

PROTOCOLO PARA O BIOMONITORAMENTO COM AS COMUNIDADES BENTÔNICAS DE RIOS E RESERVATÓRIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

2ª edição revisada



2024

**PROTOCOLO PARA O
BIOMONITORAMENTO COM AS
COMUNIDADES BENTÔNICAS DE RIOS
E RESERVATÓRIOS DO ESTADO DE
SÃO PAULO**

2ª edição revisada

Mônica Luisa Kuhlmann
Hélio Rubens Victorino Imbimbo
Lucy Lina Ogura

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE, INFRAESTRUTURA E LOGÍSTICA
CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

2024

EQUIPE TÉCNICA

Mônica Luisa Kuhlmann (CETESB – ELHC Setor de Comunidades Aquáticas)
Hélio Rubens Victorino Imbimbo (CETESB – ELHC Setor de Comunidades Aquáticas)
Lucy Lina Ogura (CETESB – ELHE Setor de Ecotoxicologia Aquática)

REVISORA

Marta Condé Lamparelli (CETESB – ELH Divisão de Análises Hidrobiológicas)

FONTES DAS ILUSTRAÇÕES

Mônica Luisa Kuhlmann
Hélio Rubens Victorino Imbimbo
Lucy Lina Ogura
Helena Mitiko Watanabe
Cláudio Santos Sorc
Venício Pedro Ribeiro
Emerson Alves de Araújo
GoogleEarth

REVISÃO NORMATIVA E CATALOGAÇÃO DA FONTE

Margot Terada (CRB 8.4422)

Dados Internacionais de Catalogação

(CETESB, Biblioteca, SP, Brasil)

C418p CETESB (São Paulo)
2.ed. Protocolo para o biomonitoramento com as comunidades bentônicas de rios e reservatórios do estado de São Paulo – versão 2 revisada [recurso eletrônico] / CETESB ; Mônica Luisa Kuhlmann, Hélio Rubens Victorino Imbimbo, Lucy Lina Ogura. – 2.ed.rev. – São Paulo : CETESB, 2024.
1 arquivo de texto (96 p.) : il. color., PDF; 7 MB

Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>>

ISBN 978-65-5577-096-4

1. Bentos 2. Comunidade bentônica – análise 3. Indicadores biológicos – métodos 4. Integridade ecológica 5. Macroinvertebrados aquáticos 6. Qualidade ambiental – biomonitoramento 7. Reservatórios 8. Rios 9. São Paulo (BR) I. Kuhlmann, Mônica Luisa II. Imbimbo, Hélio Rubens Victorino III. Ogura, Lucy Lina IV. Título.

CDD (21. ed. Esp.) 363.739 463 169308161
591.764 0286 8161
CDU (2. ed. Port.) 592/596:502.175 (282.2:815.6)

Direitos reservados de distribuição e comercialização.

Permitida a reprodução desde que citada a fonte.

© CETESB 2024.

Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345
Pinheiros – SP – Brasil – CEP 05459900

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
Governador Tarcísio de Freitas

**SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE, INFRAESTRUTURA E
LOGÍSTICA**
Secretária Natália Resende

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Diretor-Presidente Thomaz Miazaki de Toledo

Diretoria de Gestão Corporativa e Sustentabilidade
Diretora Liv Nakashima Costa

Diretoria de Controle e Licenciamento Ambiental
Diretor Adriano Rafael Arrepia de Queiroz

Diretoria de Avaliação de Impacto Ambiental
Diretora Mayla Matsuzaki Fukushima

Diretoria de Qualidade Ambiental
Diretora Carolina Fiorillo Mariani

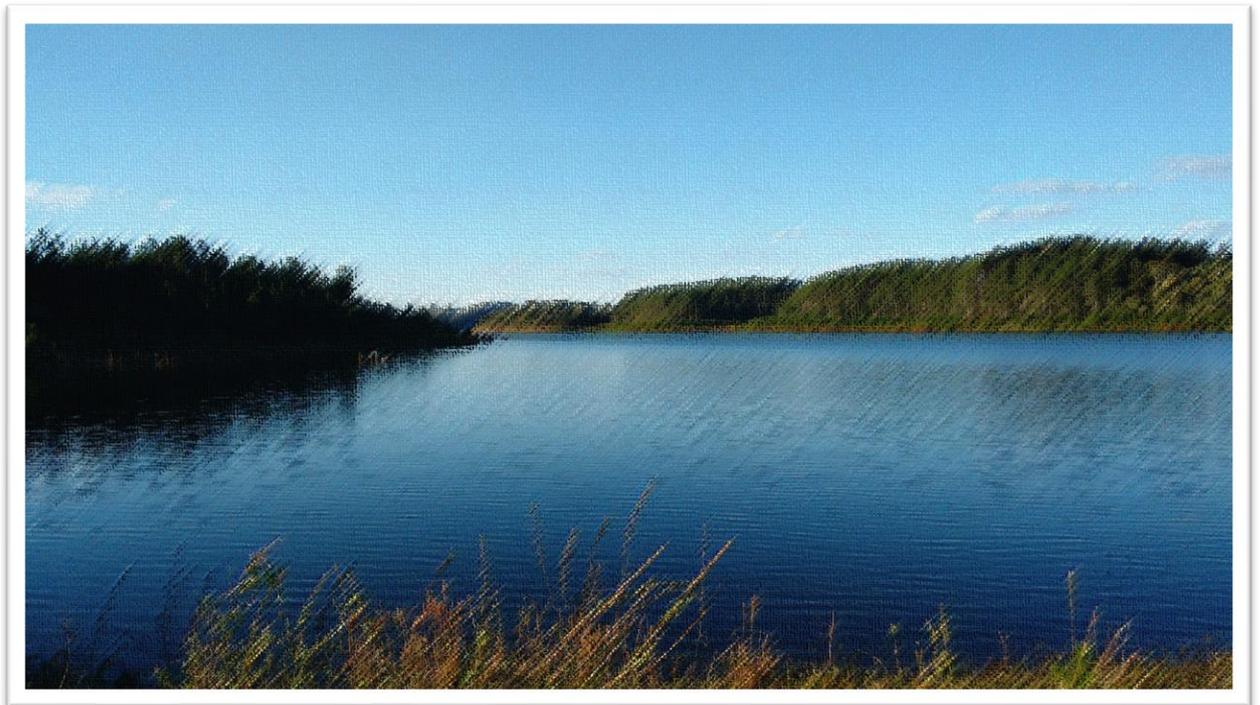
Departamento de Análises Ambientais
Gerente Maria Inês Zanoli Sato

Divisão de Análise Hidrobiológicas
Gerente Marta Condé Lamparelli

Setor de Comunidades Aquáticas
Gerente Hélio Rubens Victorino Imbimbo



SÃO PAULO
GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO SÃO TODOS



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2017)

Aos bentólogos que persistiram às extensas horas de triagem... Sempre vale a pena!

LISTA DE FOTOS

N.	Título	p.
1	Acessos para embarcação: entre o ideal e o possível	21
2	Zonas erosional e deposicional do rio Jundiá	24
3	Pegador Ponar	30
4	Pegadores Petersen modificado e van Veen	31
5	Versões do pegador Ekman-Birge	32
6	Substrato artificial do tipo cesto com pedra de brita	34
7	Corer	35
8	Coleta de amostra de sedimento para análise de comunidade bentônica	37
9	Fixação da amostra em campo com formol neutralizado	37
10	Fechamento dos sacos com amostra de sedimento para análise da comunidade	38
11	Acondicionamento das amostras para transporte	39
12	Material para lavagem de amostras de macroinvertebrados	41
13	Etapas de preparação de amostras de bentos	42/43
14	Amostra inicial, com grande volume de areia	43
15	Preparo da solução salina	44
16	Procedimento de flutuação	45
17	Placa de Petri descartável de fundo quadriculado para triagem	47
18	Nemertea com a probóscide evertida	52
19	Turbellaria-Dugesiidae em vista ventral, com a faringe evertida	52
20	Opisthocyttidae	53
21	Reprodução assexuada em <i>Dero</i> (Naididae – Naidinae)	53
22	Sanguessugas da família Glossiphoniidae com filhotes presos ao abdômen	54
23	Colônia de Bryozoa com cerca de 15 zoóides	54
24	Subamostrador em “L”	57
25	Cápsula cefálica de <i>Labrundinia</i> (Chironomidae – Tanypodinae)	61
26	Larva de <i>Chironomus</i> em 4º instar	64
27	Cápsula cefálica de <i>Chironomus</i> mostrando mento normal	64
28	<i>Gap</i>	65
29	Bifurcação de dente central	66
30	Falta de dentes	67
31	Excesso de dentes	68

N.	Título	p.
32	Quebras de dentes do mento	69
33	Anomalias não numéricas nos dentes do mento	70
34	Múltiplas deformidades	71
35	Coleção referência para famílias de Trichoptera	79
36	Coleção referência para gêneros de Chironomidae	79
37	Rio Tietê, a montante da barragem da Penha, município de São Paulo	82

LISTA DE IMAGENS

N.	Título	p.
1	Trecho meândrico do rio Aguapeí, com margens deposicionais (flechas brancas) e erosionais (flechas laranjas)	24
2	Exemplo de distribuição dos locais de coleta de réplicas em rio	29
3	Exemplo de distribuição dos locais de coleta de réplicas em sublitoral (em branco) e profundo (em amarelo) de reservatórios	29

LISTA DE QUADROS

N.	Título	p.
1	Padronização do nível de identificação taxonômica deste Protocolo	50
2	ICB _{RIO}	82
3	IB-Rio	83
4	ICB _{RES-SL}	83
5	IB-Res	84
6	ICB _{RES-PP}	84
7	ICB _{RES-PR}	85
8	Faixas de qualidade para a frequência de deformidades	87

LISTA DE FIGURAS

N.	Título	p.
1	Exemplo de formulário para registro do dado em bancada	56
2	Curva de acúmulo de táxons	58
3	Exemplo de formulário para CQA de identificação taxonômica	77
4	Lista de ocorrência dos táxons, métricas e pontuação	86

LISTA DE SIGLAS

CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CQA	Controle de Qualidade Analítico
EPC	Equipamento de Proteção Coletivo
EPI	Equipamento de Proteção Individual
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBI	Index of Biotic Integrity
ICI	Invertebrate Community Index
ICB	Índice da Comunidade Bentônica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
PCBs	Bifenilas Policloradas
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USEPA	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	13
1	INTRODUÇÃO	15
2	PLANEJAMENTO AMOSTRAL	20
2.1	Locais ou pontos de coleta	20
2.2	Habitats	22
2.3	Período de amostragem	24
2.4	Frequência de amostragem	25
2.5	Natureza do dado	26
3	MÉTODOS DE AMOSTRAGEM	27
3.1	Equipamentos	29
3.1.1	Pegadores	30
3.1.2	Substrato Artificial	33
3.1.3	Corer	34
3.2	Coleta, armazenamento e transporte	36
4	MÉTODOS DE ANÁLISE	40
4.1	Preparo da amostra	40
4.2	Análise da amostra	46
4.2.1	Triagem	46
4.2.2	Identificação e contagem	47
4.3	Subamostragem	57
4.4	Preparação de lâminas	59
5	AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DEFORMIDADE EM MENTO DE <i>Chironomus</i>	63
6	SAÚDE OCUPACIONAL	72
7	CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA	74
7.1	Triagem	74
7.2	Identificação de organismos	75
8	TRATAMENTO DE DADOS	80
	REFERÊNCIAS	89

APRESENTAÇÃO

A utilização de macroinvertebrados aquáticos, que incluem as comunidades bentônicas, para o diagnóstico de qualidade de ecossistemas aquáticos continentais remonta ao início do século XX. Desde então, muitos índices e protocolos foram desenvolvidos para sua aplicação em programas de biomonitoramento, especialmente para ecossistemas ribeirinhos de baixa ordem e rasos (nascentes, córregos, riachos), sendo atualmente a biota mais empregada para este fim (Flotemersch *et al.*, 2006). No entanto, os métodos utilizados nestes protocolos não se aplicam aos ambientes mais profundos, como os rios e reservatórios investigados na rede de monitoramento da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

A despeito de Thienemann ter empregado a comunidade bentônica na tipologia de lagos desde 1925 (Brinkhurst, 1974), protocolos para o biomonitoramento de reservatórios e grandes rios ainda são escassos na literatura, podendo ser citados Gerritsen *et al.* (1998), Gerritsen *et al.* (2000) e Flotemersch *et al.* (2006). Os primeiros dois trabalhos, voltados para lagos e reservatórios, subsidiaram muitas decisões tomadas na padronização dos métodos adotados neste protocolo. Já o trabalho de Flotemersch *et al.* (2006), desenvolvido para grandes rios, realiza coletas marginais, utilizando os mesmos métodos aplicados em riachos. Como os grandes rios do estado de São Paulo são em geral encaixados, com margens profundas ou cobertas por bancos de vegetação (alagados), não permitiriam o emprego destas técnicas. Assim, este documento procura descrever os métodos adotados pela CETESB na coleta e análise de macroinvertebrados bentônicos em estudos para o diagnóstico da qualidade de rios e reservatórios no estado de São Paulo. A principal alteração em relação à versão anterior, de 2019, é a revisão das métricas empregadas no Índice da Comunidade Bentônica (ICB) e a ampliação das classes de qualidade, a partir de estudo relatado em Kuhlmann (2022).

Os autores

1 INTRODUÇÃO

Macroinvertebrados bentônicos, ou simplesmente bentos, são os organismos que colonizam o substrato de fundo dos ambientes aquáticos selecionados em rede de, no mínimo, 0,20 mm (ou 200 μm) de abertura (Rosenberg; Resh, 1993). Em ecossistemas dulciaquícolas englobam espécies de Insecta, Annelida (principalmente Oligochaeta e Hirudinea), Nemertea, Crustacea (Decapoda, Amphipoda e Isopoda), Mollusca (Bivalvia e Gastropoda), alguns Turbellaria, Acarina e Bryozoa. Podem viver na água de fundo (hiperbentos), sobre o substrato (epifauna), se enterrar em sedimento mais fino (infauna) ou ocupar os espaços entre os grãos de areia (fauna intersticial). O termo macroinvertebrados aquáticos é mais amplo e inclui aqueles associados às macrófitas (fitófilos), ao filme superficial (nêuston) e os que nadam ativamente (nécton). Embora em ambientes rasos e marginais, a separação entre estes grupos e a fauna verdadeiramente bentônica não seja possível, em ambientes profundos, como os abordados neste Protocolo, a biota coletada com pegadores tem hábito de vida exclusivamente bentônico.

Esta biota é componente essencial para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, atuando nos processos ecológicos de transferência de energia e de ciclagem de nutrientes. Além disso, influenciam a movimentação de contaminantes e nutrientes dos sedimentos por: 1) biorrevolvimento ou bioturbação, alteração física e química dos sedimentos promovido pelas populações que se enterram; 2) bioacumulação, em que a concentração corpórea de determinada substância tende a aumentar com o tempo de contato do organismo a ela; 3) transferência trófica ou biomagnificação, quando a concentração aumenta com o nível trófico; 4) biodegradação, quando há transformação, após ingestão, da substância pelo bentos; e 5) migração, quando o contaminante é transportado para outro sistema ou trecho do mesmo ambiente como, por exemplo, na emergência de insetos cujas larvas são aquáticas.

As comunidades de macroinvertebrados bentônicos retratam a diversidade ecológica do meio aquático por serem formadas por populações de hábitat e hábitos alimentares variados. Esta biota responde especialmente bem aos impactos de origem antrópica e tem sido utilizada como indicadora da qualidade

ecológica para toda a biota aquática por viver em situação extrema. Por serem sedentárias ou de motilidade reduzida e estarem associadas ao sedimento, suas populações são as que invariavelmente sofrem as consequências deletérias das atividades humanas do entorno. Além disso, o sedimento é o destino final de grande parte da carga poluidora que adentra o ambiente aquático e é na interface entre a água e o sedimento que os teores de oxigênio dissolvido podem, rapidamente, atingir valores limitantes à vida.

Em função das características apontadas acima, os macroinvertebrados têm sido usados na tipologia de lagos (Brinkhurst, 1974) e na avaliação biológica da qualidade da água, em projetos de diagnose e de monitoramento ambiental. Nestes estudos, apesar das variáveis físicas e químicas apresentarem respostas mais rápidas, a aplicação de dados das comunidades biológicas, contribuem por:

- 1) integrarem a ação de várias fontes de impacto sobre os ecossistemas aquáticos, incluindo alterações físicas, como a retirada da mata ciliar;
- 2) integrarem a ação de vários contaminantes, situação comum tanto em descargas industriais quanto domésticas, e que podem vir a exibir efeitos sinérgicos ou antagônicos;
- 3) responderem a níveis de contaminantes não detectáveis pela metodologia química;
- 4) responderem aos novos contaminantes, cuja metodologia analítica ainda está em desenvolvimento;
- 5) acusarem a ocorrência de despejos intermitentes, como é característica da emissão de efluentes industriais e
- 6) serem medida direta da qualidade ecológica do local, servindo como indicador de metas de qualidade para a proteção da biodiversidade.

O uso formal destes organismos como indicadores da qualidade de ecossistemas aquáticos começou no início do século XX, quando Kolkwitz e Marsson introduziram espécies do grupo no Sistema Saprobiano (Cairns; Pratt, 1993). Desde então, vários índices foram desenvolvidos ao redor do mundo, com o intuito de traduzir as respostas biológicas em números que não só possibilitam o dimensionamento de impactos como são mais facilmente compreendidos pelos gestores de recursos hídricos. Estes índices podem se basear no potencial bioindicador dos diferentes grupos que compõem a biota (p. ex. os índices bióticos), na estrutura da comunidade (p. ex. os índices de diversidade), ou ser uma mistura destes (os índices multimétricos). É importante frisar que a maioria dos índices bióticos existentes foi desenvolvida para riachos e não são aplicáveis

para rios de médio e grande porte e, muito menos, para reservatórios. O mau uso destes índices pode resultar em diagnósticos errôneos e, conseqüentemente, decisões equivocadas, comprometendo a saúde do meio ambiente.

O monitoramento é um processo definido pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/05 (Brasil, 2005) como sendo de “medição ou verificação de parâmetros de qualidade e quantidade de água, que pode ser contínua ou periódica, utilizada para acompanhamento da condição e controle da qualidade do corpo d’água”. No monitoramento ambiental, análises de comunidades são utilizadas para avaliar a qualidade ambiental com vistas à proteção da biodiversidade, ou seja, a qualidade ecológica do corpo d’água, uso preconizado nesta Resolução para ambientes de Classes Especial, 1, 2 e 3. Este mesmo instrumento legal sugere a aplicação de comunidades aquáticas, “quando apropriado”, em seu artigo 8º, 3º parágrafo.

Além do monitoramento da qualidade das águas e sedimentos de água doce, outras aplicações dos dados desta biota em meio ambiente incluem os estudos de avaliação de impacto (Roque *et al.*, 2014; Buss *et al.*, 2015) e a avaliação de risco ecológico. No primeiro caso, devem ser considerados em processos de licenciamento ambiental que envolvam obras, em geral de grande porte, com potencial de gerar impactos relevantes ou significativos sobre ecossistemas aquáticos. Neste contexto, a comunidade de macroinvertebrados pode ser inserida tanto na fase de diagnose ambiental quanto como instrumento para o acompanhamento de possíveis impactos sobre os recursos hídricos envolvidos (monitoramento). Algumas diferenças metodológicas sobre o uso em monitoramento devem ser consideradas na fase de diagnose. No levantamento inicial espera-se um inventário dos componentes da biota, ou seja, a amostragem deve ser exploratória e buscar capturar exemplares de todas as populações existentes no trecho em estudo, e a identificação taxonômica deverá atingir o nível mais fino possível para responder à questões relativas à ocorrência de espécies pertencentes às listas (federal e/ou estadual) de espécies ameaçadas de extinção, de espécies exóticas invasoras ou com potencial de bioinvasão e de espécies ou grupos endêmicos. Para o monitoramento ambiental de um empreendimento, podem ser elencadas, espécies ou grupos

chave, espécies ou grupos indicadores, selecionados por sua sensibilidade específica aos impactos previstos. Na avaliação de risco ecológico (CETESB, 2022) em ecossistemas aquáticos, a comunidade de macroinvertebrados é um importante receptor a ser considerado. Na fase de Formulação do Problema, o levantamento faunístico para a caracterização da biota assemelha-se à diagnose realizada no licenciamento ambiental, aliado a uma investigação bibliográfica sobre a relação dos componentes da comunidade com o estressor, que será usada na confecção do Modelo Conceitual de Risco Ecológico. Na fase de Análise, os dados de macroinvertebrados bentônicos obtidos em campo devem seguir um desenho amostral que permita estimar o risco ao qual a biota está submetida e inferir a relação causal.

Além de sua aplicação em nível de comunidade, que confere alta relevância ecológica ao dado de macroinvertebrados aquáticos, a avaliação da frequência de deformidade em mento de larvas do gênero *Chironomus* (Diptera: Chironomidae) pode ser útil na diagnose de problemas de uma bacia. Estas deformidades são em geral consideradas de natureza teratogênica, ou seja, não são transferidas para a geração seguinte, desaparecendo o efeito assim que o agente causador for afastado (Bird; Schwartz; Joseph, 1995). Mas, segundo os mesmos autores, algumas deformidades que mantêm a simetria bilateral do espécime e que são observadas em culturas do gênero podem ser mutagênicas, neste caso, passando para a prole. De qualquer maneira, parece não haver inviabilidade da população, servindo como medida de efeitos subletais *in situ*. A literatura tem associado essas anomalias à presença de contaminantes químicos no ambiente, sendo apontados como causadores, PCBs, HPAs, metais pesados, pesticidas e hormônios e podem indicar contribuições desta natureza ao recurso hídrico avaliado.

O emprego das comunidades de macroinvertebrados bentônicos no diagnóstico da qualidade ambiental de recursos hídricos do estado de São Paulo pela CETESB iniciou-se em sua formação, no início da década de 1970, com estudos em ambientes críticos, como nos rios Atibaia (Johnscher-Fornasaro; Piva.; Chen, 1979; Imbimbo, 2006), Moji-Guaçu (CETESB, 1980), Sorocaba (Piva, 1980), Cubatão (Johnscher-Fornasaro; Zagatto, 1987), Ribeira de Iguape (Henrique, 1998) e nos reservatórios Salto Grande-Americana (Rocha, 1972), Guarapiranga

(Rocha, 1976) e Billings (Rocha, 1984; Kuhlmann *et al.*, 1997; Kuhlmann; Truzzi; Johnscher-Fornasaro, 1998). Somam-se a esses, estudos de desenvolvimento metodológico para o estabelecimento deste protocolo. Em 2002, a comunidade bentônica foi inserida na rede de monitoramento da qualidade de sedimentos, como componente, junto com outras linhas de evidência (p. ex. química e ecotoxicológica), do diagnóstico baseado na tríade de qualidade de sedimentos (Chapman, 1990).

2 PLANEJAMENTO AMOSTRAL

No planejamento amostral é primordial delinear adequadamente a **questão** a ser respondida. É a partir dela que se definirão, por exemplo, os recursos hídricos a serem amostrados, a posição dos pontos de coleta, o tipo de amostragem a ser realizada e quais variáveis físicas e químicas complementares devem ser obtidas. É essencial que todas as variáveis que serão relacionadas com os dados de macroinvertebrados sejam obtidas concomitantemente nos mesmos pontos de coleta, mesmo que em pegadas diferentes.

2.1 Locais ou pontos de coleta

Como variável ecológica, destinada a avaliar a qualidade de um corpo d'água para a sustentação da biodiversidade aquática, as amostragens das comunidades bentônicas devem ser inseridas em redes de monitoramento, em locais com tal propósito ou que estejam em processo de revisão de seu enquadramento legal para uma classe cujo uso contemple a preservação da vida aquática.

Entre os pontos de coleta estabelecidos, pode ser crucial a definição de um ou mais **locais referência**, ou seja, ambientes com características físicas similares àquele que será diagnosticado, preferencialmente localizados na mesma bacia hidrográfica, mas que apresentem nenhuma ou mínima interferência humana. Em rios e reservatórios do estado de São Paulo é muito improvável trabalhar com a primeira condição. Na análise de risco ecológico, o local de referência deve sofrer influências antrópicas similares ao local sob investigação, excetuando aquela decorrente do estressor de interesse.

Para a localização inicial dos pontos de coleta podem ser utilizadas ferramentas como cartas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (p. ex. na escala 1:50.000), imagens de satélite, do *Google Earth* e do *Google Maps*. Em redes de monitoramento, é muito importante que os órgãos ambientais, prefeituras e/ou comitês de bacia possam opinar no momento de inserção de um ponto na bacia hidrográfica de sua responsabilidade, já que conhecem os problemas da região e estão diretamente relacionados com a gestão do ambiente. De qualquer modo, é fundamental uma visita para o reconhecimento

do local antes do trabalho de amostragem. Nesta vistoria, os técnicos de campo definirão se o local permitirá o uso de embarcação, qual tipo de embarcação a ser empregada e o local de acesso para a embarcação no corpo d'água (**Fotos 1a e 1b**). Se não houver possibilidade de uso da embarcação e não houver outro tipo de apoio para a coleta, como um píer, o ponto deverá ser deslocado. Só depois de definido um local apropriado pelos técnicos de campo é que se faz a caracterização do ponto de coleta, georreferenciamento e anotação de pontos de referências, registros fotográficos, dados de uso e ocupação de solo, de ocorrência de fauna e do grau de preservação da mata ciliar. Pode-se também fazer um croqui do ponto, apontando as principais referências de localização, como estradas e ruas.

Fotos 1a e 1b - Acessos para embarcação: entre o ideal (a) e o possível (b)



Fontes: Mônica Luisa Kuhlmann (2022) e Lucy Lina Ogura (2012), respectivamente

2.2 Habitats

Nos ambientes aquáticos, as condições físicas, químicas e biológicas variam ao longo de seus eixos transversal e longitudinal, criando zonas ecológicas (mesohabitats) nas quais diferentes populações biológicas estarão mais bem adaptadas para se instalar. Conseqüentemente, as comunidades diferirão nos mesohabitats formados. Em reservatórios, comunidades bentônicas distintas são formadas nas regiões litoral, sublitoral e profunda (gradiente transversal), na zona de transição (braços) e no corpo central (gradiente longitudinal), em função da profundidade, da ação de ondas, da ocorrência de macrófitas, da variabilidade e tipo de substrato, da configuração química, da incidência de luz, da estrutura térmica da massa d'água, da flutuação de nível e da hidrodinâmica. Em rios, as comunidades das margens deposicional e erosional e do canal distinguem-se principalmente em função da hidrodinâmica que define, por exemplo, o tipo de substrato e o estabelecimento da vegetação aquática. Como, em geral, os índices utilizados no diagnóstico ambiental são também sensíveis a estas diferenças, decorrentes da zonação, é fundamental padronizar o mesohabitat a ser monitorado, evitando-se com isso que a variabilidade natural não confunda o diagnóstico.

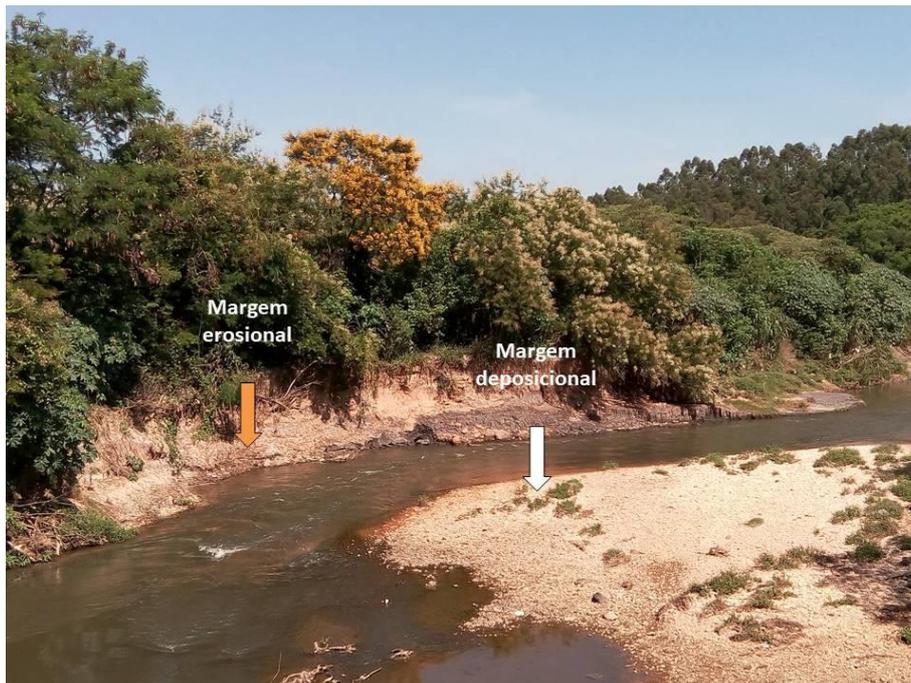
Este Protocolo orienta a obtenção de amostras nas regiões **sublitoral** e **profunda** para o monitoramento de reservatórios e **margens deposicionais** em rios.

Em **reservatórios**, as comunidades da região sublitoral, padronizada na faixa de profundidade entre 3 e 6 metros, são utilizadas não apenas por serem mais diversas que as da região profunda, mas também por melhor retratarem as condições de qualidade da água e do estado geral do ambiente para a biodiversidade aquática (Kuhlmann *et al.*, 2005). Além disso, em função da profundidade em que se encontram, não sofrem a influência de ondas e da heterogeneidade de habitats como as da região litoral (Gerritsen *et al.*, 1998). São preferidos para a coleta trechos contíguos a áreas que apresentem algum grau de conservação das matas, de modo que o dado não responda preponderantemente ao uso do solo imediatamente adjacente. A região profunda é aquela de maior profundidade do trecho em amostragem, onde se

situa a antiga calha do rio. Suas comunidades, embora naturalmente menos diversas, em resposta a homogeneidade do habitat, às condições mais restritivas de oxigenação e a ausência de luz, são únicas para o diagnóstico da qualidade dos sedimentos finos, que se depositam e acumulam nessas regiões mais profundas e calmas do sistema e que carregam consigo os contaminantes introduzidos por atividades antrópicas na bacia. Como padrão de medição e monitoramento para avaliação da qualidade ecológica de reservatórios, em geral é definido o trecho do seu corpo central, localizado a uma distância suficiente para evitar as interferências promovidas pelas operações da barragem. Para tanto, adota-se, em geral, a distância mínima de 2 km da barragem. Eventualmente é necessário um diagnóstico na zona de transição ou em reservatórios pouco profundos, em que a região profunda pode receber luz suficiente para que uma teia alimentar mais complexa, com elementos tanto da cadeia de pasteio quanto de detritos, se instale. Para ajustar melhor o diagnóstico aos padrões naturais de zanação, este Protocolo distingue a situação de amostragem na região profunda de ambiente profundo (**profunda profunda**), geralmente acima de 6 m, e de ambiente raso (**profunda rasa**).

Em rios, as coletas são realizadas padronizadamente nas regiões de deposição (**margens deposicionais**), onde assentam e se acumulam sedimentos finos e matéria orgânica, de forma que os resultados se sirvam aos diagnósticos de qualidade de águas e de sedimentos, para a preservação da biodiversidade aquática. Shimizu e colaboradores (2002) e Watanabe (2007) observaram que a fauna da margem deposicional é suficientemente sensível para o dimensionamento da qualidade ecológica de rios. As margens de deposição localizam-se na face interna de curvas, em margem oposta à erosional (**Foto 2, Imagem 1**), onde se formam bancos de areia como resultado da menor dinâmica da água. O melhor local para a amostragem, no entanto, não é no banco de areia, mas no trecho imediatamente a jusante destes.

Foto 2 - Zonas erosional e deposicional do rio Jundiáí



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2017)

Imagem 1 - Trecho meândrico do rio Aguapeí, com margens deposicionais (flechas brancas) e erosionais (flechas laranjas)



Fonte: Google Earth (2022)

2.3 Período de amostragem

Variações sazonais influenciam a estrutura da comunidade e, conseqüentemente, a resposta dos índices que a descreve. No **verão chuvoso**,

o aumento das vazões ocasiona o arraste de parte da fauna em rios e em reservatórios mais profundos, a distribuição irregular de calor ao longo da coluna d'água pode promover o estabelecimento de termoclinas, que podem conduzir a uma condição de hipóxia e até anóxia nas águas de fundo, sendo esperada menor diversidade e riqueza em rios e nas regiões profundas de reservatórios neste período. Estas alterações naturais do ambiente influenciam os resultados dos índices de forma similar a um impacto antrópico negativo sobre a biota bentônica, confundindo o diagnóstico. Conseqüentemente, este período deve ser evitado para amostragem com fins de avaliação da qualidade ecológica do ambiente.

O **inverno seco** é o período de coleta padronizado para o biomonitoramento com macroinvertebrados bentônicos no estado de São Paulo, por ser associado a menores vazões e, portanto, ao menor arrasto e ao aumento da concentração de poluentes, deixando a fauna mais vulnerável aos efeitos de efluentes e, sob condições naturais, ainda apresentar riqueza elevada (Kuhlmann *et al.*, 2005). Em reservatórios que estratificam é o período em que ocorre a circulação da massa de água (Coelho-Botelho *et al.*, 2006), que também favorece a oferta de oxigênio dissolvido às camadas mais profundas. Reservatórios com sedimento muito rico em matéria orgânica, mesmo no inverno podem apresentar quadro de hipóxia ou anoxia nas águas da camada do fundo, em função da elevada demanda por oxigênio pelo metabolismo bacteriano para a decomposição da matéria orgânica.

2.4 Frequência de amostragem

As análises de macroinvertebrados podem ser demoradas e um incremento na frequência de coleta reduzirá o alcance espacial do biomonitoramento. Uma vez padronizado o período de coleta, espera-se que variações sazonais tenham pouca ou nenhuma interferência sobre os dados. Desta forma, na rede de monitoramento do estado de São Paulo preferiu-se aumentar o número de locais diagnosticados e manter apenas um período **anual** para a coleta das amostras (inverno seco).

2.5 Natureza do dado

Os dados podem ter natureza quantitativa, qualitativa ou semiquantitativa. No primeiro caso, é possível trabalhar com as densidades populacionais, no segundo apenas com a riqueza e, no terceiro, com abundâncias relativas.

Para o diagnóstico de alterações na comunidade decorrentes de modificações antrópicas no meio ou em seu entorno, os dados de densidade são mais sensíveis, respondendo a concentrações subletais de poluentes que, em um primeiro momento, não eliminam toda a população, mas apenas os indivíduos mais sensíveis ou debilitados. Esta resposta inicial ao agente estressor é observada na queda da densidade e/ou da biomassa de organismos de alguns grupos. Por outro lado, a amostragem qualitativa oferece uma análise mais rápida, permitindo o diagnóstico de um maior número de locais a um custo inferior. A escolha do tipo de análise está também fortemente relacionada com a medida usada para o diagnóstico. As métricas e índices propostos neste Protocolo possibilitam o biomonitoramento com dados **qualitativos**, para uma avaliação mais geral e rápida, **semiquantitativos** ou **quantitativos**, para o aprofundamento do diagnóstico, quando necessário.

Para o levantamento quantitativo, a tomada de réplicas é obrigatória, diante da natureza agregada das populações que compõem a comunidade de macroinvertebrados. O número ideal de réplicas depende do ambiente em estudo, sendo menor para locais impactados, que já tiveram parte da fauna eliminada. Existem equações na literatura que permitem o cálculo do número adequado de réplicas por local a ser estudado (Elliott, 1977; Brandimarte *et al.*, 2004), porém muitas vezes este valor não é compatível com os objetivos do monitoramento e com a capacidade do laboratório. Assim, adotou-se um número fixo e viável de **três réplicas** por hábitat amostrado.

3 MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

A obtenção de amostras de sedimento para análise das comunidades de macroinvertebrados bentônicos em ambientes profundos, como rios e reservatórios, requer **embarcação**. Assim, na equipe que vai ao campo é essencial que pelo menos um técnico tenha **habilitação** para pilotar o barco. Mas, por questão de segurança, o ideal é que duas pessoas da equipe tenham esta habilitação, para o caso do piloto precisar ser substituído, por exemplo, se apresentar um mal-estar.

Os equipamentos necessários para a coleta devem estar em condições de uso e é interessante relacionar todo o material (**lista de checagem**) para verificação antes da saída para o campo.

Fichas de coleta devem ser elaboradas de acordo com as requisições do projeto, definindo todas as amostras a serem coletadas e para quais variáveis se destinam, já que muitas necessitam de preservativos ou frascos especialmente preparados.

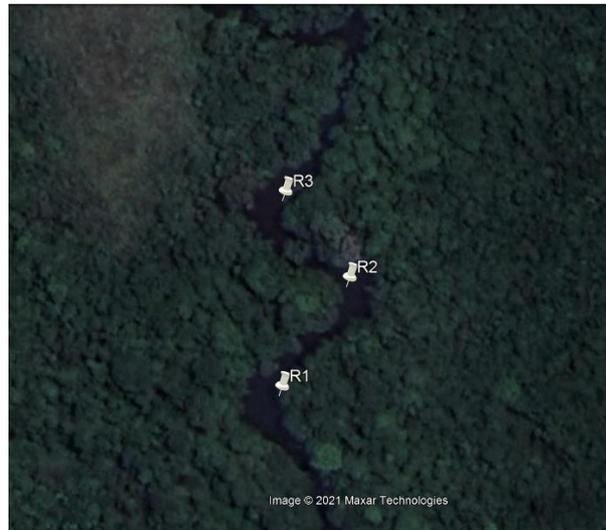
Para a interpretação posterior dos dados são consideradas variáveis essenciais a serem mensuradas, juntamente com as amostras de comunidades bentônicas: **profundidade da coluna d'água no local de coleta, transparência da água, concentração de oxigênio da água próxima ao fundo, granulometria, teor de matéria orgânica e umidade do sedimento**. A profundidade e a transparência indicarão se a comunidade amostrada será constituída por membros das cadeias alimentares de detritos e de pasteio ou só de detritos, no caso de não estar exposta à luz suficiente para que se desenvolvam organismos produtores primários. O oxigênio dissolvido é condição essencial para a vida aeróbia da qual fazem parte todos os membros da macrofauna bentônica. A granulometria determinará o tipo de população que ocorrerá no ambiente e a matéria orgânica, a disponibilidade de alimento. O resultado de umidade aliado ao da granulometria, indicam o grau de compactação do substrato. Substratos finos em geral possuem alto teor de umidade (>85%), de forma que um sedimento de granulometria fina com teor baixo de umidade, indica a ocorrência de torrões, que podem limitar o estabelecimento de organismos tubícolas.

Os trabalhos de campo que envolvam coleta de água e sedimento devem iniciar sempre com as amostragens para análises de variáveis da água, para que partículas suspensas com o revolvimento do fundo não interfiram nos resultados.

Na coleta de sedimentos, as **primeiras pegadas** devem se destinar à análise da comunidade bentônica, uma vez que a perturbação do fundo com as tomadas repetidas de amostras para as demais variáveis pode afugentar ou afastar os organismos mais ágeis. Em rios, as coletas devem seguir a direção **jusante – montante**, novamente para que não se perturbe o ambiente subsequente a ser coletado.

As réplicas são retiradas segundo um **intervalo espacial aleatório** em relação à anterior. Para as amostragens mais próximas das margens (rios e sublitoral de reservatórios) deve-se procurar preferencialmente locais que possuam a **mata ciliar** mais preservada, de forma a evitar a interferência do uso do solo contíguo na biota e se obter um retrato mais geral da qualidade do ambiente. No caso de rios, estes locais devem contemplar também a ocorrência dos **sítios de deposição (Imagem 2)** e em reservatórios localizar-se preferencialmente em **baías** distintas. Por outro lado, na região profunda de reservatórios o barco deve se deslocar ao longo do eixo longitudinal onde se darão as paradas para a obtenção das réplicas. A extensão do trecho percorrido (ou amostrado) dependerá da distância em que as condições acima serão atendidas para a obtenção das três réplicas, nos habitats rasos e, na profunda, não mais do que 500 m (considerando cerca de 250 m de distância entre as réplicas) (**Imagem 3**), mas sempre moldando-se aos **objetivos da investigação** (Flotemersch *et al.*, 2011). O importante é que o trecho em investigação seja **homogêneo** em termos de exposição, estando submetido aos mesmos estressores, sob condições similares de uso de solo e evitando-se a presença de afluentes entre as réplicas.

Imagem 2 – Exemplo de distribuição dos locais de coleta de réplicas em rio



Fonte: *Google Earth* (2021)

Imagem 3 – Exemplo de distribuição dos locais de coleta de réplicas em sublitoral (em branco) e profundo (em amarelo) de reservatórios



Fonte: *Google Earth* (2021)

3.1 Equipamentos

Existem vários tipos de equipamentos para amostragem de sedimento para análise de macroinvertebrados bentônicos de rios e reservatórios. Todos possuem alguma seletividade, sendo a escolha definida segundo o tipo de

ambiente e o objetivo do trabalho. A escolha do equipamento mais adequado é chave para a qualidade da amostragem. Existem várias publicações que podem orientar esta decisão (Klemm *et al.*, 1990; Brandimarte *et al.*, 2004; Kuhlmann; Watanabe; Kobayashi, 2006; CETESB; CETESB; ANA, 2024).

3.1.1 Pegadores

Equipamentos com área de captura mensurável que “abocanham” uma parcela do sedimento. Construídos em metal, são pesados e o movimento de descida pode formar ondas de choque com potencial de lavar a superfície do sedimento e afugentar organismos mais ágeis. Uma forma de prevenir a formação destas ondas é controlar a velocidade de descida do equipamento. O fechamento das garras pode se dar pela soltura da trava no relaxamento da corda quando o equipamento se assenta no substrato (p. ex. van Veen, Petersen e Ponar) ou pelo lançamento de um mensageiro (peso) (p. ex. Ekman-Birge). Suas garras podem ser bloqueadas por pedras, galhos ou outros detritos, acarretando perda de amostra.

a) Ponar (Foto 3)

Foto 3 - Pegador Ponar



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2003)

Ambiente:

- rios profundos, litoral e sublitoral de reservatórios.

Características:

- apresenta vários tamanhos; a versão maior é pesada e necessita de guincho atrelado à embarcação.
- é considerado o melhor amostrador quantitativo em substrato duro para a comunidade bentônica pela United States - Environmental Protection Agency (USEPA) (Klemm *et al.*, 1990).
- placas laterais e telas previnem a perda de amostra no fechamento e reduzem a formação de ondas de choque, mas, em substrato mole, pode haver perda de partículas finas por ondas de choque.
- possui pino de segurança para o transporte.
- em terreno inclinado, como em muitas regiões litorâneas e sublitorâneas de reservatórios, pode haver dificuldade de desarme, já que as placas que prendem o pino podem não ficar alinhadas.
- o perfil vertical do sedimento não é mantido íntegro.

Usos:

- em substrato grosso e duro (arenoso a cascalho).
- a versão maior é mais indicada para ambientes prístinos e a menor para locais poluídos.
- para amostragem quantitativa e qualitativa da comunidade bentônica.

b) Petersen, van Veen e modificações (Fotos 4A e 4B)**Fotos 4 - Pegadores Petersen modificado (A) e van Veen (B)**

A



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2003)

B



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2003)

Ambiente:

- rios profundos, litoral e sublitoral de reservatórios.

Características:

- apresentam vários tamanhos.

- não é adequado para uso em substrato mole, havendo perda de partículas finas por ondas de choque e de organismos que se enterram mais profundamente em versões menores.

Usos:

- em substrato grosso e duro (arenoso a cascalho).
- para ambientes límnicos são indicadas as versões menores.
- para amostragem quantitativa e qualitativa da comunidade bentônica.

c) Ekman-Birge e modificações (Fotos 5A e 5B)

É o amostrador mais usado em regiões de fundo lodoso de ambientes lênticos (profundal). A versão modificada por Lenz (**Foto 5B**) permite a estratificação da amostra, podendo ser aplicada em estudos sobre a distribuição vertical de populações bentônicas. Deve ser manipulado com cuidado pois as garras se fecham violentamente, havendo registros de acidentes com amputação.

Fotos 5 - Versões do pegador Ekman-Birge: padrão (A) e modificado por Lenz (B)

A



Fonte: Helena Mitiko Watanabe (2003)

B



Fonte: Helena Mitiko Watanabe (2003)

Ambiente:

- região profunda de reservatórios.

Características:

- é leve e de fácil operação.
- menor formação de ondas de choque pela existência de placas que se abrem no topo.
- a amostra é obtida quase íntegra, permitindo subamostragem.

- é muito leve para ser usado em substrato duro ou sob correnteza moderada ou forte.
- é possível haver perda de material fino na subida do amostrador.

Usos:

- em substrato fino e mole (arenoso fino a argiloso).
- para amostragem quantitativa e qualitativa da comunidade bentônica.
- a modificação de Lenz permite estratificação e estudos ao longo do perfil vertical do sedimento.

3.1.2 Substrato artificial

Amostradores que imitam um substrato de colonização (**Foto 6**). Podem ser totalmente construídos com material inorgânico ou preenchidos com material orgânico, que diminui o tempo de espera para a colonização. Embora possibilitem uma amostragem padronizada e não destrutiva do local, exigem duas viagens a campo (instalação e retirada). Além disso, o tempo de colonização dos organismos é espacial e temporalmente variável. Por isso, é necessário um estudo prévio para o estabelecimento do tempo de colonização dos organismos para cada ambiente em que o equipamento for empregado. É também frequente a perda de amostras por vandalismo ou inundações no local.

O substrato do tipo cesto preenchido com pedra de brita (**Foto 6**) foi desenvolvido e testado pela CETESB (Henrique-Marcelino *et al.*, 1992; Kuhlmann *et al.*, 1993; Kuhlmann, 2000; Imbimbo, 2001; Kuhlmann; Imbimbo; Watanabe, 2003), mas teve seu uso descartado para a rede de monitoramento pela demanda logística, uma vez que necessita de duas viagens a campo, e pelo risco de perda da informação. Mesmo assim, mostrou-se uma ferramenta sensível à deterioração do ambiente (Imbimbo, 2001) e interessante para o monitoramento de locais protegidos e próximos, como no monitoramento de recursos hídricos dentro de empresas ou de unidades de conservação. No rio Tietê, o tempo de colonização necessário para se observar estabilidade nas medidas de estrutura da comunidade variou de 7 (verão) a 14 (inverno) dias (Kuhlmann, 2000).

Foto 6 – Substrato artificial do tipo cesto com pedra de brita



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Ambiente:

- rios e margens de reservatórios.

Características:

- padroniza o substrato de coleta.
- permite amostragem em locais duros demais para uso de outros amostradores.
- a amostra é de fácil processamento analítico.
- o equipamento é barato, de fácil construção e operação.
- na coleta, deve-se minimizar perdas de organismos com a lavagem pelo filme de tensão superficial.
- somente reflete as condições do ambiente no período de colonização.
- é seletivo para alguns organismos, não amostrando adequadamente aqueles com hábito de se enterrar (oligoquetos) e favorecendo a coleta de insetos. Consequentemente, não retrata a estrutura da comunidade bentônica do local de amostragem.

Usos:

- em substrato grosso e duro (arenoso a rochoso).
- para ensaios de comunidades bentônicas.
- para amostragem semi-quantitativa e qualitativa da comunidade bentônica.

3.1.3 Corer

Também conhecidos como *core sampler*, amostrador em tubo ou testemunho, são coletores cilíndricos, de cerca de 10 cm de diâmetro, que permitem amostragem de um perfil íntegro e profundo dos sedimentos (**Foto 7**). A versão mais simples, para uso em ambientes rasos, é construída em tubo de PVC com

um dos lados serrilhado e funciona manualmente, enquanto as mais elaboradas, para uso em ambientes mais profundos, exigem um mecanismo de fechamento por cordas ou mensageiros. Podem ser constituídos por um único tubo ou por até quatro (múltiplo). Este último, segundo Milbrink e Wiederholm (1973) é quase tão eficiente quanto a Ekman-Birge padrão na amostragem de larvas de Chironomidae em substrato lodoso. Para Zilli e colaboradores (2008), é o melhor equipamento para coleta de macroinvertebrados em solos inundados de áreas úmidas temporárias. Também são considerados os mais adequados para estudos sobre a distribuição vertical de organismos que se enterram no substrato, mas o pequeno diâmetro de abertura não permitirá uma amostragem eficiente de organismos de maior tamanho, como moluscos e crustáceos.

Foto 7 - Corer



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2002)

Ambiente:

- rios e reservatórios. Os modelos manuais têm uso restrito a ambientes rasos.

Características:

- amostragem quantitativa e qualitativa.
- amostra íntegra, permitindo estratificação e estudos ao longo do perfil vertical do sedimento.
- perturbação mínima da interface sedimento água.
- amostrador adequado para organismos que se enterram profundamente em sedimento mole.
- o pequeno tamanho amostral permite maior número de replicatas a serem analisadas em curto período.
- existem vários modelos (por ex.: fechamento por gravidade ou mensageiro) e diâmetros disponíveis.
- pode apresentar válvulas de funcionamento automático que previnem a perda da amostra.
- aqueles que operam por gravidade podem apresentar problemas de funcionamento e ocasionar perda da amostra.

- área de amostragem limitada, requerendo repetição da operação e retirada de tubos.
- não permite precisão na estimativa da biomassa bentônica.
- o modelo múltiplo é mais indicado para análise de comunidades bentônicas.
- é necessário cuidado no manuseio para evitar perda de sedimento.
- o diâmetro do tubo do amostrador pode restringir o tamanho dos organismos coletados, como crustáceos, bivalves e gastrópodos de maiores dimensões.

Usos:

- em substrato fino e compacto.

3.2 Coleta, armazenamento e transporte

Amostras obtidas com pegadores ou testemunhos, que cheguem à superfície vazando ou transbordando de sedimentos, devem ser descartadas, já que a perda de material é evidente. Considerando que a maior parte dos organismos se concentra nos 10 cm superiores do sedimento, para uma amostra adequada o equipamento deverá estar preenchido com cerca de 2/3 a 3/4 de material. A água que recobre o sedimento pode ou não ser coletada, dependendo do objetivo da amostragem. Se a análise for considerar a epifauna ela deverá ser coletada, se for uma análise da infauna, como em alguns estudos de qualidade de sedimentos, essa água deverá ser sifonada e descartada. Nas amostragens da rede de monitoramento do estado de São Paulo a epifauna é considerada. Amostras obtidas com pegadores, testemunhador ou substrato artificial podem ser acondicionadas diretamente em sacos plásticos resistentes (**Foto 8**). Sugere-se o uso de sacos duplos (sobrepostos), já que o próprio pegador, de metal, pode furar o saco interno.

Foto 8 - Coleta de amostra de sedimento para análise de comunidade bentônica



Fonte: Venício Pedro Ribeiro (2023)

A fixação da amostra previne a continuidade de processos interativos entre os organismos, como a predação, e a decomposição do material, que modificariam o resultado. Portanto, deve ser realizada em campo, com o uso de preservativo químico (formalina ou álcool), ou na impossibilidade desses a preservação por resfriamento. Para o formol neutralizado (com bórax ou bicarbonato de sódio) o volume a ser usado deve ser tal que a concentração final na amostra atinja de 4 e 10%. Ou seja, cerca de 100 mL para cada litro de amostra. Se possível os volumes necessários para preservar cada amostra podem ser enviados já medidos (**Foto 9**). Na possibilidade de lavagem em campo, a amostra pode ser fixada diretamente com álcool 70 °GL após o acondicionamento do material lavado em sacos ou potes.

Foto 9 - Fixação da amostra em campo com formalina neutralizada



Fonte: Cláudio Santos Sorc (2022)

CUIDADO: O formol, componente da formalina, é uma substância volátil, tóxica e cancerígena. Portanto, atenção com sua manipulação e armazenamento, assim como com as amostras em que foi utilizado, para não provocar danos à saúde e não contaminar amostras destinadas à análise de outros parâmetros, especialmente para ensaios de toxicidade e mutagenicidade.

Os sacos, quando usados duplos, devem ser fechados separadamente, com fita adesiva grossa (**Fotos 10A e 10B**).

Fotos 10 - Fechamento dos sacos com amostra de sedimento para análise da comunidade



Fonte: Cláudio Santos Sorc (2022)

No transporte deve-se evitar a colocação de materiais pesados e/ou pontiagudos sobre os sacos e o transbordamento dos potes, caso as amostras tenham sido assim acondicionadas (**Foto 11**). E, havendo coleta para outras variáveis, principalmente de medidas de efeitos tóxicos ou mutagênicos, as amostras de bentos não devem ser armazenadas juntas, assim como o manuseio da formalina no barco deve ser cuidadoso de forma a evitar a contaminação das outras amostras.

Foto 11 - Acondicionamento das amostras para transporte

Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

4 MÉTODOS DE ANÁLISE

As amostras de sedimento coletadas em campo devem ser preparadas antes de se iniciar a análise propriamente dita, uma vez que partículas finas de sedimento dificultam e até impossibilitam a recuperação dos organismos que compõem a comunidade.

4.1 Preparo da amostra

A lavagem da amostra pode ser realizada em campo ou em laboratório, de acordo com a melhor logística de trabalho de campo, a ser definida no final do planejamento. Por exemplo, quando as amostras forem de locais muito distantes do laboratório e/ou muito numerosas, a lavagem em campo facilitará o transporte.

Após a coleta, as amostras de sedimento devem ser lavadas com água de torneira em rede com malha de seleção previamente escolhida segundo os objetivos do projeto. Este procedimento reduz o volume da amostra ao eliminar partículas orgânicas e inorgânicas finas, o que também facilita a visualização dos organismos. Para biomonitoramento são geralmente empregadas aberturas de malha de 0,5 – 0,6 mm, enquanto malhas mais finas (p. ex. 0,25 mm) encaixam-se melhor às metas do levantamento faunístico. A CETESB padroniza em seu programa de biomonitoramento a **malha de 0,5 mm (500 µm)**.

Em campo ou laboratório a lavagem deve ser realizada preferencialmente em pia, com água corrente, e os cuidados devem centrar-se em evitar a perda de parte do material amostrado pelas bordas da rede, tanto na transposição do material do saco para a rede quanto por transbordamento, e a quebra dos organismos, que compromete sua identificação. Para tanto, a rede deve estar apoiada e não se deve inserir material até sua boca. Redes na forma de sacos são mais eficientes e previnem melhor o transbordo que peneiras rígidas (**Fotos 12A e 12B**) e o uso de baixa velocidade de fluxo da água corrente ou chuveirinhos evitam danos aos organismos. Na confecção dos sacos é importante evitar dobras e costuras internas, onde os organismos possam se prender ou enroscar.

Fotos 12 - Material para lavagem de amostras de macroinvertebrados

Peneiras (A)



Malha em forma de saco (B)



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

O sedimento coletado deve ser transferido cuidadosamente para a rede de lavagem para que não haja perda de material (**Foto 13A**). A areia fina quando presente na amostra pode entupir a trama da rede, tornando a lavagem mais demorada. Além disso, a areia danifica muito os organismos por fricção, dificultando o trabalho posterior de identificação. Elimina-se mais facilmente a areia fina da amostra, sem danificar tanto os organismos, mergulhando a rede de lavagem em balde com água e passando a mão gentilmente na superfície externa desta para desobstruir a malha (**Foto 13B**), tomando-se o cuidado para não deixar extravasar o material pela boca da rede. A lavagem termina quando a água de saída da rede estiver transparente. Mas, eventualmente a amostra pode conter muitos torrões de terra ou argila, retardando o fim da lavagem. Nestes casos, não é necessário desfazê-los totalmente, podendo-se eliminá-los por flutuação, antes da análise.

Folhas e galhos podem ser subtraídos da amostra lavando-os com cuidado na rede. Atenção para recuperar organismos fixos (ex. Bryozoa) ou que colonizem o interior oco dos troncos (ex. Trichoptera e Chironomidae) (**Foto 13C**).

Após a lavagem, o preservativo pode continuar a ser o formol 4-10% mas, por uma questão de saúde do analista, é preferencial trocá-lo pelo álcool 70 °GL, em volume tal que o volume de amostra não ultrapasse 1/3 (um terço) do volume total entre amostra e preservativo, principalmente quando houver muito material

orgânico. Amostras que resultem em mais de um pote devem ter em suas etiquetas a anotação do número de potes (p. ex. 1/3, 2/3 e 3/3).

O uso de um corante (Rosa de Bengala ou Floxina B) otimiza a etapa de triagem, que consome a maior parte do tempo da análise de comunidade bentônica, mas pode dificultar a identificação de alguns organismos (**Foto 13D**). Segundo Mason e Yevich (1967) o uso de corante pode economizar até 50% do tempo da triagem e boa parte da cor, que atrapalha a identificação, pode ser retirada do espécime se este for mergulhado em etanol 95%. Os mesmos autores relatam que o corante Rosa de Bengala, além de apresentar coloração mais intensa, tinge mais rapidamente (em 24 horas) que a Floxina B (48 horas). Aproximadamente 10 mL de Rosa de Bengala são adicionados ao frasco com a amostra após lavagem, podendo aumentar este volume em amostras com muita matéria orgânica.

Fotos 13 - Etapas de preparação de amostras de bentos (continua)

Transbordo da amostra (A)



Remoção de areia fina (B)



Fotos 13 - Etapas de preparação de amostras de bentos (conclusão)

Lavagem de folhas (C)



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Amostra lavada e corada (D)



Amostras com muito material inorgânico grosseiro (cascalho e areia) (**Foto 14**) ou com muitos torrões de argila podem ser flutuadas em solução supersaturada de sal de cozinha para diminuição de volume e, conseqüentemente, do tempo de triagem.

Foto 14 - Amostra inicial, com grande volume de areia



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

O procedimento de flutuação inicia-se com a preparação da solução salina saturada. Para tanto, mistura-se um volume de sal de cozinha em água de torneira (**Foto 15A**) suficiente para que surja precipitado no fundo do recipiente de mistura (**Foto 15B**).

Fotos 15 - Preparo da solução salina

Preparo da solução salina supersaturada
(A)



Precipitado de sal (B)



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

A seguir retira-se o líquido da amostra (**Foto 16A**), transferindo-a para recipiente onde será realizado o procedimento (**Foto 16B**). Jogar a solução na amostra (**Foto 16C**), revolvendo-a gentilmente (**Foto 16D**) para que os organismos sejam expostos à solução. A seguir o sobrenadante é retido na rede (**Foto 16E**) e lavado em água corrente para remoção do sal (**Foto 16F**). Cuidado para não manter por muito tempo os organismos em contato com a solução salina, que pode provocar murchamento e dificultar a identificação. O procedimento deve ser repetido por pelo menos três vezes, reutilizando-se a solução retida no béquer, ou até que não se verifiquem perdas. Por último pode-se realizar uma lavagem da amostra com água de torneira. O material flutuado, retido na rede, deve ser armazenado com álcool 70° GL (**Foto 16G**) e encaminhado para a triagem (**Foto 16H**). O material inorgânico deve ser triado a olho nu (**Foto 16I**) para verificação de perdas, principalmente de moluscos e tricópteros, dotados de conchas e abrigos, respectivamente, que tendem a funcionar como lastro e manter esses organismos em meio à areia que será descartada. Essa visualização será facilitada se a amostra tiver sido previamente corada. No caso de amostras com torrões, após a flutuação, retornar o material para a rede e desmanchá-los gentilmente com as mãos, triando o material restante em busca de organismos cavadores.

Fotos 16 - Procedimento de flutuação

Remoção do líquido da amostra (A)



Amostra no recipiente (B)



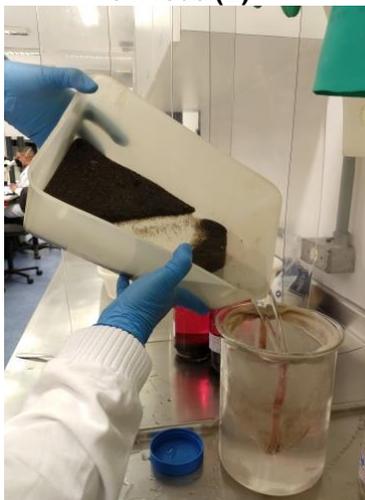
Solução na amostra (C)



Revolvimento da amostra (D)



Retenção do sobrenadante em rede (E)



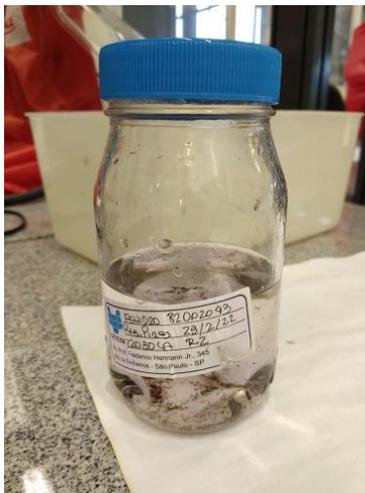
Lavagem em água corrente do material retido (F)



Armazenamento da amostra (G)



Amostra final (H)



Triagem a olho nu do resíduo (I)



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

4.2 Análise da amostra

A análise da amostra propriamente dita é realizada em duas etapas que podem ou não ser concomitantes: a **triagem**, que consiste na separação dos macroinvertebrados aquáticos dos detritos vegetais e das partículas inorgânicas dos sedimentos e a **identificação** e/ou **contagem** (para amostras quantitativas) dos táxons.

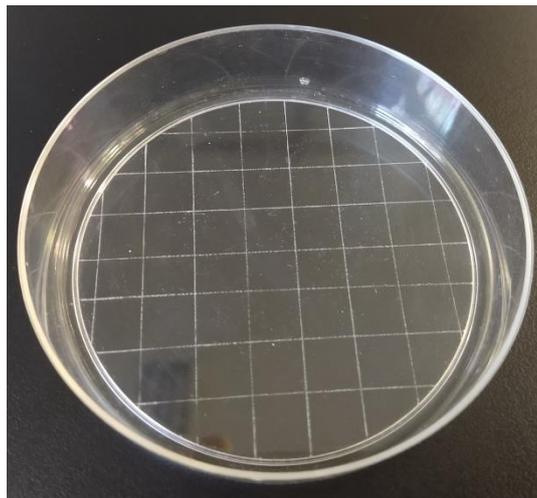
4.2.1 Triagem

A triagem consiste na separação dos macroinvertebrados dos detritos vegetais e das partículas inorgânicas da amostra. Pode ser realizada integralmente a olho nu, em bandeja de fundo branco, de fundo quadriculado ou não, com ou sem base iluminadora; parcialmente a olho nu, para separação do material mais grosseiro, aliada a uma inspeção mais fina em busca de indivíduos de menor tamanho, sob lupa (microscópio estereoscópico); ou integralmente sob lupa. Dependerá do objetivo do estudo, da malha de seleção empregada e das características da amostra.

Colheres e pinças de ponta grossa e fina (por exemplo, pinça de relojoeiro, números dois e três) são utilizadas como ferramentas de manipulação da amostra. Alguns profissionais também se utilizam de pincéis, principalmente para a captura de organismos frágeis, como pequenos moluscos e microcrustáceos.

Para amostras coradas é necessário realizar uma lavagem prévia antes do início da triagem para a retirada do excesso de corante e assim efetivar o contraste entre os indivíduos corados e o material (orgânico e vegetal) não corado.

Sob a lupa, a amostra é examinada aos poucos, em pequenas subamostras homogeneamente distribuídas em placas de Petri, para garantir a leitura de toda a amostra. As placas de Petri podem ser em material plástico descartável e ter seu fundo quadriculado em campos de, por exemplo, 1 cm² (**Foto 17**). Os campos são passados um a um, na direção que o analista assim padronizar. Mas há outros métodos que atingem o mesmo objetivo, como o uso de um afunilador de amostra.

Foto 17 - Placa de Petri descartável de fundo quadriculado para triagem

Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

4.2.2 Identificação e contagem

A macrofauna bentônica em rios e reservatórios compõe-se essencialmente de Nemertea, Turbellaria, Mollusca (Bivalvia e Gastropoda), Annelida (Oligochaeta e Hirudinea), Bryozoa, Crustacea (Decapoda e Amphipoda), Acarina e Insecta (principalmente Diptera, mas com algumas famílias de Odonata, Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera, Coleoptera e Lepidoptera). Outros grupos e muitas famílias de macroinvertebrados restringem-se a ambientes lóticos de cabeceiras, como os insetos Megaloptera e Neuroptera.

Grande parte do trabalho de identificação da macrofauna é realizada sob lupa e em geral baseia-se na visualização de caracteres morfológicos externos. Informações e chaves para o trabalho de identificação de macroinvertebrados aquáticos ao nível requerido por este Protocolo podem ser encontrados em: Azevedo; Hamada, 2008; Benetti *et al.*, 2006; Brinkhurst; Marchese, 1989; Calor, 2007; Carvalho; Calil, 2000; Costa.; Ide; Simonka, 2006; Costa *et al.*, 2000; Damborenea; Rogers; Thorp, 2020; Domínguez *et al.*, 2006; Domínguez; Fernández, 2009; Epler, 1995; Epler, 2001; Froehlich, 2007; Hamada; Nessimian; Querino, 2014; Hamada; Thorp; Rogers, 2018; Lecci; Froehlich, 2008; Mansur; Pereira, 2006; Marchese, 2009; Martins, 2003; Melo, 2003; Merritt; Cummins; Berg, 2008; Mugnai; Nessimian; Baptista, 2009; Nieser; Melo, 1997; Pennak, 1991; Pes; Hamada; Nessimian, 2005; Pimpão; Mansur, 2009; Pinho, 2008; Righi, 1984; Roldán-Pérez, 1996; Segura; Valente-Neto; Fonseca-

Gessner, 2011; Silva *et al.*, 2003; Silva, 2007; Simone, 2006; Souza; Costa; Oldrini, 2007; Stark; Froehlich; Zúñiga, 2009; Triplehorn; Jonnson, 2015; Trivinho-Strixino, 2014; Wiggins, 1998; Zilli; Montalto; Marchese, 2008.

A resolução taxonômica a ser empregada variará de acordo com o tipo de estudo. Em levantamentos faunísticos para avaliação de impactos, por exemplo, é fundamental o investimento no refinamento taxonômico, já que é possível que diferentes espécies dentro de um grupo taxonômico possuam diferentes requisitos ambientais e, conseqüentemente, responderão de formas distintas aos impactos de uma determinada atividade. Além disso, há espécies de invertebrados bentônicos nas listas federal e estadual de invertebrados (terrestres e aquáticos) ameaçados de extinção, cujas populações estão legalmente protegidas, sendo em alguns casos importante identificá-las. Em outros, será fundamental verificar a presença de espécies exóticas da fauna bentônica e se estas apresentam potencial de bioinvasão. Nestes dois casos, será necessária a identificação mais fina, em espécie.

Por outro lado, em programas de monitoramento o importante será padronizar esse procedimento, de forma que o resultado seja comparável e o retrato da qualidade eficiente.

A discussão sobre a resolução taxonômica ou o nível de identificação ideal tem ocupado vários pesquisadores também com relação às metas do biomonitoramento (p. ex.: Bailey; Norris; Reynoldson, 2001; Chessman; Williams; Besley, 2007). É muito claro que, quanto mais fina a identificação, mais informação se agregará ao dado e mais preciso será o diagnóstico. Por exemplo, segundo Pinto *et al.* (2009), a utilização de características biológicas e ecológicas das populações que compõem a biota oferece menor variabilidade temporal que o uso de densidades. Embora esta abordagem se mostre promissora, no Brasil ainda se enfrenta uma grande lacuna de conhecimento sobre a biologia e os requisitos ecológicos das espécies que compõem nossas comunidades bentônicas. Assim, os principais critérios para a escolha do menor nível taxonômico recaem sobre a sensibilidade ao gradiente de degradação e o menor tempo possível para a análise, crucial para a obtenção de uma resposta rápida, que acelere a tomada de ações de controle e que permita a investigação

de um maior número de ambientes. Considera-se também que quanto mais refinado o dado, maior o risco de erros de identificação, já que haverá exigência de um treinamento de especialista.

O **Quadro 1** mostra a padronização empregada para o diagnóstico de qualidade ambiental com este Protocolo. No biomonitoramento de rios de médio e grande porte, onde a fauna bentônica é representada por uma maior variedade de grupos taxonômicos, **família** é o nível taxonômico padrão, mas alguns táxons são identificados mais grosseiramente, em filo, classe ou ordem, como Bryozoa, Turbellaria/Tricladida e Nemertea, enquanto a família Chironomidae é identificada até o nível taxonômico discernível sob lupa, ou seja, subfamílias (Chironominae, Orthocladinae e Tanyptodinae), com distinção da tribo Tanytarsini entre os Chironominae, uma vez que esta exibe maior sensibilidade. Para estes ambientes, nossos estudos têm demonstrado que a identificação genérica das ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (Imbimbo, 2006), mundialmente considerados indicadores de boa qualidade em riachos, e de Chironomidae (Mazzini, 2007), que podem predominar nos ambientes abordados por este protocolo, ainda não se oferece compensadora mediante o tempo gasto para a geração da informação. Mas é possível que no futuro, com o crescente conhecimento sobre a biologia e a ecologia das espécies bentônicas, o refinamento do dado realmente incremente a sensibilidade do diagnóstico e possa ser usado na necessidade de um diagnóstico mais robusto.

Em reservatórios, espécimes de Oligochaeta são identificados até família ou gênero e de Chironomidae em gênero, já que os dois grupos predominam e, não raramente, representam mais de 80% de suas comunidades bentônicas. Neste caso, um nível taxonômico mais grosseiro não permitiria o discernimento das classes de qualidade necessárias ao diagnóstico.

Quadro 1 – Padronização do nível de identificação deste Protocolo

Táxon	Rios	Reservatórios
Bryozoa	Filo	Filo
Turbellaria	Classe	Classe
Nemertea	Filo	Filo
Mollusca	Família ¹	Família ¹
Aeolosomatidae	Família	Família
Enchytraeidae	Família	Família
Lumbriculidae ²	Espécie	Espécie
Megadrili	Super ordem	Super ordem
Naididae	Subfamília (com discriminação dos tipos sem e com queta capilar para Tubificinae e Rhyacodrilinae)	gêneros
Narapidae	Família	gênero
Opistocystidae	Família	gênero
Phreodrilidae	Família	Família
Hirudinea	Família	Família
Hydracarina	Hydracarina	Hydracarina
Chironomidae	Subfamília (com discriminação da tribo Tanytarsini)	gênero
Outros Diptera	Família	Família
Outros Insecta	Família	Família

Fonte: Elaboração própria (2024)

¹ Exóticos invasores, em espécie;

² Família composta de uma única espécie exótica com potencial de ser invasora (*Lumbriculus variegatus*)

Atualmente há uma grande disponibilidade de chaves de identificação, encontradas em livros ou publicadas em revistas e *sites*, que auxiliam o trabalho de identificação. Materiais desenvolvidos para os territórios brasileiro e sul-americano devem ser preferidos ao uso de chaves norte-americanas e de outros continentes, que podem ser utilizados, mas com critério. Muitas famílias, gêneros e espécies não ocorrem no Brasil e vice-versa. É importante checar a listagem de famílias ou gêneros presentes no país ou em seu estado. Já existem várias listas organizadas por especialistas de diferentes grupos de organismos.

Muitos grupos exigem o uso de espécimes maduros ou de último ínstar para identificação, uma vez que alguns caracteres desenvolvem-se tardiamente. É fundamental seguir a diretriz da chave de identificação utilizada quanto a este critério, caso contrário, o risco de resultado errôneo será maior. Assim, espécimes em estágio de desenvolvimento abaixo do requerido pela chave deverão ser mantidos no nível taxonômico mais grosseiro em que sua correta identificação for segura.

O que identificar também é uma questão pertinente, especialmente nas amostragens quantitativas. Quando o foco for o levantamento da macrofauna, com o uso de redes de malha 0,5-0,6 mm, como no biomonitoramento de rios e reservatórios da CETESB, indivíduos da meiofauna e até da microfauna eventualmente capturados e observados podem ter suas presenças registradas, mas nunca suas densidades estimadas. Isto porque a malha aplicada permitirá que grande parte da população seja perdida na lavagem e um erro operacional estará associado ao valor de densidade que se obtenha. Similarmente, formas inativas da população, como pupas, casulos e gêmulas podem ter as presenças registradas, mas não comporão a tabela de densidades das populações, já que são fases diferentes das mesmas populações cujas densidades foram estimadas como larvas ou adultos. Da mesma forma, não são contabilizados organismos que não possuem nenhuma fase da vida aquática (estavam no ambiente por queda na água, por exemplo) ou com suspeita de estarem já mortos no momento da coleta, como aqueles que não apresentam conteúdo interno ou estejam em aparente decomposição.

O tipo de coleta e preparo do material muitas vezes danifica os espécimes. Neste caso, é preciso padronizar o que ou como será realizada a quantificação das famílias ou gêneros. Nemertíneos, turbelários e oligoquetos, por exemplo, quebram com facilidade.

Para *Nemertea* (**Foto 18**), pode-se padronizar a contagem pela porção anterior, que apresenta os ocelos e a probóscide.

Foto 18 - Nemertea com a probóscide evertida



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2016)

No caso de Turbellaria, a melhor forma de quantificação é pela contagem da faringe musculosa, que sai próximo da metade ventral do corpo, mas pode-se optar pela contagem da cabeça.

Foto 19 - Turbellaria Dugesiidae em vista ventral, com a faringe evertida



Fonte: Emerson Alves de Araújo (2016)

Já para Oligochaeta a contagem requer uma maior padronização, que dependerá da família. Na identificação e contagem de Tubificinae é aconselhável que se utilize a parte anterior do corpo onde, para algumas espécies se desenvolve, no XI segmento, a bainha penial em indivíduos maduros, estrutura essencial para sua identificação. Para Pristininae, Naidinae e Opistocystidae, tanto a parte anterior quanto a posterior serão fundamentais para a determinação do gênero. Assim, para os espécimes quebrados aconselha-se a contagem separada das partes (anterior e posterior), para posterior definição. Por exemplo, a família Opistocystidae caracteriza-se pela presença de três apêndices caudais de tamanhos variáveis no final do abdômen (**Foto 20**). No entanto sua porção anterior, com quetas capilares desde o segmento II e presença de uma probóscide torna-o confundível com o gênero *Pristina* (Naididae: Pristininae). Em amostras em que se evidencie, pelos espécimes inteiros, a presença dos dois táxons, conta-se separadamente as porções posteriores de Opistocystidae (com três caudas) e as porções anteriores que podem ser Opistocystidae ou *Pristina*.

No final, são considerados como *Pristina* apenas as partes anteriores que sobrarem da subtração com as porções posteriores de Opistocystidae. Similar procedimento pode ser seguido na separação e contagem de espécimes quebrados de *Dero*, *Aulophorus* e *Nais*. Além disso, Aeolosomatidae, Naidinae e Opistocystidae reproduzem-se assexualmente por fissão, podendo formar cadeias de indivíduos (**Foto 21**). Neste caso, é preciso padronizar se, na quantificação da população, será considerado apenas os organismos livres, totalmente diferenciados, ou cada membro da cadeia.

Foto 20 - Opistocystidae



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Nota: Setas apontam apêndices caudais e probóscide. A cor se deve ao uso do corante Rosa de Bengala.

Foto 21 - Reprodução assexuada em *Dero* (Naididae: Naidinae)



Fonte: Hélio Rubens Victorino Imbimbo (2012)

Nota: A cor se deve ao uso do corante Rosa de Bengala. A seta indica a região da fissão.

Algumas vezes ocorrem nas amostras espécimes de Hirudinea – Glossiphoniidae com filhotes aderidos ao abdômen (**Foto 22**). Neste caso, apenas o indivíduo adulto deve ser contado, já que os filhotes ainda são dependentes da mãe e parte deles pode vir a morrer antes de se tornarem membros livres na população. Porém, se os filhotes forem encontrados livres na amostra serão contabilizados.

Foto 22 - Sanguessugas da família Glossiphoniidae com filhotes presos ao abdômen



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2015)

Para Bryozoa, que forma colônias, cada indivíduo ou zoóide é contado separadamente (**Foto 23**).

Foto 23 - Colônia de Bryozoa com cerca de 15 zoóides



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2015)

E, finalmente, na contagem de Mollusca é preciso confirmar se o espécime estava vivo no momento da coleta, quebrando ou abrindo a concha até ser observada sua parte mole. Como a concha é elemento importante na identificação, esta deve ser realizada antes da contagem. Principalmente para este grupo taxonômico, as espécies exóticas invasoras e ameaçadas de extinção devem ser identificadas e consideradas como informação adicional ao diagnóstico de qualidade.

Para o cômputo final de riqueza e diversidade de espécies, espécimes identificados mais grosseiramente do que o requerido, até por dificuldade na identificação (espécimes muito pequenos ou quebrados), só serão considerados se nenhuma identificação no nível exigido foi possível. Caso contrário, serão computados como sendo daquela família identificada (se algumas características se assemelharem) ou extraídos da análise, já que poderíamos estar considerando o mesmo táxon duas vezes. Por exemplo, se não foi possível identificar a família de três espécimes de Bivalvia, que se apresentaram em más condições de identificação, e nenhum outro espécime possibilitou a definição de família dentro deste grupo, os três espécimes serão considerados como um táxon único (Bivalvia ni), de família não identificada (ni), nos cálculos dos índices de riqueza e diversidade. Porém, se forem encontrados indivíduos de Corbiculidae e algumas características combinarem, os três serão somados a esta família. Caso contrário, se persistir a dúvida sobre a inserção dos três em Corbiculidae, eles serão extraídos da análise.

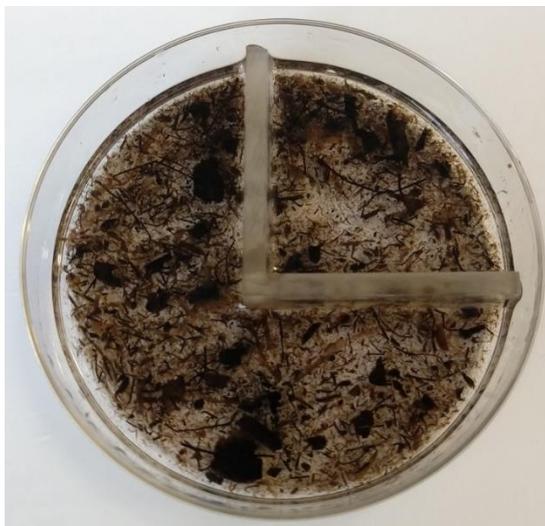
O dado bruto deve ser registrado em formulário próprio que identifique a amostra, algumas decisões no seu processo, os responsáveis pela sua análise e os resultados obtidos (**Figura 1**).

uma regra de três para determinar o fator de multiplicação do pegador para a transformação em m². Por exemplo: para uma área de 20 x 20 cm = 400 cm² = 0,04 m², cada indivíduo contado na triagem equivalerá a 25 ind./m².

4.3 Subamostragem

Amostras com altas densidades de uma ou poucas populações bentônicas, estrutura típica de ambientes submetidos a cargas elevadas de esgotos domésticos, podem ser subamostradas na triagem, na identificação ou na contagem. Um subamostrador ou quarteador em “L”, com comprimento dos lados iguais ao raio da placa de Petri, pode ser utilizado para este fim (**Foto 24**). A amostra é distribuída homoganeamente na placa de Petri e o quarteador é inserido aleatoriamente na placa. Os táxons que ocorrem em superpopulação serão retirados e contados apenas no ¼ delimitado, enquanto os outros podem ser triados e contados integralmente. Organismos “cortados” pelo subamostrador devem ser contados apenas se sua parte anterior estiver na área de contagem. Não esquecer que as densidades finais dos táxons subamostrados corresponderão ao resultado da contagem multiplicado por quatro! Este método de subamostragem garante a continuidade do caráter quantitativo da análise e pode ser usado de uma vez só para a amostra toda. Neste caso, a amostra é homoganeamente espalhada em uma bandeja branca. Um quarteador com dimensões compatíveis com o tamanho da bandeja é então utilizado para separar a porção a ser trabalhada (Klemm *et al.*, 1990).

Foto 24 - Subamostrador em “L”

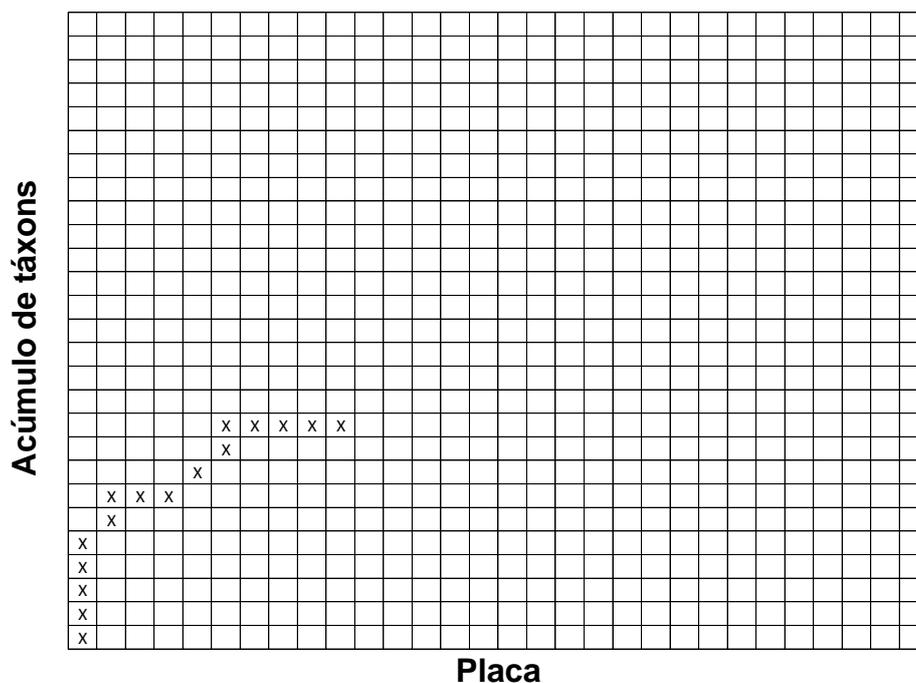


Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Outros métodos de subamostragem podem tornar o dado semiquantitativo, perdendo a possibilidade de transformação em densidades absolutas, mas mantendo seu uso em termos de abundâncias relativas. Este é o caso da contagem de um número mínimo de indivíduos, quando não associado a uma porcentagem ou parcela da amostra total. A literatura (por exemplo, Klemm *et al.*, 1990) define como suficientes a identificação e contagem de 100 a 400 organismos como método de subamostragem. Se a estimativa de riqueza for importante para o diagnóstico, é aconselhável aliar o método com uma curva de acúmulo de espécies/táxons (**Figura 2**), usando como unidade amostral o conteúdo de uma placa de Petri. Para a aplicação desse método cada alíquota colocada na placa de Petri deve ter aproximadamente o mesmo volume, sendo então verificado quantos novos taxóons foram encontrados, os quais são contabilizados com o acumulado das placas anteriores.

Quando a curva se estabilizar e o número mínimo de organismos a ser contado (p. ex. 400) for atingido, encerra-se a análise. Um critério de estabilização deve ser assumido (por exemplo, após cinco placas sem alteração de S).

Figura 2 - Curva de acúmulo de táxons



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Quando a densidade de organismos a serem identificados for muito elevada é possível utilizar uma técnica de subamostragem nesta etapa, em que apenas uma parcela dos organismos é submetida ao trabalho de identificação, sendo o valor total extrapolado segundo as proporções obtidas na subamostra. Para tanto, é possível proceder a uma separação prévia em grupos morfológicos em lupa e posterior identificação de uma parcela (10 a 50%, dependendo da densidade total e da segurança do analista). Se o grupo se revelar homogêneo, ou seja, estiver composto de um único gênero ou espécie, o número de organismos contados para o grupo será a densidade do táxon aí identificado. Se o grupo se mostrar heterogêneo, significa que os caracteres morfológicos utilizados na separação não foram eficientes. Neste caso, pode-se rever o material em busca de novas diferenças e separações ou extrapolar o número total na proporção identificada de organismos. Essa última opção pode ser utilizada desde o início do procedimento, mas gera mais insegurança quanto à perda de táxons raros. Aliás, para que táxons raros não deixem de ser observados e tenham sua presença registrada para o ambiente em estudo, aconselha-se o uso da subamostragem apenas para a contagem de táxons dominantes.

4.4 Preparação de lâminas

A identificação mais fina de alguns grupos, como Chironomidae e Oligochaeta requererá preparo de lâminas para análise em microscópio.

É importante escolher o meio mais apropriado para cada táxon e conhecer previamente a posição que o espécime deverá ser arranjado na lâmina. Existem meios temporários, de curta (água, glicerina, ácido láctico 70%) e média (CMC-9, CMC-10, Hoyer, lactofenol) duração, e meios para preparação permanente (bálsamo do Canadá e Euparal).

Os meios prontos, CMC-9 e CMC-10 são importados e indicados para Chironomidae e Oligochaeta, respectivamente, mas apresentam problema de formação de “craquelado” com o tempo.

Para Chironomidae, o **meio de Hoyer** é o mais indicado e facilmente preparado, segundo procedimento abaixo, descrito em Trivinho-Strixino (2014):

❖ Material:

- ✓ 30 g de goma arábica;
- ✓ 200 g de hidrato de cloral;
- ✓ 20 mL de glicerina;
- ✓ 50 mL de água destilada.

- ❖ Forma de preparo: Adicionar a goma arábica na água e deixar dissolver por cerca de 24h. Acrescentar o hidrato de cloral e deixar a solução em repouso até que dissolva totalmente. Acrescentar a glicerina e filtrar em algodão de vidro.

Os espécimes de Chironomidae, preferencialmente de 4º ínstar (Trivinho-Strixino, 2014), devem ser decapitados com a ajuda de pinças de pontas finas, agulhas ou estiletos, e as cabeças montadas em lâmina em face ventral, de forma a permitir a visualização das peças bucais. Sugere-se que a decapitação dos organismos seja feita sobre a lâmina já com o meio de preparação, de modo a evitar que as cabeças destacadas sejam perdidas. Os corpos devem ser removidos da lâmina após a retirada das cabeças. O material deve ser coberto com uma lamínula e uma leve pressão sobre esta assegurará a exposição e, conseqüentemente, a visualização, das peças bucais necessárias para a identificação. Na identificação genérica de Tanypodinae e Orthoclaadiinae, os corpos também devem ser montados. Para conseguir o foco desejado e necessário, peças de diferente espessura não devem ficar sob a mesma lamínula. Assim, nunca se deve juntar na mesma lamínula corpo e cabeça de um espécime ou cabeças de diferentes tamanhos. Para tanto, é importante que o analista tenha registrado exatamente o que está montado em cada lamínula e manter alguma ordem em suas preparações. Por exemplo, na montagem de vários espécimes de Tanypodinae é possível organizar na mesma lâmina uma lamínula de cabeças e outra de corpos, estes posicionados na mesma sequência que as respectivas cabeças. Alguns gêneros possuem morfologia facilmente reconhecível em lupa e não necessitarão de montagem em lâmina. É o caso de *Coelotanypus*, de cabeça tipicamente “pontuda” (cônica) em que, nos espécimes de maior porte, é possível visualizar o par de ganchos entre o terceiro e o quarto segmentos. A espécie *Tanypus stellatus* possui prolongamentos laterais no penúltimo segmento abdominal e algumas espécies do gênero *Labrundinia* exibem espinhos laterais e manchas em forma de Y na face ventral da cabeça (**Foto 25**).

Foto 25 - Cápsula cefálica de *Labrundinia* (Chironomidae: Tanypodinae)

Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Para Oligochaeta o meio deve ser menos viscoso, de forma a permitir alterações na posição do espécime. Meios de curta duração servem a este propósito, porém, o lactofenol é o meio mais apropriado, segundo o especialista Dr. Roberto da Gama Alves (UFJF) (com. Pess.), mas seu uso deve ser cuidadoso, pois o fenol pode causar irritação na pele, nos olhos, no nariz, na garganta e no sistema nervoso (CDC: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/phenol>). No seu preparo, basta misturar:

- ✓ 100 g de fenol;
- ✓ 100 mL de ácido láctico;
- ✓ 200 mL de glicerina;
- ✓ 100 mL de água.

Segundo o Dr. Alves, a visualização das quetas será melhor se a lâmina for mantida em estufa a 30-40 °C por poucos minutos a até três dias. O lactofenol é higroscópico e pode ser guardado por poucos meses no escuro ou em frasco âmbar (Brinkhurst; Marchese, 1989).

CUIDADO: Evitar a inalação do lactofenol utilizando máscaras, pois o fenol é composto químico irritante.

Para evitar a formação de bolhas, a lamínula deve ser posicionada obliquamente na borda do meio e deslizada gentilmente para baixo. Ocorrendo bolhas, se estas estiverem atrapalhando a visualização dos caracteres, é possível retirá-las pressionando levemente a lamínula de forma a empurrá-las para a borda. Se

este procedimento não for eficaz, será necessário refazer a montagem. Bolhas que não estiverem atrapalhando o trabalho de identificação podem ser mantidas na preparação.

Para maior durabilidade de preparações em meios semipermanente e permanente, após sua secagem, a lamínula deve ser selada com esmalte de unha, preferencialmente, transparente.

5 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DEFORMIDADES EM MENTO DE *Chironomus*

Deformidade ou assimetria flutuante (Sanseverino; Nessimian, 2008) são alterações morfológicas que fogem do desenho normalmente descrito e observado para determinada estrutura e espécie, muitas vezes decorrentes da exposição do indivíduo ou população a um contaminante químico, geralmente de origem industrial ou agrícola. Servem como medida de efeito subletal destes químicos, tanto em populações naturais como laboratoriais. Embora ocorram deformidades em outros gêneros de Chironomidae, o gênero *Chironomus* foi escolhido por apresentar maior suscetibilidade a este efeito (Hudson; Ciborowski, 1996) e por ser tolerante às condições extremas de baixa oxigenação, já que é bastante comum que ambientes com forte impacto industrial também sofram a influência de efluentes domésticos. Além disso, é um gênero de tamanho grande, de coloração avermelhada e de fácil identificação. A maioria das espécies de *Chironomus* apresenta larvas com dois pares de longos túbulos no 8º segmento abdominal e as mais resistentes também exibem um par de processos laterais no 7º segmento abdominal. Não é só no mento que são observadas deformidades em larvas de Chironomidae, contudo é nessa estrutura que se pode diferenciar melhor as deformidades de danos promovidos no momento da preparação da lâmina para a análise microscópica (Warwick *et al.*, 1987).

A avaliação de frequência de deformidades só será possível quando ocorrer no local sob investigação uma população numerosa e madura do gênero *Chironomus* (Diptera: Chironomidae), já que se estabeleceu um mínimo de 100 larvas para a análise (Burt; Ciborowski; Reynoldson, 2003). Os espécimes podem ser obtidos a partir das três réplicas que compõem a amostra para a análise de comunidade, ou com amostras adicionais até que este número seja atingido. É importante salientar que este esforço adicional só será recompensador se houver de fato no ambiente uma população densa do gênero. Além do número, foi padronizada a utilização de larvas de 4º ínstar, mais facilmente caracterizadas em sua fase final, quando exibem espessamento no tórax (**Foto 26**). A utilização de larvas em seu último estágio de desenvolvimento

garante sua exposição mais prolongada aos agentes causadores de deformidade.

Foto 26 - Larva de *Chironomus* em 4^o ínstar



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Nota: A seta aponta o espessamento torácico.

O mento normal do gênero *Chironomus* apresenta um dente central trífidido e seis laterais (**Foto 27**). As proporções de tamanho e largura dos dentes variam entre as diferentes espécies/morfotipos, mas mantêm-se constantes para cada um. O primeiro lateral, por exemplo, costuma ter o mesmo tamanho ou ser mais longo que o central trífidido. Em relação ao dente trífidido, as duas partes laterais deste são sempre menores que a central e estarão mais ou menos fundidos a esta.

Foto 27 – Cápsula cefálica de *Chironomus* mostrando mento normal

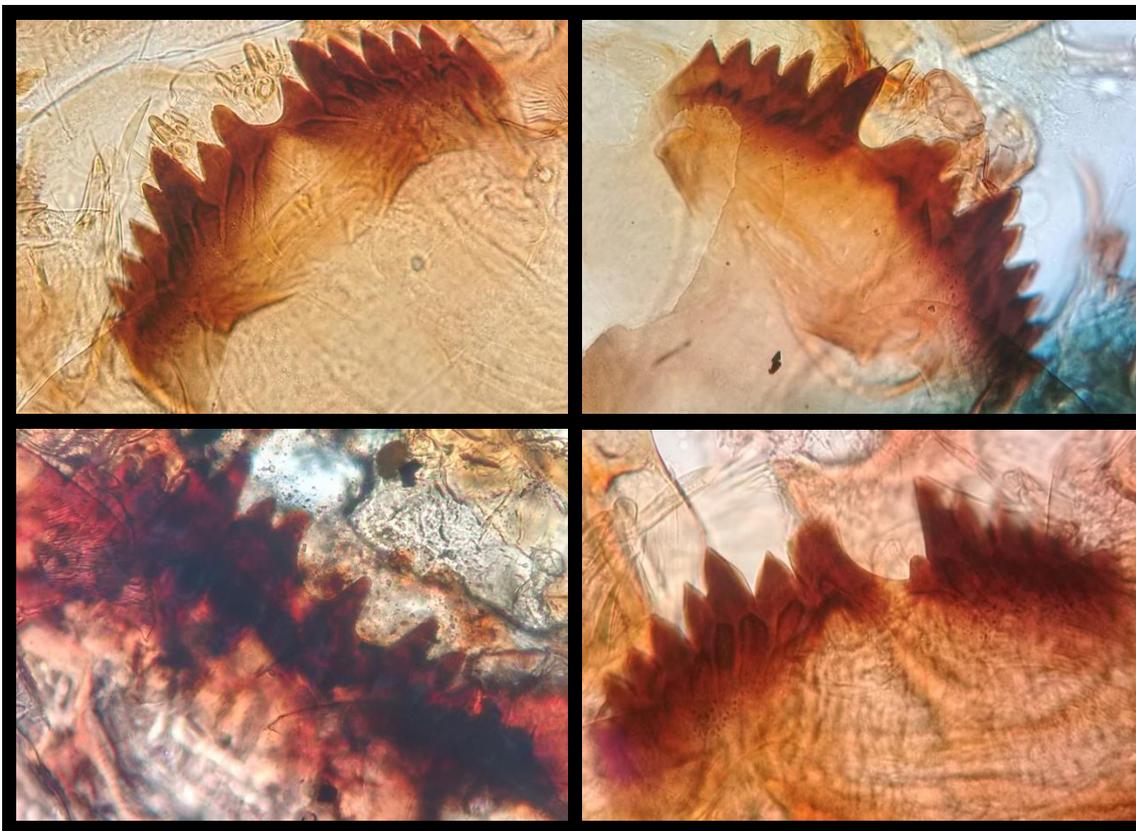


Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

A frequência de deformidade é simplesmente a porcentagem de indivíduos que apresentaram um ou mais tipos de deformidades com relação ao total analisado. Para padronizar seu cálculo, são consideradas as deformidades (Kuhlmann; Hayashida; Araújo, 2000): *gap* (ou falha) (**Fotos 28 a-d**), bifurcação do dente central (**Fotos 29 a-d**), falta (**Fotos 30 a-f**) e excesso de dentes (**Fotos 31 a-d**).

O *gap* é uma falha que varia em intensidade e caracteriza-se por apresentar uma borda lisa e arredondada. Pode ocorrer duplamente em um mesmo mento e até apresentar um início de crescimento de dente em seu interior (**Fotos 28 a-d**).

Fotos 28 – Gap

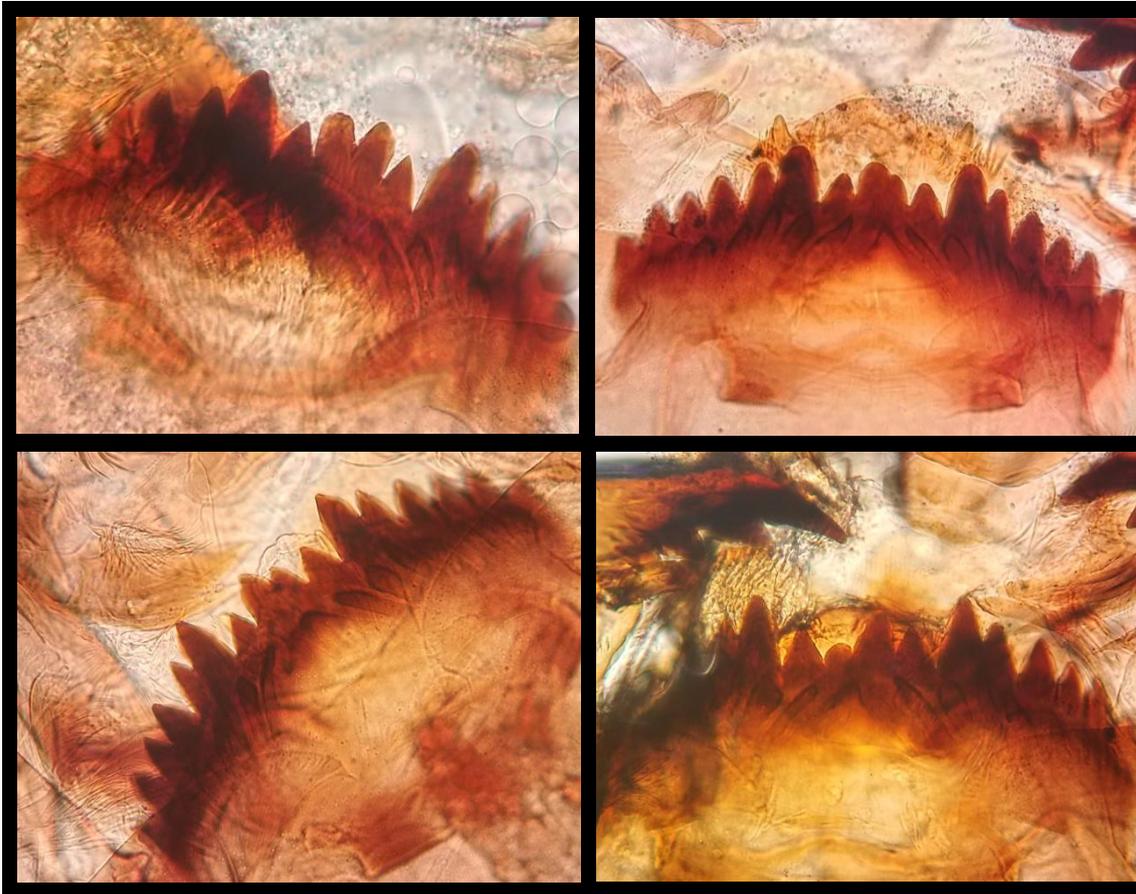


Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

A bifurcação no dente central (**Fotos 29 a-d**) é um tipo diferenciado de excesso de dentes, sendo contado separadamente pois alguns autores (Bird; Schwartz; Joseph, 1995) a relacionam a um efeito mutagênico por manter a bilateralidade do indivíduo. As outras deformidades em geral têm sido consideradas teratogênicas (fenotípicas, não hereditárias), desaparecendo na geração seguinte quando o agente causador é removido do ambiente (Dickman *et al.*,

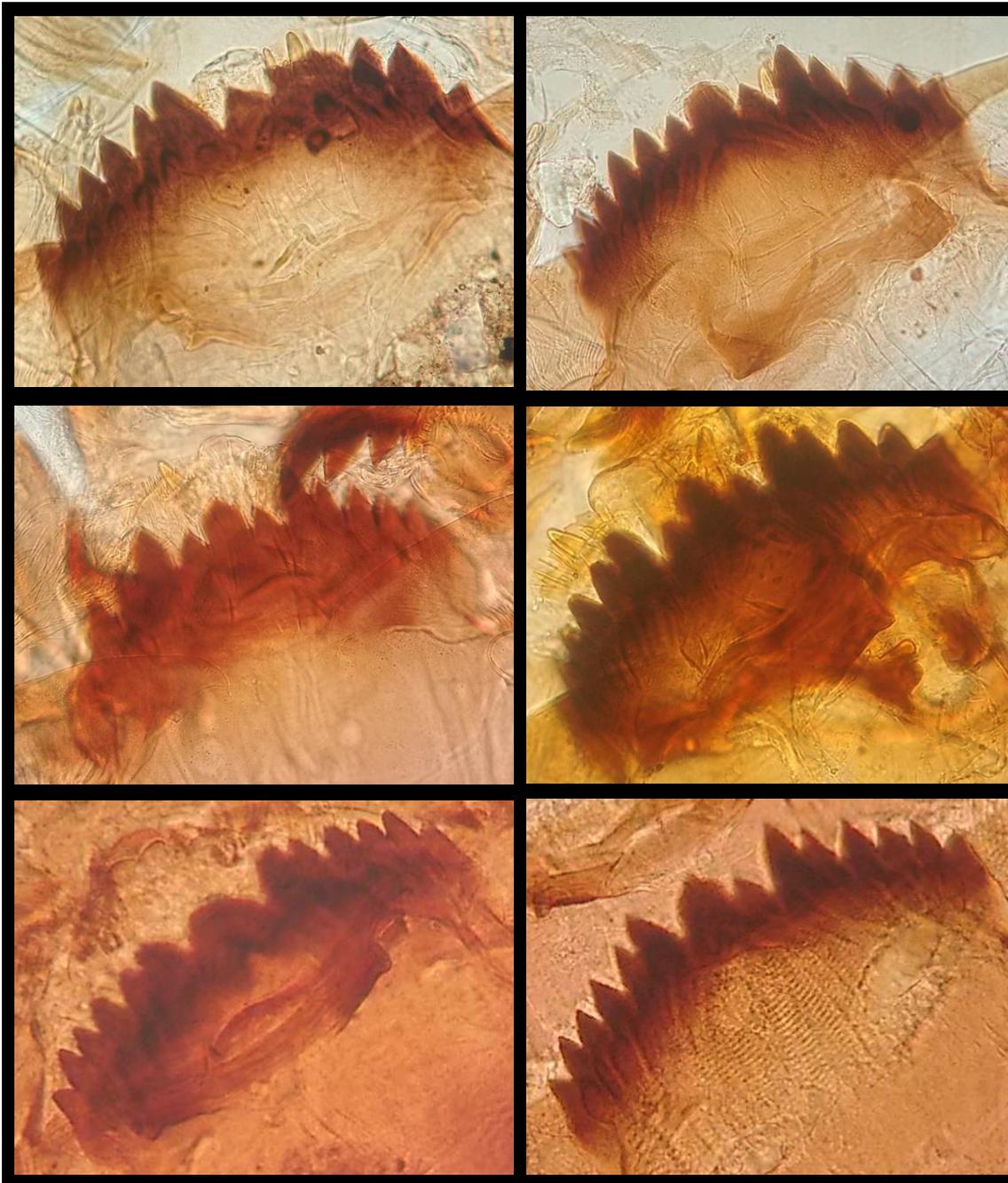
1992). Ocorre em diferentes intensidades e pode conduzir a uma identificação equivocada do organismo.

Fotos 29 – Bifurcação do dente central



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

A falta de dentes (**Fotos 30 a-f**) é o tipo mais frequente de deformidades e em geral é mais observada nos dentes laterais, podendo ocorrer nos dois lados ou apenas em um. Quando ocorre no dente central também pode conduzir ao erro na identificação do organismo.

Fotos 30 – Falta de dentes

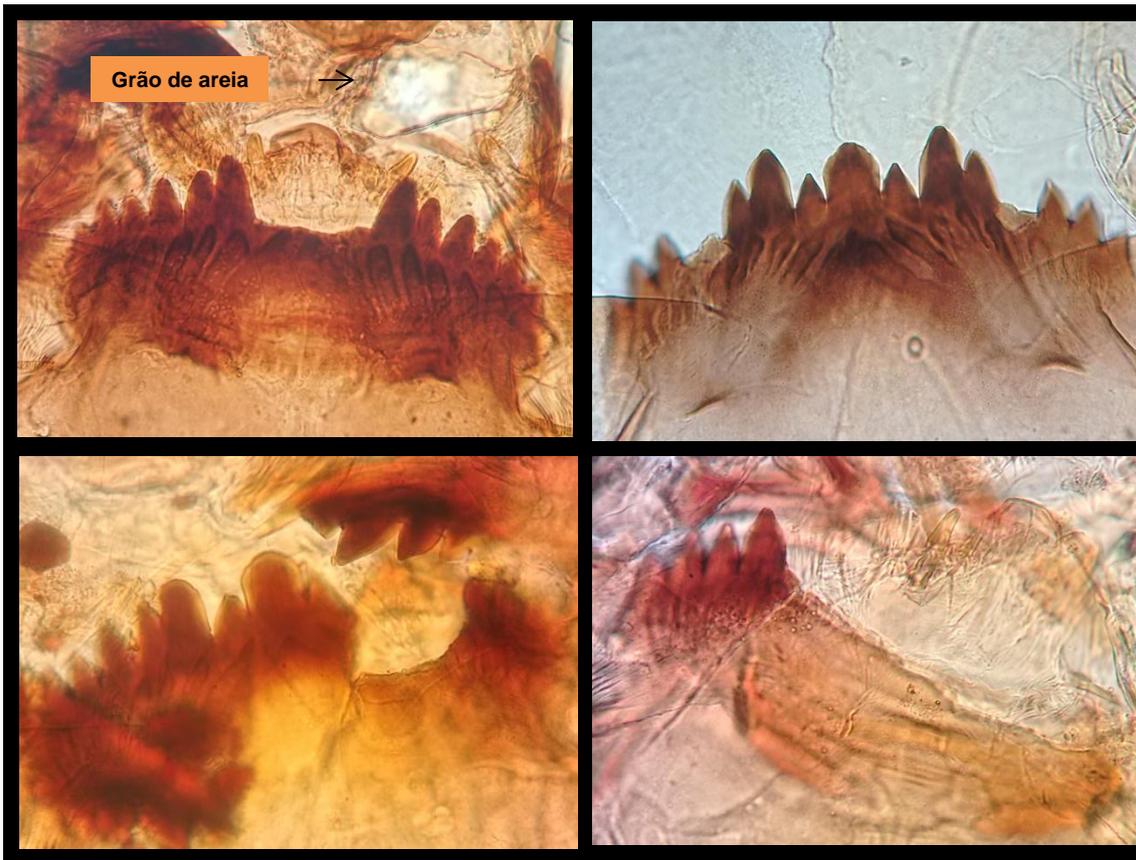
Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

Por outro lado, a deformidade mais raramente observada nas populações de *Chironomus* costuma ser o excesso de dentes laterais (Bonani, 2010) (**Fotos 31 a-d**).

Fotos 31 – Excesso de dentes

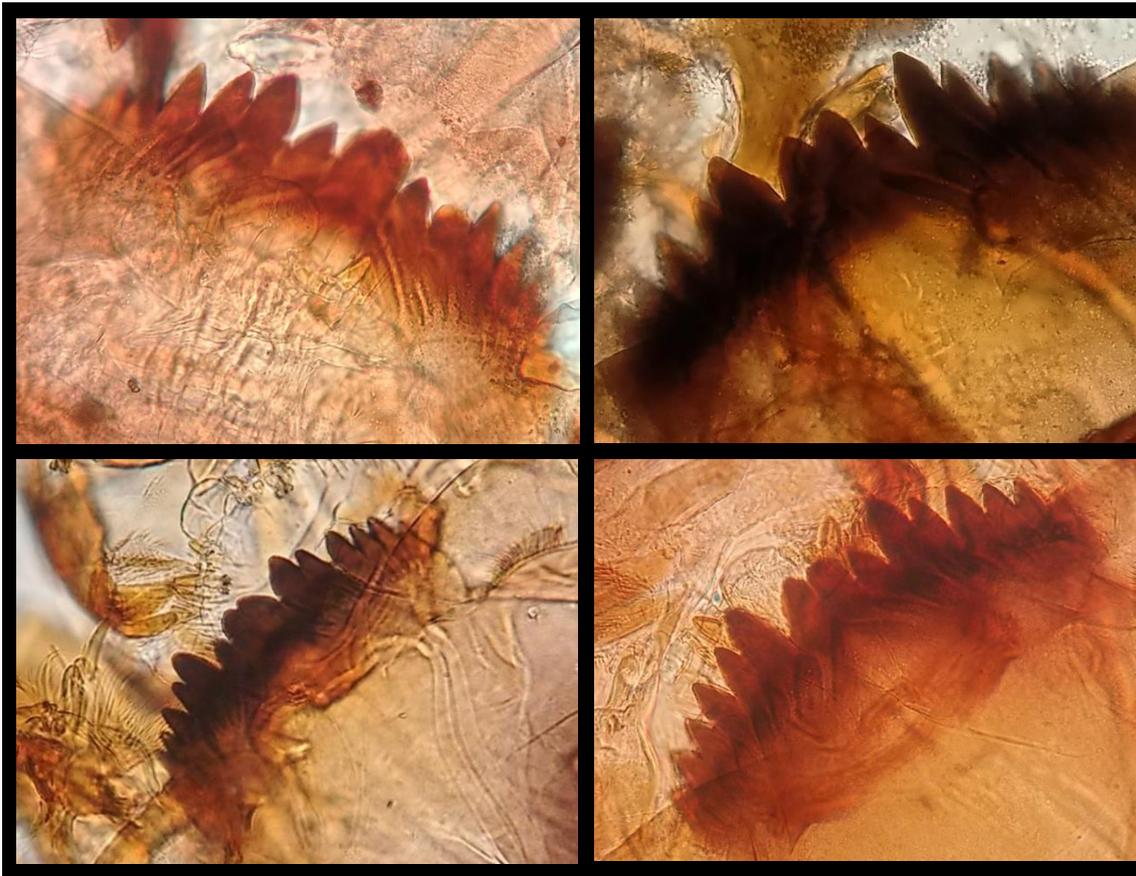
Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

Quebras nos dentes do mento são relativamente comuns (Madden; Austin; Suter, 1995) e podem ocorrer, por exemplo, pela presença de areia nos sedimentos, por erro de manipulação na preparação da lâmina ou até por se tornarem fracos em resposta à contaminação no ambiente. Pelo fato das duas primeiras alternativas não se relacionarem com o grau de contaminação do ambiente e pela terceira não se caracterizar como deformidade, as quebras (**Fotos 32 a-d**) não são consideradas no cálculo de frequência de deformidades. Para não confundir uma quebra com um *Gap*, basta observar a borda da falha. Se for lisa é um *Gap* e se rugosa, uma quebra.

Fotos 32 – Quebras de dentes do mento

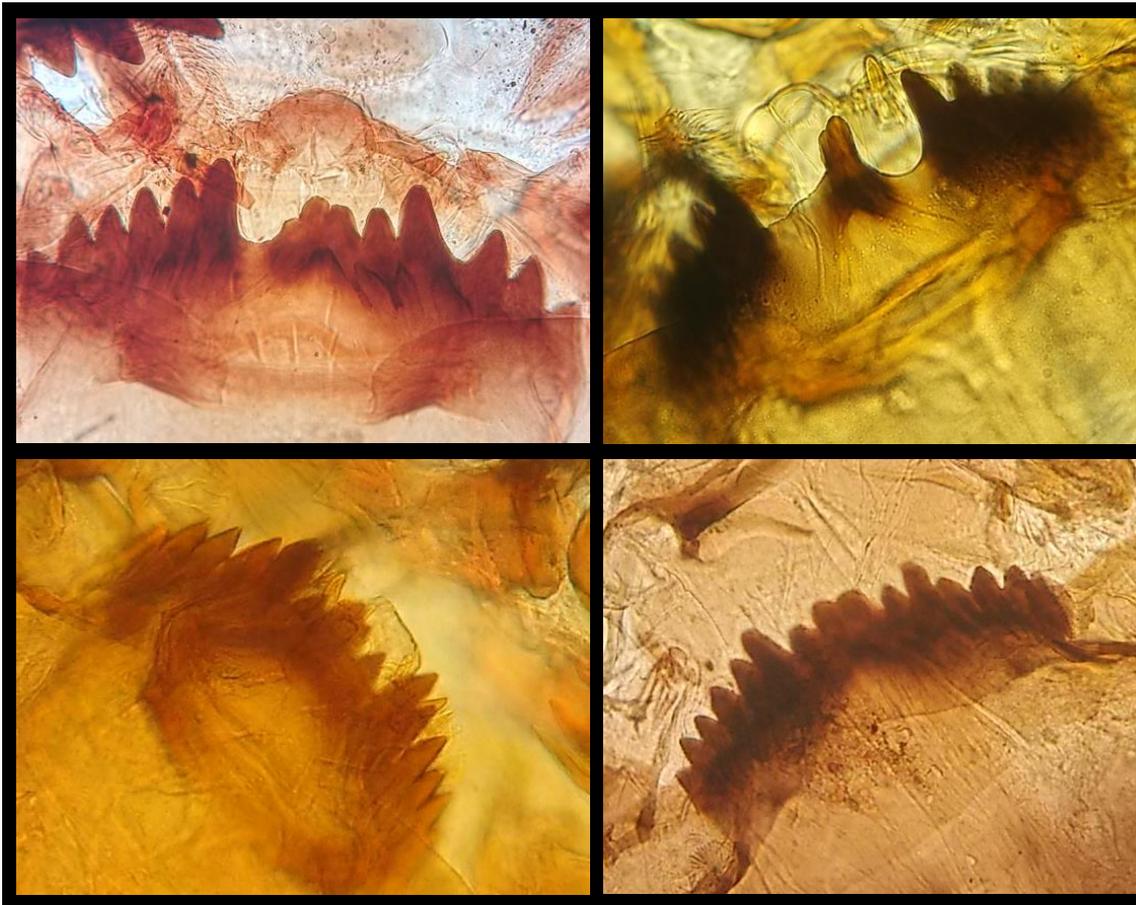
Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

Alterações nos padrões de proporção entre os dentes do mento (**Fotos 33 a-d**) não numéricas são anomalias que também podem ser efeito de algum estressor químico. Como a assimetria pode ser sutil e sua identificação depende de um conhecimento mais profundo das diferenças morfológicas dentro do gênero, sua leitura pode sofrer forte influência do analista e, portanto, elas não são consideradas no cálculo da frequência de deformidades.

Fotos 33 – Anomalias não numéricas nos dentes do mento

Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

Na ocorrência de mais de um tipo de deformidade no mento de um mesmo indivíduo (**Fotos 34 a-d**), para o cálculo da frequência só se considera um mento deformado, já que é uma métrica ao nível populacional.

Fotos 34 – Múltiplas deformidades

Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

6 SAÚDE OCUPACIONAL

Algumas etapas da análise de comunidade bentônica exigirão o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) ou coletivo (EPC).

Na coleta, por requerer o uso de embarcações, a segurança do trabalho dependerá em grande parte da habilitação e treinamento dos pilotos. Estabilizar um barco em situações de forte correnteza, evitar pedras e troncos submersos, agir rapidamente em emergências são capacitações desejáveis ao piloto e copiloto da embarcação. A presença de dois membros da equipe com habilitação para a navegação também é garantia de segurança, já que numa emergência ou na impossibilidade temporária do piloto conduzir a embarcação sempre haverá o segundo piloto para fazê-lo. Uma pessoa que fique na margem, como apoio em terra, também é desejável, principalmente em ambientes de grandes proporções, como o são vários reservatórios do estado de São Paulo. Além disso, é importante zelar pela manutenção do próprio barco e de seus equipamentos de proteção coletiva, como botes salva-vidas, boias circulares, sinalizadores e aparelhos de comunicação à distância. Este material deve estar disponível, especialmente em embarcações de maior porte que naveguem em grandes reservatórios. Os tripulantes devem utilizar EPI, como: colete salva-vidas, luvas e óculos de segurança, além de protetor solar.

Os técnicos coletores também devem ser capacitados no manuseio dos equipamentos. Os mecanismos de fechamento dos pegadores muitas vezes operam de forma violenta para evitar o bloqueio das garras por pedras, galhos ou outros detritos. Travas de segurança devem ser adicionadas a estes equipamentos para evitar riscos, inclusive de amputação, em sua operação.

No campo, os técnicos devem utilizar luvas de proteção e, no momento da fixação da amostra com formol, devem também colocar um respirador descartável para evitar inalação de vapores deste composto, comprovadamente cancerígeno.

Em laboratório a amostra deve ser lavada em pia, sob um exaustor ou capela e o técnico deve utilizar avental, luvas de borracha e, se preferir, também um avental de plástico, por exemplo, do tipo utilizado por açougueiros.

Para a saúde do analista é aconselhável manter a amostra, após lavagem, em álcool 70-80 °GL.

A análise de macroinvertebrados não exige muita adequação na estrutura física do laboratório. É necessária uma bancada para acomodação dos equipamentos ópticos (lupa e microscópio) e da base iluminadora e de uma pia. Nesta questão, em relação à saúde ocupacional, um dos focos principais na análise de bancada será com a ergonomia, ou seja, com o uso de bancadas e cadeiras apropriadas para a correta postura diante dos equipamentos ópticos. Além disso, o tempo prolongado de observação em microscopia, na direção de um campo iluminado ou, às vezes, diretamente para a fonte luminosa, pode causar prejuízos à visão. O analista em geral tende a piscar menos do que o necessário, causando secura nos olhos, e a luz intensa sobre a retina pode prejudicá-la. Consequentemente, é adequado que se realizem breves descansos em intervalos de 40-50 minutos e que o trabalho em bancada ocupe no máximo 70% do trabalho diário do analista.

Amostras já analisadas são descartadas em lixo comum após a retirada de seu conteúdo líquido (álcool).

7 CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA

A implementação de procedimentos de controle de qualidade para análises ambientais assegura a confiabilidade do resultado obtido e fortalece sua aplicação como instrumento legal sendo, portanto, fundamental para os órgãos de controle ambiental. A Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) acredita análises ambientais segundo a Norma ISO-IEC 17025 (ABNT, 2017), incluindo a análise de comunidade bentônica (ou macroinvertebrados aquáticos). Os cuidados com a qualidade na análise de comunidade bentônica englobam procedimentos, relacionados desde a tomada da amostra até a expressão de seu resultado, que garantem a rastreabilidade do dado, a descrição dos métodos empregados e a garantia de sua aplicação. Qualquer fonte de erro que possa comprometer a fidelidade do resultado à realidade local em investigação deve ser cercada por cuidados, alguns dos quais formarão o Controle de Qualidade Analítico (CQA) da análise.

Para a análise de macroinvertebrados aquáticos foram definidos dois CQAs, um na etapa de triagem e outro na identificação dos organismos.

7.1 Triagem

Todas as amostras triadas devem ser guardadas para posterior avaliação do CQA de triagem. É aconselhável indicar na etiqueta as amostras já triadas e armazenadas para o CQA, de forma a não serem confundidas com aquelas que ainda necessitam de triagem. Neste controle, a cada 10 amostras analisadas por um técnico já capacitado, uma (10%) será sorteada para retriagem por outro técnico. É considerado aceitável um máximo de 5% de perda de organismos (para amostras quantitativas) ou táxons (para amostras qualitativas). A estimativa de perda é calculada segundo as seguintes fórmulas:

Estimativa de perda para amostras quantitativas:

$$\text{Perda (quanti) (\%)} = \frac{P}{DT} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

P = número de organismos encontrados na retriagem,
DT = densidade total da amostra na triagem.

Estimativa de perda para amostras qualitativas:

$$\text{Perda (quali) (\%)} = \frac{T}{S} \times 100 \quad (2)$$

Onde,

T = número de táxons encontrados na retriagem, que não haviam sido registrados na triagem,

S = número total de táxons na amostra triada.

Se a análise efetuada por um técnico treinado exceder o critério de aceitabilidade, outra amostra sua, imediatamente anterior ou posterior, será retriada até que tenha atingido o critério.

Perdas na triagem decorrem de distração, que pode ser eventual, restrita a uma amostra, ou mais frequente, e ter origem ambiental ou pessoal. Se a perda recorrer para um determinado técnico, eventuais causas, como excesso de visitas no laboratório, má ação do corante, falta de conhecimento das espécies que compõem a amostra e cansaço, devem ser detectadas e sanadas.

Técnicos em treinamento devem ter 100% das amostras retriadas até que seu trabalho se estabilize dentro da faixa de aceitabilidade. Análises realizadas por estagiários sempre devem ser retriadas por funcionários treinados do laboratório.

7.2 Identificação de organismos

Também no controle da qualidade na identificação dos organismos, 10% das amostras identificadas por um biólogo capacitado será revisada por outro, mas apenas no caso de o laboratório desejar verificar a variabilidade (ou conflito de identificação) entre os resultados de dois analistas. Neste caso é aceita uma variabilidade de 20%. Este valor foi estabelecido a partir das distorções no índice utilizado para o diagnóstico da qualidade ambiental na rede de monitoramento (o ICB, ver item 8). Para outros usos do dado, outro valor de aceitabilidade deve ser avaliado.

A amostra (preferencialmente a de maior riqueza no lote de 10) é analisada pelo analista 1 e pelo analista 2 (**Figura 3**) e os dois resultados são colocados em paralelo para que se identifique perdas (P = táxon cuja ocorrência o primeiro analista registrou, mas o segundo não) e ganhos (G = táxon registrado pelo segundo analista, mas não pelo primeiro). Calcula-se, então, o Dimensionamento de Conflito (DC) como:

$$DC (\%) = \frac{PG}{S_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde,
PG = maior valor entre Perdas (P) e Ganhos (G),
Sm = riqueza média das duas leituras.

Os resultados do CQA de identificação de organismos podem indicar os grupos taxonômicos de maior dificuldade (grande frequência de conflitos) da equipe e, conseqüentemente apontar para a necessidade de treinamento dos analistas.

O conhecimento do analista na identificação dos grupos taxonômicos que compõem a fauna de macroinvertebrados é chave para a garantia da veracidade e, portanto, da qualidade dos dados. Várias ferramentas podem e devem ser desenvolvidas pelo laboratório para que se mantenha a qualidade de seus resultados. A manutenção e atualização de material bibliográfico relacionado à taxonomia de macroinvertebrados aquáticos, como artigos e livros, é requisito obrigatório, assim como a realização de cursos com especialistas. O conhecimento de listas de ocorrência dos diferentes grupos taxonômicos auxilia o analista a não cometer erros grosseiros de identificação, principalmente quando este se utiliza de chaves de identificação estrangeiras. A organização de catálogos com informações, desenhos e fotos dos táxons que podem ocorrer na região de abrangência das análises também é de grande auxílio. Muita informação pode ser obtida em *sites* de especialistas. A organização e manutenção de coleções referência de organismos, avalizada por um especialista de cada grupo taxonômico, é um instrumento similar ao padrão utilizado nas análises químicas, para aferir o bom estado de seus equipamentos e, portanto, tem sido bem aceito pelo sistema de qualidade. A coleção (**Fotos 35 e 36**) deve receber os cuidados de armazenamento e manutenção similar aos de um museu de zoologia. Por exemplo, armazenamento em local escuro e livre de umidade e revisão periódica do conservante (em geral, álcool 80 °GL) e etiquetas. O laboratório pode também manter uma lista de especialistas colaboradores para garantir uma checagem final em uma dúvida que persista mesmo após o uso de todos os recursos do laboratório.

Foto 35 - Coleção referência para famílias de Trichoptera



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2012)

Nota: Organizada e avalizada pelo especialista prof. Dr. Adolfo A. Calor (UFBA).

Foto 36 - Coleção referência para gêneros de Chironomidae



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2022)

Nota: Organizada e avalizada pela especialista prof. Dra. Suzana Trivinho-Strixino (UFSCar).

8 TRATAMENTO DE DADOS

No diagnóstico da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos, os dados de comunidade bentônica têm o papel de avaliar a qualidade do ambiente em termos de preservação de sua biodiversidade. É uma medida ecológica do estado de um corpo d'água que, aliada às medidas físicas, químicas e ecotoxicológicas permite que se verifique se um ambiente está ou não degradado, qual o seu grau de degradação e, muitas vezes também quais poderiam ser as causas da degradação.

Transformar a informação biológica em um número não é tarefa fácil, mesmo porque o universo biológico é complexo e não exato. Mesmo assim, muitos realizaram este feito, dando origem a uma infinidade de índices encontrados na literatura de biomonitoramento (por exemplo, Resh; Jackson, 1993). Este esforço demonstra a importância desta tradução, que não só permite dimensionar a alteração na biota causada por um estressor, como facilita a comunicação com profissionais de outras carreiras.

Algumas características devem ser verificadas na escolha do índice:

- Seu poder estatístico (Carlisle; Clements, 1999), dado em % deve ser elevado, sendo calculado como:

$$\text{Poder Estatístico (\%)} = \frac{(I_r - I_t)}{CV_r} \quad (4)$$

Onde,

$(I_r - I_t)$ = diferença entre o valor do índice no ambiente referência e no tratamento

CV_r = coeficiente de variação entre as réplicas do ambiente referência

- O coeficiente de variação deve ser baixo entre os dados do ambiente referência.
- Ser sensível ao gradiente de qualidade (Carlisle; Clements, 1999), de preferência, fornecendo diferentes respostas aos diferentes estressores.
- Ter relevância ecológica, ou seja, retratar as alterações sofridas pela biota em resposta ao impacto, em nível populacional ou de comunidade.
- Ser de fácil compreensão e cálculo, de forma a ser claro aos não especialistas.
- Minimizar a variabilidade espacial, com a padronização do habitat.
- Minimizar a variabilidade temporal do dado, com a definição de um período fixo de coleta.
- Evitar a redundância de informação na montagem de um índice multimétrico. Por exemplo, não utilizar dois índices de diversidade.

- Ser de baixo custo. Índices quantitativos em geral costumam mais por exigirem réplicas.

Índices multimétricos agregam em um número vários índices (ou métricas), cada qual abordando um aspecto diferente da comunidade alterado em função de impactos de origem antrópica. O primeiro índice deste tipo foi o *Index of Biotic Integrity* (IBI), desenvolvido para a ictiofauna por Karr (1981 apud Klemm *et al.*, 1990). Em 1989 a USEPA de Ohio (USEPA, 1989) adaptou este índice para macroinvertebrados, denominando-o *Invertebrate Community Index* (ICI), a partir do qual vários outros surgiram. Atualmente é, provavelmente, a linha de diagnose mundialmente mais adotada, tendo absorvido em sua constituição muitos índices bióticos e de comunidade.

No monitoramento da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo a partir de dados de macroinvertebrados bentônicos de rios e reservatórios, a CETESB desenvolveu e adotou o Índice da Comunidade Bentônica (ICB) para o diagnóstico da qualidade ecológica em rios e reservatórios, ou seja, daquela associada à preservação da biota aquática. Este índice tem caráter multimétrico e, entre seus componentes, apenas as métricas de diversidade (ICS ou H') exigem a obtenção de dados semiquantitativos/quantitativos. Para programas de avaliação rápida, a partir de dados qualitativos, sugere-se a aplicação dos Índices Bióticos (IB-Rio e IB-Res) no lugar do ICB. Assim como o IB, o ICB possui versões diferentes para cada tipo de sistema analisado.

No diagnóstico, a qualidade PÉSSIMA reflete a condição em que nenhuma população da comunidade conseguiu se instalar. Esta informação pode ser obtida a partir da análise de amostras, nas quais constata-se a ausência de populações da macrofauna (amostra azóica) ou por inferência, quando o coletor observa que o ambiente não apresenta a condição básica (oxigenação) para a existência de uma biota de respiração aeróbia, como em rios e reservatórios com água escura, cinza a preta, com desprendimento de gás sulfídrico (cheiro semelhante a ovo podre) (**Foto 37**).

Foto 37 – Rio Tietê, a montante da barragem da Penha, município de São Paulo



Fonte: Mônica Luisa Kuhlmann (2023)

As métricas que compõem o ICB e suas faixas de variação variam de acordo com o tipo de ambiente em avaliação, sendo:

a) ICB_{RIO} (**Quadro 2**), para as comunidades de rios de médio a grande porte

Quadro 2 – ICB_{RIO}

Qualidade	S _{nat}	ICS	H'	IB-Rio	pontos
PÉSSIMA		azóico			6
MUITO RUIM	< 10	< 5,89	< 1,71	< 27	5
RUIM	10 - 14	5,89 – 9,65	1,71 – 2,07	27 - 47	4
REGULAR	15 - 19	9,66 – 14,55	2,08 – 2,50	48 - 67	3
BOA	20 - 26	14,56 – 19,93	2,51 – 2,63	68 - 111	2
ÓTIMA	> 26	> 19,93	> 2,63	> 111	1

Fonte: Elaboração própria (2024)

Notas:

- S_{nat} (Riqueza de nativos), calculada como a soma das categorias taxonômicas encontradas na amostra, excetuando-se as espécies exóticas invasoras;
- ICS (Índice de Comparação Sequencial), descrito em Cairns e Dickson (1971) e calculado por um pacote em R desenvolvido para CETESB por MSc Enoque G. Ribeiro (Calculation [...], 2021);
- H' (Índice de diversidade de Shannon-Wiener), descrito em Washington (1984) e calculado com log em base 2. Só utilizado quando não for possível o cálculo do ICS;
- IB-Rio, calculado como a soma das valências dos indicadores que ocorreram na amostra, conforme **Quadro 3**.

Quadro 3 – IB-Rio

Valências	Indicadores
1	Tubificinae sqc + Rhyacodrilinae sqc, Naidinae + Pristininae, Chironomini
2	Glossiphoniidae
3	Physidae, Tubificinae cqc + Rhyacodrilinae cqc, Simuliidae
4	BRYOZOA, TURBELLARIA, Sphaeriidae, Aeolosomatidae, Enchytraeidae, Megadrili, Opistocystidae, Ceratopogonidae, Tanytarsini, Orthoclaadiinae
5	NEMERTEA, Ancyliidae, Planorbiidae, Tanypodinae, Gomphidae, Veliidae, Hydroptilidae
6	Hyriidae, Hydracarina, Dolichopodidae, Empididae, Muscidae, Tipulidae, Calopterygidae, Coenagrionidae, Libellulidae, Curculionidae, Dryopidae, Dytiscidae, Elmidae, Gyrinidae, Staphylinidae, Baetidae, Caenidae, Leptohiphidae, Leptophlebiidae, Gripopterygidae, Hydropsychidae, Leptoceridae

Fonte: Elaboração própria (2024)

Notas: sqc = sem queta capilar; cqc = com queta capilar

Nível de identificação taxonômica: ver Quadro 1.

ATENÇÃO: O sinal + indica uso conjunto das subfamílias, de forma que a presença das duas subfamílias unidas pelo sinal + resultará em uma única pontuação

b) ICB_{RES-SL} (Quadro 4), para comunidades da região sublitoral de reservatórios,

Quadro 4 – ICB_{RES-SL}

Qualidade	S _{nat}	ICS	H'	IB-Res	pontos
PÉSSIMA		azóico			6
MUITO RUIM	< 16	< 10,75	< 2,31	< 39	5
RUIM	16 - 19	10,75 – 14,74	2,31 – 2,71	39 - 50	4
REGULAR	20 - 22	14,75 – 19,74	2,72 – 3,15	51 - 62	3
BOA	23 - 29	19,75 – 26,49	3,16 – 3,48	63 - 86	2
ÓTIMA	> 29	> 26,49	> 3,48	> 86	1

Fonte: Elaboração própria (2024)

Notas:

- S_{nat} (Riqueza de nativos), calculado como a soma das categorias taxonômicas encontradas na amostra, excetuando-se as espécies exóticas invasoras;
- ICS (Índice de Comparação Sequencial), descrito em Cairns e Dickson (1971) e calculado por um pacote em R desenvolvido para CETESB por MSc Enoque G. Ribeiro (Calculation [...], 2021);
- H' (Índice de diversidade de Shannon-Wiener), descrito em Washington (1984) e calculado com log em base 2. Só utilizado quando não for possível o cálculo do ICS;

- IB-Res, calculado como a soma das valências dos indicadores que ocorreram na amostra, conforme **Quadro 5**.

Quadro 5 – IB-Res

Valências	Indicadores
1	<i>Limnodrilus, Chironomus, Tanypus</i>
2	<i>Branchiura, Dero, Nais, Pristina, Opistocysta, Glossiphoniidae, Saetheria, Labrundinia, Procladius</i>
3	<i>Sphaeriidae, Aulodrilus, Bothrioneurum, Stephensoniana, Aedokritus, Cladopelma, Goeldichironomus, Polypedilum, Coelotanypus</i>
4	BRYOZOA, TURBELLARIA, NEMERTEA, Physidae, <i>Chaetogaster, Slavina, Hydracarina, Ceratopogonidae, Dicotendipes, Fissimentum, Parachironomus, Paralauterborniella, Pelomus, Caladomyia, Tanytarsus, Polymitarciidae</i>
5	<i>Ampullaridae, Aeolosomatidae, Enchytraeidae, Haemonais, Asheum, Axarus, Cryptochironomus, Nilothauma, Stenochironomus, Zavreliella, Ablabesmyia, Leptoceridae, Polycentropodidae</i>

Fonte: Elaboração própria (2024)

Nível de identificação taxonômica: ver **Quadro 1**.

- c) ICB_{RES-PP} (**Quadro 6**), para comunidades da região profunda profunda de reservatórios

Quadro 6 – ICB_{RES-PP}

Qualidade	S _{nat}	ICS	H'	IB-Res	pontos
PÉSSIMA		azóico			6
MUITO RUIM	< 4	< 1,61	< 0,63	< 6	5
RUIM	4 - 7	1,61 – 4,30	0,63 – 1,79	6 - 17	4
REGULAR	8 - 13	4,31 – 9,90	1,80 – 2,57	18 - 33	3
BOA	14 - 19	9,91 – 15,09	2,58 – 2,72	34 - 54	2
ÓTIMA	> 19	> 15,09	> 2,72	> 54	1

Fonte: Elaboração própria (2024)

Notas:

- S_{nat} (Riqueza de nativos), calculado como a soma das categorias taxonômicas encontradas na amostra, excetuando-se as espécies exóticas invasoras;
- ICS (Índice de Comparação Sequencial), descrito em Cairns e Dickson (1971) e calculado por um pacote em R desenvolvido para CETESB por MSc Enoque G. Ribeiro (Calculation [...], 2021);
- H' (Índice de diversidade de Shannon-Wiener), descrito em Washington (1984) e calculado com log em base 2. Só utilizado quando não for possível o cálculo do ICS;
- IB-Res, calculado como a soma das valências dos indicadores que ocorreram na amostra, conforme **Quadro 5**.

Nível de identificação taxonômica: ver **Quadro 1**.

d) ICB_{RES-PR} (Quadro 7), para comunidades da região profunda rasa de reservatórios.

Quadro 7 – ICB_{RES-PR}

Qualidade	S _{nat}	ICS	H'	IB-Res	pontos
PÉSSIMA	azóico				6
MUITO RUIM	< 10	< 4,60	< 1,66	< 23	5
RUIM	10 - 14	4,60 – 8,85	1,66 – 1,88	23 - 35	4
REGULAR	15 - 19	8,86 – 16,25	1,89 – 2,63	36 - 48	3
BOA	20 - 27	16,26 – 23,79	2,64 – 3,69	49 - 65	2
ÓTIMA	> 27	> 23,79	> 3,69	> 65	1

Fonte: Elaboração própria (2024)

Notas:

- S_{nat} (Riqueza de nativos), calculado como a soma das categorias taxonômicas encontradas na amostra, excetuando-se as espécies exóticas invasoras;
- ICS (Índice de Comparação Sequencial), descrito em Cairns e Dickson (1971) e calculado por um pacote em R desenvolvido para CETESB por MSc Enoque G. Ribeiro (Calculation [...], 2021);
- H' (Índice de diversidade de Shannon-Wiener), descrito em Washington (1984) e calculado com log em base 2. Só utilizado quando não for possível o cálculo do ICS;
- IB-Res, calculado como a soma das valências dos indicadores que ocorreram na amostra, conforme **Quadro 5**.

Nível de identificação taxonômica: ver **Quadro 1**.

Ressalta-se novamente que no cálculo do Índice da Comunidade Bentônica apenas um dos índices de diversidade (ICS ou H') é considerado, dando-se preferência ao ICS, cuja amplitude de variação é maior. O valor final, que gera o diagnóstico ou a classificação da qualidade do habitat, será simplesmente a média aritmética do valor obtido com a soma dos pontos de cada métrica.

Abaixo, um **exemplo** de lista de ocorrência dos táxons (**Figura 4**) observados em um ambiente ribeirinho, suas valências e o cálculo do IB-Rio associado:

Figura 4 – Lista de ocorrência dos táxons, métricas e pontuação

Indicadores	Valência
Nemertea	5
Hyriidae	6
<i>Corbicula fluminea</i>	sv
Sphaeriidae	4
Ancylidae	5
Planorbiidae	5
Tubificinae sqc	1
Tubificinae cqg	3
Naidinae	1
Pristininae	1
Opistocystidae	4
Glossiphoniidae	2
Chironomini	1
Tanytarsini	4
Tanypodinae	5
Orthoclaadiinae	4
Leptohyphidae	6
Leptophlebiidae	6
IB-Rio	63

Fonte: Elaboração própria (2024)

sv = sem valência

Os resultados das métricas que compõem o ICB_{RIO} para o exemplo acima foi:

S_{nat}	17
ICS	11,43
IB-Rio	63

A pontuação para cada métrica será:

S_{nat}	3
ICS	3
IB-Rio	3

Então, o ICB_{RIO} = 3 + 3 + 3 = 9 ÷ 3 = 3, portanto a qualidade ecológica deste ambiente será REGULAR.

A frequência de deformidades (FD) em mento de *Chironomus* é calculada pela fórmula:

$$FD (\%) = \frac{DEF}{N} \times 100$$

Onde,
DEF = número de mentos deformados,
N = número total de mentos analisados

Na interpretação do resultado de frequência de deformidades em mento de *Chironomus*, consideram-se os níveis naturais destas alterações morfológicas como basais, acima dos quais se evidencia a ação de poluentes. Para o estado de São Paulo, Bonani (2010) sugeriu o valor de 2% como limite entre o natural e o provocado por contaminação química do ambiente, diante da observação de ausência total a 2,4% de deformidades em mento de larvas coletadas em ambientes mais preservados. Por outro lado, considerando que o maior valor encontrado foi de 43% (rio Quilombo) (CETESB, 2005) e que ambientes com forte influência de esgotos domésticos, exibem frequências de 4-6%, como os rios Sorocaba (Kuhlmann *et al.*, 2007) e Jacupiranguinha (CETESB, 2009), foram definidas as seguintes faixas de qualidade (**Quadro 8**) para esta métrica:

Quadro 8 – Faixas de qualidade para a frequência de deformidades (%)

QUALIDADE	FREQUÊNCIA	RELAÇÃO COM O AMBIENTE
ÓTIMA	≤ 2 %	Ambiente sem contaminantes que promovam a má formação do mento de <i>Chironomus</i>
REGULAR	2,1 – 6 %	Frequência provavelmente provocada por contaminantes diluídos no esgoto doméstico
RUIM	> 6 %	Frequência provavelmente provocada por contaminantes químicos lançados ao ambiente

Fonte: Elaboração própria (2024)

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. 3.ed. Rio de Janeiro, 2017.

AZEVEDO, C.A.S.; HAMADA, N. Megaloptera: ordem Megaloptera Latreille, 1802 (Arthropoda: Insecta). Versão 1B1.0. *In*: FROEHLICH, C.G. (org.). **Guia on-line**: identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2008. Cap. 6. Disponível em: https://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online/Capitulo_6_Megaloptera.pdf. Acesso em: nov. 2024.

BAILEY, R.C.; NORRIS, R.H.; REYNOLDS, T.B. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. **Journal of the North American Benthological Society**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 280-286, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/258918567_Taxonomic_Resolution_of_Benthic_Macroinvertebrate_Communities_in_Bioassessments. Acesso em: nov. 2024.

BENETTI, C.J.; FIORENTIN, G.L.; CUETO, J.A.R.; NEISS, U.G. Chaves de identificação para famílias de coleópteros aquáticos ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 1, n. 1, p. 24-28, Aug. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/333973554_Chaves_de_identificacao_para_familias_de_coleopteros_aquaticos_ocorrentes_no_Rio_Grande_do_sul_Brasil. Acesso em: nov. 2024.

BIRD, G.A.; SCHWARTZ, W.J.; JOSEPH, D.L. The effect of ^{210}Pb and stable lead on the induction of menta deformities in *Chironomus tentans* larvae and on their growth and survival. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, US, v. 14, n. 12, p. 2125-2130, Dec. 1995.

BONANI, F. **Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomus* (Díptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/1992/3033.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: nov. 2024.

BRANDIMARTE, A.L.; SHIMIZU, G.Y.; ANAYA, M.; KUHLMANN, M.L. Amostragem de invertebrados bentônicos. *In*: BICUDO, C.E.M.; BICUDO, D.C. (org.). **Amostragem em limnologia**. São Paulo: RiMa, 2004. Cap. 13., p. 213-230.

BRASIL. CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2005. Publicada originalmente no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Alterada pelas Resoluções 410/2009 e 430/2011. Disponível em: https://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=450. Acesso em: dez. 2024.

BRINKHURST, R.O. **The benthos of lakes**. London: MacMillan, 1974. 190 p.

BRINKHURST, R.O.; MARCHESE, M.R. **Guia para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de sud y centroamerica**. 2.ed. Santo Tomé: Asociacion de Ciencias Naturales del Litoral, 1989. 207 p. (Colección Climax, n. 6).

BURT, J.; CIBOROWSKI, J.J.H.; REYNOLDSON, T.B. Baseline incidence of mouthpart deformities in Chironomidae (Diptera) from Laurentian Great Lakes, Ontario. **Journal of Great Lakes Research**, Duluth, US, v. 29, n. 1, p. 172-80, Dec. 2003.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/248599170_Baseline_Incidence_of_Mouthpart_Deformities_in_Chironomidae_Diptera_From_The_Laurentian_Great_Lakes_Canada. Acesso em: nov. 2024.

BUSS, D.B.; ROQUE, F.O.; SONODA, K.C.; MEDINA JR, P.B.; STEFANES, M.; IMBIMBO, H.R.V.; KUHLMANN, M.L.; LAMPARELLI, M.C.; OLIVEIRA, L.G.; MOLLOZZI, J.; CAMPOS, M.C.S.; JUNQUEIRA, M.V.; LIGEIRO, R.; MOULTON, T.P.; HAMADA, N.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Macroinvertebrados Aquáticos como Bioindicadores no Processo de Licenciamento Ambiental no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, DF, v. 6, n. 1, p. 1-39, 2016. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1056404/1/2016AP07.pdf>.

Acesso em: nov. 2024.

CAIRNS JR., J.; DICKSON, K.L. A simple method for biological assessment on the effects of the most discharges on aquatic bottom-dwelling organisms. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, Washington, DC, v. 43, n. 5, p. 755-772, May 1971.

CAIRNS, JR., J.; PRATT, J.R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. *In*: ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. (ed.). **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993. Chap. 2, p. 10-27.

CALCULATION of Sequential Comparison Index (ICS). Version 1.0.0. [São Paulo: s.n.], 2021. Pacote ICSCETESB desenvolvido para CETESB por Enoque G. Ribeiro, com o *software R version 4.1.1*. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: dez. 2024.

CALOR, A.R. Trichoptera: ordem Trichoptera Kirby 1813 (Arthropoda: Insecta). Versão 1B2.0. *In*: FROELICH, C.G. (org.). **Guia on-line: identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo**. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2007. Cap. 3. Disponível em: https://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guia_online/Guia_Trichoptera_b.pdf. Acesso em: nov. 2024.

CARLISLE, D.M.; CLEMENTS, W.H. Sensitivity and variability of metrics used in biological assessment of running waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, US, v. 18, n. 2, p. 285-291, Feb. 1999.

CARVALHO, A.L.; CALIL, E.R. Chave de identificação para as famílias de Odonata (Insecta) ocorrentes no Brasil, adultos e larvas. **Papéis Avulsos de Zool.**, São Paulo, v. 41, n. 1-28, p. 223-241, 1999-2000. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/paz/issue/view/12883>. Acesso em: jan. 2025.

CETESB. **Avaliação da situação atual de contaminação dos rios Mogi-Guaçu e Pardo e seus reflexos sobre as comunidades biológicas**: relatório técnico. São Paulo: CETESB, 1980. 3 v.

CETESB. **P4.001**: Avaliação de Risco Ecológico (ARE) - áreas contaminadas. São Paulo: CETESB, 2022. 1 arquivo PDF (37 p.). Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2024/09/Norma-Tecnica-Cetesb-P4.001-Avaliacao-de-Risco-Ecologico-ARE-Areas-Contaminadas-1a-Edicao.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2004**. São Paulo: CETESB, 2005. 297 p. + anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: nov. 2024.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2009**. São Paulo: CETESB, 2010. 312 p. + anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: nov. 2024.

CETESB; ANA. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. 2.ed. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2023. 456 p. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/guia-nacional-de-coleta-e-preservacao-de-amostras/>. Acesso em: nov. 2024.

CHAPMAN, P.M. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, NL, v. 97-98, p. 815-25, Nov. 1990.

CHESSMAN, B.; WILLIAMS, S.; BESLEY, C. Bioassessment of streams with macroinvertebrates: effect of sampled habitat and taxonomic resolution. **Journal of the North American Benthological Society**, Lawrence, v. 26, n. 3, p. 546-565, Sept. 2007.

COELHO-BOTELHO, M.J.C.; CARVALHO, M.C.; KUHLMANN, M.L.; SALVADOR, M.E.P.; SOUZA, R.C.R.; WATANABE, H.M.; ARAÚJO, R.P.A.; BRESSAN, JR, H.; BRANDIMARTE, A.L.; ANAYA, M.; GUERESCHI, R.M. **Desenvolvimento de índices biológicos para o biomonitoramento em reservatórios do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2006. 146 p. + anexos. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: nov. 2024.

COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C.E. (ed.). **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto, Holos, 2006. 250 p.

COSTA, J.M.; MACHADO, A.B.M.; LENCIONI, F.A.A.; SANTOS, T.C. Diversidade e distribuição dos Odonata (Insecta) no estado de São Paulo, Brasil: parte I – lista de espécies e registros bibliográficos. **Publicações Avulsas do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, n. 80, p. 1-27, abr. 2000. Disponível em: <http://www.angelfire.com/mn/janira/trabalhos/pa80.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

DAMBORENEA, C.; ROGERS, D.C.; THORP, J.H. (ed.). **Keys to neotropical and Antarctic fauna: Thorp and Covichs's Freshwater Invertebrates**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2020. v. 5, xxviii, 1018 p.

DICKSON, M.; BRINDLE, I.; BENSON, M. Evidence of teratogens in sediments of the Niagara River watershed as reflected by Chironomid (Diptera: Chironomidae)

deformities. **Journal of Great Lakes Research**, Amsterdam, NL, v. 18, n. 3, p. 467-480, 1992.

DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDEZ, H.R. (ed.). **Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos**: sistemática y biología. Tucumán, AR: Fundación Miguel Lillo, 2009.

DOMÍNGUEZ, E.; MOLINERI, C.; PESCADOR, M.L.; HUBBARD, M.D.; NIETO, C. **Ephemeroptera of South América**. Sofia, Bulgaria: Pensoft, 2006. 646 p. (Aquatic Biodiversity in Latin America Series, v. 2).

ELLIOTT, J.M. **Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates**. 2nd ed. Ambleside, UK: Freshwater Biological Association, 1977. 160 p. (Scientific publication, n. 25).

EPLER, J.H. **Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of Florida**. Tallahassee, FL: Department of Environmental Protection, 1995. 320 p. Final report for DEP Contract WM579. Disponível em: <http://publicfiles.dep.state.fl.us/dear/labs/biology/biokeys/midges.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

EPLER, J.H. **Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina**. Version 1.0. North Carolina: EPA, 2001. 53 p. Region 4. Disponível em: <https://files.nc.gov/ncdeq/Water%20Quality/Environmental%20Sciences/BAU/Benthos%20Reference/intro.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

FLOTEMERSCH, J.E.; BLOCKSOM, K.A.; HUTCHENS Jr., J.J.; AUTREY, B. C. Development of a standardized large river bioassessment protocol (LR-BP) for macroinvertebrate assemblages. **River Research and Applications**, New Jersey, US, v. 22, n. 7, p. 775-790, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/227676466_Development_of_a_Standardized_Large_River_Bioassessment_Protocol_LR-BP_for_Macroinvertebrate_Assemblages. Acesso em: nov. 2024.

FLOTEMERSCH, J.E.; STRIBLING, J.B.; HUGHES, R.M.; REYNOLDS, L.; PAUL, M.J.; WOLTER, C. Site length for biological assessment of boatable rivers. **River Research and Applications**, New York, US, v. 27, n. 4, p. 520 – 535, May 2011. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NERL&dirEntryId=205312. Acesso em: nov. 2024.

FROEHLICH, C.G. (org.). **Guia on-line**: identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2007-2008. Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/botoes.htm>. Acesso em: nov. 2024.

GERRITSEN, J.; CARLSON, R.E.; DYCUS, D.L.; FAULKNER, C.; GIBSON, G.R.; HARKUM, J.; MARKOWITZ, S.A. **Lake and reservoir bioassessment and biocriteria**: technical guidance document. Washington, DC: EPA, 1998. (EPA 841-B-98-007). Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20004ODM.PDF?Dockey=20004ODM.PDF>. Acesso em: nov. 2024.

GERRITSEN, J.; JESSUP, B.; LEPPA, E.W.; WHITE, J. **Development of Lake Condition Indexes (LCI) for Florida**. Florida: Department of Environmental Protection, 2000. Disponível em:

http://seminole.wateratlas.usf.edu/upload/documents/Florida_LCI_Development_July2000.pdf. Acesso em: nov. 2024.

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R.B. (ed.). **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Ed. INPA, 2014. 724 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1000609/insetos-aquaticos-na-amazonia-brasileira-taxonomia-biologia-e-ecologia>. Acesso em: nov. 2024.

HAMADA, N.; THORP, J.H.; ROGERS, D.C. (ed.). **Key to neotropical Hexápoda: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2018. v. 3, 812 p.

HENRIQUE, R.M. **Avaliação da qualidade ambiental do rio Ribeira de Iguape (SP, Brasil) através do estudo da macrofauna bentônica**. 1998. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HENRIQUE-MARCELINO, R. M.; LOPES, C.F.; MILANELLI, J.C.C.; JOHNSCHER-FORNASARO, G.; MORAES, A.C.; BRUNI, A.C.; CUTRUPI, S. **Macrofauna bentônica de água doce: avanços metodológicos**. São Paulo: CETESB, 1992. 16 p.

HUDSON, L.A.; CIBOROWSKI, J.J.H. Spatial and taxonomic variation in incidence of mouthpart deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae: Chironomini). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 53, n. 2, p. 297-304, 1996.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/237184707_Spatial_and_taxonomic_variation_in_incidence_of_mouthpart_deformities_in_midge_larvae_Diptera_Chironomidae_Chironomini. Acesso em: nov. 2024.

IMBIMBO, H.R.V. **Estudo comparativo da eficácia de dois amostradores de comunidade bentônica no diagnóstico da qualidade d'água do rio Tietê**. 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/34494739_Estudo_comparativo_da_eficacia_de_dois_amostradores_de_comunidade_bentonica_no_diagnostico_da_qualidade_da_agua_do_rio_Tiete. Acesso em: nov. 2024.

IMBIMBO, H.R.V. **Avaliação da qualidade ambiental, utilizando invertebrados bentônicos, nos rios Atibaia, Atibainha e Cachoeira, SP**. 2006. 75 p. + anexos. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41134/tde-16082007-111253/publico/Helio_Rubens_Victorino_Imbimbo.pdf. Acesso em: nov. 2024.

JOHNSCHER-FORNASARO, G.L.; PIVA, S.A.E.; CHEN, Y.P. A comunidade bentônica e a caracterização da qualidade da água de um trecho do rio Atibaia. São Paulo: CETESB, 1979. 31 p. (CETESB, nº 37). Trabalho apresentado no 10^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Manaus, AM, 1979.

JOHNSCHER-FORNASARO, G.; ZAGATTO, P.A. The use of the benthic community as a water quality indicator in the Cubatão river basin. **Water Science & Technology**, London, UK, v. 19, n. 11, p. 107-112, Nov. 1987.

KLEMM, D.J.; LEWIS, P.A.; FULK, F.; LAZORCHAK, J.M. **Macroinvertebrate field and laboratory methods for evaluating the biological integrity of surface waters**.

Cincinnati, US: EPA, 1990. 256 p. (EPA/600/4-90/030). Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30000VCE.PDF?Dockkey=30000VCE.PDF>. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L. **Invertebrados bentônicos e qualidade ambiental**. 2000. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/wp-content/uploads/sites/30/2016/06/Monica_L_Kuhlmann_Bentos_Qual_Ambiental.pdf. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L. **Revisão dos índices da comunidade de macroinvertebrados bentônicos aplicados aos rios e reservatórios do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2022. 372 p. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2022/12/REVISAO-DOS-INDICES-DA-COMUNIDADE-BENTONICA.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L.; HENRIQUE-MARCELINO, R.M.; JOHNSCHER-FORNASARO, G.; ARON, M.; TRUZZI, A.C.; LOPES, C.F.; MILANELLI, J.C.C. **Macrofauna bentônica de água doce: avanços metodológicos II**. São Paulo: CETESB, 1993. 18 p.

KUHLMANN, M.L.; HAYASHIDA, C.Y.; ARAÚJO, R.P.A. Using *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 12, n. 2, p. 55-61, 2000. Disponível em: <https://actalb.org/article/6279b770782aad044755f4f8/pdf/alb-12-2-55.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L.; IMBIMBO, H.R.V.; WATANABE, H.M. **Macrofauna bentônica de água doce: avanços metodológicos III**. São Paulo: CETESB, 2003. 74 p. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/wp-content/uploads/sites/30/2016/06/macrofauna_bentonica_agua_doce_metodologia_III.pdf. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L.; TRUZZI, A.C.; JOHNSCHER-FORNASARO, G. The benthos community of the Billings Reservoir (São Paulo, Brazil) and its use in environmental quality assessment. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, Stuttgart, v. 26, n. 4, p. 2083-87, May 1998.

KUHLMANN, M.L.; TRUZZI, A.C.; LAMPARELLI, M.C.; JOHNSCHER-FORNASARO, G. **A fauna bentônica do complexo Billings (SP)**. São Paulo: CETESB, 1997. 108 p. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/escolasuperior/wp-content/uploads/sites/30/2016/06/fauna_bentonica_Complexo_Billings.pdf. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L.; WATANABE, H.M.; BRANDIMARTE, A.L.; ANAYA, M.; GUERESCHI, R.M. Developing a protocol for the use of benthic invertebrates in São Paulo state's reservoirs biomonitoring: habitat, sampling period, mesh size and taxonomic level - I. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 17, n. 2, p. 143-153, 2005. Disponível em: <https://actalb.org/article/627b113d782aad05cd1891ed/pdf/alb-17-2-143.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

KUHLMANN, M.L.; WATANABE, H.M.; KOBAYASHI, J.T. Estudo da estrutura da comunidade bentônica. In: MOZETO, A.A.; UMBUZEIRO, G.A.; JARDIM, W.F. (ed.). **Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce: projeto QUALISED**. São Carlos: Cubo, 2006. Cap. 5, Parte III, p. 182-189.

KUHLMANN, M.L.; WATANABE, H.M.; ARAÚJO, R.P.A.; LAMPARELLI, M.C. **Aplicação da tríade na avaliação da qualidade de sedimentos em redes de monitoramento**. São Paulo: CETESB, 2007. 107 p. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: nov. 2024.

LECCI, L.S.; FROELICH, C.G. Plecoptera: Ordem Plecoptera Burmeister 1839 (Arthropoda: Insecta). Versão 1B2.0. *In*: FROELICH, C.G. (org.). **Guia on-line: identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo**. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2008. Cap. 2. Disponível em: https://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guia_online/Guia_identifica%C3%A7%C3%A3o_larvas_Plecoptera.pdf. Acesso em: nov. 2024.

MADDEN, C.P.; AUSTIN, A.D.; SUTER, P.J. Pollution monitoring using chironomid larvae: what is a deformity? *In*: CRANSTON, P. (ed.) **Chironomids: from genes to ecosystems**. Melbourne, AU: CSIRO, 1995. Part II, p. 89-100.

MANSUR, M.C.D.; PEREIRA, D. Bivalves límnicos da bacia do rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Unionoidea, Veneroidea e Mytiloidea). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 1123-1147, dez. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbzool/a/zNLXvvh96J9dzRvnYs4H6sb/abstract/?lang=pt>. Acesso em: nov. 2024.

MARCHESE, M.R. Annelida Oligochaeta. *In*: DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDEZ, H.R. (ed.) **Macroinvertebrados bentônicos sudamericanos: sistemática y biología**. Tucumán, AR: Fundación Miguel Lillo, 2009. Cap. 17, p. 551-565.

MARTINS, C.M. **Chave para identificação de moluscos dulcícolas**. São Paulo: CETESB, 2003. 14 p. + fig. Apostila de curso interno CETESB.

MASON, W.T.; YEVICH, P.P. The use of phloxine B and rose bengal stains to facilitate sorting benthic samples. **Trans. Amer. Microsc. Soc.**, Lawrence, v. 86, n. 2, p. 221-223, Apr. 1967.

MAZZINI, F. **Efeitos da resolução taxonômica de invertebrados bentônicos no diagnóstico da qualidade de ecossistemas lóticos**. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/91/91131/tde-22102007-111107/publico/DissertacaoFlaviaMazzini.pdf>. Acesso em: nov. 2024.

MELO, G.A.S. (ed.) **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. São Paulo: Loyola: Museu de Zoologia/USP, 2003. 430 p.

MERRITT, R.W.; CUMMINS, K.W.; BERG, M.B. (ed.) **An introduction to the aquatic insects of North America**. 4th ed. Dubuque: Kendall Hunt, 2008. 1158 p. + 1 CD.

MILBRINK, G.; WIEDERHOLM, T. Sampling efficiency of four types of mud bottom samplers. **Oikos: a journal ecology**, Copenhagen, v. 24, p. 479-482, 1973.

MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J.L.; BAPTISTA, D.F. **Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2009. 176 p.

- NIESER, N.; MELO, A.L. **Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais**: guia introdutório com chave de Identificação para as espécies de Nepomorpha e Gerromorpha. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 1997. 177 p.
- PENNAK, R.W. **Fresh-water invertebrates of the United States**: protozoa to mollusca. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1991. 628 p.
- PES, A.M.O.; HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L. Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 181-204, jun. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbent/v49n2/a02v49n2.pdf>. Acesso em: nov. 2024.
- PIMPÃO, D.M.; MANSUR, M.C.D. Chave pictórica para identificação dos bivalves do baixo Rio Aripuanã, Amazonas, Brasil (Sphaeriidae, Hyriidae e Mycetopodidae). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, set. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/VYwNmbgThc33tqnXpKc6RQb/>. Acesso em: nov. 2024.
- PINHO, L.C. Diptera: ordem Diptera (Arthropoda: Insecta). Versão 1B3.0. *In*: FROEHLICH, C.G. (org.). **Guia on-line**: identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2008. Cap. 5. Disponível em: https://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guia_online/Guia_Diptera.pdf. Acesso em: nov. 2024.
- PINTO, P.; MORAIS, M.; USSEGLIO-POLATERA, P.; FIGUEIREDO, H.D.; MARTINS, A.C.; DUQUE, A.P.; GONÇALVES, C.; SANTO, M.; GUILHERME, P. Seasonal and spatial gradients in the biological and ecological traits of benthic macroinvertebrate communities in Mediterranean rivers in southern Portugal. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, Stuttgart, v. 30, n. 8, p. 1197-1201, Oct. 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321449367_Seasonal_and_spatial_gradients_in_the_biological_and_ecological_traits_of_benthic_macroinvertebrate_communities_in_Mediterranean_rivers_in_southern_Portugal. Acesso em: nov. 2024.
- PIVA, S.A.E. **Projeto rio Sorocaba**: estudos biológicos. São Paulo: CETESB, 1980. 59 p.
- RESH, V.H.; JACKSON, J.K. Rapid assessment approaches to biomonitoring using benthic macroinvertebrates. *In*: ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. (ed.) **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993. Chap. 6, p. 195-233.
- RIGHI, G. Oligochaeta. *In*: SCHADEN, R. (org.). **Manual de identificação de invertebrados límnicos do Brasil**. Brasília, DF: CNPq, 1984. 48 p.
- ROCHA, A.A. **Estudo sobre a fauna bentônica da represa de Americana no estado de São Paulo (BR)**. 1972. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.
- ROCHA, A.A. **A limnologia, os aspectos ecológicos-sanitários e a macrofauna bentônica da represa do Guarapiranga na região metropolitana de São Paulo**. 1976. 194 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976.
- ROCHA, A.A. **A ecologia, os aspectos sanitários e de saúde pública da represa Billings na região metropolitana de São Paulo**: uma contribuição à sua

recuperação. 1984. 166 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

ROLDÁN PEREZ, G. **Guía para el estudio de los macroinvertebrados acuáticos del Departamento de Antioquia**. Bogotá, CO: Presencia, 1996. 226 p. Editor FEN Colombia, Universidad de Antioquia. Disponível em: <https://ianas.org/wp-content/uploads/2020/07/wbp13.pdf>. Acesso em: jan. 2025.

ROQUE, F.O.; BUSS, D.F.; ABES, S.S.; STEFANES, M.; JUEN, L.; SIQUEIRA, T. Insetos aquáticos no âmbito de instrumentos de gestão ambiental: caminhos ainda pouco explorados. *In*: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R.B. (ed.) **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Ed. INPA, 2014. Cap. 8, p. 129- 140. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339746939_Insetos_Aquaticos_na_Amazonia_a_brasileira_taxonomia_biologia_e_ecologia. Acesso em: nov. 2024.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (ed.) **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993. 504 p.

SANSEVERINO, A.M.; NESSIMIAN, J.L. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p. 382-405, 2008. Disponível em: [https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/download/5733/4319#:~:text=A%20investiga%C3%A7%C3%A3o%20de%20assimetria%20flutuante,dos%20mesmos%20\(Silva%20et%20al](https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/download/5733/4319#:~:text=A%20investiga%C3%A7%C3%A3o%20de%20assimetria%20flutuante,dos%20mesmos%20(Silva%20et%20al). Acesso em: nov. 2024.

SEGURA, M.O.; VALENTE-NETO, F.; FONSECA-GESSNER, A.A. Chave de famílias de Coleoptera aquáticos (Insecta) do estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 393-412, mar. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/9hmnQjgrMwDwfrNGjtTHn9b/?lang=pt>. Acesso em: nov. 2024.

SHIMIZU, G.Y.; LAMPARELLI, M.C.; JOHNSCHER-FORNASARO, G.; WATANABE, H.M.; SALVADOR, M.E.P.; COSTA, M.P.; CARVALHO, M.C.; KUHLMANN, M.L.; SOUZA, R.C.R.; BERTOLETTI, E.; ARAÚJO, R.P.A.; BURATINI, S.V.; AGUJARO, L.F.; PRADELLA, D.Z.A.; FIALHO, R.C.; SOUZA, J.B.; BEVILACQUA, J.E.; MENEGON Jr, N.; TRUZZI, A.C.; AVELINO, E.L.; BRANDIMARTE, A.L.; CARVALHO, M.A.J.; SENDACZ, S. **Estudos preliminares para o uso de índices biológicos no biomonitoramento de ambientes aquáticos continentais: riachos e corredeiras da bacia hidrográfica do rio Atibaia**. São Paulo: CETESB, 2002. 85 p. + anexos. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: nov. 2024.

SILVA, E.R. da; SALLES, F.F.; NESSIMIAN, J.L.; COELHO, L.B.N. A identificação das famílias de Ephemeroptera (Insecta) ocorrentes no estado do Rio de Janeiro: chave pictórica para as ninfas. **Boletim do Museu Nacional**, Nova série Zoologia, Rio de Janeiro, n. 508, p. 1-6, ago. 2003. Disponível em: https://www.ephemeroptera-galactica.com/pubs/pub_d/pubdasilvae2003p1a.pdf. Acesso em: jan. 2025.

SILVA, R.M.L. Ephemeroptera: ordem Ephemeroptera (Arthropoda: Insecta). Versão 1B2.0. *In*: FROEHLICH, C.G. (org.). **Guia on-line: identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo**. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2007. Cap.1. Disponível em: https://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guia_online/guia_Ephemeroptera.pdf. Acesso em: nov. 2024.

SIMONE, L.R.L. **Land and freshwater mollusks of Brazil**. São Paulo: EGB: FAPESP, 2006. 390 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267923378_Land_and_Freshwater_Molluscs_of_Brazil. Acesso em: jan. 2025.

SOUZA, L.O.I.; COSTA, J.M.; OLDRINI, B.B. Odonata: ordem Odonata Fabricius, 1793 (Arthropoda: Insecta). Versão 1B2.0. *In*: FROEHLICH, C.G. (org.). **Guia on-line**: identificação de larvas de insetos aquáticos do estado de São Paulo. [Ribeirão Preto: FFCLRP], 2007. Cap. 4. Disponível em: https://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online/Guia_online_Odonata_Vers%C3%A3o_1%C3%9F2.0.pdf. Acesso em: nov. 2024.

STARK, B.P.; FROEHLICH, C.G.; ZÚÑIGA, M.C. **South American Stoneflies (Plecoptera)**. Sofia, Bulgária: Pensoft, 2009. 154 p. (Aquatic Biodiversity in Latin America Series, v. 5).

TRIPLEHORN, C.; JONNSON, N. **Estudos dos insetos**. 2.ed. brasileira. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 766 p. Tradução de 7.ed. do original em inglês.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Ordem Diptera: Família Chironomidae – guia de identificação de larvas. *In*: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R.B. (ed.). **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira**: taxonomia, biologia e ecologia. Manaus: Ed. INPA, 2014. Cap. 26, p. 457-660. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339746939_Insetos_Aquaticos_na_Amazonia_brasileira_taxonomia_biologia_e_ecologia. Acesso em: nov. 2024.

USEPA. Macroinvertebrates. *In*: USEPA. **Biological criteria for the protection of aquatic life**: standardized biological field sampling and laboratory methods for assessing fish and macroinvertebrate communities. Revised June 26, 2015. Ohio, US: EPA, 2015. v. 3, Subsec. 1, p. 1-28. (Ohio EPA Technical Report, EAS/2015-06-01). Disponível em: https://dam.assets.ohio.gov/image/upload/epa.ohio.gov/Portals/35/documents/BioCrit15_Vol3.pdf. Acesso em: nov. 2024.

WARWICK, W.F.; FITCHKO, J.; MCKEE, P.M.; HART, D.R.; BURT, A.J. The incidence of deformities in *Chironomus* spp from Port Hope Harbour, Lake Ontario. **Journal of Great Lakes Research**, Duluth, US, v. 13, n. 1, p. 88-92, 1987.

WASHINGTON, H.G. Diversity, biotic and similarity indices: a review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, London, v. 18, n. 6, p. 653-694, 1984.

WATANABE, H.M. **Bases para a aplicação de índices biológicos no biomonitoramento de ambientes lóticos**: comunidade bentônica. 2007. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41134/tde-20122007-144107/publico/Helena_Mitiko_Watanabe.pdf. Acesso em: nov. 2024.

WIGGINS, G.B. **Larvae of the North American caddisfly genera (Trichoptera)**. 2nd ed. Toronto: UTP, 1998. xiv, 458 p.

ZILLI, F.L.; MONTALTO, L.; MARCHESE, M.R. Benthic invertebrate assemblages and functional feeding groups in the Paraná River floodplain (Argentina). **Limnologia**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 159-171, May 2008.