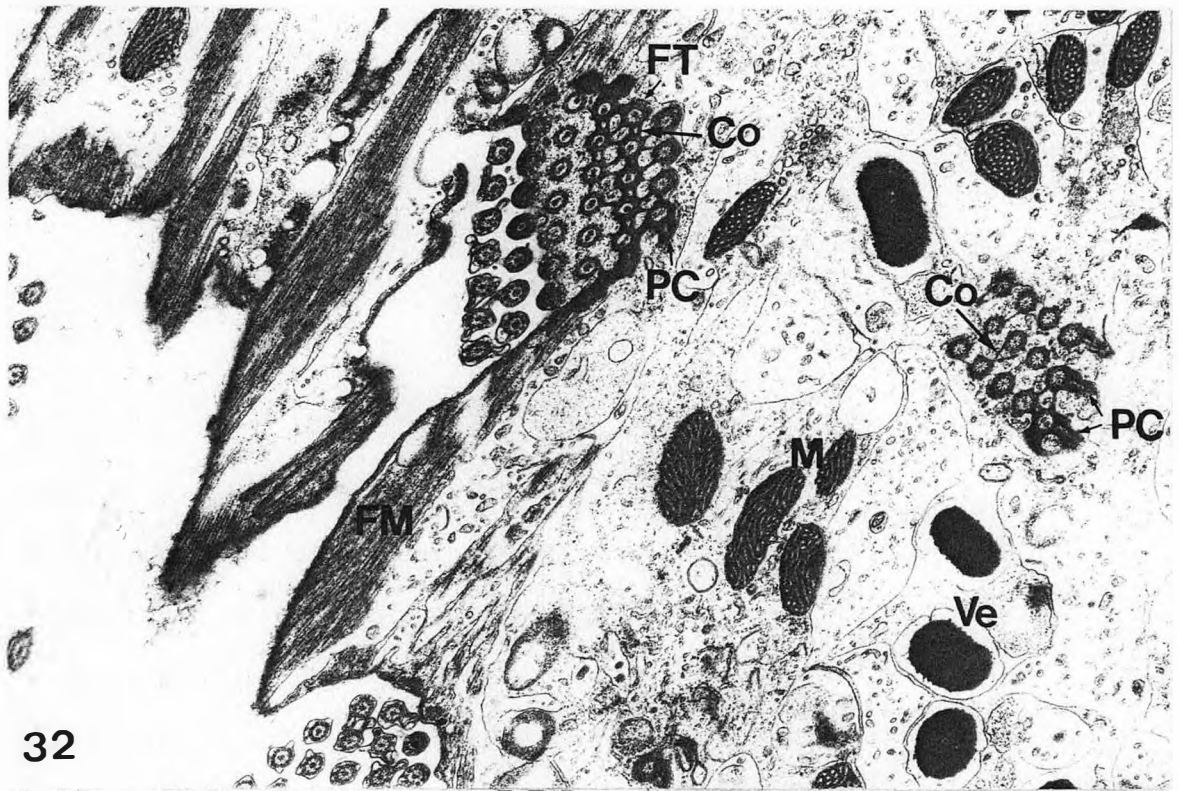
Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figura 29 - Micrografia eletrônica de varredura da face dorsal. Observar o prolongamento de algumas das cinécias de cirros ventrais (CV) que adentram a face dorsal e as cinécias de cerdas dorsais (CD).

Aumento: 1.300X.

Figuras 30 e 31 - Fotomicrografia em reação nuclear de Feulgen e micrografia eletrônica de transmissão do aparelho nuclear, respectivamente. Ma - Macronúcleo.

Aumentos: 560X e 14.540X, respectivamente.



Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figuras 25 e 26 - Fotomicrografia ao Protargol e micrografia eletrônica de varredura mostrando aspectos da face ventral, respectivamente. CF - cirros frontais; CMV - cinécias médio-ventrais; CT - cirros transversais; CV - cirros ventrais; LP - lábio peristomático; ME - membrana endoral; MP - membrana paroral; ZAM - zona adoral de membranelas.

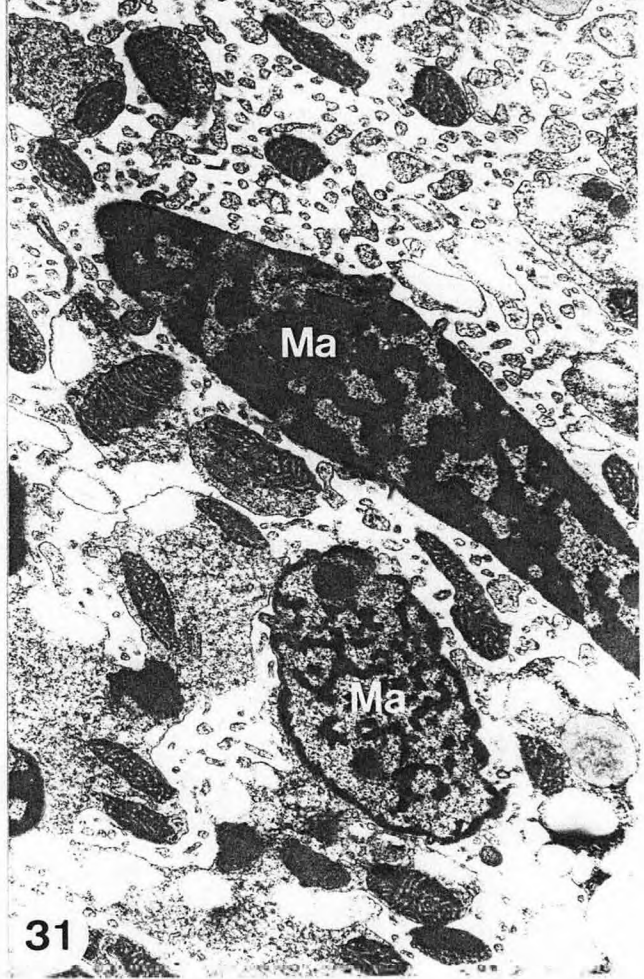
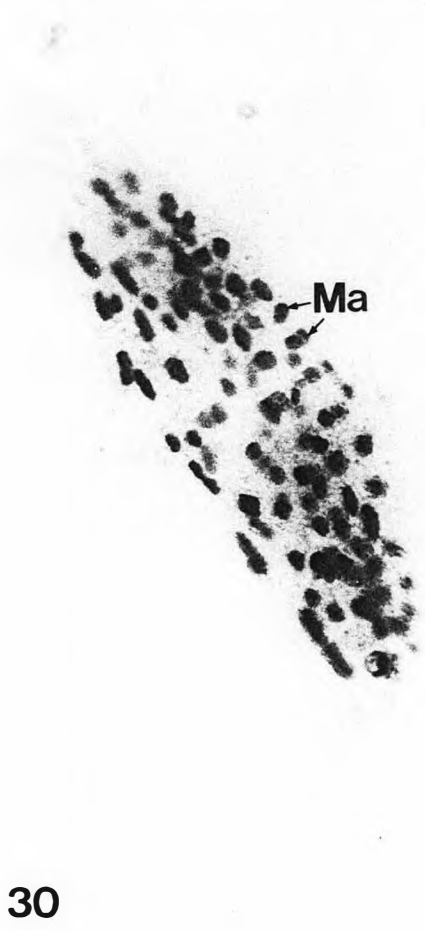
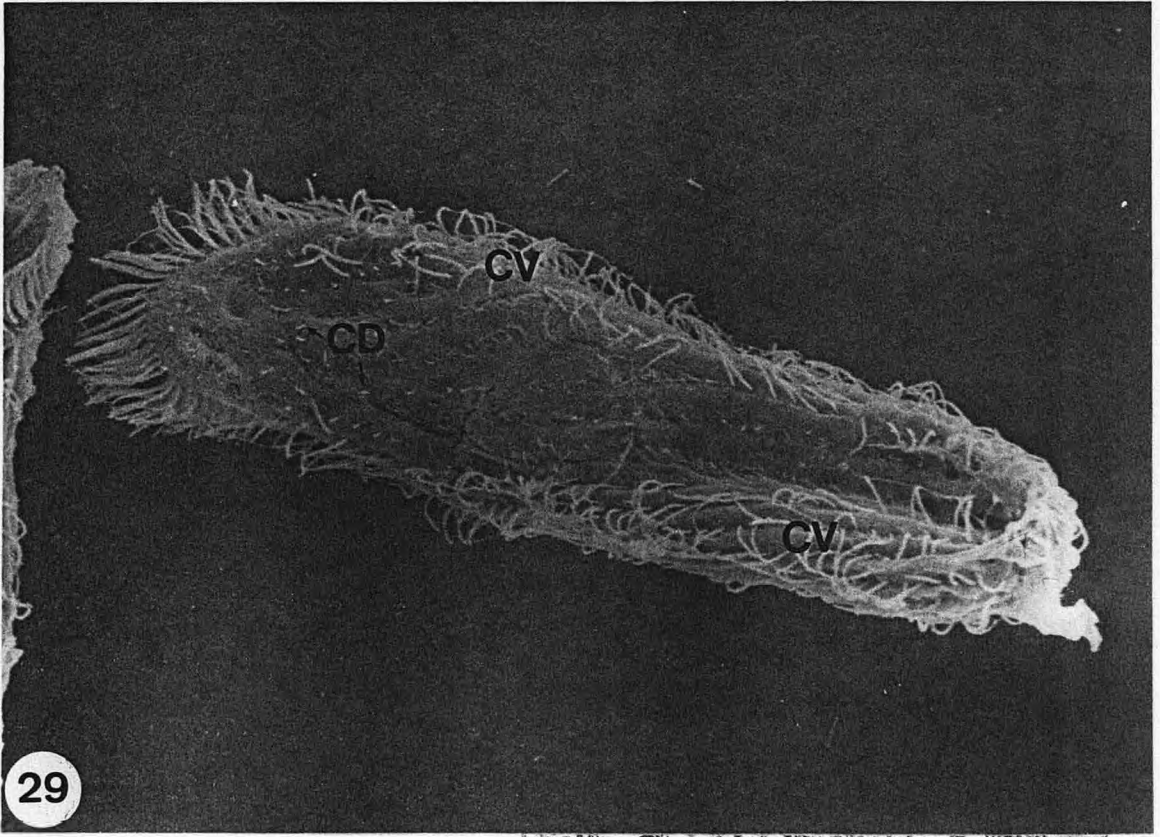
Aumentos: 900X e 1.850X, respectivamente.

Figura 27 - Fotomicrografia de um close dos cirros transversais (CT) ao Protargol.

Aumento: 1.950X.

Figura 28 - Micrografia eletrônica de varredura da região oral. Notar a presença de cirros frontais (CF) bem próximos a membrana paroral (MP); dos lábios peristomáticos externo (LPE) e interno (LPI); e da membrana endoral (ME).

Aumento: 2.000X.



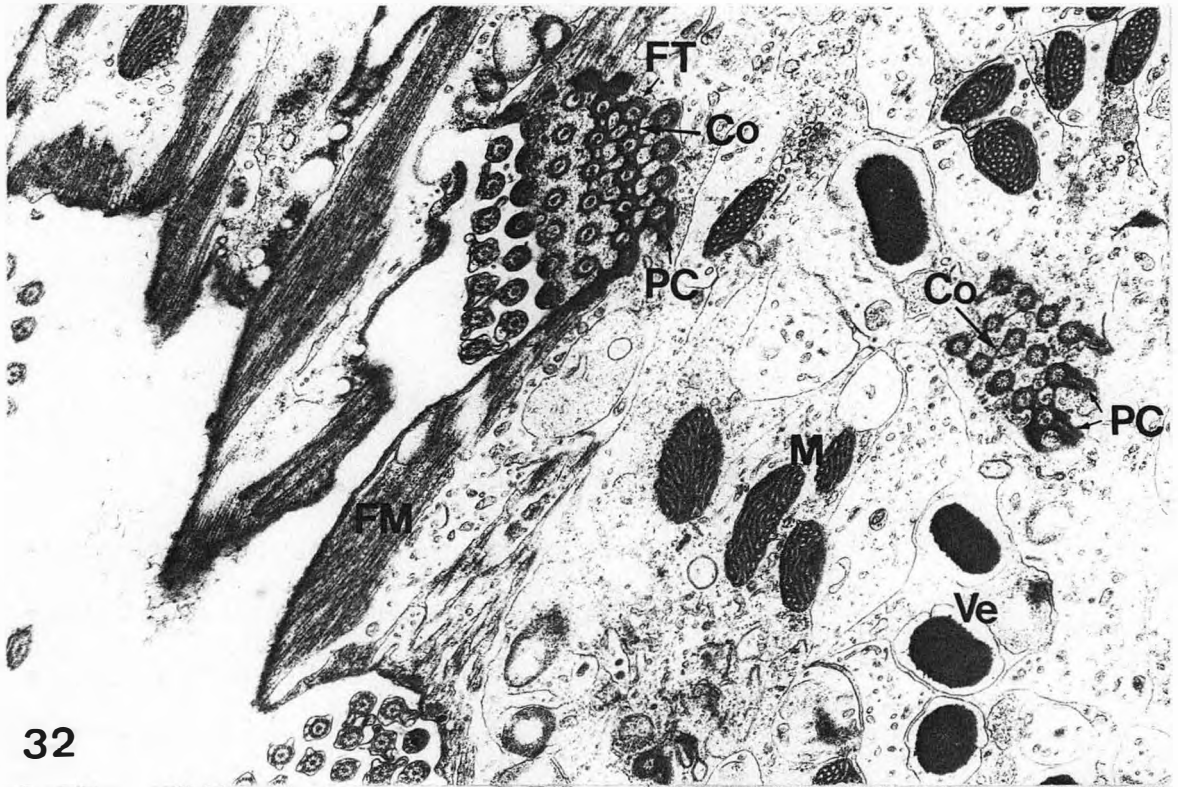
Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figura 29 - Micrografia eletrônica de varredura da face dorsal. Observar o prolongamento de algumas das cinécias de cirros ventrais (CV) que adentram a face dorsal e as cinécias de cerdas dorsais (CD).

Aumento: 1.300X.

Figuras 30 e 31 - Fotomicrografia em reação nuclear de Feulgen e micrografia eletrônica de transmissão do aparelho nuclear, respectivamente. Ma - Macronúcleo.

Aumentos: 560X e 14.540X, respectivamente.



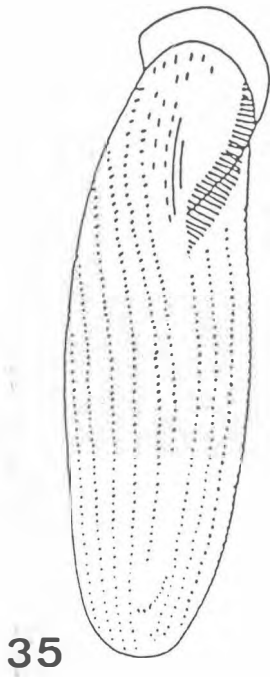
Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figuras 32 e 33 - Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando aspectos do córtex somático. Notar no corte transversal a nível dos cinetosomos dos cirros as conexões intercinetosomianas (Co); as fibras transversas (FT) e as fibras pós-ciliares (PC) que partem dos cinetosomos. M - mitocôndrias; FM - feixes de microtúbulos; Ve - vesículas de conteúdo denso.

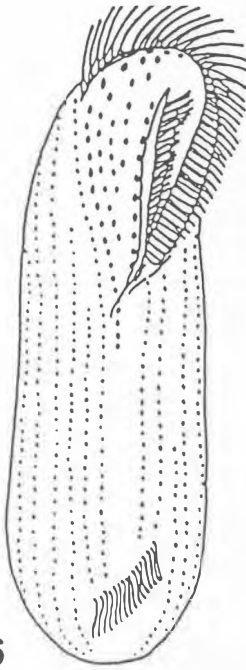
Aumentos: 15.620X e 12.780X, respectivamente.

Figura 34 - Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção transversal na base das membranelas da zona adoral. Observar as três fileiras paralelas de cinetosomos (números) que formam cada membranela e as cristas que as separam (setas).

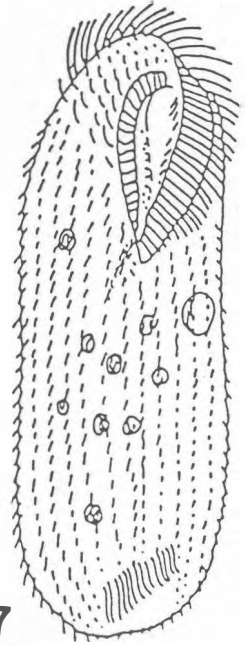
Aumento: 12.825X.



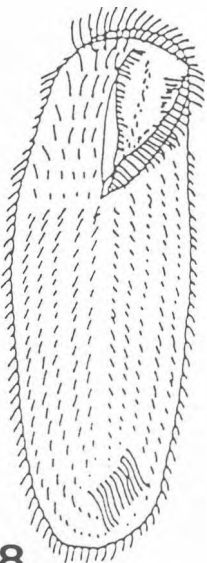
35



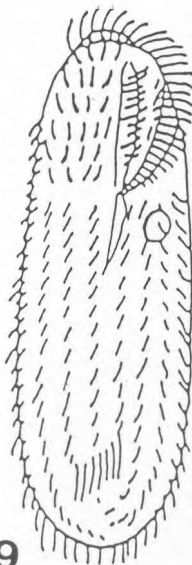
36



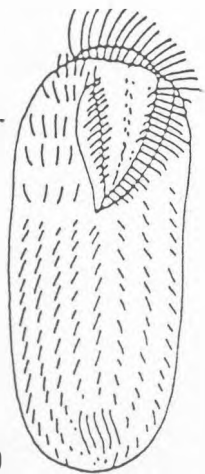
37



38



39



40

Urostyla grandis Ehrenberg, 1838

Figura 35 - Desenho esquemático figurado por BORROR (1979).

Comprimento: 360 μ m

Figura 36 - Desenho esquemático figurado por Ehrenberg, 1838
(*apud* KAHL, 1932).

Comprimento: 300 - 400 μ m

Figura 37 - Desenho esquemático figurado por Stein (*apud*
KAHL, 1932).

Comprimento: 350 μ m

Figura 38, 39 e 40 - Desenhos esquemáticos figurados por Stokes (*apud* KAHL, 1932). Nesta ordem: *Urostyla trichogaster* Stokes, 1885 (comp.: 300 μ m); *Urostyla elongata* Stokes, 1891 (comp.: 300 μ m); *Urostyla fulva* Stokes, 1891 (comp.: 250 μ m).

Tabela 4 - Aspectos Característicos de Urostyla grandis Ehrenberg, 1838 com Base na Literatura e nos Resultados Aqui Obtidos^a.

Autores	Nomenclatura	Dimensões		Número de círculos ventrais	Número de círculos frontais	Número de círculos transvers.	Número de paracercárias da 2ª BH	Número de círculos dorsais	Número de macronúcleos	Número de micronúcleos
		Comprimento	Largura							
BORROR (1979)	<u>Urostyla grandis</u>	360µm	-	10	22	11	-	-	-	-
DREYER (1838) [#]	<u>Urostyla grandis</u>	300 - 400µm	-	11	> 40	10 - 20	-	-	> 100	6 - 8
ZEMPA-DZIADOSZ (1963)	<u>Urostyla grandis</u>	300 - 400µm	-	12	24	12 - 16	-	> 50	> 100	3
ZEMPA-DZIADOSZ (1972)	<u>Urostyla grandis</u>	-	-	10 - 14	24	12 - 16	60 - 70	0 - 16	80 - 100	3
STEIN [#]	<u>Urostyla grandis</u>	350µm	-	13	35	14	-	-	-	-
STOKES (1865) [#]	<u>Urostyla trichogaster</u>	250 - 320µm	-	12	35	10	-	-	-	-
STOKES (1891) [#]	<u>Urostyla elongata</u>	300µm	-	8	25	0 - 10	-	-	-	-
STOKES (1891) [#]	<u>Urostyla fulva</u>	250µm	-	8	20	5 - 6	-	-	-	-
SANTOS (1991) ⁰	<u>Urostyla grandis</u>	102 - 253µm	33 - 75µm	18	26	11	60 - 70	14	> 100	-

[#] apud KAHL (1932)

3 - *Steinia quadrinuclata* Dragesco & Njiné, 1971

3.1 - Descrição:

Os espécimes de *Steinia quadrinuclata* examinados possuíam um corpo flexível de forma elipsóide, onde ambas as extremidades, anterior e posterior, apresentavam-se arredondadas. A superfície ventral era ligeiramente côncava e a dorsal convexa. (Figuras 41, 42, 43, 44 e 49).

As dimensões dos exemplares fixados variavam de 73 a 110 μ m de comprimento por de 35 a 55 μ m de largura.

A ciliatura somática ventral, bastante diferenciada e formada por um conjunto de cirros fortes, mostrava duas fileiras de cinécias marginais, separadas posteriormente perto da região dos cirros caudais, com cerca de 16 cirros na cinécia marginal direita e cerca de 14 cirros na cinécia marginal esquerda (Figuras 41 e 44). Enquanto que os cirros marginais direitos mantinham-se sempre ao longo do bordo do corpo do ciliado, os cirros marginais esquerdos afastavam-se gradativamente da margem esquerda, a medida que se aproximavam da região oral (Figuras 41 e 44). Estavam presentes 8 cirros frontais, sendo mais longos e fortes os 4 mais anteriores (Figuras 41 e 44). Existiam 5 cirros ventrais, dos quais 2 abaixo da região oral, 1 nas imediações da região mediana do corpo e os outros 2 dispostos na porção posterior, sendo o último destes bem vizinho aos cirros transversais (Figuras 41, 45 e 47). Os cirros transversais em número de 5, bem posteriores e longos, estavam 4 deles perfeitamente enfi-

leirados em uma diagonal e 1 se destacava, elevando-se ligeiramente dos restantes (Figuras 41, 46 e 47). O conjunto destes últimos, pelo seu posicionamento e longitude excedida por sobre a extremidade posterior do corpo, deve ter papel importante na locomoção, acrescentando-se a eles os movimentos realizados pelos cirros caudais.

A área oral era bastante evidente, mostrando um grande perístoma em forma de gota portador de uma zona adoral de membranelas constituída por cerca de 28 paramembranelas e de uma única membrana paroral contornada, a sua direita, por um lábio peristomático conspícuo (Figuras 41 e 44). Esta se arqueava, anteriormente, em direção a margem esquerda do corpo, aonde se encontrava com a zona adoral de membranelas fechando, desta forma, a parte superior do perístoma (Figuras 41 e 44). Dentro da cavidade bucal foi constatada a presença de uma membrana endoral que, em trajeto paralelo ao da zona adoral de membranelas, encontra-se anteriormente com a extremidade final encurvada da membrana paroral (Figuras 41 e 48).

A ciliatura somática dorsal, escassa, compunha-se por 6 cinécias de cerdas, dispostas por vezes no interior de sulcos, sendo a primeira e a segunda bastante curtas (Figuras 42, 49 e 50) (segundo BERGER & FOISSNER, 1987 e DRAGESCO & NJINÉ, 1971 na vista dorsal a cinécia de número 1 será sempre a do extremo direito). Situavam-se na extremidade posterior 3 cirros caudais notadamente longos e tão fortes quanto os cirros transversais da ciliatura somática ventral (Figuras 42 e 51).

Na superfície dorsal esquerda, quase medianamente ao corpo, observou-se por diversas ocasiões (ao nível

da microscopia eletrônica de varredura) a presença de uma estrutura que se abria ao exterior ou que, vez por outra, apresentava-se fechada, mostrando sempre o seu contorno proeminente (Figuras 42 e 49). Esta pareceu-nos alojar-se logo acima da região do vacúolo contrátil (Figuras 41 e 52).

No endoplasma encontrávamos frequentemente 4 grandes macronúcleos dispostos, na maioria das vezes, um após o outro (Figura 52) ou, em poucas ocasiões, pareados (Figura 53), no eixo ântero-posterior central do corpo. O aparecimento de um número maior, de 5 a 8, ocorreu. As massas macronucleares, imprecisamente arredondadas, possuíam um diâmetro médio de $9\mu\text{m}$, e comumente mostravam as bandas de reorganização de seus cromossomos (Figura 54). O número de micronúcleos variou de 2 a 5 nos quais o diâmetro médio era de $2\mu\text{m}$. Estes podiam ser vistos, repetidamente, flanqueando as massas macronucleares (Figuras 52 e 55).

Exemplares de *Steinia quadrinucleata* vistos *in vivo* sob o microscópio estereoscópico demonstraram ser, quando ao fundo, nadadores velozes que executavam frequentes movimentos de vaivém, tanto na procura pelo alimento como nas mobilizações para escape. Quando deslocavam-se entre o fundo e a superfície realizavam movimentos giratórios em torno do eixo longitudinal de seu corpo. Estes mostravam-se mais lentos do que os efetuados no fundo, aonde a maioria dos exemplares permanecia. Poucos mantinham-se flutuando na camada superficial da água.

3.2 - Discussão e Conclusão:

Durante a descrição original DRAGESCO & NJINÉ (1971) destacaram que *Steinia quadrinucleata* é um ciliado de fácil identificação graças a marcante característica genérica da curvatura anterior de sua membrana paroral e específica de suas 4 massas macronucleares. Entretanto, a existência do gênero *Steinia* Diesing, 1866 tem sido discutida e contestada por alguns autores. KAHL (1932) o dispôs como subgênero de *Oxytricha* Ehrenberg, 1838, enquanto BORROR (1972) e HEMBERGER (1982) questionaram a validade diagnóstica de tal característica. Para este último o mesmo padrão de curvatura pode ser observado em variados graus de desenvolvimento em representantes do gênero *Oxytricha*. Igual abordagem é dada por DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), embora aceitem o gênero como válido. Ratificaram também sua existência CORLISS (1979b) e FOISSNER (1982 e 1984). Ressaltou este último o fato de BORROR (*op. cit.*) e HEMBERGER (*op. cit.*) darem sinônimos errados para o gênero, uma vez que as espécies de *Steinia* apresentam um grânulo subpelicular típico e constante (o mucocisto), e de não reconhecerem o gênero injustamente, pois a membrana paroral e o lábio peristomático encurvados são típicos e constantes, de modo que *Steinia* é claramente distinta de *Oxytricha*.

Apoiando-se na ocorrência de uma ciliatura somática ventral similar, HEMBERGER (1982) supôs ser *Steinia quadrinucleata* uma forma de *Oxytricha candens* Kahl, 1932 com 4 massas macronucleares. No entanto, consideramos o trabalho de FOISSNER (1984) com sua nova descrição da espécie baseada em dados biométricos que corroboraram com a descrição original de *Steinia quadrinucleata* (Tabela 5) e, segundo o qual,

HEMBERGER (1982) classificou inseguramente a espécie, não restando a partir de seus resultados mais nenhuma dúvida na determinação deste ciliado.

Os exemplares examinados por DRAGESCO & NJINÉ (1971) e FOISSNER (1984) eram pouco maiores que os descritos neste trabalho (Tabela 5). Suas cinécias marginais direita e esquerda possuíam, proporcionalmente, também um número maior de cirros, sendo os demais cirros que compõem a ciliatura somática ventral numericamente iguais aos encontrados em nosso estudo (Tabela 5). Aachamos, entretanto, que a cinécia marginal esquerda afasta-se de sua margem mais pronunciadamente (Figuras 41 e 44) do que a retratada por estes autores.

O comprimento e a espessura de alguns dos cirros que formam a ciliatura somática foram figurados de forma diversa. Para FOISSNER (1984) dos cirros frontais os 3 mais anteriores são mais fortes e extensos que os demais, assim como os 3 caudais são cirros longos. Já DRAGESCO & NJINÉ (1971) assemelharam os caudais ao aspecto dos cirros marginais e retrataram uma *Steinia quadrinucleata* com 3 cirros frontais anteriores mais grossos e longos. Concordamos com a representação do primeiro para os cirros caudais (Figuras 42 e 51) e discordamos com a de ambos para os frontais (Figuras 41 e 44). Estes mesmos autores mostraram 2 fortes cirros ventrais proximais ao perístoma. Para nós os 5 existentes são similares entre si (Figuras 41 e 45).

Foram assinaladas aqui em torno de 28 paramembranelas compondo a zona adoral de membranelas, para de 35 a 38 paramembranelas citadas na descrição original.

O perístoma foi descrito por DRAGESCO & NJINÉ

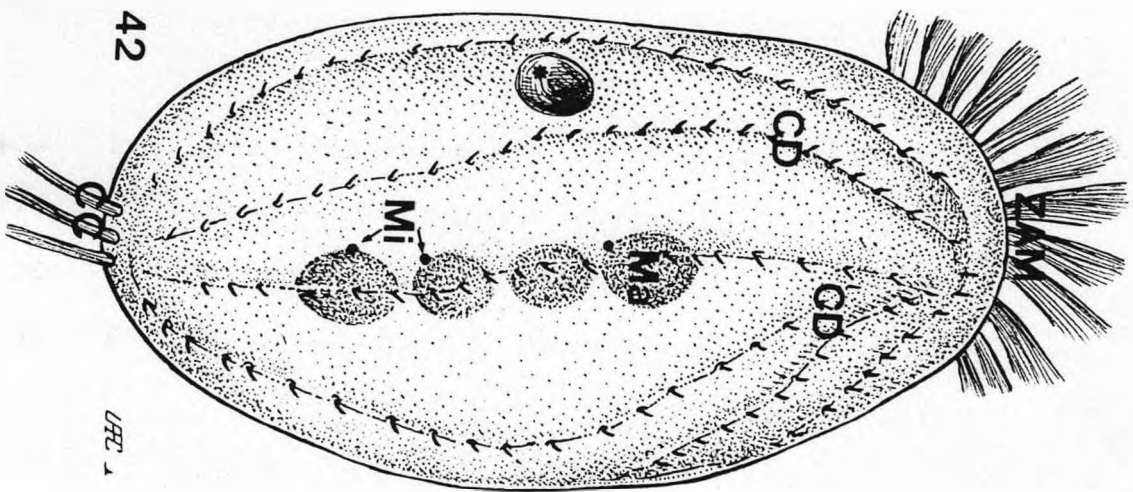
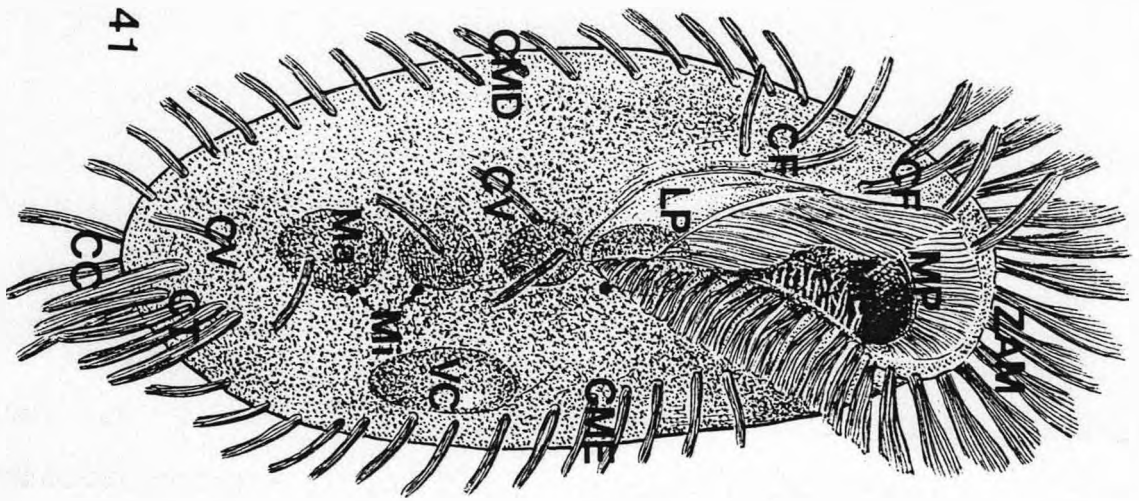
(1971) como possuidor de duas membranas parorais e talvez uma terceira mais curta e de traçado retilíneo. Já em seu trabalho de 1986 DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS mostraram-se incertos sobre a existência de uma dupla membrana paroral, mas firmaram a presença de uma curta membrana endoral. Comprovamos a existência desta última (Figuras 41 e 48), embora mais longa que a figurada por DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (*op. cit.*) e observamos somente uma membrana paroral (Figuras 41, 44 e 48). Justificou FOISSNER (1984) ser comum, pela disposição profunda e quase dorsal da membrana endoral no gênero *Steinia*, a sua não observação em seus diversos representantes. Mesmo GROLIÈRE (1975) não mencionou qualquer verificação da presença de membrana endoral para *Steinia candens* e *Steinia macrostoma*. Claramente definida é a descrição de FOISSNER (1984) de uma membrana endoral profunda que anteriormente quase encosta na porção final encurvada de uma única membrana paroral em *S. quadrinucleata*. Este aspecto só nos foi uma vez evidenciado com clareza, graças a uma preparação em microscopia eletrônica de varredura de um proter desta espécie (Figura 48).

As cinécias de cerdas dorsais não foram evidenciadas por DRAGESCO & NJINÉ (1971) e, seu trajeto, representado por FOISSNER (1984), descreveu em parte o de nossas observações (Figuras 42 e 49). Este representou-as com cinetosomas duplos, sendo um acilífero e o outro cilífero, aspecto que não pudemos constatar. Também assinalou a presença de um vacúolo contrátil no lado esquerdo superior do corpo, abaixo da zona adoral de membranelas. Supomos que a ruptura do poro deste vacúolo produziu o aparecimento das estranhas aberturas

dorsais que comumente observamos (Figuras 42 e 49).

Embora tenhamos verificado com frequência o aparecimento de mais de 4 massas macronucleares, de 5 a 8, consideramos representarem um momento da divisão nuclear, já que foi constante e característica a presença de indivíduos com apenas 4 macronúcleos (Figuras 52 e 53). Diferentemente do que descreveu FOISSNER (1984) as massas macronucleares dos organismos observados não se organizavam comumente em pares ou se disponham ao lado esquerdo do corpo, estando na maioria das vezes separadas e no eixo central deste, como em DRAGESCO & NJINÉ (1971) (Figuras 41, 42 e 52).

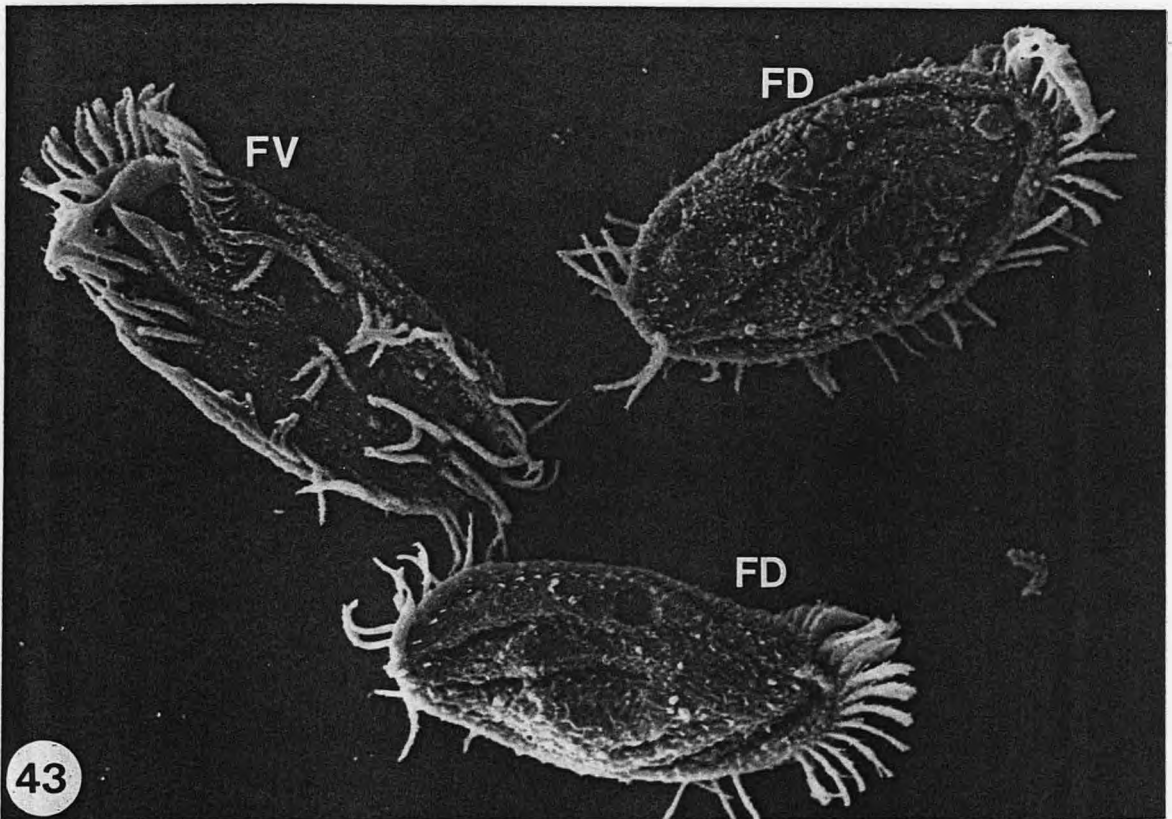
Salvo estas poucas diferenças ora expostas, que certamente constituem pequenas variações de ordem individual, as fortes congruências morfológicas estabelecidas com a confrontação de nossos resultados aos dos trabalhos de DRAGESCO & DRAGESCO-KERNÉIS (1986), DRAGESCO & NJINÉ (1971) e, principalmente, FOISSNER (1984), tornaram indubitável o posicionamento de nosso material como pertencente a espécie *Steinia quadrinucléata*.



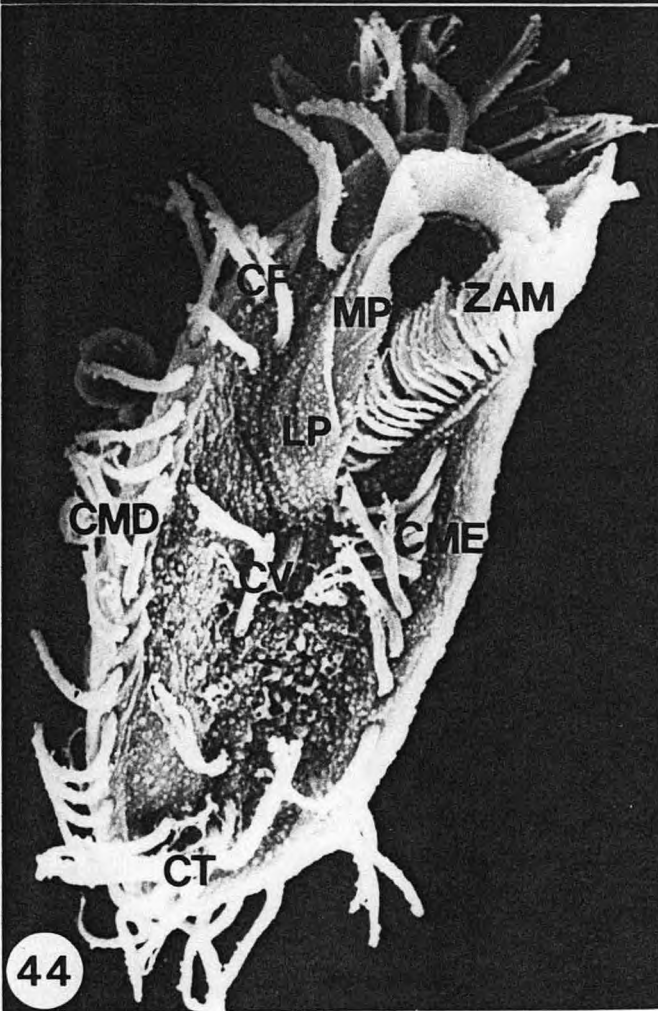
Steinia quadrinucleata Dragesco & Njiné, 1971.

Figura 41 - Representação mostrando o aspecto geral da face ventral. CC - cirros caudais; CF - cirros frontais; CMD - cirros marginais direitos; CME - cirros marginais esquerdos; CT - cirros transversais; CV - cirros ventrais; LP - lábio peristomático; Ma - macronúcleo; ME - membrana endoral; Mi - micronúcleo; MP - membrana paroral; VC - vacúolo contrátil; ZAM - zona adoral de membranelas.

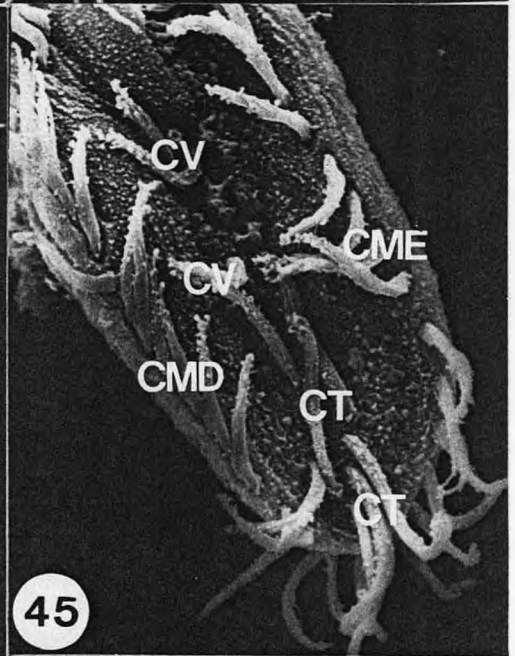
Figura 42 - Representação mostrando o aspecto geral da face dorsal. CC - cirros caudais; CD - cerdas dorsais; Ma - macronúcleo; Mi - micronúcleo; ZAM - zona adoral de membranelas; asterisco - abertura dorsal atípica.



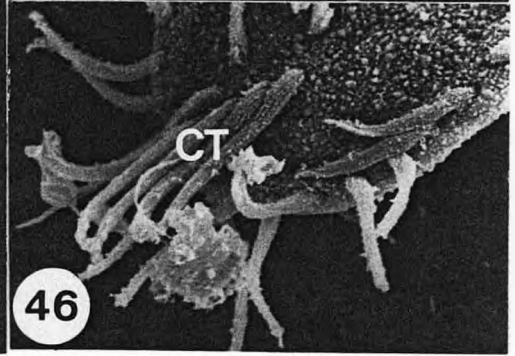
43



44



45



46

Steinia quadrinucleata Dragesco & Njiné, 1971.

Figura 43 - Micrografia eletrônica de varredura de três indivíduos mostrando aspectos gerais das faces ventral (FV) e dorsal (FD).

Aumento: 1.190X.

Figura 44 - Micrografia eletrônica de varredura da face ventral. CF - cirros frontais; CMD - cirros marginais direitos; CME - cirros marginais esquerdos; CT - cirros transversais; CV - cirros ventrais; LP - lábio peristomático; MP - membrana paroral; ZAM - zona adoral de membranelas.

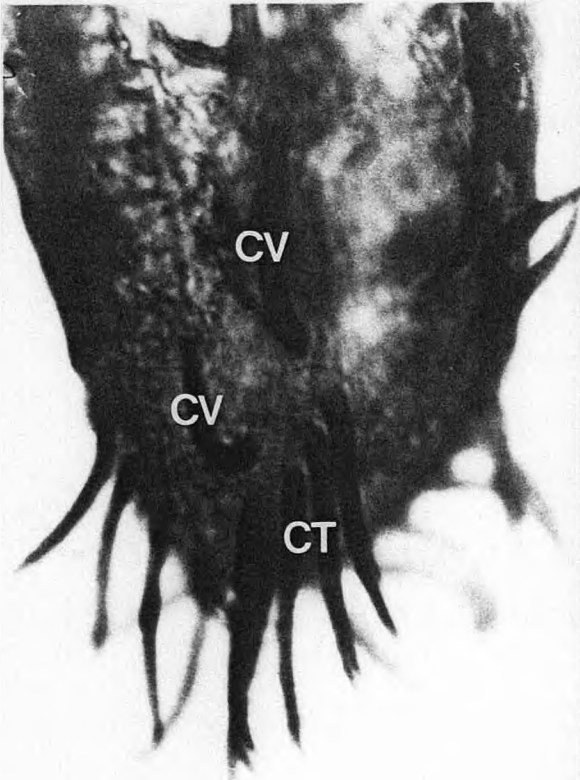
Aumento: 2.380X.

Figura 45 - Micrografia eletrônica de varredura da região médio-posterior ventral. CMD - cirros marginais direitos; CME - cirros marginais esquerdos; CT - cirros transversais; CV - cirros ventrais.

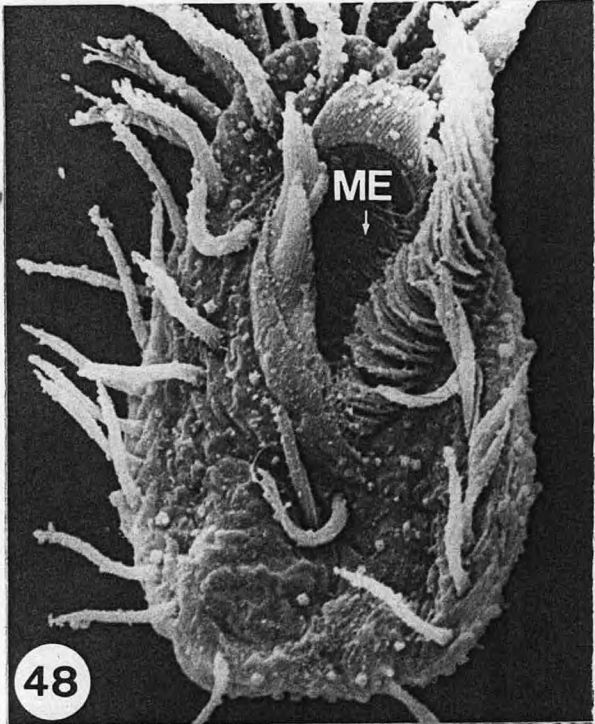
Aumento: 2.300X.

Figura 46 - Micrografia eletrônica de varredura da região posterior ventral. Close dos cirros transversais (CT).

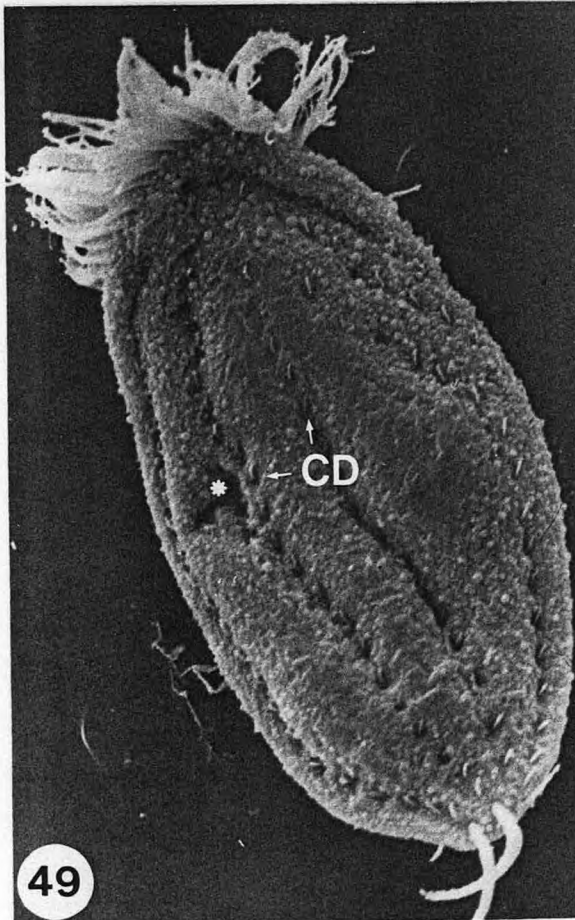
Aumento: 2.530X.



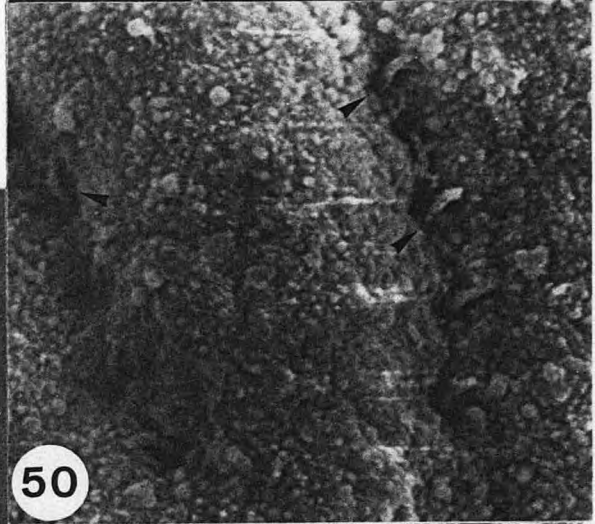
47



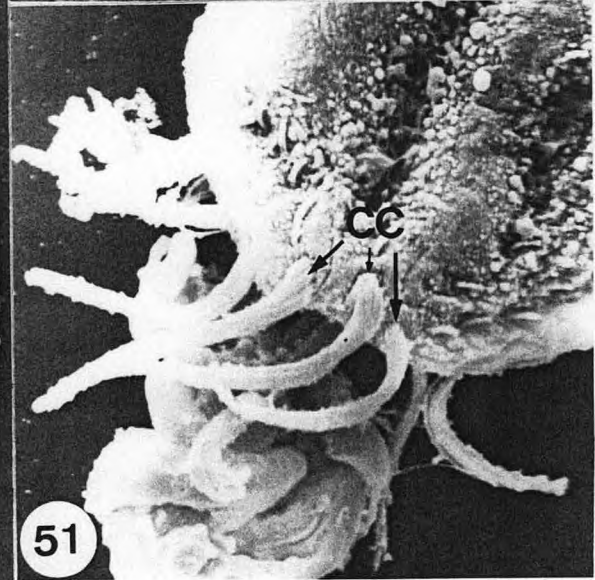
48



49



50



51

Steinia quadrinucleata Dragesco & Njiné, 1971.

Figura 47 - Fotomicrografia da região posterior ao Protargol. Aspectos dos cirros ventrais (CV) mais posteriores e dos cirros transversais (CT).

Aumento: 1.700X.

Figura 48 - Micrografia eletrônica de varredura de um proter. Observar a membrana endoral (ME).

Aumento: 2.670X.

Figura 49 - Micrografia eletrônica de varredura da face dorsal. Observar o trajeto das cinécias de cerdas dorsais (CD) e a abertura dorsal atípica (asterisco).

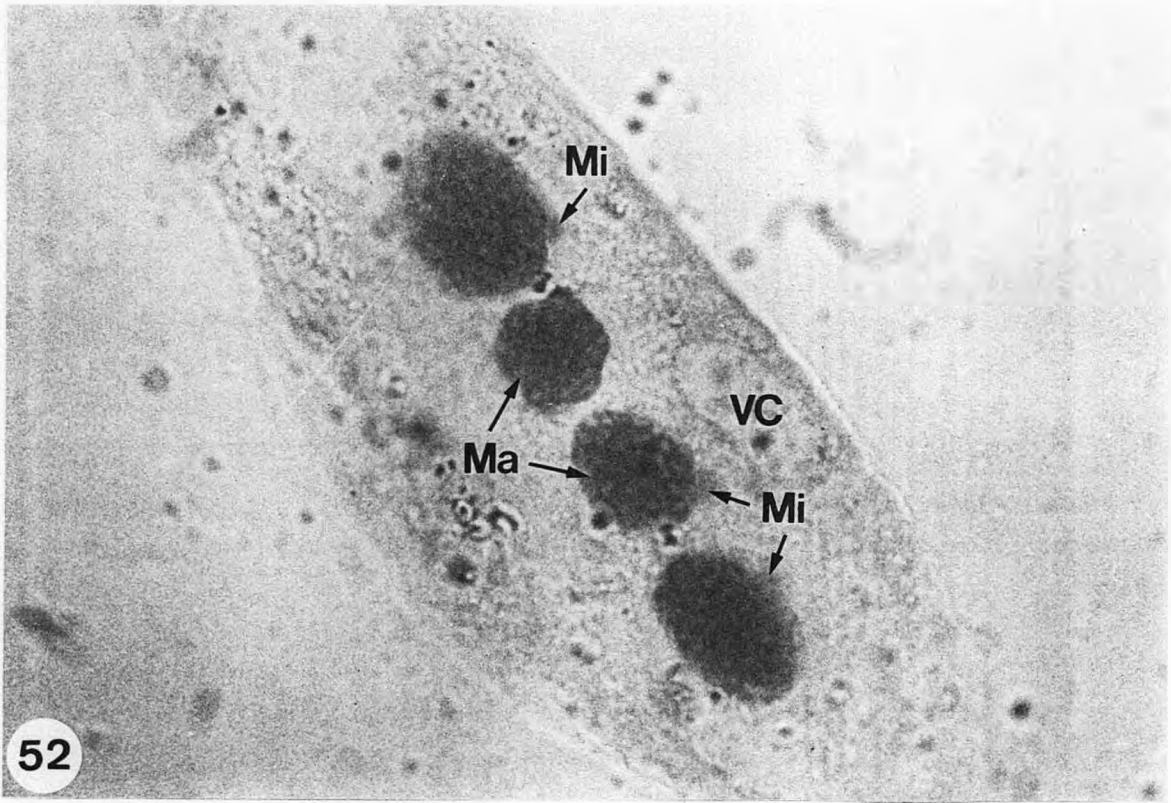
Aumento: 2.050X.

Figura 50 - Micrografia eletrônica de varredura de um close das cerdas dorsais (setas).

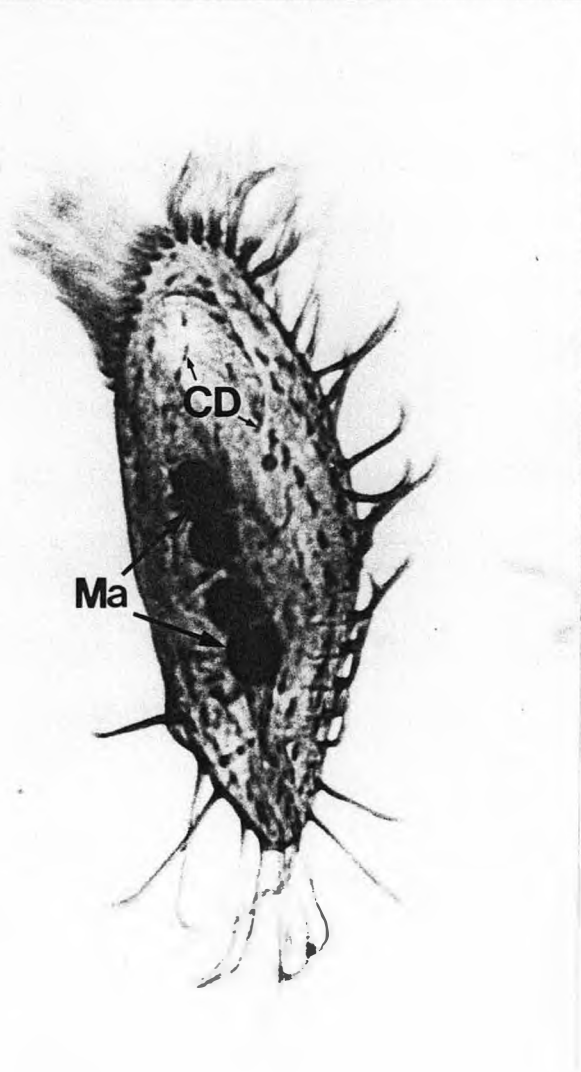
Aumento: 7.360X.

Figura 51 - Micrografia eletrônica de varredura da região posterior dorsal. Close dos cirros caudais (CC).

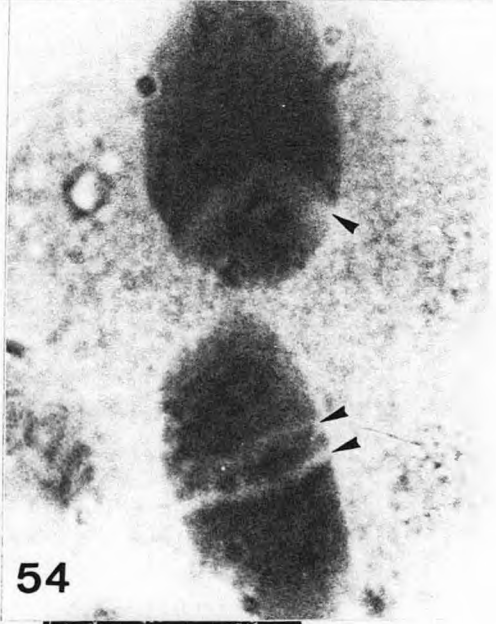
Aumento: 3.655X.



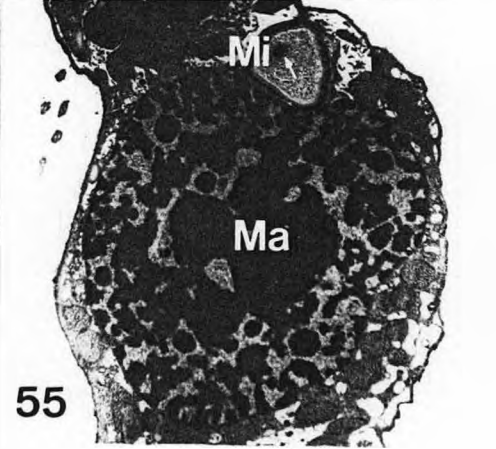
52



53



54



55

Steinia quadrinucleata Dragesco & Njiné, 1971.

Figura 52 - Fotomicrografia em reação nuclear de Feulgen. Aspecto da separação das massas macronucleares. Ma - macronúcleo; Mi - micronúcleo; VC - vacúolo contrátil.

Aumento: 1.800X.

Figura 53 - Fotomicrografia ao Protargol. Aspectos do pareamento das massas macronucleares. CD - cerdas dorsais; Ma - macronúcleo.

Aumento: 930X.

Figura 54 - Fotomicrografia em reação nuclear de Feulgen. Close das massas macronucleares mostrando as bandas de reorganização de seus cromossomos (setas).

Aumento: 1.650X.

Figura 55 - Micrografia eletrônica de transmissão com um aspecto de um dos macronúcleos (Ma) e do seu micronúcleo (Mi) adjacente. Seta - nucléolo.

Aumento: 6.940X.

Tabela 5 - Aspectos Característicos de Steinia quadrimucleata Dragesco & Njine, 1971 com Base na Literatura e nos Resultados Aqui Obtidos^a.

Autores	Nomenclatura	Dimensões		Número de cirros marginais		Número de cirros frontais	Número de cirros ventrais	Número de cirros transvers.	Número de cirros caudais	Número de paramerone-las da ZAH	Número de cinéscias dorsais	Número de macronúcleos	Número de micronúcleos
		Comprimento	Largura	Direito	Esquerdo								
DRAGESCO & NJINE (1971)	<u>Steinia quadrimucleata</u>	100 - 120µm	40 - 57µm	12 - 23	17 - 20	8	5	5	3	35 - 38	-	4	3 - 5
		78 - 140µm	32 - 54µm	21	18	8	5	5	3	39	6	4 (aos pares)	2 - 4
POISSNER (1984)	<u>Steinia quadrimucleata</u>	73 - 110µm	35 - 55µm	16	14	8	5	5	3	28	6	4 (5 - 8)	2 - 5

COMENTÁRIOS FINAIS

Ao iniciarmos esta dissertação partimos da completa ignorância a respeito dos ciliados, este grupo de protista tão evoluído e complexo. Pouco a pouco ampliamos nossa experiência no campo da ciliatologia. A cada passo nos familiarizávamos com algumas das técnicas mais tradicionais empregadas para sua pesquisa, nos inteirávamos da vasta bibliografia especializada e alcançávamos um conhecimento proveitoso sobre os aspectos da sua morfologia, ultraestrutura e modo de vida.

Somamos resultados que nos levaram a identificação de três espécies de ciliados que, vivendo nos musgos *Sematophyllum subsimplex* e *Barbula* sp., têm seu ciclo de vida dependente das fases de seca e de hidratação destes vegetais. São elas um Prostomata Probosciphorida da família Spathidiidae, *Epispathidium amphoriforme* (Greeff, 1888), e dois Polyhymenophora Euhypotrichida: um da família Urostylidae, *Urostyla grandis* Ehrenberg, 1838, e outro da família Oxytrichidae, *Steinia quadrinucleata* Dragesco & Njiné, 1971. Para *Urostyla grandis* reservamos a necessidade de um parecer especializado para que nossas argumentações possam ser confirmadas ou retificadas. Salvo isto, no contexto da pesquisa dos ciliados em nosso país, ainda em um estágio incipiente, todas as espécies ora reconhecidas constituem ocorrências novas para o Estado do Rio de Janeiro, sendo as duas últimas também para o Brasil.

BIBLIOGRAFIA

- BEÇAK, W. & PAULETE-VANRELL, J. 1970 - *Técnicas de citologia e histologia*. Livraria Nobel S.A., São Paulo. 470 pp.
- BERGER, H. & FOISSNER, W. 1987 - Morphology and biometry of some soil hypotrichs (Protozoa: Ciliophora). *Zool. Jb. Syst.*, 114: 193 - 239.
- BICK, H. 1972 - *An illustrated guide to ciliated Protozoa used as "biological indicators" in freshwater ecology*. World Health Organization, Geneva. 198 pp.
- BODIAN, D. 1936 - A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat. Rec.*, 65: 89.
- 1937 - The staining of paraffin sections of nervous tissue with activated Protargol. The role of fixatives. *Anat. Rec.*, 69: 153 - 162.
- BOHATIER, J.; IFTODE, F.; DIDIER, P. & FRYD - VERSAVEL, G. 1978 - Sur l'ultrastructure des genres *Spathidium* et *Bryophyllum*, ciliés Kinetophragmophora (de Puytorac et al., 1974). *Protistologica*, 14(2): 189 - 200.
- BORROR, A.C. 1972 - Revision of the order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa). *J. Protozool.*, 19(1): 1 - 23.

- BORROR, A.C. 1979 - Redefinition of the Urostylidae (Ciliophora, Hypotrichida) on the basis of morphogenetic characters. *J. Protozool.*, 26(4): 544 - 550.
- CANHA, I.; PETTIGROSSO, R.E. & SANTA ROSA, M.R. de 1988 - Preliminary study of the ciliatofauna of briofits found in Rio de Janeiro State. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83 (suppl. I): 231.
- CHACHARONIS, P. 1956 - Observations on the ecology of Protozoa associated with *Sphagnum*. *J. Protozool.*, 11 (suppl. 3): 59.
- COIRO, J.R.R.; WEIGL, D.R.; KISIELIUS, J.; MENEZES, H. and BILOTTA, J.A.T. 1972 - A new embedding medium (polylite 8001) for biological material. *Ciência e Cultura*, 24(7): 660 - 662.
- CORLISS, J.O. 1979a - The impact of electron microscopy on ciliate systematics. *American Zoologist*, 19(2): 573 - 587.
- 1979b - *The ciliated Protozoa: Characterization, classification and guide to the literature*. 2nd edition. Pergamon Press, Oxford. xvi + 455 pp.
- DRAGESCO, J. 1962 - L'orientation actuelle de la systématique des ciliés et la technique d'imprégnation au protéinate d'argent. *Bull. Microsc. Appl.*, 11(2): 49 - 58.

- DRAGESCO, J. 1970 - Ciliés libres du Cameroun. *Ann. Fac. Sc. Yaoundé*, no hors série: 1 - 141.
- DRAGESCO, J. & DRAGESCO-KERNÉIS, A. 1986 - Ciliés libres de L'Afrique intertropicale. Introduction à la connaissance et à l'étude des ciliés. *Collection Faune Tropicale*, 26: 1 - 559.
- DRAGESCO, J. & NJINÉ, T. 1971 - Compléments à la connaissance des ciliés libres du Cameroun. *Ann. Fac. Sc. du Cameroun*, 7-8: 97 - 140.
- FERNANDES, M.C. 1949 - *Métodos escolhidos de técnica microscópica*. 2ª edição. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. xx + 615 pp.
- FEULGEN, R. 1926 - Die Nuclealfärbung. *Abderharden's Handb. biol. Arbeitsmeth.*, Abt. 5(2): 1055.
- FLEURY, A.; IFTODE, F.; DEROUX, G. & FRYD-VERSAVEL, G. 1985 - Unité et diversité chez les hypotriches (protozoaires ciliés): II - Éléments d'ultrastructure comparée chez divers représentants du sous-ordre des Euhypotrichina. *Protistologica*, 21(4): 505 - 524.
- FOISSNER, W. 1982 - Ökologie und Taxonomie der Hypotrichida (Protozoa: Ciliophora) einiger österreichischer Böden. *Arch. Protistenk.*, 126: 19 - 143.

FOISSNER, W. 1984 - Infraciliatur, Silberliniensystem und Biometrie einiger neuer und wenig bekannter terrestrischer, limnischer und mariner Ciliaten (Protozoa : Ciliophora) aus den Klassen Kinetofragminophora, Colpodea und Polyhymenophora. *Stapfia*, 12: 1 - 165.

— 1986 - Neue terrestrische und limnische Ciliaten (Protozoa, Ciliophora) aus Österreich und Deutschland. *Sber. Akad. Wiss. Wien*, 195(8): 217 - 268.

— 1987 - Soil Protozoa: Fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bio-indicators, and guide to the literature. *Progress in Protistology*, 2: 69 - 212.

FRYD-VERSAVEL, G.; IFTODE, F. & DRAGESCO, J. 1975 - Contribution à la connaissance de quelques ciliés gymnostomes. II: Prostomiens, pleurostomiens; morphologie, stomatogenèse. *Protistologica*, 11(4): 509 - 530.

GRAIN, J. 1969 - Le cinétosome et ses dérivés chez les ciliés. *Ann. Biol.*, 8(1 - 2): 53 - 97.

GROLIÈRE, C-A. 1974 - 1975 - Étude de quelques ciliés hyménostomes des eaux acides de la région de Besse-en-Chandesse. *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse*, 9: 79 - 109.

GROLIÈRE, C-A. 1975 - Descriptions de quelques ciliés hypotriches des tourbières a sphaignes et des étendues d'eau acides. *Protistologica*, 11(4): 481 - 498.

— 1975 - 1976 - Contribution à l'étude des ciliés des sphaignes et des étendues d'eau acide. I. Description de quelques espèces de gymnostomes, hypostomes, hyménostomes et hétérotriches. *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse*, 10: 265 - 297.

— 1977 - Contribution a l'étude des ciliés des sphaignes: II - Dynamique des populations. *Protistologica*, 13(3): 335 - 352.

— 1978 - Contribution a l'étude des ciliés des sphaignes. III. Étude mathématique des résultats. *Protistologica*, 14(3): 295 - 311.

GROLIÈRE, C-A. & NJINÉ, T. 1973 - Étude comparée de la dynamique des populations de ciliés dans différents biotopes d'une mare de forêt pendant une année. *Protistologica*, 9(1): 5 - 16.

HALLER, G. de; EHRET, CH.F. & NAEF, R. 1961 - Technique d'inclusion et d'ultramicrotomie destinée à l'étude du développement des organelles dans une cellule isolée. *Experientia*, 17: 524 - 526.

HAUSMANN, K. 1978 - Extrusive organelles in protists. *Int. Rev. Cytol.*, 52: 197 - 276.

HAUSMANN, E. & HAUSMANN, K. 1973 - Cytologische Studien an Trichocysten. VII. Die Feinstruktur der trichocystenwarzen von *Loxophyllum meleagris*. *Protistologica*, 9(1): 139 - 147.

HEMBERGER, H. 1982 - Revision der Ordnung Hypotrichida Stein (Ciliophora, Protozoa) an Hand von Protargolpräparaten und Morphogenesedarstellungen. *Inaug. Dissert. Erlang. Doktorwürde, Hohen Mathem. Naturw. Fakultät, Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität, Bonn.* iv + 296 pp.

HOVASSE, R. & MIGNOT J-P. 1975 - Trichocystes et organites analogues chez les protistes. *Ann. Biol.*, 14(9 - 10): 397 - 422.

JERKA-DZIADOSZ, M. 1963 - Morphogenesis in division and regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. *Acta Protozool.*, 1(6): 43 - 54.

— 1964a - *Urostyla cristata* sp. n. (Urostylidae, Hypotrichida); the morphology and morphogenesis. *Acta Protozool.*, 2(11): 123 - 128.

— 1964b - Localization of the organization area in course of regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. *Acta Protozool.*, 2(12): 129 - 136.

- JERKA-DZIADOSZ, M. 1972 - Cortical development in *Urostyla*.
I. Comparative study on morphogenesis in *U. cristata* and
U. grandis. *Acta Protozool.*, 10(3): 73 - 100.
- 1980 - Ultrastructural study on development of hypotrich
ciliate *Paraurostyla weissei*. I. Formation and morphogene-
tic movements of ventral ciliary primordia. *Protistologi-
ca*, 16(4): 571 - 589.
- KAHL, A. 1930 - 1935 - Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere
oder Ciliata (Infusoria) - Eine Bearbeitung der freileben-
den und ectocommensalen Infusorien der Erde, unter
Ausschluss der marinen Tintinnidae. In Dahl, F., ed., *Die
Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile
nach ihren Merkmalen und nach ihrer Lebensweise*, Gustav
Fischer, Jena, Teil 18 - Allgemeiner Teil und Prostomata
(1930) pp. 1 - 180, Teil 21 - Holotricha (1931) pp. 181 -
398, Teil 25 - Spirotricha (1932) pp. 399 - 650, Teil 30 -
Peritricha und Chonotricha (1935) pp. 651 - 886.
- KATTAR, M.R. 1986 - Comportamento polimorfo de *Spathidium
amphoriforme* (Penard, 1922), Ciliata, Haptorida. *Mem.
Inst. Oswaldo Cruz*, 81 (suppl.): 19.
- KIRBY, H. 1950 - *Materials and methods in the study of Proto-
zoa*. University of California Press, Berkeley. 72pp.
- KUDO, R.R. 1985 - *Protozoologia*. 5ª edición. Compañía Edito-
rial Continental, México. 905 pp.

MACHADO, R.D. 1989 - Desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contrastação. In Souza, W. de, ed. *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica Vol. I - Técnicas básicas*. pp. 49 - 63. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.

MARCHANT, H.J. & THOMAS, D.P. 1983 - Polylysine as an adhesive for the attachment of nanoplankton to substrates for electron microscopy. *J. of Microsc.*, 131: 127 - 129.

MEEK, G.A. 1976 - *Practical electron microscopy for biologists*. 2^a edition. John Wiley & Sons, London. xix + 528 pp.

MERMOD, G. 1914 - Recherches sur la faune infusorienne des tourbières et des eaux voisines de Ste - Croix (Jura Vaudois). *Rev. Suisse Zool.*, 22: 31 - 114.

NISSENBAUM, G. 1953 - A combined method for the rapid fixation and adhesion of ciliates and flagellates. *Science*, 118: 31 - 32.

PENARD, E. 1922 - *Études sur les infusoires d'eau douce*. Georg & Cie éditeurs, Genève. 331 pp.

POSTEK, M.T.; HOWARD, K.S.; JOHNSON, A.H. & McMICHAEL, K.L. 1980 - *Scanning electron microscopy - A student's handbook*. Michael T. Postek, Jr & Ladd Research Industries ed. xv + 305 pp.

- PUYTORAC, P. de 1970 - Definitions of ciliate descriptive terms. *J. Protozool.*, 17: 358.
- 1988 - Intérêt actuel de l'étude des protistes. *Ann. Biol.*, 27(4): 233 - 268.
- PUYTORAC, P. de & GRAIN, J. 1976 - Ultrastructure du cortex buccal et évolution chez les ciliés. *Protistologica*, 12(1): 49 - 67.
- PUYTORAC, P. de; GRAIN, J. & MIGNOT, J-P. 1987 - *Précis de protistologie*. Société Nouvelle des Éditions Boubée & Fondation Singer Polignac, Paris. 581 pp.
- PUYTORAC, P. de; GRAIN, J. & RODRIGUES DE SANTA ROSA, M. 1976 - A propos de l'ultrastructure corticale du cilié hypotriche *Stylonychia mytilus* Ehrbg., 1838: les caractéristiques du cortex buccal adoral et paroral des Polyhymenophora Jankowski, 1967. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 95(3): 327 - 345.
- REYNOLDS, E.S. 1963 - The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208 - 212.
- RIOS, R.M.; TORRES, A.; CALVO, P. & FEDRIANI, C. 1985 - The cyst of *Urostyla grandis* (Hypotrichida: Urostylidae): Ultrastructure and evolutionary implications. *Protistologica*, 21(4): 481 - 485.

RODRIGUES de SANTA ROSA, M. & DIDIER, P. 1975 - Remarques sur l'ultrastructure du cilié gymnostome *Monodinium balbiani* (Fabre Domergue, 1888). *Protistologica*, 11(4): 469 - 479.

SANTOS, I.C. dos & SANTA ROSA, M.R. de 1989 - Observations on a ciliate Hypotrichida component of the bryophytes ciliatofauna found in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(suppl. II): 168.

SERAVIN, L.N. & GERASSIMOVA, Z.P. 1978 - A new macrosystem of ciliates. *Acta Protozoologica*, 17(3): 399 - 418.

SESSO, A. 1989 - Fixação de sistemas biológicos. In Souza, W. de, ed. *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica Vol. I - Técnicas básicas*. pp. 1 - 36. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.

SHIGENAKA, Y.; WATANABE, K. & KANEDA, M. 1973 - Effects of glutaraldehyde and osmium tetroxide on hypotrichous ciliates, and determination of the most satisfactory fixation methods for electron microscopy. *J. Protozool*, 20(3): 414 - 420.

SILVEIRA, M. 1989 - Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In Souza, W. de, ed. *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica Vol. I - Técnicas básicas*. pp. 71 - 90. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica.

SMALL, E.B. & LYNN, D.H. 1985 - Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In Lee, J.J.; Hutner, S.H. & Bovee, E.C., ed. *An illustrated guide to the Protozoa*. pp. 393 - 575. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas.

TUFFRAU, M. 1959 - Un dispositif simple pour l'observation durable *in vivo* des microorganismes. *Hydrobiologia*, 18(4): 316 - 318.

— 1964 - Quelques variantes techniques de l'impregnation des ciliés par le protéinate d'argent. *Arch. Zool. Exp.*, 104: 186 - 190.

— 1967 - Perfectionnement et pratique de la technique d'impregnation au Protargol des infusoires ciliés. *Protistologica*, 3(1): 91 - 98.

— 1979 - Une nouvelle famille d'hypotriches, Kahliellidae n. fam., et ses conséquences dans la répartition des Stichotrichina. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 98: 521 - 528.

WENZEL, F. 1953 - Die Ciliaten der Moosrasen trockner Standorte. *Arch. Protistenk.*, 99: 70 - 141.

WICKLOW, B.J. 1981 - Evolution within the order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa) ultrastructure and morphogenesis of *Thigmokeronopsis jahodai* (n. gen., n. sp.); phylogeny in the Urostylina (Jankowski, 1979). *Protistologica*, 17(3): 331 - 351.