

## Protocolo de Coleta e Preparação de Amostras de Macroinvertebrados Bentônicos em Riachos

Mariana Pinheiro Silveira<sup>1</sup>  
Júlio Ferraz de Queiroz<sup>2</sup>  
Rita Carla Boeira<sup>3</sup>

### Introdução

O biomonitoramento de corpos hídricos através do uso de macroinvertebrados bentônicos é cada vez mais usado e aceito como uma importante ferramenta na avaliação da qualidade da água. Embora seja uma ferramenta utilizada desde o início do século XX na Europa e na América do Norte, no Brasil esta técnica tem apenas algumas décadas e não existem publicações de protocolos específicos para a coleta de macroinvertebrados em rios tropicais. Na América do Norte, em particular, a publicação de Rosenberg & Resh (1993) constitui uma das principais obras sobre o tema, sendo uma boa fonte de consulta para os iniciantes no estudo do biomonitoramento da qualidade das águas. Por ser uma metodologia de baixo custo e de aparato técnico simples, é interessante que se estabeleça um protocolo padrão para utilização em riachos nos países em desenvolvimento, a fim de que estudos futuros possam ser comparados, desde que desenvolvidos em áreas de clima e geografia semelhantes. Esta metodologia apresenta várias vantagens quando empregada em associação à tradicional análise de parâmetros físicos, químicos e físico-químicos da água.

O uso de indicadores biológicos para avaliação da qualidade das águas é sustentado também pela legislação dos Recursos Hídricos (Lei 9433/97, que institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos), a qual tem como um de seus preceitos "considerar que a saúde e o bem-estar humanos, bem como o equilíbrio ecológico aquático, não devem ser afetados como consequência da deterioração da qualidade das águas". Desse modo, se justifica a necessidade de avaliar a condição da comunidade biológica para a manutenção da integridade dos ecossistemas aquáticos, a qual pode ser definida como a capacidade do sistema em manter a sua biodiversidade natural e os processos ecológicos essenciais para seu perfeito funcionamento. Segundo Barbosa et al. (1995), os métodos biológicos pressupõem que as atividades antrópicas produzem efeitos que afetam a organização e o funcionamento das comunidades naturais, comprometendo, portanto, a integridade desses ecossistemas.

A comunidade de invertebrados bentônicos apresenta uma elevada riqueza taxonômica, incluindo protozoários, vermes pertencentes a diversos filos, crustáceos, moluscos

<sup>1</sup>Bacharel em Ciências Biológicas, Mestre em Ecologia, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, Km 127,5 - Cx. Postal 69 Cep 13820-000 - Jaguariúna, SP. mariana@cnpma.embrapa.br

<sup>2</sup>Oceanólogo, Doutor em Ciências Agrárias, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP-340, Km 127,5 - Cx. Postal 69, Cep 13820-000 - Jaguariúna, SP. jqueiroz@cnpma.embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, Doutora em Solos e Nutrição de Plantas, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, Km 127,5 - Cx. Postal 69 Cep 13820-000 - Jaguariúna, SP. rboeira@cnpma.embrapa.br

e insetos (adultos e imaturos), entre outros. Devido à sua grande diversidade de espécies, a comunidade macrobentônica apresenta diversas formas e modos de vida, adaptando-se ao hábitat local, os quais podem ser: fundos de corredeiras, riachos, rios, lagoas e represas.

Segundo Metcalfe (1989) e Brandimarte et al. (2004), algumas das vantagens que destacam os invertebrados bentônicos como os mais utilizados nas avaliações de efeitos de impactos antrópicos sobre os ecossistemas aquáticos são:

a) constituem um grupo bastante diverso e cosmopolita, sendo sensíveis a vários tipos de poluentes e distúrbios físicos (processos de erosão e assoreamento, por exemplo);

b) sua coleta é de baixo custo e requer aparelhagem relativamente simples e barata;

c) por estarem associados ao sedimento e serem relativamente sésseis, permitem: 1) registrar um tempo maior de impactos do que a avaliação de parâmetros físicos, químicos e físico-químicos, servindo como testemunhas tanto de impactos recentes como de médio prazo; e 2) associar sua presença ou ausência às alterações das condições de seu hábitat, já que estão intimamente associados a eles;

d) presença de espécies com ciclo de vida longo em relação a outros organismos, possibilitando um maior tempo de efeitos de ações antrópicas sobre a comunidade.

O procedimento de coleta de amostras em campo e o material utilizado irão depender da natureza do corpo hídrico estudado. Assim, o presente trabalho tem como objetivo descrever detalhadamente uma metodologia para a obtenção, preparo e conservação em laboratório de amostras de macroinvertebrados (com ênfase em insetos aquáticos), obtidas em riachos tropicais, para a avaliação da qualidade da água. Tal metodologia pode ser útil para pesquisadores que estejam se iniciando no uso do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água, bem como para estudantes das áreas de limnologia e de recursos hídricos em geral.

## Protocolos de metadados de campo e laboratório

A fim de que o tempo de coleta em campo e o procedimento de preparação de amostras em laboratório seja otimizado, é aconselhável que se prepare previamente um protocolo de todo o material a ser utilizado na coleta e no laboratório. Em campo, tal protocolo incluiria toda a metodologia de coleta e mais particularmente a descrição do material utilizado e suas especificações, bem como o número de amostras e pseudo-réplicas a serem coletadas e

os códigos usados nas etiquetas de campo. O protocolo relativo aos procedimentos de laboratório seguiria padrão semelhante ao protocolo de campo, ou seja, material utilizado, etiquetas, fases de triagem e identificação dos espécimes.

## Equipamentos e procedimentos de coleta das amostras

Os rios (ou sistemas lóticos) podem ser divididos em três classes de tamanho: as cabeceiras (rios de 1ª a 3ª ordens), rios de trecho médio (4ª a 6ª ordens) e "grandes rios" (7ª ordem ou superior) (Karr & Dudley, 1981). Os riachos estariam inseridos no grupo de rios de 1ª a 3ª ordens ou cabeceiras e nascentes, região também chamada de crenon. Dependendo do rio, há trechos de 2ª e 3ª ordens que podem ser classificados como ritron, que corresponde à região com áreas de declive acentuado. A metodologia de coleta utilizada em riachos é diferente daquela de rios em regiões de foz ou potamal, uma vez que as condições hidrológicas são completamente diversas. O sedimento da calha principal também será diferente, assim como a fauna associada. Assim, o tipo de coletor irá variar de acordo com o ambiente estudado.

Para rios de pequeno porte (até 3ª ordem), como córregos e nascentes, o amostrador do tipo Surber é bastante indicado (Fig. 1).



Fig. 1. Coletor Surber, com malha de 250µm.

Em geral, a área amostrada do Surber é de 900cm<sup>2</sup> e a malha coletora usada é de 250 micrômetros. Entretanto, o tamanho da malha do coletor dependerá dos objetivos da pesquisa, tais como a importância ou não da coleta de indivíduos muito pequenos e imaturos, número de espécimes coletados ou outros. Para a coleta, o procedimento é feito da seguinte forma:

a) Posicionar o Surber contra a correnteza, e fixar a área de amostragem no leito do rio (Fig. 2A e 2B);

b) Recolher com a mão, ou com a ajuda de uma pequena escova (no caso, por exemplo, de coleta de perífiton aderido a rochas) todo o substrato contido dentro da área de 900cm<sup>2</sup> para dentro da rede coletora (Fig. 2. A e B);

c) Transferir o material recolhido para sacos plásticos (50 X 80 X 0,12 cm) (Figura 3);

d) Verificar cuidadosamente se nenhum animal ficou preso na rede;

e) Fixar a amostra em álcool etílico a 70% (Figura 4), cuja preparação será descrita adiante;

f) Fechar os sacos plásticos com um nó simples, e acondicioná-los em baldes plásticos (Fig. 5).



A. Coleta em área de correnteza.



B. Coleta em pedra.

Fig. 2. Coleta de amostras.



Fig. 3. Transferindo a amostra para o saco plástico.



Fig. 4. Fixando a amostra com álcool a 70%.



Fig. 5. Amostras do ponto de coleta no balde.

Em geral, nos riachos há quatro tipos principais de substrato disponíveis: folhiço retido em áreas de correnteza; folhiço retido em áreas de remanso ou folhiço de fundo; pedra (com detritos vegetais aderidos e/ou perífiton); e sedimento não consolidado (areia, silte, cascalho). Recomenda-se a coleta de no mínimo três amostras para cada tipo de substrato, de modo que, neste caso, é obtido um conjunto de 12 amostras (quatro tipos de substrato com três repetições) por ponto de coleta. Portanto, ao se colocar as amostras em baldes, deve-se separar um balde para cada ponto de coleta. O balde deve ser identificado indicando o ponto de coleta e a data. A identificação dos baldes pode ser feita com caneta usada para retroprojeter (não apaga com a água).

Para o álcool a 70%, em uma proveta de 1000 ml coloca-se 730 ml de álcool comum a 96°GL e completa-se com 270 ml de água destilada, de preferência. Considerando-se que o álcool etílico comercial está a 92%, o correto é usar aproximadamente 760 ml de álcool e 240 ml de água destilada. É aconselhável o uso de um alcoômetro para medir o percentual do álcool preparado, a fim de garantir a preparação de álcool etílico a 70%.

A identificação das amostras é importante. As etiquetas de identificação das amostras de substratos deverão ser confeccionadas com papel vegetal ou papel manteiga (resistente à água, álcool e abrasão) e identificadas com lápis ou lapiseira, pois o trabalho com água impede o uso de canetas esferográficas, cuja tinta pode borrar ou manchar. O tamanho da etiqueta poderá ser de 2,5 x 5,0 cm. A etiqueta deverá conter: o ponto de coleta; o tipo de substrato amostrado com a identificação de sua réplica (A, B ou C) e a data de coleta. Para que a etiqueta seja facilmente encontrada dentro do saco, sugere-se que sejam colocadas dentro de pequenos frascos plásticos transparentes com tampa (3,0 ml) e só então colocadas nos sacos. A etiqueta representada a seguir é provisória, sendo que o coletor deverá modificá-la e atualizá-la a cada nova campanha de coleta.

Ao final de todas as etapas de processamento e identificação das amostras, deverão ser confeccionadas etiquetas definitivas, as quais deverão conter os seguintes dados: País, Estado, Município, Cidade ou localidade, rio, trecho, substrato, mesohabitat ou microhabitat, coordenadas geográficas quando possível, data, coletor (pessoa) e número da amostra. Este tipo de identificação será muito útil para estudos posteriores de consulta, constituindo um importante acervo para usuários do laboratório.

Exemplo de etiqueta:

- Ponto de coleta – Rio Macaé 1 (M1)
- Tipo de Substrato: Folhiço de Correnteza A (FCA)
- Data: Fevereiro de 2003 (02/2003)

M1 – FCA

02/2003

As amostras podem ser transportadas até o laboratório à temperatura ambiente.

## Procedimentos de laboratório

O procedimento de preparo e conservação das amostras que dão entrada no laboratório seguirá o seguinte protocolo: lavagem, flutuação (ou pré-triagem), triagem e identificação dos organismos. Todas estas etapas podem ser realizadas no mesmo espaço físico, mas é aconselhável que as etapas de triagem na lupa estereoscópica e a identificação sejam realizadas numa sala específica para tal procedimento.

### Lista de material necessário

- Bandejas translúcidas em polietileno (28cm x 45cm);
- Caixas de plástico (31,5 cm x 20cm x 12 cm);
- Caixa de madeira e vidro com lâmpadas fluorescentes;
- Pinças de relojoeiro tamanho AA de aço inoxidável;
- Lupa estereoscópica com aumento de 45 vezes;
- Placas de Petri;
- Álcool a 70%;
- Frascos de vidro ou plástico transparentes de 3,0 ml para colocação dos macroinvertebrados;
- Potes de vidro ou plástico (500 ml) para colocação dos frascos com as amostras;
- Cloreto de sódio;
- Açúcar refinado;
- Chaves taxonômicas (Angrisano, 1995; Fernández & Domínguez, 2001, Nieser & de Melo, 1997, Carvalho & Calil, 2000; Merritt & Cummins, 1996);

### **A) Lavagem de amostras:**

O objetivo desta etapa é separar o material grosseiro (folhas grandes, galhos ocos, pedras) do material mais particulado, de modo a facilitar a triagem posterior dos macroinvertebrados em lupa.

No laboratório deve-se:

- a) Retirar os substratos amostrados (folhas, pedras, galhos, perífiton, algas, areia) dos sacos plásticos e colocá-los em um sistema com duas peneiras metálicas acopladas (25 cm de diâmetro x 10 cm de altura cada uma), sendo que a de cima deve ser revestida com uma malha superior à da rede do coletor Surber utilizado (por exemplo de 1 ou 2 mm) e abaixo, outra peneira com malha



de mesmo tamanho daquela usada no coletor (250mm) (Fig. 6A);

b) Usar água corrente de pia para lavagem (Fig. 6B). É importante ressaltar que durante esta etapa, muito cuidado deve ser tomado para evitar a quebra dos organismos. Isto vale principalmente para efemerópteros, que são muito frágeis, podendo perder suas brânquias, as quais são muito importantes para a identificação taxonômica.



6A. Peneiras acopladas.

6B. Lavagem de amostra.

Fig. 6. Lavagem de amostras.

**B) Flutuação de organismos em solução de sal ou açúcar:**

Após a lavagem, colocar o restante da amostra em bandejas plásticas translúcidas com capacidade para 3 litros, na qual já deve estar preparada uma solução supersaturada de sal (Brandimarte & Anaya, 1998) ou açúcar. A solução supersaturada com açúcar também pode ser usada para o mesmo fim. Neste caso, faz-se uma solução de 500 g de açúcar para 2 litros de água. Este procedimento tem como objetivo fazer os macroinvertebrados mais leves flutuarem, por serem menos densos do que a solução supersaturada. Outro objetivo da flutuação é facilitar e otimizar a triagem na lupa estereoscópica, pois os espécimes maiores e mais leves irão flutuar, enquanto que os mais pesados irão para o fundo da bandeja. Desse modo, a flutuação serve como uma pré-triagem dos organismos bentônicos. Para melhor visualização dos organismos na bandeja, pode-se utilizar uma caixa de madeira e vidro com lâmpadas fluorescentes (Fig. 7A). Vale observar que, no caso da presença de moluscos (gastropódos ou bivalves) nas amostras este método não é indicado, pois a concha os fará ir para o fundo do recipiente.

O procedimento começa com a colocação da amostra na bandeja com a solução supersaturada (Fig. 7B).

Os animais que flutuaram devem ser retirados com uma pinça cirúrgica ou de relojoeiro AA ou número 02 de aço

inoxidável, e colocados em frascos de vidro transparente de 3 ml com álcool a 70% e etiquetados (etiquetas semelhantes às usadas nos sacos plásticos para coleta). Os vidros deverão ser guardados em uma estante ou armário à temperatura ambiente e agrupados de acordo com o ponto de coleta ao qual pertencem (Fig. 7C e 7D).

O restante da amostra (o que não flutuou e o restante do substrato lavado), deverá ser colocado em vidros maiores (de 500 ml aproximadamente) com álcool a 70% e etiquetados, devendo ser guardados em estantes ou armários à temperatura ambiente. Os vidros de 500 ml deverão ser etiquetados com a identificação do ponto de coleta, o tipo de substrato da amostra, o número de sua réplica e data da coleta (Fig. 7E).



7A. Caixa com lâmpadas fluorescentes



7B. Colocando amostra lavada na solução de açúcar.



7C. Pinçando macroinvertebrados na solução de açúcar.



7D. Vidro de 3 ml com macroinvertebrados pinçados na solução.



7E. Retornando o restante da amostra para o vidro de 500 ml.

Fig. 7. Flutuação da amostra.

### C) Triagem e identificação dos organismos

A etapa da triagem final (na lupa estereoscópica) é a da identificação dos macroinvertebrados. A triagem no nível taxonômico de ordem pode ser feita por um técnico após treinamento para reconhecimento dos principais grupos de macroinvertebrados. No entanto, é aconselhável que um especialista reveja a amostra para verificar se todos os organismos foram triados. O técnico poderá se orientar com o auxílio de uma pequena cartilha com fotos ou desenhos das principais ordens, acompanhada de algumas das principais características morfológicas de cada ordem. Para esta primeira etapa de identificação, o nível de separação por ordens de macroinvertebrados é suficiente.

O restante da amostra e os organismos triados na etapa de flutuação deverão ser examinados em uma lupa estereoscópica com aumento de até 45 vezes. A triagem e a identificação dos macroinvertebrados são feitas colocando-se um pouco da amostra, diluída em água comum ou álcool a 70%, em placas de Petri, e então os organismos deverão ser coletados com uma pinça cirúrgica ou de relojoeiro número 02 tamanho AA de aço inoxidável. Este procedimento deve ser realizado até que toda a amostra seja examinada. Os organismos pinçados são então colocados em pequenos frascos plásticos ou de vidro transparente de 3,0 ml etiquetados e conservados em álcool a 70%. Dentro destes vidros deverá ser colocada uma etiqueta feita com papel vegetal, e a lápis deverão ser escritos o ponto de coleta, a identificação da amostra (tipo de substrato, número da réplica) e a data (Figura 8). Ao final desta etapa, os espécimes podem ser separados por ordem de macroinvertebrados, nos vidros de 3 ml.

A etapa de identificação em nível taxonômico menor do que ordem deverá ser feita por especialistas. Os macroinvertebrados deverão ser identificados até o menor nível taxonômico possível, com auxílio de chaves taxonômicas. Exemplos: Angrisano (1995), Fernández & Domínguez (2001), Merritt & Cummins (1996), Nieser & de Melo (1997), e Carvalho & Calil (2000). Para as larvas da Família Chironomidae (Diptera), que são numerosas nos ecossistemas aquáticos continentais, sugere-se as seguintes referências para identificação de imaturos no nível de gênero: Cranston et al. (1983), Epler (1995) e Trivinho-Strixino & Strixino (1995).



Fig. 8. Triagem das amostras e identificação dos espécimes na lupa.

## Referências

- ANGRISANO, E. B. Insecta Trichoptera. In: LOPRETTO, E. C.; TELL, G. (Ed.). **Ecosistemas de águas continentais: metodologias para su estudio**. La Plata: Ediciones Sur, 1995. v. 3, p. 1199-1237.
- BARBOSA, F.; MAIA-BARBOSA, P.; SANTOS, M. B. L.; MINGOTTI, S.; AQUINO, V. Nova ferramenta para o monitoramento da qualidade da água. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 110, p. 16-17, 1995.
- BRANDIMARTE, A. L.; SHIMIZU, G. Y.; ANAYA, M.; KUHLMANN, M. L. Amostragem de invertebrados bentônicos. In: BICUDO, C. E. M.; BICUDO, D. C. (Ed.). **Amostragem em limnologia**. Rio de Janeiro, 2004. p. 213-230.
- BRANDIMARTE, A. L.; ANAYA, M. Bottom fauna using a solution of sodium chloride. **Verhandlungen für Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 26, p. 2358-2359, 1998.
- CARVALHO, A. L.; CALIL, E. R. Chaves de identificação para as famílias de Odonata (Insecta) ocorrentes no Brasil, adultos e larvas. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 15, n. 41, p. 223-241, 2000.
- CRANSTON, P. S.; OLIVER, D. R.; SAEETHER, O. A. The larvae of Orthocladiinae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region – keys and diagnosis. In: WIEDERHOLM, T. (Ed.). **Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnose. Part I: Larvae**. Ent. Scan., v. 19, suppl., p. 149-291, 1983.
- EPLER, J. H. **Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of Florida**. Tallahassee: Department of Environmental Protection. Division of Water Facilities, 1995. 319 p.
- FERNÁNDEZ, H. R.; DOMÍNGUEZ, E. (Ed.). **Guía para la determinación de los artrópodos bentônicos sudamericanos**. Tucumán: Editorial Universitaria de Tucumán, 2001. 282 p.
- KARR, J. R.; DUDLEY, D. R. Ecological perspective on water quality goals. **Environmental Management**, v. 5, n. 1, p. 55-68, 1981.
- KOLKWITZ, R.; MARSSON, M. Ökologie der pflanzlichen Saprobien. **Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 26A, p. 505-519, 1909.
- MERRITT, R. W.; CUMMINS, K. W. (Ed.). **An introduction to the aquatic insects of North America**. 3. ed. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing, 1996. 862 p.
- METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, v. 60, p. 101-39, 1989.
- NIESER, N.; MELO, A. L. de. **Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997. 180 p.
- ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993. 448 p.
- TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. **Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo: guia de identificação e diagnose dos gêneros**. São Carlos: UFSCar, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 1995. 227 p.

### Comunicado Técnico, 19

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



#### Embrapa Meio Ambiente

**Endereço:** Rodovia SP-340 - Km 127,5  
Tanquinho Velho - Caixa Postal 69  
Cep. 13820-000 - Jaguariúna, SP  
**Fone:** (19) 3867-8700  
**Fax:** (19) 3867-8740  
**E-mail:** sac@cnpma.embrapa.br

### Comitê de publicações

**Presidente:** Geraldo Stachetti Rodrigues  
**Secretário-Executivo:** Maria Amélia de Toledo Leme  
**Secretário:** Sandro Freitas Nunes  
**Membros:** Marcelo A. Boechat Morandi, Maria Lúcia Saito, José Maria Guzman, Manoel Dornelas de Souza, Heloisa F. Filizola, Cláudio C. de A. Buschinelli

### Expediente

**Normalização Bibliográfica:** Maria Amélia de Toledo Leme  
**Edição eletrônica:** Alexandre R. Conceição