



NORMA TÉCNICA

L5.309

Mai/2003
16 PÁGINAS

Determinação de bentos de água doce - macroinvertebrados:
métodos qualitativo e quantitativo

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)



**DETERMINAÇÃO DE BENTOS DE ÁGUA DOCE –
MACROINVERTEBRADOS**

**L5.309
maio/03**

MÉTODO QUALITATIVO E QUANTITATIVO

Índice	Página
Introdução.....	1
1.Objetivo.....	2
2.Definições.....	3
3.Coleta de amostras.....	3
4.Preparação de amostras.....	4
5.Análise de amostras.....	5
6.Resultados.....	6
7.Controle de qualidade.....	6
8. Referências bibliográficas.....	8
Anexo A - Equipamentos de coleta.....	9
Anexo B - Ficha de dados brutos Bentos de água doce.....	13
Anexo C - Registro de entrada de amostras.....	14
Anexo D - Registro de preparo de amostras.....	15
Anexo E - Registro de acompanhamento analítico.....	16

Introdução

São considerados organismos bentônicos todos aqueles que habitam o fundo de ecossistemas aquáticos, podendo ocorrer enterrados ou sobre o substrato, fixos ou móveis. Essas formas incluem fungos, bactérias, algas, plantas aquáticas superiores, animais invertebrados e vertebrados, que podem ser encontrados no ambiente natural e em sistemas de transporte e armazenamento de água. A comunidade macrozoobêntica, objetivo desta norma, compreende os animais invertebrados retidos em peneira com abertura de malha de 0,5mm, que vivem pelo menos parte de suas vidas no ambiente aquático

bentônico e se compõem principalmente de vermes anelídeos, moluscos, crustáceos e larvas e ninfas de insetos.

Os macroinvertebrados bentônicos são membros importantes da cadeia alimentar e têm papel funcional nos ecossistemas aquáticos ao participarem dos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes. Alguns de seus elementos, que trabalham mais ativamente as camadas de sedimento, têm sido responsabilizados em parte pela redistribuição de nutrientes e contaminantes do sedimento para a coluna d'água, em um processo conhecido como biorrevolvimento.

A comunidade bentônica é bastante sensível às tensões promovidas por poluição e às modificações físicas de ecossistemas aquáticos (ex.: desmatamento, extração de areia, construção de barragens), de forma que tem sido amplamente usada em estudos de diagnóstico ambiental e em programas de biomonitoramento. A baixa ou nenhuma motilidade de seus componentes permite que as medidas obtidas possam ser relacionadas mais precisamente com a qualidade do local de amostragem. Além disso, sua relação íntima com os sedimentos e a extensão de seus ciclos de vida fazem com que uma avaliação da qualidade do meio por meio dessa biota ganhe uma perspectiva histórica, já que suas respostas refletem as condições do ambiente por um maior período de tempo e não apenas no momento da coleta. Assim, são bons indicadores para o policiamento de despejos intermitentes, contínua disposição de contaminantes em baixas concentrações e alterações físicas da bacia, condições essas não necessariamente detectáveis por avaliações puramente químicas.

A análise do bentos aplica-se:

- a) À programas de monitoramento e caracterização ecológica de mananciais. Esses estudos visam o levantamento da comunidade bentônica e de suas variações sazonais e espaciais.
- b) À avaliação da qualidade da água e de sedimentos, tanto em ambientes lênticos (lagos e reservatórios) quanto lóticos (riachos e rios).
- c) Aos estudos de problemas de saúde pública relacionados à população de insetos, moluscos ou outros organismos aquáticos que possam ser vetores de agentes patogênicos ao homem e a animais domésticos.
- d) Ao diagnóstico *in situ* sobre a natureza, a extensão e os efeitos de poluição por esgotos domésticos e/ou despejos industriais.
- e) À definição de gradientes de auto-depuração em rios e outros corpos d'água.
- f) À aqüicultura, uma vez que organismos bentônicos podem ser predadores de alevinos e importante item na dieta de várias espécies de peixes e crustáceos de importância econômica.

1. Objetivo

Esta norma descreve os procedimentos para análise de macroinvertebrados bentônicos de ecossistemas límnicos, incluindo a coleta, a preparação da amostra, a análise e uma introdução ao tratamento de dados.

2. Definições

2.1. Límnico: Relativo ao ambiente das águas doces.

2.2. Intermitente: Que apresenta interrupções ou suspensões; não contínuo.

2.3. *in situ*: No local.

2.4. Auto-depuração: Capacidade de um corpo d'água ser purificado da poluição orgânica através da atividade de sua flora bacteriana.

2.5. Alevinos: Formas jovens de peixes.

2.6. Método “kick”: Método de amostragem de bentos em ambientes lóticos rasos que consiste no deslocamento do material de fundo por meio de chutes, o que provoca o desalojamento dos organismos aderidos ou ocultos sob o substrato. Os organismos são capturados em redes colocadas contra-corrente e em frente à área de amostragem.

2.7. Sobrenadante: O que flutua.

3. Coleta de Amostras

O método de coleta varia de acordo com o ambiente a ser amostrado e os objetivos do trabalho.

Existem basicamente quatro tipos de equipamentos de amostragem para a comunidade bentônica. Os mais usuais são apresentados no **ANEXO A**:

a) **Redes:** Redes de formato retangular (rede de espera para coleta de deriva), triangular (rede para amostragem “kick”, circular (rede manual para coleta em vegetação marginal e sob macrófitas flutuantes) ou semi-circular (“D-frame”), com abertura de malha de 0,5mm, empregadas na amostragem de dados qualitativos ou semi-quantitativos. No segundo caso, o esforço amostral, medido temporal ou espacialmente, deve ser padronizado. Usadas em banco de macrófitas e riachos rasos no método “kick”.

b) **Delimitadores:** Compostos de rede associada a um delimitador de área, circular (ex.: Hess) ou retangular (ex.: Surber), empregados na amostragem de dados quantitativos. Usados em riachos rasos com fundo de cascalho a areia grossa.

c) **Pegadores:** Equipamentos construídos em aço inoxidável, que capturam amostras de sedimento por mecanismo de apreensão engatilhado por mensageiro (ex.: Ekman-Birge) ou não (ex.: Petersen, van Veen e Ponar). Usados em amostragem quantitativa de rios profundos, lagos e reservatórios. O pegador Ekman melhor se adequa à coleta de amostras da região profundal de ambientes lênticos e os pegadores Petersen, van Veen e Ponar à ambientes lóticos e à região sub-litoral de ambientes lênticos.

d) Substratos artificiais: Cestos preenchidos com pedras do tipo brita, usados para amostragem semi-quantitativa, em locais em que seja impossível o uso de outro tipo de amostrador (ex.: em lajes) ou como técnica padronizada em programas de monitoramento.

Na amostragem do bentos devem ser coletadas no mínimo 3 réplicas (idealmente 5) por ponto de coleta. Cada réplica é constituída de uma passagem de rede, uma lavagem de área delimitada, uma pegada ou um cesto.

No uso de substratos artificiais, na retirada do cesto da água deve-se ter o cuidado de utilizar uma rede sob o cesto ou envolvê-lo com o saco plástico, antes de sua passagem pela superfície, já que nesse processo podem-se perder organismos pela lavagem.

Na coleta com pegadores, os sacos que acondicionarão a amostra devem ser colocados sob o equipamento assim que este for içado. A amostra deve ser rejeitada quando o pegador não fechar completamente, vier muito vazio ou transbordando de lodo. Amostras ideais são aquelas em que 1/2 a 2/3 do pegador esteja preenchido com sedimento e que contenha água de fundo.

Em campo, a amostra deve ser acondicionada em saco plástico resistente, se possível, revestido com um segundo saco devidamente etiquetado por fora (etiqueta de papel escrita com caneta ou lápis resistente à água) e por dentro (etiqueta de papel vegetal escrita a lápis), contendo as seguintes informações: nome ou código do projeto; local; habitat; data e ponto de coleta, número da réplica e número da amostra.

As amostras devem ser imediatamente preservadas com formaldeído 40% neutralizado (com bicarbonato de sódio ou borax – borato de sódio), em volume suficiente para que a concentração final na amostra seja de 4 a 10%. Em estudos que pretendam identificar com maior detalhe as sanguessugas (Hirudinea), pode-se utilizar um relaxante (água gaseificada) antes do fixador.

Os sacos devem ser lacrados com fitas adesivas, de forma a impedir vazamento e perda de parte ou de toda a amostra. No transporte, as amostras devem ser acondicionadas lado a lado, de preferência dentro de caixas plásticas, tendo-se o cuidado de não colocar peso sobre os sacos com as amostras, para prevenir vazamento ou rompimento dos sacos.

Após coleta, uma amostra de pegador pode ser armazenada, de preferência refrigerada, por um tempo máximo de 24:00h antes de sua preparação.

4. Preparação de Amostras

A preparação da amostra pode envolver os processos de lavagem, conservação, flutuação e aplicação do corante. Na lavagem, o material grosseiro (galhos, folhas e pedras) pode ser retirado após análise minuciosa para retirada de organismos presos. Após lavagem, as amostras devem ser acondicionadas em potes de vidro devidamente etiquetados, interna e externamente, como descrito no item 3. Cada pote deve ser preenchido com, no máximo, 1/2 do volume da amostra e 1/2 do conservante. Quando a amostra preencher mais de um pote, na etiqueta deve ser registrado o número do pote/total de potes (ex.: 1/3, 2/3 e 3/3).

Amostras obtidas com redes e delimitadores devem ser apenas lavadas em rede com abertura de malha de 0,5mm.

Para amostras obtidas com substrato artificial, as pedras devem ser deixadas, por aproximadamente 00:15h, em baldes contendo solução desprendedora de organismos (7L de água de torneira + 210mL de álcool etílico comercial + 10mL de ácido clorídrico). A água coletada junto com o substrato e a solução devem ser então passadas em rede com abertura de malha de 0,5mm.

As amostras coletadas com pegadores devem ser lavadas em rede com abertura de malha de 0,5mm. Quando contiverem muito material inorgânico grosseiro (cascalho e/ou areia grossa e/ou areia média), deverão passar pelo processo de flutuação com sal de cozinha. Nesse método, a amostra deve ser lavada em rede com malha de abertura de 0,5mm e colocada em um recipiente largo (ex.: bandeja). Sobre a amostra coloca-se uma solução saturada de sal de cozinha. A amostra deve ser então mexida e o sobrenadante passado pela rede, tomando-se o cuidado de guardar a solução em outro recipiente. O material retido na rede deve ser imediatamente lavado com água de torneira para se evitar o murchamento dos organismos. O procedimento deve ser repetido por pelo menos três vezes ou até que o material orgânico tenha sido totalmente separado do inorgânico. Por último, o resíduo é lavado com água de torneira. De preferência a flutuação deve ser realizada pouco antes da análise, com o material já corado, para evitar perdas de organismos. O resíduo de material inorgânico deve ser analisado a olho nu para coleta de organismos mais pesados (moluscos e tricópteros) que eventualmente não tenham flutuado. Só então esse material pode ser descartado.

Todas as amostras devem ser conservadas em etanol 70°GL e coradas com cerca de 10mL de solução de rosa de bengala (1g/1000mL de álcool etílico comercial) para cada frasco de 500mL.

Após a preparação, a amostra pode ser conservada por longo período (anos), desde que seja mantida em local fechado, ao abrigo de luz, e feita manutenção periódica (anual), com troca do conservante e corante.

5. Análise de Amostras

A análise das amostras compõe-se das atividades de triagem, identificação e contagem de organismos.

A triagem, que consiste na separação dos organismos dos detritos, pode ser processada a olho nu, com o material disposto em bandeja plástica de fundo branco. A triagem a olho nu sempre deve ser realizada no resíduo de amostras flutuadas e pode ser realizada, em campo ou laboratório, como triagem prévia em amostras que apresentem muito material vegetal grosseiro e/ou abundância de organismos de maior porte.

Uma triagem mais fina deve ser realizada sob estereomicroscópio (ou lupa). Uma pequena fração da amostra deve ser colocada, juntamente com um pouco de álcool 70°GL, e homogeneamente espalhada, em uma placa de Petri descartável com fundo quadriculado (de 0,5 a 1cm), que auxiliará na certificação

de que todo o material foi examinado. Pode-se também juntar a fração de amostra em um lado da placa, separando para o lado oposto o material já triado. Neste caso é preciso precaução no escape de organismos pelas bordas. Os organismos capturados são armazenado em frascos de vidro preenchidos com álcool 70°GL, devidamente etiquetados, interna e externamente (**ver item 3**).

A identificação e contagem de organismos pode se dar posterior ou concomitantemente à triagem e requer chaves de identificação específicas. A identificação e contagem de organismos deve ser registrada em ficha de dados brutos (**ANEXO B**).

6. Resultados

Se a análise for quantitativa, após o término da contagem e identificação deve ser feito o cálculo do número de indivíduos por unidade de área (ind./m²). Para tanto, é necessário o conhecimento da área do amostrador utilizado e a transformação seguirá uma regra de três.

Por exemplo, em uma amostra obtida com o auxílio de um pegador Ekman-Birge com 15,2cm de lado, em que foram encontrados dois Oligochaeta, *Limnodrilus hoffmeisteri*, os cálculos serão:

$$\text{Área do pegador (A)} = 15,2\text{cm} \times 15,2\text{cm} = 231,04\text{cm}^2 = 0,0231\text{m}^2$$

$$\text{Número de } \textit{Limnodrilus hoffmeisteri} / \text{m}^2 = (2 \textit{Limnodrilus hoffmeisteri} \times 1\text{m}^2) / 0,0231\text{m}^2 = 87 \text{ ind./m}^2.$$

Os resultados de amostras semi-quantitativas obtidas com substrato artificial são expressos em termos de número de indivíduos por cesto (ind./cesto).

Em análises qualitativas, indica-se apenas a relação dos *taxa* encontrados na amostra.

Para amostragens quantitativas e semi-quantitativas, o cálculo de índices comumente utilizados no diagnóstico da qualidade dos ambientes aquáticos, deve-se processar sobre o número médio de organismos encontrados nas réplicas.

7. Controle de Qualidade

O controle de qualidade analítica compreende vários procedimentos que devem garantir a confiabilidade e o rastreamento do dado.

7.1. Etiquetagem de Sacos Plásticos e Frascos

Todos os recipientes que acondicionarem toda ou parte da amostra devem receber etiquetas externas, escritas com tinta resistente a água e álcool, e internas, escritas a lápis em papel vegetal. Ambas devem apresentar as seguintes informações:

- Projeto: Título ou Código;
- Local: Nome do manancial;
- Ponto de coleta: Número do ponto e/ou Identificação da região de amostragem (ex.: sub-litoral ou

profundal para reservatórios; margem deposicional, erosional, canal ou corredeira para rios e riachos);

- Número da amostra (am. XXXX);
- Número da réplica (R1, R2, R3,...);
- Data de coleta (dia/mês/ano);
- Numeração do pote, no caso de a amostra ter sido dividida em vários potes: ex.: 1/3; 2/3; 3/3, em que o número após a barra indica o total de potes que representa toda a amostra.

Amostras para retriagem devem também ser identificadas, por meio de etiqueta, com a palavra RETRIAGEM.

Frascos com organismos devem receber na etiqueta, além das informações acima, o nome do *taxa*.

7.2. Registros

O resultado da análise é registrado em FICHAS DE DADOS BRUTOS (**ANEXO B**), preenchidas com caneta resistente a água e a álcool. Correções efetuadas após retriagem, recontagem e reidentificação dos organismos são anotadas na mesma ficha, obedecendo a códigos contidos em observação de rodapé das próprias fichas.

Para possibilitar o rastreamento de amostras, dados sobre os procedimentos são anotados em três cadernos de registro:

- REGISTRO DE ENTRADA DE AMOSTRAS (ANEXO C);
- REGISTRO DE PREPARO DE AMOSTRAS (ANEXO D);
- REGISTRO DE ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO (ANEXO E).

7.3. Avaliação do Procedimento de Triagem

As amostras triadas devem ser guardadas para que, no final de cada projeto, seja realizada uma avaliação do analista. 10% das amostras triadas por cada analista deve ser retriada, recontada e reidentificada por outro profissional. Perdas iguais ou superiores a 5% na demanda total de organismos devem exigir continuidade de revisão de mais 10% das amostras analisadas e assim por diante, até que se atinjam perdas inferiores a 5%.

7.4. Coleção para Identificação e Catálogo de Organismos

Na verificação da identificação dos organismos, devem ser mantidos para cada projeto, espécimens-referência preservados em álcool 70°GL, periodicamente conferidos para evitar evaporação e consequente perda do material. Os frascos com espécimens-referência devem receber etiquetas como acima descritas. A identificação desses espécimens-referência deve ser confirmada por taxonomista especialista.

Além disso, registros fotográficos e gráficos, acompanhados de informações sobre a biologia dos organismos, podem ser organizados como catálogos, de forma a possibilitar a contínua atualização de informações e inserção de novo material.

8. Referências Bibliográficas

BARBOUR, M.T., GERRITSEN, J., SNYDER, B.D. & STRIBLING, J.B.. **Revision to rapid bioassessment protocols for use in streams and rivers: Peryphyton, benthic macroinvertebrates, and fish.** Washington D.C., U.S.E.P.A. EPA 841/D-97/002. 1997.

EPA/OHIO. **Biological criteria for the protection of aquatic life: Volume II: Users manual for biological field assessment of Ohio surface waters.** Surface Water, Section, Division of Water, Quality Monitoring and Assessment, Columbus. 1987.

GERRITSEN, J., CARLSON, R.E., DYCUS, B.L., FAULKMER, C., GIBSON, J.R., HARCUN, J. & MARKOWITZ, S.A.. **Lake and reservoir bioassessment and biocriteria – technical guidance document.** Washington D.C., U.S.E.P.A., Office of Water. EPA 841/B-98/007. 1999.

GERRITSEN, J., JESSUP, B., LEPPON, E.W. & WHITE, J.. **Development of lake condition indexes (LCI) for Florida.** Report prepared for Florida Department of Environmental Protection by Tetra Tech, Inc., Owings Mills, MD. 2000.

GIBBONS, W.N., MUNN, M.D. & PAINE, M.D.. **Guidelines for monitoring benthos in freshwater environments.** Report prepared for Environment Canada, North Vancouver, B.C. by EVS Consultants, North Vancouver, B.C. 81p..1993.

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, Relatório Técnico, 16p. + Anexos. 1992.

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, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA/600/4-90/030. 256p. 1990.

PLAFKIN, J.L., BARBOUR, M.T., PORTER, K.D., GROSS, S.K. & HUGHES, R.M.. **Rapid bioassessment protocols for use in streams and rivers: Benthic macroinvertebrates and fish.** Washington D.C., USEPA. 1989.

ROSENBERG, D.M., DAVIES, I.J., COBB, D.G. & WIENS, A.P.. **Protocols for measuring biodiversity: Benthic macroinvertebrates in freshwaters.** Winnipeg, University Crescent, Department of fisheries and oceans, freshwater institute. 1997.

WATANABE, S. (coord.) **Glossário de ecologia.** 2ª ed. São Paulo, CNPq/FINEP/ACIESP. Publ. ACIESP n:103, 352p. 1997.

.../Anexo A

ANEXO A - EQUIPAMENTOS DE COLETA



DELIMITADOR HESS



REDE MANUAL



PEGADOR PETIT PONAR



PEGADOR VAN VEEN



PEGADOR EKMAN-BIRGE MOD. LENZ



EKMAN – BIRGE PADRÃO



PEGADOR PETERSEN MODIFICADO



SUBSTRATO ARTIFICIAL

.../Anexo B

ANEXO B - FICHA DE DADOS BRUTOS BENTOS DE ÁGUA DOCE

Projeto:**Local:****Ponto:****Data de coleta:****Nº da amostra/réplica:****Profundidade:****Equipamento (tipo/área de amostragem):****Fator (para ind./m²):****Coletores:****Data de entrada:****Malha:****Flutuação:** s n **Corante:** s n **Triagem prévia a olho nu:** s n **Sub-amostragem:****Triagem*:****Retriagem*:****Identificação e Contagem*:****Revisão de Ident. e Cont.*:**

TAXA	CONTAGEM	TOTAL

+ X = resultado da retriagem; (X) = resultado da recontagem/reidentificação

* nome e rubrica do técnico responsável.

Observações:

.../Anexo C

ANEXO C - REGISTRO DE ENTRADA DE AMOSTRAS

Cliente	Nº da amostra	Tipo de análise ¹	Projeto	Data de coleta	Manancial	Ponto de coleta	Répl- ca	Amostrador (tipo e área de amostragem)	Prof. (m)	Data de entrada	Técnico responsável	Observa- ção

.../Anexo D

¹ = CP = comunidade, com pegador; CS = comunidade, com substrato artificial; CR = comunidade, com rede; I = identificação de organismos

ANEXO D - REGISTRO DE PREPARO DE AMOSTRAS

Nº da amostra	Projeto	Data de coleta	Réplica	Malha de lavagem	Solução ácida ¹	Corante (s/n)	Flutuação (s/n)	Características (cor, odor, textura)	Nº de potes	Preparo	Técnico responsável	Observação

.../Anexo E

¹ Solução desprendedora de organismos do substrato artificial

ANEXO E - REGISTRO DE ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO

Nº da amostra	Projeto	Data de coleta	Ponto de coleta	Réplica	Triagem	Retriagem*	Identificação e contagem*	Reidentificação e Recontagem*	Emissão de boletim	Pág.	Observação

* = Técnico responsável e data de início