

# **METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS DE MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS EM RIACHOS**

*M. P. Silveira, J. Ferraz, R. C. Boeira  
Embrapa Meio Ambiente  
Caixa Postal 69 – Jaguariúna, SP, Brasil - CEP: 13820 - 000*

## **RESUMO**

Há uma crescente demanda por avaliações e monitoramento de recursos hídricos devido à preocupação mundial com sua escassez e o comprometimento da qualidade da água. Embora o biomonitoramento e o uso de macroinvertebrados sejam ferramentas utilizadas desde o início do século XX na Europa (Kolkwitz & Marsson, 1909) e América do Norte (Rosenberg & Resh, 1993), no Brasil esta técnica tem apenas algumas décadas e não existem publicações de protocolos específicos para a coleta de macroinvertebrados em rios tropicais. Por ser uma metodologia de baixo custo e de aparato técnico simples, é interessante que se estabeleça um protocolo padrão para utilização em riachos nos países em desenvolvimento.

O presente trabalho tem como objetivo descrever detalhadamente uma metodologia para o preparo e conservação em laboratório de amostras de macroinvertebrados obtidas em riachos tropicais para a avaliação da qualidade da água. Tal metodologia pode ser útil para laboratórios que estejam se iniciando nesta atividade, bem como para estudantes de áreas ambientais.

## **MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS**

O uso de bioindicadores é bastante amplo e sua aplicação vai desde a verificação de normas de qualidade por indústrias até na elaboração de legislação específica para o controle de poluição (MacDonald & Smart, 1993). Ademais, o uso de indicadores tem sido frequentemente incorporado em políticas e regulamentações a fim de se monitorar a integridade ecológica de bacias hidrográficas (Moyle & Rendall, 1998).

A avaliação clássica da qualidade de águas continentais é tradicionalmente realizada por meio de parâmetros físico-químicos. No entanto, a avaliação biológica tem sido cada vez mais utilizada, em complementação à análise físico-química, em virtude de inúmeras vantagens (ecológicas e econômicas). O biomonitoramento de corpos hídricos através do uso de macroinvertebrados bentônicos é o melhor exemplo dessas vantagens. Estes organismos constituem um grupo bastante diverso e cosmopolita, sendo sensíveis a vários tipos de poluentes e distúrbios físicos (processos de erosão e assoreamento, por exemplo); sua coleta é de baixo custo e requer aparelhagem simples e barata; são visíveis a olho nu, facilitando a coleta e a identificação das espécies; devido ao fato de estarem associados ao sedimento e a serem relativamente sésseis, podem registrar um tempo maior de impactos do

que na avaliação físico-química, servindo como testemunhas tanto de impactos recentes como de médio prazo (Metcalf, 1989).

## **EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS DE COLETA**

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

Para rios de pequeno porte (até 3ª ordem), como córregos e nascentes, o amostrador do tipo Surber é o mais indicado. Em geral, a área amostrada é de 900cm<sup>2</sup> e a malha coletora usada é de 250µm. Também podem ser usados os coletores puçá e rede de deriva (Figura 1).

- a) Para a coleta com Surber, o procedimento é feito da seguinte forma: posicionar o Surber contra a correnteza, e fixar a área de amostragem no leito do rio;
- b) recolher com a mão, ou com a ajuda de uma pequena escova (no caso, por exemplo, de coleta de perifiton aderido a rochas) todo o substrato contido dentro da área de 900cm<sup>2</sup> para dentro da rede coletora;
- c) transferir, o material recolhido para sacos plásticos (40,5 x 60 cm);
- d) verificar cuidadosamente se nenhum animal ficou preso na rede;
- e) fixar em álcool a 70% todos os animais coletados;
- f) fechar os sacos plásticos com um nó simples, e acondicioná-los em baldes plásticos.

Em geral, nos riachos há quatro tipos principais de substrato disponíveis: folhiço retido em áreas de correnteza; folhiço retido em áreas de remanso ou folhiço de fundo; pedra (com detritos vegetais aderidos e/ou perifiton); e sedimento não consolidado (areia, silte, cascalho). Recomenda-se a coleta de no mínimo três amostras para cada tipo de substrato, de modo que, neste caso, é obtido um conjunto de 12 amostras (4 substratos com 3 repetições) por ponto de coleta. Portanto, ao se colocar as amostras em baldes, deve-se separar um balde para cada ponto de coleta. Este balde deve ser etiquetado, identificando-se o local de coleta, o coletor e a data. A seguir são descritas as especificações das etiquetas utilizadas nas amostras e nos baldes.

## **ETIQUETAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS**

A identificação das amostras é importante. As etiquetas de identificação das amostras de substratos deverão ser confeccionadas com papel-vegetal ou papel-manteiga

(resistente à água, álcool e abrasão) e identificadas com lápis ou lapiseira, pois o trabalho com água impede o uso de canetas esferográficas, cuja tinta pode borrar ou manchar. O tamanho da etiqueta deverá ser de 2,5 x 5,0 cm.

A etiqueta deverá conter: o ponto de coleta; o tipo de substrato amostrado com a identificação de sua réplica (A, B ou C) e a data de coleta. Para que a etiqueta seja facilmente encontrada dentro do saco, sugere-se que sejam colocadas dentro de pequenos frascos plásticos transparentes com tampa (3,0 ml) , e só então colocadas nos sacos.

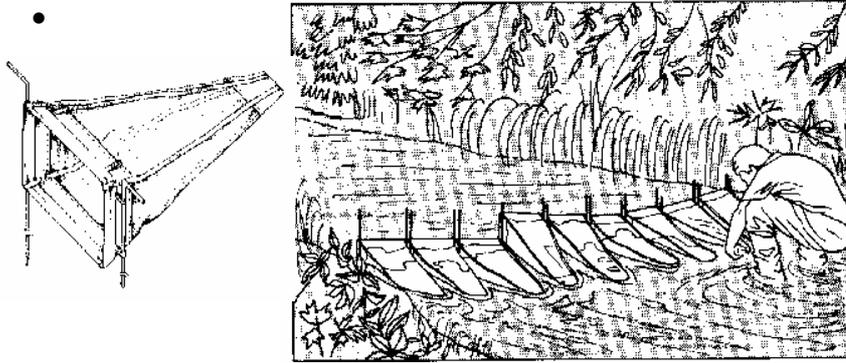
Exemplo de etiqueta:

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

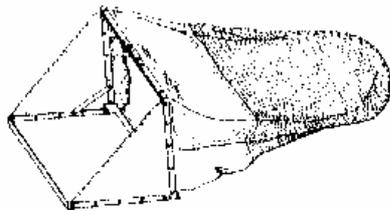
M1 – FCA 02/2003
---------------------

A identificação dos baldes pode ser feita com caneta usada para retroprojeter (não apaga com a água). Nos baldes devem estar inscritos o ponto de coleta amostrado, a data de coleta e o coletor.

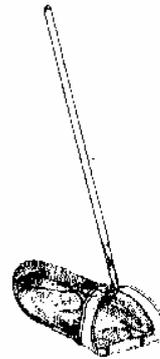
As amostras podem ser transportadas até o laboratório à temperatura ambiente.



Rede de deriva



Surber



Puçá

Figura 1- Coletores usados em ambientes lóticos.

## **PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO**

As etapas após a entrada das amostras no laboratório são as seguintes: lavagem, flutuação (ou pré-triagem), triagem e identificação dos organismos. Todas as etapas podem ser realizadas no mesmo espaço físico, mas é aconselhável que as etapas de triagem na lupa estereoscópica e a identificação sejam realizadas numa sala específica para tal procedimento.

### **Lista de material necessário**

- lupa estereoscópica Hund® com aumento de 450 vezes
- pinças de relojoeiro tamanho AA de aço inoxidável
- placas de Petri
- álcool a 80%
- frascos de plástico transparentes de 3,0 ml para colocação dos macroinvertebrados
- potes de vidro ou plástico (500 ml) para colocação dos frascos com os espécimes
- chaves taxonômicas (Angrisano, 1995; Fernández & Domínguez, 2001, Nieser & de Melo, 1997, Carvalho & Calil, 2000; Merritt & Cummins, 1996)
- bandejas plásticas translúcidas acopladas à lâmpadas fluorescentes
- açúcar

### **Lavagem das amostras**

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

No laboratório deve-se: retirar os substratos amostrados (folhas, pedras, galhos, perifiton, algas) dos sacos plásticos e colocá-los em um sistema com duas peneiras metálicas vazadas acopladas (25 cm de diâmetro x 10 cm de altura cada uma), sendo que a de cima é revestida com uma malha de mesmo tamanho daquela usada no coletor Surber (250µm). Usar água corrente de pia para lavagem. O objetivo desta etapa é separar o material grosseiro (folhas grandes, galhos ocos, pedras) do material mais particulado, de modo a facilitar a triagem posterior dos macroinvertebrados.

### **Flutuação de organismos em solução de açúcar**

Após a lavagem, colocar o restante da amostra em bandejas plásticas translúcidas com capacidade para 3 litros, na qual já deve estar preparada uma solução supersaturada de açúcar (500 gramas de açúcar para 2 litros de água comum). Este procedimento tem como objetivo fazer os macroinvertebrados mais leves flutuarem, por serem menos densos do que a solução supersaturada. Esta etapa tem também como objetivo facilitar e otimizar a

triagem na lupa estereoscópica, pois os espécimes maiores e mais leves (ninfas de Odonata e Plecoptera, larvas de Megaloptera, por exemplo) irão flutuar, enquanto que moluscos com concha (Gastropoda e Bivalvia, por exemplo) irão para o fundo da bandeja. Desse modo, a flutuação serve como uma pré-triagem dos organismos bentônicos.

Os animais que flutuaram devem ser retirados com uma pinça cirúrgica ou de relojoeiro AA ou Número 02 de aço inoxidável, e colocados em frascos de vidro transparente de 200 ml com álcool a 80% e etiquetados (etiquetas semelhantes às usadas nos sacos plásticos para coleta). Os vidros deverão ser guardados em uma estante ou armário à temperatura ambiente e agrupados de acordo com o ponto de coleta ao qual pertencem. O restante da amostra (o que não flutuou e o restante do substrato lavado), deverá ser colocado em vidros maiores (de 500 ml aproximadamente) com álcool a 80% e etiquetados, devendo ser guardados em estantes ou armários à temperatura ambiente. Os vidros de 500 ml deverão ser etiquetados com a identificação do ponto de coleta, o tipo de substrato da amostra, o número de sua réplica e data da coleta. Os frascos de 500 ml poderão ser separados por ordens de macroinvertebrados.

### **Triagem e identificação dos organismos**

A etapa da triagem final (na lupa estereoscópica) é a da identificação dos macroinvertebrados. A triagem ao nível taxonômico de ordem pode ser feita por um técnico após treinamento para reconhecimento dos principais grupos de macroinvertebrados. No entanto, é aconselhável que um especialista reveja a amostra para verificar se todos os organismos foram triados. O técnico poderá se orientar com o auxílio de uma pequena cartilha com fotos ou desenhos das principais ordens de macroinvertebrados, acompanhada de algumas das principais características morfológicas de cada ordem (Anexo 1). Para esta primeira etapa de identificação, o nível de separação por ordens de macroinvertebrados é suficiente.

O restante da amostra e os organismos triados na etapa de flutuação deverão ser examinados em uma lupa estereoscópica (Hund®) com aumento de até 450 vezes. A triagem e identificação dos macroinvertebrados são feitas colocando-se um pouco da amostra, diluída em água comum, em placas de Petri, e então os organismos deverão ser coletados com uma pinça cirúrgica ou de relojoeiro No. 02 tamanho AA de aço inoxidável. Este procedimento deve ser realizado até que toda a amostra seja examinada. Os organismos pinçados são então colocados em pequenos frascos plásticos ou de vidro transparente de 3,0 ml etiquetados e conservados em álcool a 80%. Dentro destes vidros deverá ser colocada uma etiqueta feita com papel vegetal e à lápis deverá ser escrito o ponto de coleta, a identificação da amostra (tipo de substrato, número da réplica) e a data.

A etapa de identificação em nível taxonômico menor do que ordem deve ser feita por especialistas. Os macroinvertebrados deverão ser identificados até o menor nível taxonômico possível, com auxílio de chaves taxonômicas. Exemplos: Angrisano (1995), Fernández & Domínguez (2001), Merritt & Cummins (1996), Nieser & de Melo (1997), e Carvalho & Calil (2000).

Para as análises estatísticas, como, por exemplo, a Análise de Correspondência e o Teste de Mantel, pode ser usado o sistema de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), o qual considera os diferentes organismos como um táxon, independentemente do nível de identificação (família, gênero ou espécie). Através do sistema de UTOs, todos os táxons são tratados de maneira uniforme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angrisano, E. B. 1995. Insecta Trichoptera, pp. 1199-1237. **In** E. C. Lopretto & G. Tell (eds.), *Ecosistemas de Aguas Continentales: metodologias para su estudio*, vol. III, Ediciones Sur, La Plata, Argentina. Xvii + 897-1401p.
2. Carvalho, A. L. & E. R. Calil. 2000. Chaves de identificação para as famílias de Odonata (Insecta) ocorrentes no Brasil, adultos e larvas. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 41(15): 223-241.
3. Fernández, H. R. & E. Domínguez. 2001. Guía para la Determinación de los Artrópodos Bentónicos Sudamericanos. Fernández, H. R. & E. Domínguez (eds.). Editorial Universitaria de Tucumán. Argentina. 282p.
4. Karr, J. R. & D. R. Dudley. 1981. Ecological Perspective on Water Quality Goals. *Environmental Management*, 5(1): 55-68.
5. Kolkwitz, R. & M. Marsson. 1909. Ökologie der pflanzlichen Saprobien. *Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft* 26A: 505-519.
6. MacDonald, L. H. and A. Smart. 1993. Beyond the guidelines: Practical lessons for monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 26: 203-218.
7. Merritt, R. W. & K. W. Cummins (eds.) 1996. An introduction to the aquatic insects of North America, 3<sup>rd</sup> edition. Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, IA. 862p.
8. Metcalfe, J. L. 1989. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental Pollution*, 60: 101-139.
9. Moyle, P. B. and P. J. Rendall. 1998. Evaluating the biotic integrity of watersheds in the Sierra Nevada, California. *Conserv. Biol.*, 12: 1318-1326.
10. Nieser, N. & A. L. de Melo. 1997. Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais. Editora UFMG. Belo Horizonte, 180 p.
11. Parsons, T. R., Y. Maita & C. M. Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods
12. Rosenberg, D. M. & V. H. Resh. 1993 (eds.). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York. 448p.

**ANEXO 1**  
**CHAVE PICTÓRICA DAS PRINCIPAIS ORDENS DE INSETOS AQUÁTICOS**

**ORDEM EPHEMEROPTERA**

Características morfológicas das ninfas (estágio imaturo):

- geralmente dois ou três cercos (filamentos caudais), achatados ou em forma de dedo;
- brânquias no abdômen;
- uma garra no final de cada perna.

OBS: as ninfas podem ser bastante achatadas ou mais cilíndricas. Os adultos são terrestres.



Figura 1- Família Leptophlebiidae.  
Fonte: [www.dec.state.ny.us/website/dow/stream/ephfamtri.jpg](http://www.dec.state.ny.us/website/dow/stream/ephfamtri.jpg)



Figura 2- Família Baetidae.  
Fonte:  
[www.waterbugkey.vcsu.edu/.../EphemMainKey/Baetidae-side.jpg](http://www.waterbugkey.vcsu.edu/.../EphemMainKey/Baetidae-side.jpg)

## ORDEM PLECOPTERA

Embora este grupo de insetos seja à primeira vista parecido com as ninfas de Ephemeroptera, suas ninfas apresentam algumas diferenças:

- sempre possuem dois cercos (nunca três);
- geralmente não possuem brânquias abdominais (algumas ninfas têm brânquias em forma de dedo no tórax ou na base de cada perna;
- possuem duas garras no final de cada perna (Figura 3).

OBS: assim como as ninfas de Ephemeroptera, a maioria das ninfas de Plecoptera são achatadas. Os adultos são terrestres.

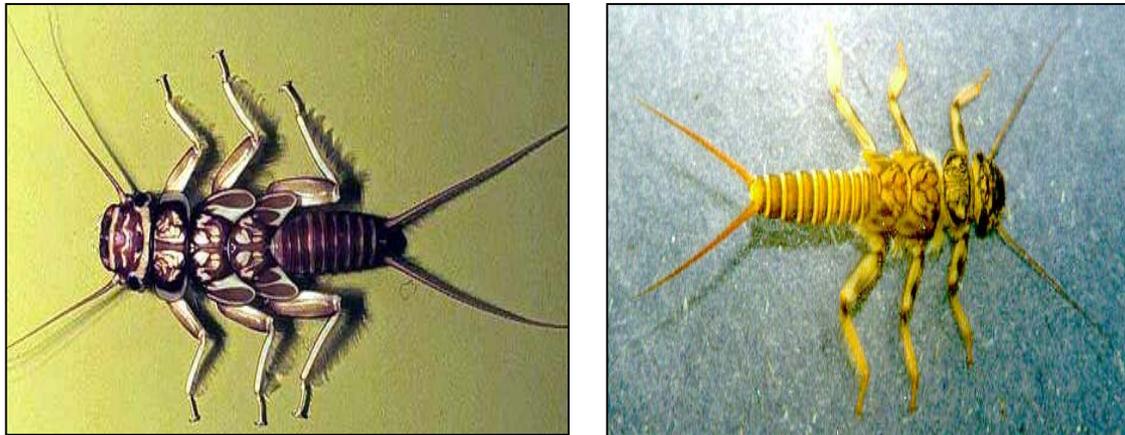


Figura 3- Família Perlidae.  
Fonte: [lamar.colostate.edu/~colloq/](http://lamar.colostate.edu/~colloq/)

## ORDEM ODONATA

As ninfas desta ordem possuem uma característica marcante e fácil de se visualizar:

- aparelho bucal (labium) modificado em forma de colher com dentes. Este tipo de aparelho bucal está adaptado para capturar presas;

A Ordem Odonata se divide em duas sub-ordens principais: Zygoptera e Anisoptera. Cada uma destas sub-ordens apresentará ninfas com caracteres morfológicos distintos.

### **Zygoptera:**

- corpo alongado com grandes e finas brânquias no final do abdômen (Figura 4).

### **Anisoptera:**

- corpo robusto e ausência de brânquias externas no abdômen (Figuras 4 e 5).

OBS: os adultos de ambos os grupos são terrestres.

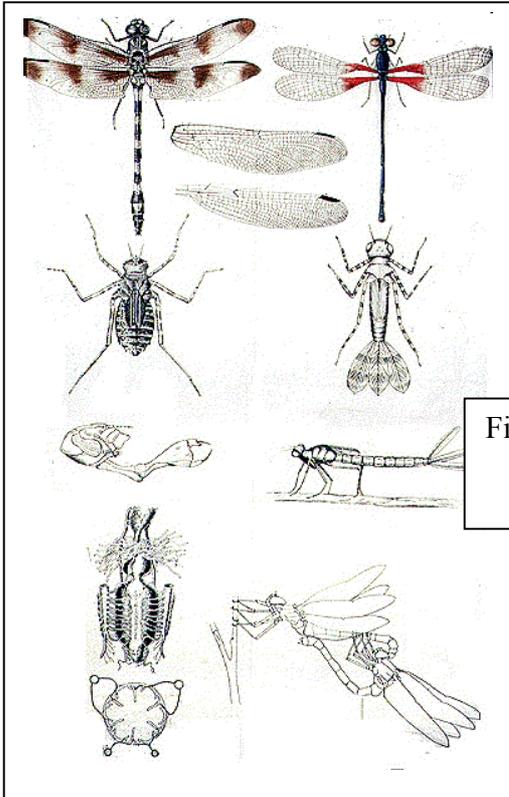


Figura 4- Subordens Anisoptera e Zygoptera.  
 Fonte: [www.life.uiuc.edu/Entomology/insectgifs/odonata.gif](http://www.life.uiuc.edu/Entomology/insectgifs/odonata.gif)



Figura 5- Ninfas  
 (Anisoptera)  
 Foto de Joseph R.

### ORDEM TRICHOPTERA

Em geral, as larvas de Trichoptera possuem formato de lagartas. As principais características morfológicas são:

- abdômen mole e esbranquiçado;
- cabeça e tórax marrom-escuro;
- três pares de pernas bem desenvolvidas e próximas da cabeça;
- último segmento abdominal possui um par de apêndices parecidos com ganchos;
- algumas larvas constroem e vivem em casulos feitos de pequenos galhos, fragmentos de folha ou de material inorgânico (areia fina) (Figuras 6 e 8). Outras larvas possuem vida livre (não fazem casulos) (Figura 7 e 8).

OBS: os adultos são terrestres e se assemelham a mariposas.



Figura 6- Família Odontoceridae  
 Larva construtora de casa.



Figura 7- Família Hydropsychidae.  
 Larva de vida livre.

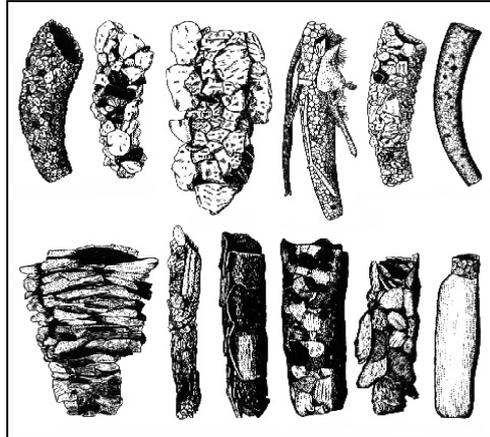


Figura 8- Casas de Trichoptera.  
 Fonte: [www.bio.umass.edu/biology/conn.river/insect\\_images/cases.ip](http://www.bio.umass.edu/biology/conn.river/insect_images/cases.ip)

## ORDEM DIPTERA

Este grupo de insetos é o que possui o maior número de espécies, constituindo o maior grupo de insetos aquáticos.

- as larvas não possuem pernas, embora possam ter uma projeção única em forma de tubo, chamada de proleg (falsa-perna), próxima da cabeça;
- corpo membranoso e mole;
- cabeça presente ou ausente;
- grupos mais comuns em rios: Família Simuliidae (Figura 9), Família Chironomidae (Figura 10) e Família Tipulidae (Figura 11).

OBS: os adultos são terrestres e geralmente se parecem com mosquitos.



Figura 9- Família Simuliidae  
 Fonte: [www.wcupa.edu/\\_academics/sch\\_cas.bio/IMAGES/Simuld.ipg](http://www.wcupa.edu/_academics/sch_cas.bio/IMAGES/Simuld.ipg)



Figura 10- Família Chironomidae  
Fonte: [www.esb.enr.state.nc.us/BAUwww/Conchapelopia\\_GROUP.JPG](http://www.esb.enr.state.nc.us/BAUwww/Conchapelopia_GROUP.JPG)



Figura 11- Família Tipulidae  
Fonte: [www.ru.ac.za/.../departments/zooento/Martin/tipulidae2.jpg](http://www.ru.ac.za/.../departments/zooento/Martin/tipulidae2.jpg)

### ORDEM COLEOPTERA

As larvas possuem grande variedade na forma, com o corpo variando de uma forma cilíndrica e alongada (besouros de áreas de correnteza - Figura 12), até uma forma de disco e achatada (Figura 13).

OBS: embora muitos adultos possuam vida terrestre, são também comuns os adultos aquáticos. Os coleópteros adultos apresentam uma forma típica de besouros terrestres – pequenos, algumas vezes coloridos e corpo extremamente duro (carapaça – Figura 14).



Figura 12- Família Elmidae (larva).  
Fonte: [lakes.chebucto.org/ZOOBENTH/elmidae.jpg](http://lakes.chebucto.org/ZOOBENTH/elmidae.jpg)



Figura 13- Família Psephenidae.  
 Fonte: [www.wlu.ca/~wwwbiol/bio305/Database/Psephenus.htm](http://www.wlu.ca/~wwwbiol/bio305/Database/Psephenus.htm)

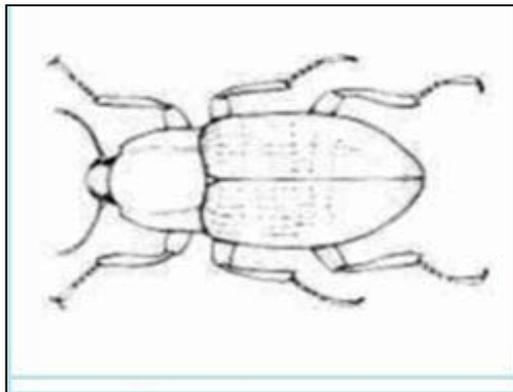


Figura 14- Família Elmidae (adulto).  
 Fonte: [www.parcotaro.it/.../foto/coleotteri/elmidae\\_bassa.jpg](http://www.parcotaro.it/.../foto/coleotteri/elmidae_bassa.jpg)

### ORDEM MEGALOPTERA

As larvas desta ordem são parecidas com as larvas de Trichoptera, com a exceção de que possuem:

- projeções laterais longas (filamentos) e/ou brânquias no abdômen;
- cabeças fortes com grandes mandíbulas;
- geralmente são maiores do que as larvas de Trichoptera (Figura 15).

OBS: os adultos são terrestres.

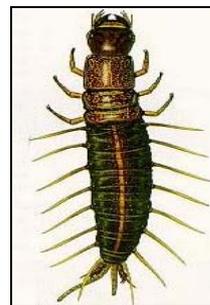


Figura 15- Família Sialidae  
 (Gênero *Neochaliodes*).  
 Fonte: [www.wlu.ca/~wwwbiol/bio305/Database/Sialis.htm](http://www.wlu.ca/~wwwbiol/bio305/Database/Sialis.htm)

## ORDEM LEPIDOPTERA

As larvas têm formato mais ou menos cilíndrico, e variam de 3 a 75 mm quando estão maduras. Se caracterizam por apresentar:

- cabeça: esclerotizada (dura e de cor marrom-escura) e antenas curtas;
- tórax: com um escudo esclerotizado em alguns grupos, três pares de patas com cinco segmentos e unhas fortes na extremidade; algumas espécies aquáticas possuem brânquias;
- abdômen: com dez segmentos, e a maioria possui falsas patas nos segmentos 3 a 6 e no segmento 10; brânquias traqueais presentes e espiráculos laterais que podem ser funcionais ou não.



Figura 16- Larva de Lepidoptera.  
Foto: Johnson County K-State Research and  
Extension Master Gardener, Jacolyn Loyd  
Goetz.

## ORDEM HEMIPTERA

- são predadores
- alguns possuem pernas raptorais (com o fêmur alargado) para segurar a presa;
- aparelho bucal picador-sugador, em forma de canudo;
- alguns vivem em águas paradas ou de pouca corrente (Ex: hemípteros “patinadores” – Figura 16)
- são hemimetábolos (o imaturo possui a mesma forma do adulto)



Figura 17- Família Gerridae  
(patinador).  
Foto de Andreas Just.

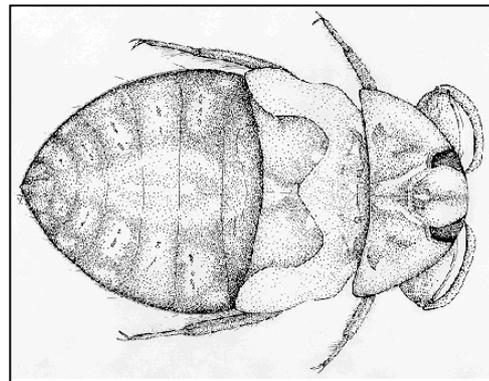


Figura 18- Família Naucoridae  
(*Ambrysus mormon*). Ilustração: B.  
C. Kondratieff, Colorado State  
University.

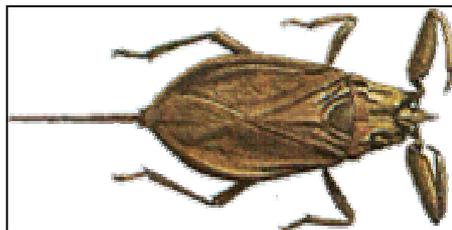


Figura 19- Família Nepidae  
(*Nepa cinerea* L.).  
Fonte: [www.bioweb.lu/sapro/wanzen.htm](http://www.bioweb.lu/sapro/wanzen.htm)