

ENTRE CORES E MÉTODOS: UMA ANÁLISE EXPERIMENTAL DE MÉTODOS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS PARA ANÁLISE DA COMUNIDADE DE PROTISTAS CILIADOS PLANCTÔNICOS.

Bruno Henrique Soares Napoleão¹, Loiani Oliveira Santana¹, Marina Martins Oliveira¹, Matheus Henrique de Oliveira de Matos¹, Yasmin Rodrigues de Souza¹, Luiz Felipe Machado Velho¹

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Ecologia de ecossistemas.

Palavras-chave: Ciliados; Corantes; Método de contagem.

RESUMO

A padronização de métodos de coloração e contagem de protistas ciliados é essencial para aprimorar a identificação taxonômica, embora ainda haja lacunas sobre a eficiência comparativa entre técnicas. Este estudo avaliou três corantes vitais (rosa de bengala, azul de metileno e verde de metila) combinados a dois métodos de contagem (Sedgewick-Rafter e Utermöhl) na estimativa de abundância, riqueza e composição de ciliados planctônicos. Foram coletados 100 L de água no Pesqueiro São José (Maringá-PR), aclimatados e distribuídos em 24 unidades experimentais, com quatro réplicas por tratamento, sendo as amostras fixadas, coradas e analisadas por microscopia, com análises in vivo como controle. Os resultados indicaram que o rosa de bengala e combinações como Sedgwick-in vivo e Utermöhl-Sedgewick apresentaram maior riqueza, enquanto a abundância variou principalmente entre amostras in vivo, e a composição de espécies diferiu tanto entre métodos de contagem quanto entre corantes. Conclui-se que a escolha do corante e do método de contagem influencia significativamente a estimativa de diversidade e abundância de ciliados, reforçando que os métodos não são substituíveis, mas complementares.

INTRODUÇÃO

Os protistas ciliados desempenham papel central nos ecossistemas de água doce devido à elevada diversidade taxonômica e funcional, além da contribuição para a transferência de matéria e energia nas cadeias alimentares (Guimarães Durán et al., 2024). Apesar dessa relevância ecológica, ainda são escassos os estudos metodológicos voltados à sua análise (Elmoor-Loureiro et al., 2023). Entre as técnicas disponíveis, destacam-se a observação in vivo e as contagens em câmaras de Sedgewick-Rafter e Utermöhl, que permitem estimar abundância e riqueza, embora apresentem limitações. O uso de corantes em organismos fixados tem surgido como alternativa para facilitar a visualização de estruturas internas, como núcleo, ciliatura e vacúolos, auxiliando na identificação taxonômica. Entre os

principais corantes empregados estão o rosa de bengala, o azul de bromofenol e o verde de metila (Araújo & Godinho, 2008; Madoni, 2005).

A seleção adequada da metodologia de contagem, em conjunto com o corante mais apropriado, é fundamental para garantir maior precisão na identificação das espécies, bem como para aprofundar a compreensão de sua diversidade e organização taxonômica. Nesse contexto, espera-se que o método de contagem *in vivo* apresente maior eficiência na detecção e quantificação de ciliados em comparação aos métodos baseados em fixação (câmaras de Utermöhl e Sedgewick-Rafter), por possibilitar a observação de organismos vivos e móveis, preservando características morfológicas e comportamentais essenciais à identificação. Quanto ao uso de corantes, a hipótese é que o rosa de bengala apresenta melhor desempenho na distinção de morfoespécies, dada sua reconhecida capacidade de impregnar estruturas citoplasmáticas com alta definição, sem comprometer a integridade dos organismos analisados.

MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no Pesqueiro São José (Maringá, PR) e o material encaminhado ao Laboratório de Protozooplâncton da UEM. Foram coletados 100 L de água, aclimatados em aquário e posteriormente distribuídos em 24 unidades experimentais (potes de 250 mL), resultantes da combinação de dois métodos de contagem (Utermöhl e Sedgewick-Rafter) e três corantes (rosa de bengala, verde de metila e azul de bromofenol), cada tratamento com quatro réplicas. As amostras foram filtradas em rede de 10 μ m e concentradas em 100 mL, sendo em seguida fixadas em lugol acético e coradas. Como controle, realizaram-se contagens *in vivo* em microscópio óptico.

As contagens seguiram protocolos específicos: no método Sedgewick-Rafter foram analisados 3 mL em microscópio óptico (objetivas de 10x e 20x), enquanto no método Utermöhl as análises foram conduzidas em microscópio invertido (20x e 40x), após sedimentação. Os ciliados foram identificados ao menor nível taxonômico possível (Foissner et al., 1999; Berger, 2003).

Para as análises estatísticas, riqueza e abundância de espécies foram avaliadas por ANOVA bifatorial com teste de Tukey HSD, enquanto a composição foi comparada por PERMANOVA (índice de Bray-Curtis, 999 permutações) e visualizada por PCoA. Todas as análises foram realizadas no R (R Core Team, 2023), com os pacotes **ggplot2**, **ape** e **ggforce**.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A riqueza de espécies variou significativamente entre os métodos de contagem ($F = 13,22$; $p < 0,001$) e entre os tratamentos com corantes ($F = 5,98$; $p = 0,009$). Os métodos Utermöhl e *in vivo* registraram maior riqueza em comparação ao Sedgewick. Entre os corantes, o rosa de bengala destacou-se por apresentar maior

riqueza de espécies, superando o azul de metila ($p = 0,046$) e o verde de metila ($p = 0,024$). Esses resultados corroboram Pereira et al. (2021), que evidenciaram a eficácia do rosa de bengala em organismos de difícil visualização, devido à sua afinidade com proteínas celulares e ao contraste gerado, o que favorece a detecção de estruturas intracelulares. Assim, a alta riqueza observada nesse tratamento pode estar associada a essas propriedades, reforçando seu potencial para estudos de biodiversidade microbiana (Gomes et al., 2022).

Figura 1: Riqueza e abundância de espécies entre os diferentes tratamentos

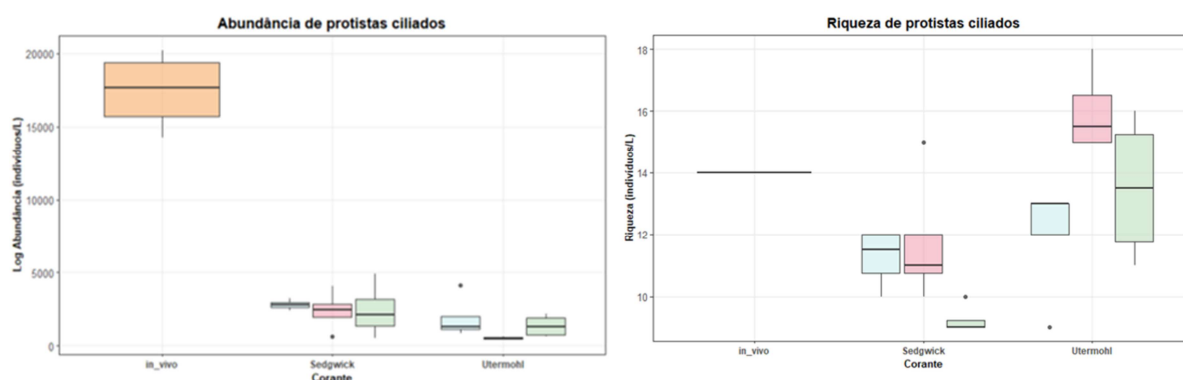
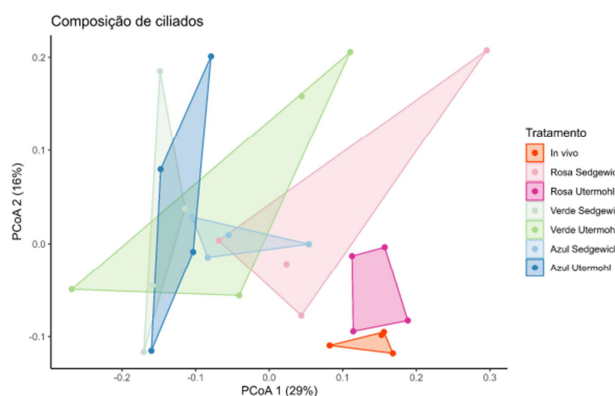


Figura 2: Análise de variância permutacional.



Em relação à abundância de ciliados, observaram-se diferenças significativas apenas entre os métodos de contagem ($F = 183,65$; $p < 0,001$), sem efeito dos corantes. Os gráficos indicaram uma tendência de maior abundância no método in vivo, quando comparado ao Utermöhl ($p < 0,001$) e ao Sedgewick-Rafter ($p < 0,001$). Quanto à composição de espécies, a análise PERMANOVA revelou diferenças significativas entre os tratamentos ($R^2 = 0,5$; $p = 0,001$), sendo o método in vivo distinto dos métodos Utermöhl e Sedgewick-Rafter e também foram identificadas diferenças significativas entre os corantes ($p < 0,05$). A análise PCoA evidenciou uma separação clara entre tratamentos, especialmente naqueles que utilizaram rosa de bengala e contagem in vivo, sugerindo que a combinação de técnicas pode

influenciar substancialmente a detecção e a caracterização de diferentes grupos de ciliados.

De forma geral, os resultados reforçam a relevância da contagem in vivo, que apresentou maior riqueza, abundância e diferença na composição de espécies. Embora exija considerável experiência e treinamento para identificação (Dragesco et al., 1986), trata-se de um método acessível e adequado para análises quantitativas e qualitativas da comunidade planctônica, preservando estruturas morfológicas e comportamentais essenciais para a taxonomia. Em contrapartida, métodos baseados em amostras fixadas podem causar deformações celulares que dificultam a identificação, como já apontado por Foissner (2014), além de apresentarem limitações descritas em estudos anteriores (Sime-Ngando et al., 1990).

No entanto, entre os métodos de preservação, o Utermöhl se destacou por permitir estimativas expressivas de abundância e riqueza, sobretudo de espécies pequenas que tendem a ser subestimadas em análises in vivo. Além disso, quando associado a técnicas de coloração, favorece a identificação taxonômica, garantindo a preservação celular e possibilitando análises posteriores ou a repetição de contagens (Freibott et al., 2014).

CONCLUSÕES

Os achados reforçam que os métodos de contagem e os corantes afetam diferentes aspectos da análise: o rosa de bengala destacou-se na estimativa de riqueza, enquanto a escolha do método de contagem influenciou mais a abundância detectada. Essa distinção evidencia a complementaridade entre métodos, sugerindo que protocolos laboratoriais devem ser escolhidos de acordo com os objetivos do estudo, especialmente em monitoramento ambiental, avaliação de impactos ecológicos e ecotoxicologia aquática. Além disso, a pesquisa preenche uma lacuna na literatura sobre o uso de corantes em análise de ciliados planctônicos em ecossistemas de água doce, fornecendo evidências empíricas sobre a eficiência de diferentes abordagens para a mensuração da biodiversidade planctônica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Cnpq e a Fundação Araucária, pela oportunidade de trabalhar com pesquisa na minha área de atuação com auxílio monetário, a Universidade Estadual de Maringá e ao laboratório de protozooplâncton pela estrutura e suporte para realizar esse trabalho, a minha coorientadora Loiani e ao meu orientador Felipe Machado, além dos meus parceiros do laboratório que me auxiliaram na resolução deste trabalho e me apoiaram em tudo que eu precisei, a Marina, por ter me dado essa oportunidade, passando a bolsa para mim, e a minha namorada Isadora por todo o apoio e incentivo durante a produção desse trabalho.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M. F. F.; GODINHO, M. J. L. Spatial and seasonal variations of planktonic protists (Mastigophora, Sarcodina and Ciliophora) in a river-lacustrine system in northeast Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 20, n. 3, p. 235-244, 2008.

FOISSNER, Wilhelm; BERGER, Helmut. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater biology*, v. 35, n. 2, p. 375-482, 1996.

LU, Xiaoteng; WEISSE, Thomas. Top-down control of planktonic ciliates by microcrustacean predators is stronger in lakes than in the ocean. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 10501, 2022.

SIME-NGANDO, Telesphore; HARTMANN, Hans Julian; GROLIERE, Claude Alain. Rapid quantification of planktonic ciliates: comparison of improved live counting with other methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 7, p. 2234-2242, 1990.

UTERMÖHL, Hans. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Mitteilungen*, v. 9, n. 1, p. 1-38, 1958.

VICENTE-VILLARDON, Jose L.; VICENTE-GONZALEZ, Laura. Redundancy analysis for binary data based on logistic responses. In: *Data Analysis and Rationality in a Complex World 16*. Springer International Publishing, 2021. p. 331-339.