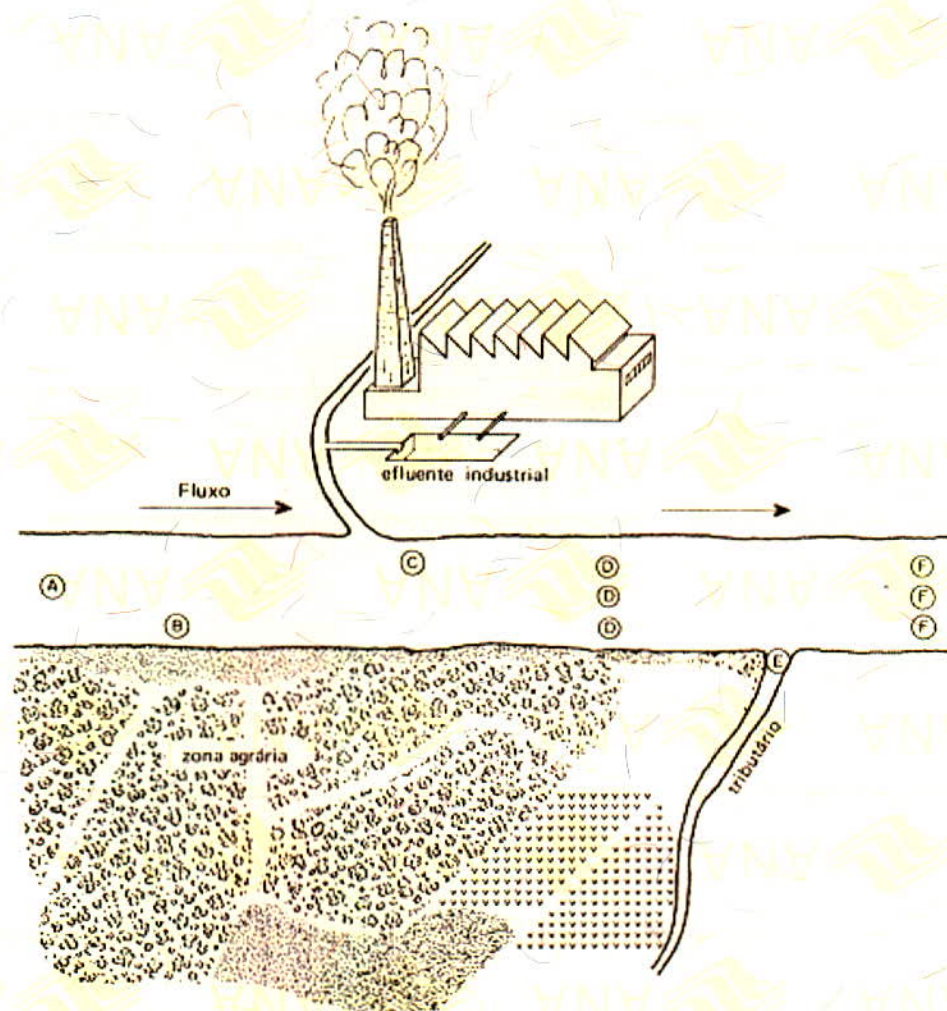


### 6 AMOSTRAGEM DE ÁGUA BRUTA E SEDIMENTOS

Em um estudo básico de avaliação da qualidade das águas e do sedimento deve-se levar em consideração os seus usos preponderantes. Para tanto, recomenda-se consultar o capítulo “Planejamento de Amostragem”. De uma maneira geral, a amostragem em rios, riachos e pequenos cursos d’água é feita a montante e a jusante das fontes poluidoras, quando essas existem. Dependendo do objetivo do estudo, pode-se adicionar pontos de coleta para avaliar o grau de poluição ou assimilação de carga orgânica ao longo do trecho avaliado, por exemplo. Convém evitar a coleta de amostras em áreas onde possa ocorrer estagnação da água e em locais próximos à margem interna das curvas, exceto para a coleta de sedimentos e organismos bentônicos.

Para cursos d’água maiores deve-se levar em consideração a existência e o grau de mistura dos lançamentos (afluentes e efluentes) no corpo receptor, tanto lateral (de uma margem à outra) como verticalmente (da superfície ao fundo). A mistura na direção lateral muitas vezes ocorre mais lentamente que a mistura na direção vertical. Por outro lado, deve-se considerar que a água do corpo principal pode adentrar o tributário pela superfície ou pelo fundo, devido à diferença de densidade causada pela temperatura, sais dissolvidos ou turbidez. Para se obter uma amostra representativa, essas possibilidades devem ser avaliadas durante o período de caracterização ou monitoramento, realizando coleta de amostras em pontos múltiplos ao longo do eixo transversal (Fig. 58) ou vertical do corpo d’água quando não houver certeza da completa mistura.





**Figura 58.** Localização genérica de pontos de coleta de água superficial em grandes cursos de água (Fonte: CETESB, 1988).

**Legenda:** A - Controle na região superior da área em estudo (referência ou "background"); B - Monitoramento de fontes poluidoras não pontuais (exemplo: poluição agrícola); C - Amostragem de descargas poluidoras no ponto de seu lançamento no corpo receptor; D - Pontos múltiplos a jusante dos lançamentos, para verificar a sua mistura no sentido lateral; E - Amostragem em tributários, na área de sua desembocadura no corpo receptor em estudo (no esquema, o monitoramento a montante do tributário é obtido por meio da amostragem em D); F - Monitoramento a jusante do tributário, após sua mistura no corpo.

A não ser que sejam necessárias informações sobre a qualidade da água durante período chuvoso, a amostragem poderá ser suspensa durante ou logo após fortes chuvas, pois pode ocorrer aumento significativo da vazão do curso d'água. No caso dos estudos que necessitem de informações sazonais, a amostragem deve ter continuidade e mesmo os dados obtidos no período de chuvas poderão ser englobados aos demais.

Em ambientes lânticos (lagos, reservatórios, açudes etc.), a programação de amostragem depende não só dos seus usos (recreação, aquicultura, geração de energia, agricultura, indústria, esgotamento sanitário, drenagem pluvial e abastecimento público), como também dos objetivos do estudo, tais como: taxa de sedimentação, dispersão e degradação de poluentes orgânicos, distribuição e comportamento de metais e pesticidas, eutrofização e carga de



nutrientes, estudos ictiofaunísticos, entre outros. Cada caso requer uma metodologia específica, tanto de coleta quanto de ensaios e interpretação de dados.

Para definição dos ensaios a serem realizados nas águas superficiais (bruta) e sedimento e o enquadramento das classes e usos, é fundamental manter-se atualizado, consultando a legislação vigente nos "sites" das instituições responsáveis pela sua elaboração e/ou homologação, como ANA (Agência Nacional de Águas), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente), SMA (Secretaria do Meio Ambiente) de cada estado, e critérios internacionais adotados pela OMS (Organização Mundial de Saúde), USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), *Environment Canada*, Comunidade Européia, entre outros.

Nas coletas de água bruta e sedimento de uma forma geral recomenda-se que:

- (1) a coleta de água seja realizada antes da coleta de sedimentos;
- (2) os primeiros frascos a serem preenchidos de água do local devem ser direcionados aos ensaios microbiológicos, biológicos e aos que não podem sofrer aeração, e
- (3) a água superficial seja coletada antes da amostra em profundidade.

É importante lembrar que, neste guia, é considerado como água superficial os primeiros 30cm da lâmina d'água, e água em profundidade aquela coletada na coluna d'água abaixo dos 30cm superficiais e acima de 1m do fundo.

Para que sejam evitados problemas de contaminação cruzada durante a amostragem, deve-se utilizar materiais de coleta diferentes para cada amostra, como por exemplo, um balde e uma corda em cada ponto amostrado. Caso isto não seja possível, esses materiais devem ser lavados em campo com água destilada ou deionizada e ambientados, ou seja, enxaguados com água do local a ser amostrado.

A seguir, serão considerados os procedimentos para a coleta de amostras em água bruta (camada superficial e em profundidade) e em sedimento para os diversos ensaios. A preservação, tipo de recipiente, volume requerido e prazo de validade da amostra estão descritos no Apêndice 1.

## **6.1 Coleta e Preservação de Amostras para Ensaios em Água Bruta**

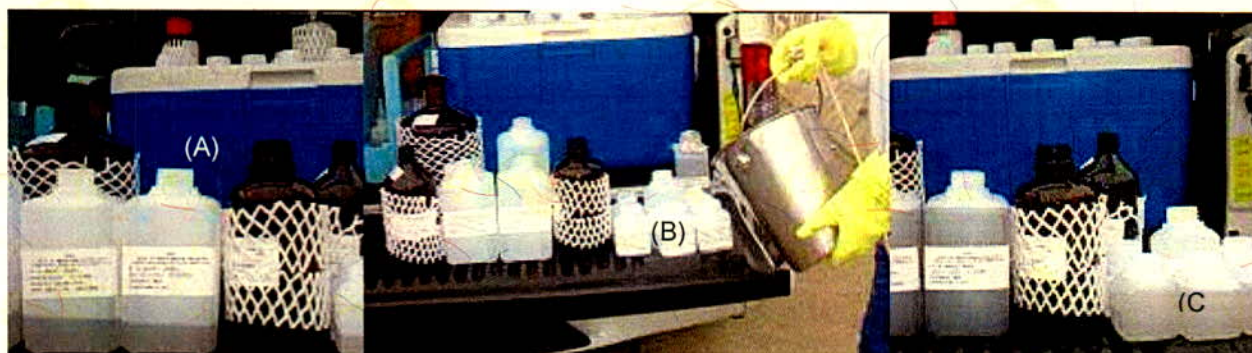
### **6.1.1 Químicos (exceto metais dissolvidos)**

#### **Procedimentos de coleta em águas superficiais:**

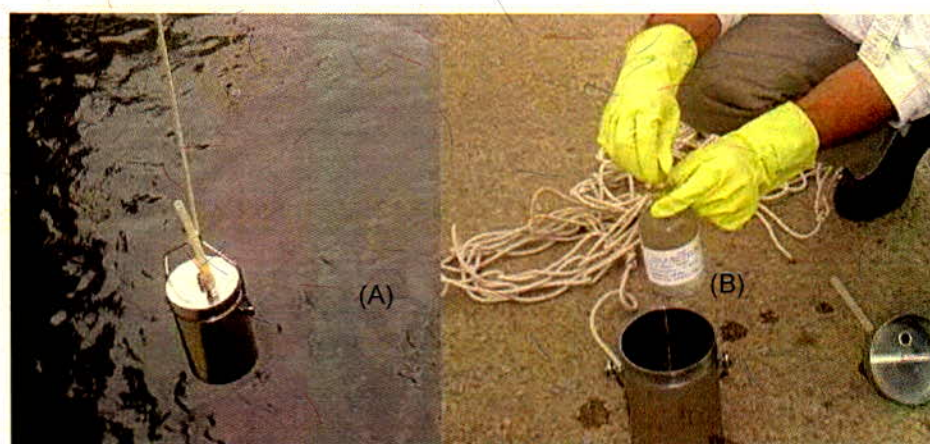
- Encher o balde de aço inox ou a garrafa de van Dorn de fluxo horizontal e distribuir seu volume proporcionalmente nos diversos frascos destinados aos ensaios químicos, como forma de garantir a homogeneidade da amostra; (Fig. 59); Repetir o procedimento até que todos os frascos estejam com o volume de água necessária para os ensaios, tomando o cuidado de manter um espaço vazio no frasco para sua posterior homogeneização;



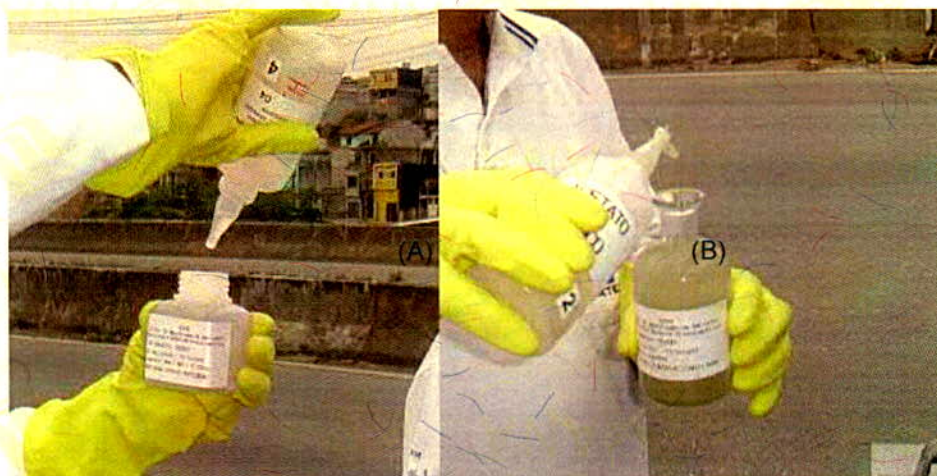
- No caso de amostras que não podem sofrer aeração (oxigênio dissolvido, sulfeto, compostos orgânicos voláteis e fenóis), a garrafa de van Dorn de fluxo horizontal ou o batiscafo deverão ser empregados (Fig. 60). No caso da utilização da garrafa de van Dorn, a mangueira deve ser introduzida estrangulada até o fundo do recipiente, liberando-se lentamente o regulador de fluxo da mangueira e deixando-se extravasar duas vezes, ou mais, o volume do frasco, não deixando espaço vazio;
- Efetuar as preservações requeridas (ver Apêndice 1) (Fig. 61);
- Acondicionar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração, para transporte



**Figura 59.** Coleta de amostras de água superficial: (A) Disposição dos frascos com identificação; (B) Distribuição da amostra em todos os frascos; (C) Frascos preechidos com amostra (Fotos: Carlos Jesus Brandão).



**Figura 60.** Coleta de amostras de água superficial para análise de OD: (A) Batiscafo; (B) Fechamento do frasco (Fotos: Carlos Jesus Brandão).





**Figura 61.** Procedimento de preservação de amostra: (A) Adição de ácido nítrico 1+1 para preservação de metais pesados; (B) Adição de acetato de zinco para preservação de sulfeto (Fotos: Carlos Jesus Brandão).

**Procedimento de coleta em águas de profundidade:**

- Coletar com garrafa de profundidade (ex.: garrafa de van Dorn de fluxo vertical) no estrato de interesse. É importante que o equipamento não promova a suspensão do sedimento; para tanto, recomenda-se a coleta de água até 1m acima do fundo, exceto quando o estrato abaixo de 1m for de interesse (Fig. 62);
- Desconectar a mangueira da garrafa e desprezar a água contida na mangueira;
- Distribuir seu volume proporcionalmente nos diversos frascos destinados aos ensaios químicos, como forma de garantir a homogeneidade da amostra;
- Repetir o procedimento até que todos os frascos estejam com o volume de água necessário, tomando o cuidado de manter um espaço vazio para sua posterior homogeneização. No caso de amostras que não podem sofrer aeração (oxigênio dissolvido, sulfeto, compostos orgânicos voláteis e fenóis), a mangueira deve ser introduzida estrangulada até o fundo do recipiente, liberando-se lentamente o regulador de fluxo da mangueira e deixando-se extravasar duas vezes ou mais, o volume do frasco, não deixando espaço vazio;
- Efetuar as preservações requeridas (ver Apêndice 1);
- Acondicionar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração, para transporte.



**Figura 62.** Coleta de amostra em profundidade com garrafa de van Dorn de Fluxo Vertical (Foto: Carlos Jesus Brandão).

### 6.1.2 Metais Dissolvidos

Para o ensaio de metais dissolvidos, a água do local deverá ser filtrada em campo. A água filtrada é a que será encaminhada para o ensaio. A unidade filtrante deve passar por um pré condicionamento antes da filtragem, como forma de prepará-la para receber a amostra. Podem ser utilizadas seringa e unidade filtrante descartáveis para cada ponto de coleta, que devem ser recolhidas para descarte apropriado. A filtragem da amostra também pode ser realizada por meio de bomba de vácuo manual ou movida a gerador de eletricidade.



**Procedimento para o pré condicionamento da unidade filtrante:**

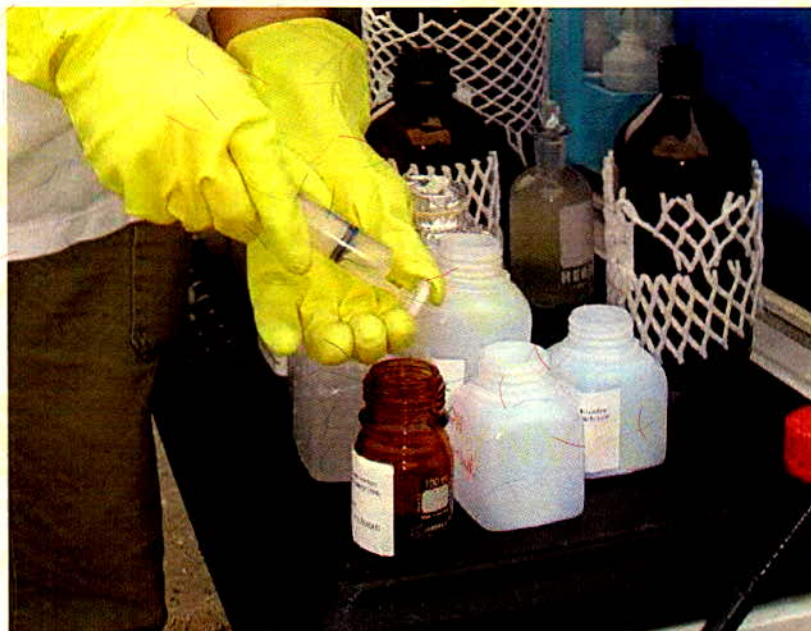
- Encher uma seringa estéril com água deionizada;
- Conectar uma unidade filtrante de 0,45µm na seringa;
- Passar um volume de 50mL de água deionizada pelo filtro.

**Procedimento de coleta de amostra para metais dissolvidos em águas superficiais:**

- Coletar a amostra de água do local com auxílio de um balde confeccionado em aço inox (AISI 316L), ou de uma garrafa de van Dorn horizontal;
- Encher a seringa, preenchendo todo o seu volume;
- Conectar o filtro preconditionado à ponta da seringa;
- Pressionar o êmbolo da seringa e recolher a amostra filtrada em frasco de coleta apropriado (Fig. 63);
- Repetir o procedimento até obter o volume necessário para o ensaio;
- Caso ocorra saturação do filtro, substituí-lo por outro novo já preconditionado, e completar o volume necessário para o ensaio;
- Efetuar as preservações requeridas (ver Apêndice 1);
- Acondicionar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração, para transporte.
- Guardar o(s) filtro(s) e seringa(s) para descarte, conforme procedimento de cada laboratório.

**Procedimento de coleta de amostra para metais dissolvidos em águas de profundidade:**

- Coletar a amostra de água de profundidade com garrafa de van Dorn vertical;
- Desconectar a mangueira da garrafa e desprezar a água contida na mangueira;
- Preencher um frasco descartável de 1L e retirar uma alíquota com a seringa, preenchendo todo o seu volume;
- Conectar o filtro preconditionado à ponta da seringa e proceder conforme protocolo para água superficial.



**Figura 63.** Filtração em campo de amostra para metais dissolvidos (Foto: Carlos Jesus Brandão).



### 6.1.3 Ecotoxicológicos

Serão abordados os procedimentos de coleta e preservação de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos e de toxicidade aguda com bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (Teste Microtox).

Ensaio ecotoxicológicos são procedimentos nos quais as respostas de organismos aquáticos são usadas para detectar ou avaliar, a presença ou efeito, de uma ou mais substâncias, despejos líquidos ou fatores ambientais, considerados isoladamente ou em conjunto. Esses ensaios podem ser realizados em condições controladas de laboratório ou em campo.

Neste guia são abordados apenas os procedimentos de coleta para realização de ensaios ecotoxicológicos em condições controladas de laboratório.

Nesses ensaios os organismos teste são expostos à amostra bruta (água superficial ou sedimento) ou a várias concentrações da amostra em solução (efluente), por um determinado período. Após o período de teste verifica-se os efeitos da amostra em relação à alguns parâmetros biológicos, como mortalidade, crescimento e reprodução, dentre outros. Os organismos de água doce e marinha mais comumente empregados constam da Tabela A4 do Apendice 1.

Outro ensaio frequentemente empregado para a triagem de toxicidade aguda em amostras de água e sedimento (água intersticial) é o ensaio com a bactéria *Vibrio fischeri* também conhecido como teste Microtox. A bactéria marinha *Vibrio fischeri* emite luz naturalmente em ambientes aquáticos favoráveis e na presença de substâncias tóxicas à bactéria, a luminescência diminui, sendo esta diminuição de intensidade de luz proporcional à toxicidade da amostra.

A escolha dos ensaios dependerá do objetivo do estudo. No caso de atendimento à legislação recomenda-se utilizar métodos padronizados elaborados pela ABNT ou órgão internacional de padronização.

#### **Procedimentos para coleta de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos e Microtox em águas superficiais:**

- Preencher todo o volume do frasco sem deixar volume morto, de maneira a evitar a presença de ar;
- Tampar o frasco deixá-lo em repouso por alguns minutos e verificar se não existem bolhas de ar no seu interior. Caso haja presença de bolhas, bater levemente nas laterais do frasco, visando o desprendimento das bolhas;
- Completar o volume do frasco, se necessário;
- Identificar a amostra;
- Acondicionar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração, para transporte.

#### **Procedimentos para coleta de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos e Microtox em águas de profundidade:**

- Após a coleta com garrafa de van Dorn, desconectar a mangueira de látex da garrafa de van Dorn;



- Desprezar a água contida na mangueira de látex e encher o frasco, preenchendo todo o volume do frasco sem deixar volume morto, de maneira a evitar a presença de ar;
- Tampar o frasco e seguir os procedimentos descritos no item anterior.

#### 6.1.4 Mutagenicidade com *Salmonella*/Microsoma (Teste de Ames)

O teste de *Salmonella*/Microsoma tem por objetivo detectar a presença de substâncias que possam produzir danos genéticos nos organismos expostos. No caso de amostras ambientais, o objetivo é detectar a presença destes compostos no meio, não avaliar diretamente o seu efeito neste ou naquele indivíduo ou população. O ensaio utiliza diferentes linhagens de *Salmonella* Typhimurium, na presença e na ausência de ativação metabólica, capazes de detectar compostos que atuam por meio de mecanismos de ação diferentes. O teste foi desenvolvido especificamente para detecção de mutagênese induzida quimicamente e pode ser realizado tanto em amostras líquidas, após esterilização, quanto em extratos orgânicos. Podem ser avaliadas amostras de águas, efluentes, solos, sedimentos, lodos e material particulado. O procedimento adotado para a coleta de águas superficiais e de profundidade empregando balde e amostradores específicos é o mesmo empregado para análises químicas (item 6.1.1) (Fig.64).



**Figura 64.** Coleta de amostra com balde de aço inox para Teste de Ames (Foto: Carlos Jesus Brandão).

As amostras de água podem também ser coletadas empregando-se o método denominado Blue rayon *in situ* (Sakamoto & Hayatsu, 1990). As mechas de Blue rayon (ver preparo Capítulo 3) são acondicionadas em redes de náilon, com um peso no fundo, e estas são conectadas a uma bóia. O conjunto é colocado no ponto de amostragem e as fibras permanecem imersas por 24



horas. Após este período o conjunto é removido e as mechas de Blue rayon levadas ao laboratório.

Maiores informações relativas a tipos de frascos empregados, armazenamento e preservação das amostras estão detalhadas na Tabela A6 do Apêndice 1.

#### 6.1.5 Microbiológicos

A contaminação das águas por excretas de origem humana ou animal pode torná-las um veículo na transmissão de agentes de doenças infecciosas. Dessa forma, a vigilância da qualidade microbiológica da água é essencial, sendo requerida pelas legislações aplicadas nos mais diversos usos da água. Embora sejam disponíveis métodos para determinação dos microrganismos patogênicos responsáveis pelas doenças de veiculação hídrica, essas análises são complexas, demoradas e dispendiosas. Além disso, somente pessoas e animais infectados eliminam esses microrganismos, que podem estar em concentrações extremamente baixas nas amostras de água e requerem métodos específicos de concentração. Por esse motivo, a pesquisa de patógenos é realizada somente em condições específicas, por exemplo, na ocorrência de surtos, em estudos de vigilância epidemiológica ambiental de patógenos, estudos de avaliação de risco microbiológico, entre outras. Na rotina para monitoramento da água e atendimento das regulamentações de sua qualidade são realizadas as análises dos microrganismos indicadores de poluição fecal, os quais podem indicar o risco da presença de microrganismos enteropatogênicos.

A análise de indicadores microbianos na água é um método bastante sensível e específico para detecção de poluição de origem fecal, não sendo adequada a análise química para esse objetivo. As análises devem ser realizadas com regularidade e frequência, uma vez que a poluição fecal é intermitente e poucas amostragens podem não ser suficientes para detectá-la. Deve-se, portanto, dar preferência a um método simples, ao invés de vários métodos ou um método complexo, embora nem sempre os resultados apresentem uma relação direta com patógenos mais persistentes no ambiente.

Além de fornecer informações sobre a presença de contaminação fecal na água, as análises microbiológicas são úteis para se avaliar a eficácia de métodos de tratamento para determinados grupos de microrganismos. Por exemplo, a presença de bacteriófagos pode indicar que os vírus não foram removidos, e a presença de clostrídios sulfito-redutores pode estar demonstrando a presença de microrganismos mais persistentes. A contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas pode fornecer informações sobre a disponibilidade de nutrientes na água que propiciam o crescimento bacteriano, o que pode resultar em problemas estéticos, ou na presença de microrganismos patogênicos oportunistas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* sp e *Aeromonas* sp. Para esses, existem técnicas específicas de detecção, que não



são utilizadas rotineiramente, mas somente quando necessário para resolver problemas relacionados à sua presença.

A coleta de amostras de água para exame microbiológico apresenta técnica diferenciada em água bruta e tratada e deve ser realizada sempre antes da coleta de qualquer outro tipo de ensaio ou determinação de campo, a fim de se evitar o risco de contaminação do local de amostragem com frascos ou amostradores não estéreis.

O frasco deve ser preparado previamente no laboratório, estéril e conter (a) EDTA em quantidade necessária para complexar metais pesados que possam estar presentes na amostra (por exemplo, cobre), e (b) tiosulfato de sódio, se houver a suspeita da presença de cloro livre (Capítulo 3 - Ensaios Microbiológicos). Este frasco não deve ser ambientado e a coleta deve ser pontual, ou seja, a amostra para ensaio microbiológico **não** deve ser composta.

**Procedimentos de coleta de amostras para ensaio microbiológico em águas superficiais**

- As amostras para análises microbiológicas devem, preferencialmente, ser recolhidas diretamente nos frascos esterilizados que serão enviadas para análise; ou em baldes esterilizados.
- Remover a tampa do frasco, juntamente com o papel alumínio protetor, tomando cuidado para evitar a contaminação da amostra pelos dedos das luvas ou outro material;
- Manter a tampa sobre o frasco no momento da coleta a uma distância de aproximadamente 10 centímetros, para evitar a contaminação da parte interna da tampa ou queda de qualquer material no interior do frasco;
- Encher o frasco com a amostra até aproximadamente  $\frac{3}{4}$  (três quartos) do seu volume, para possibilitar sua homogeneização durante o processo de ensaio no laboratório (Fig. 65);
- Fechar imediatamente o frasco, fixando muito bem o papel alumínio protetor em volta da tampa;
- Identificar a amostra
- Acondicionar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração, para transporte.



**Figura 65.** Coleta de amostra de água superficial para análise microbiológica: (A) com balde de aço inox; (B) diretamente do corpo d'água (Foto: Carlos Jesus Brandão).



#### **Procedimentos de coleta de amostras para ensaio microbiológico em águas de profundidade**

- Após a coleta da amostra do local com garrafa de van Dorn, desconectar a mangueira de látex;
- Desprezar a água contida na mangueira de látex da garrafa de van Dorn;
- Remover a tampa do frasco, juntamente com o papel alumínio protetor, tomando cuidado para evitar sua contaminação pelos dedos das luvas ou outro material;
- Encher o frasco através da mangueira de látex, até aproximadamente  $\frac{3}{4}$  (três quartos) do seu volume, para possibilitar sua homogeneização durante o processo de ensaio no laboratório;
- Manter a tampa sobre o frasco no momento da coleta a uma distância de aproximadamente 10 centímetros, para evitar a contaminação da parte interna da tampa ou queda de qualquer material no interior do frasco;
- Fechar imediatamente o frasco, fixando muito bem o papel alumínio protetor em volta da tampa;
- Identificar a amostra;
- Acondicionar e transportar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração (Fig. 66).



**Figura 66.** Acondicionamento e transporte de amostras para análises microbiológicas em caixa térmica sob refrigeração (Foto: Carlos Jesus Brandão).

As amostras para ensaios de bactérias patogênicas podem ser obtidas de duas formas distintas: coleta de água do local (observando o preparo da frascaria na coleta para ensaios microbiológicos), ou instalação de uma mecha que, após ser retirada do local, deve ser transportada em meio de transporte Cary e Blair. Orientações para a confecção da mecha e preparo do meio de transporte Cary e Blair encontram-se no Capítulo 3 (Ensaio Microbiológicos).

#### **Procedimento de coleta com mecha (Bactérias patogênicas)**

- Imergir a mecha no ponto de coleta, amarrando previamente o seu fio de náilon em local seguro;
- Deixar a mecha no local por um período de 24h;
- Retirar a mecha, colocando-a em saco plástico esterilizado contendo meio de transporte Cary e Blair;
- Identificar a amostra;
- Acondicionar e transportar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração.



### 6.1.6 Balneabilidade de Praias

As praias a serem monitoradas e seus pontos de coleta devem ser definidos considerando os diversos fatores que influem na sua balneabilidade. Esses pontos são selecionados em função da frequência de banhistas, da fisiografia da praia e dos riscos de poluição que possam existir e devem ser revistos periodicamente.

As amostras de água para balneabilidade são coletadas no local considerado mais representativo, na região de profundidade aproximada de 1 metro, que representa a seção no corpo de água mais utilizada para a recreação. Deve-se também observar certa distância da área de influência de cursos d'água eventualmente contaminados, para que as amostragens sejam representativas das condições de balneabilidade da praia.

As condições de amostragem têm um importante papel no resultado do monitoramento de balneabilidade e devem ser aquelas consideradas as mais críticas. As amostragens devem ser realizadas nos dias de maior afluência do público às praias, geralmente aos domingos, e preferencialmente na maré vazante no caso de águas marinhas, na qual, em princípio, observa-se maior contribuição e menor diluição dos efluentes.

Recomenda-se que a periodicidade de amostragem das praias seja estabelecida em função da época do ano, frequência de banhistas e do índice de ocupação residencial das regiões próximas à sua orla. Assim, as praias mais freqüentadas devem ser monitoradas semanalmente. As praias menos freqüentadas, mas que já passam por um processo de urbanização em suas imediações, podem ser avaliadas por meio de monitoramento mensal sem, no entanto, serem classificadas conforme as categorias preconizadas pela Resolução Conama relativa ao controle da qualidade da água para balneabilidade (CONAMA nº 274/00). O acompanhamento da evolução da qualidade destas praias deve ser realizado em caráter preventivo e, se forem constatados índices indicadores de contaminação fecal em quantidades significativas, o monitoramento deve ser conduzido semanalmente. Na época de temporada (meses do verão e das férias escolares), deve ser prevista a intensificação do monitoramento para as praias com maiores índices de contaminação.

No Estado de São Paulo informações adicionais sobre a balneabilidade das praias podem ser obtidas na página oficial da CETESB ([www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br)), especialmente nos Relatórios Anuais "Qualidade das Águas Litorâneas do Estado de São Paulo", e na página da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo ([www.ambiente.sp.gov.br](http://www.ambiente.sp.gov.br)).

#### ***Procedimentos de coleta de amostras para ensaios microbiológicos, para avaliação de balneabilidade das praias interiores e litorâneas***

- A coleta deve ser realizada em local com maior frequência de banhistas;
- O técnico deve adentrar na água até à linha de cintura do banhista;
- Remover a tampa do frasco, juntamente com o papel alumínio protetor, tomando cuidado para evitar sua contaminação pelos dedos das luvas ou outro material (Fig. 67);



- Manter a tampa sobre o frasco no momento da coleta a uma distância de aproximadamente 10 centímetros, para evitar a contaminação da parte interna da tampa ou queda de qualquer outro material no interior do frasco;
- Encher o frasco com a amostra até aproximadamente  $\frac{3}{4}$  (três quartos) do seu volume, para possibilitar sua homogeneização durante o ensaio no laboratório;
- Fechar imediatamente o frasco, fixando muito bem o papel alumínio protetor em volta da tampa;
- Identificar a amostra;
- Acondicionar a amostra em caixa térmica, sob refrigeração, para transporte.



**Figura 67.** Coleta de amostra de água recreacional (mar) para análise microbiológica (Fonte: Foto Carlos Jesus Brandão).

### 6.1.7 Comunidades Biológicas

As comunidades biológicas fornecem a melhor base para a avaliação da integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos. Uma vez que o dado biológico é gerado a partir da coleta de organismos vivos, que podem escapar à captura ou apresentar comportamento migratório ou distribuição espacial heterogênea no local de investigação, o programa de amostragem biológica deve ser cuidadosamente planejado para que os resultados tenham aplicabilidade e reflitam com fidelidade a qualidade do hábitat.

Sempre que for possível, as estações para monitoramento biológico (biomonitoramento), ou caracterização ecológica, devem ser as mesmas que aquelas estabelecidas para o levantamento químico, físico e bacteriológico, de forma que todas as coletas sejam concomitantes. Para efeito de comparação, os pontos de coleta devem ter condições ecológicas similares dentro do mesmo projeto ou programa de monitoramento; por exemplo, devem estar localizados na mesma região em lagos e reservatórios (litorânea, limnética e profunda), ou serem em rios de ordens similares (1ª, 2ª, 3ª, 4ª ordens).

É importante que sejam levantados, ao mesmo tempo, dados relativos ao meio físico como, por exemplo, granulometria do sedimento, transparência e cor da água, velocidade e vazão da corrente, largura e profundidade do leito, tipos de hábitat presentes no local (por exemplo, proximidade de corredeiras, remansos, várzeas, presença de macrófitas e cobertura vegetal das



margens). Devem também ser observadas condições do local, tais como uso e ocupação do solo, presença de despejos industriais e urbanos, extração de areia ou outra atividade de mineração.

Para se comparar diferentes pontos de coleta é essencial também que todos sejam amostrados aproximadamente ao mesmo tempo. A periodicidade de amostragem depende da comunidade a ser analisada, mas se alguma situação atípica ocorrer, como descarga ou derramamento de substâncias químicas, as amostragens devem ser realizadas a intervalos de tempo menores, de modo a acompanhar a recuperação das comunidades.

A seleção do tamanho da estação de amostragem é influenciada pelos grupos taxonômicos a serem estudados e pela natureza do problema a ser investigado. Para fitoplâncton e macroinvertebrados, um local adequado de amostragem pode cobrir pequenas áreas ou volumes, enquanto que para peixes uma estação pode se estender de 100m<sup>2</sup> a 1000m<sup>2</sup>, dependendo da densidade das populações e do território usual da espécie sob investigação.

A amostragem de comunidades biológicas pode ser dividida basicamente em três tipos, conforme o objetivo do trabalho ou projeto: qualitativa, semiquantitativa e quantitativa. O tipo da amostragem define os equipamentos e o esforço da coleta, necessários. A amostragem qualitativa serve a estudos de comparação espacial e/ou temporal, baseados na composição faunística e/ou florística. Neste caso, não há transformação dos dados em unidade de área ou volume. Amostras semiquantitativas podem ser obtidas de duas formas: a) o esforço amostral (tempo) é medido no emprego de métodos qualitativos de coleta, ou b) amostradores quantitativos são usados em coleta não aleatória e sem réplicas. A amostragem mais exigente é, sem dúvida, a quantitativa, em que são amostradas unidades de área ou volume bem definidos. Preferencialmente são realizadas réplicas (ou unidades de amostragem), tomando-se cuidados relativos ao tamanho e distribuição das unidades de amostragem na área de estudo. Os dados da coleta quantitativa se prestarão a objetivos mais amplos, fornecendo a possibilidade de se estimar densidades ou biomassas das populações de organismos, além das informações obtidas pelos outros dois tipos de amostragem.

Existem vários estudos definindo o número de réplicas necessário em relação à confiabilidade estatística que se deseja obter na amostragem quantitativa. Em geral, são aplicadas fórmulas onde se empregam dados (média, desvio ou erro padrão, variância) provenientes de uma campanha de amostragem preliminar. Os dados obtidos serão tanto mais confiáveis quanto mais cuidadosamente definidos o local de amostragem e o número de réplicas (para maiores informações recomenda-se a consulta à Elliott, 1977 e Merritt & Cummins, 1996).

O plano de amostragem depende dos objetivos do projeto ou do programa de monitoramento. Cada caso requer uma metodologia específica, tanto de coleta, quanto de ensaios e interpretação de dados.



#### 6.1.7.1 Pigmentos Fotossintetizantes (Clorofila *a* e Feofitina *a*)

Há diversos métodos para se avaliar a biomassa vegetal de um ecossistema aquático. Além da estimativa do *standing-stock* por meio da contagem do número de organismos num dado volume de água (determinação do fitoplâncton, seja de água doce ou marinha), pode-se efetuar a estimativa pela determinação da concentração de pigmentos, sobretudo de clorofila *a*. A clorofila *a* que é um pigmento comum a todos os vegetais, representa de 0,1% a 9,7% do peso do material orgânico em todas as algas planctônicas, sendo por isso, o indicador preferido para estimar a biomassa algal.

Entretanto, as moléculas de clorofila não são estáveis; dependendo das condições do meio, tais como mudanças do pH, temperatura, ou luminosidade excessiva, elas podem sofrer degradação, originando produtos conhecidos como feopigmentos. A feofitina *a* é um produto da degradação da clorofila *a*, que pode interferir grandemente nas medidas deste pigmento, por absorver luz na mesma região do espectro que a clorofila *a*. A relação entre clorofila *a* e feofitina *a* em ambientes aquáticos tem grande importância na indicação do estado fisiológico da comunidade fitoplanctônica.

A determinação quantitativa da clorofila *a* propicia a avaliação do grau de trofia do ambiente, ou seja o grau de enriquecimento por nutrientes, podendo ainda ser utilizada para uma estimativa da biomassa algal, bem como da produção primária.

- **Procedimentos de coleta**

As amostras para determinação das concentrações de clorofila *a* e feofitina *a* devem ser obtidas preferencialmente em replicata, por ponto de coleta. A distância entre as réplicas é determinada aleatoriamente. Estas réplicas são coletadas na superfície, até 30cm de profundidade. Deve-se sempre enxaguar o frasco com água do local antes de introduzir a alíquota que servirá de amostra para exame. O frasco não deve ser totalmente preenchido, a fim de facilitar a homogeneização da amostra antes da filtragem.

Os recipientes utilizados para o armazenamento de amostras para a determinação de clorofila devem ser de vidro neutro, devido à sensibilidade de algumas algas ao meio alcalino. Utilizar preferencialmente vidros escuros (frasco âmbar de 1L) com tampa rosqueada. No caso de se utilizar outro tipo de frasco de vidro neutro, este deve ser protegido por folha de papel alumínio, para que não haja penetração de luz, evitando o metabolismo fotossintético, bem como a degradação da molécula de clorofila. Os frascos plásticos devem ser evitados, pois o material tende a aderir nas paredes, resultando em perdas nas determinações.



A amostra deve ser filtrada em campo, imediatamente após a coleta; caso isto não seja possível, deve ser mantida refrigerada até a chegada ao laboratório, o que deverá ocorrer em um prazo máximo de 48 horas (ver detalhes no Apêndice 1). Quando o pH da amostra for inferior a 6, ou se considerado necessário, a amostra pode ser preservada com carbonato de magnésio 1%.

**Procedimentos para coleta de amostras para ensaio de clorofila *a* e feofitina *a* em águas superficiais:**

- Antes da amostragem, deve-se verificar se há análises correlatas como, por exemplo, nutrientes, fitoplâncton e teste de toxicidade, para se ter o cuidado de distribuir alíquotas da mesma amostragem nos diferentes frascos;
- Realizar a coleta a aproximadamente 30cm abaixo da lâmina d'água. Esta coleta pode ser feita manualmente (submergindo o frasco de coleta), com um balde de aço inox polido AISI 316L ou garrafa de amostragem;
- Preencher o frasco de coleta de forma que fique um espaço que possibilite a homogeneização da amostra.
- Caso a filtração não possa ser realizada no local, a amostra deve ser imediatamente armazenada ao abrigo da luz e transportada em caixa térmica com gelo, nunca excedendo o prazo de 48 horas após a coleta para a filtração.

**Procedimentos para coleta de amostras para ensaio de clorofila *a* e feofitina *a* em amostras de profundidade:**

- Antes da amostragem, deve-se verificar se há análises correlatas como, por exemplo, nutrientes, fitoplâncton e teste de toxicidade, para se ter o cuidado de distribuir alíquotas da mesma amostragem nos diferentes frascos;
- Após a coleta com garrafa de van Dorn, desconectar a mangueira de látex da garrafa;
- Desprezar a água contida na mangueira de látex, e transferir para um frasco de vidro, sendo que este não deve ser totalmente preenchido para que possa ser feita a sua homogeneização de seu conteúdo no laboratório;
- Caso a filtração não possa ser realizada no local, a amostra deve ser imediatamente armazenada ao abrigo da luz e transportada em caixa térmica com gelo, nunca excedendo o prazo de 48 horas após a coleta, para ser filtrada.

Se não for possível enviar a amostra ao laboratório no prazo de 48h, filtrar a amostra e refrigerar o filtro em campo.

**Procedimentos para filtração das amostras para ensaios de clorofila *a* e feofitina *a* em campo:**

**Materiais:**

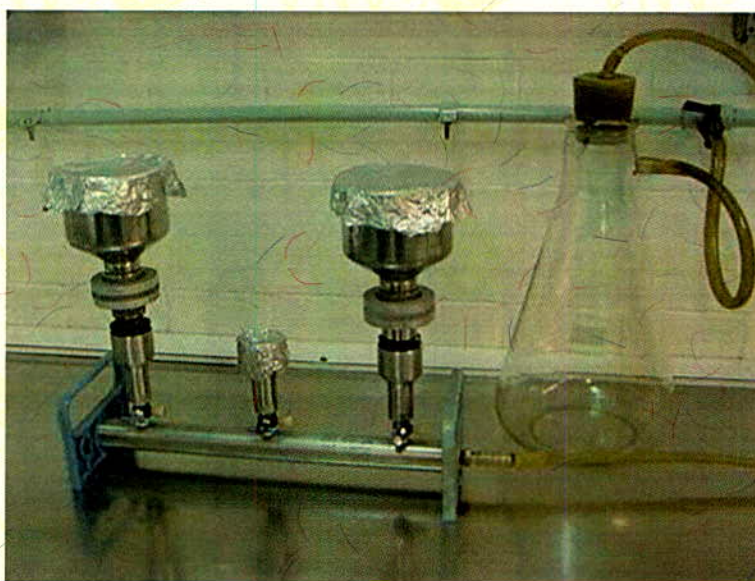
- Membrana filtrante (47mm de diâmetro) de fibra de vidro ou membrana filtrante de celulose hidrofílica com porosidade entre 0,45µm e 1,0µm.;
- Conjunto para filtração a vácuo para membranas de 47mm de diâmetro (Fig. 68 e 69);
- Pinça de ponta reta, de aço inoxidável, borda plana;
- Envelope de papel pardo do tipo "kraft", para armazenar o filtro com o conteúdo filtrado;
- Proveta de 500mL a 1L;
- Pisseta com água destilada;
- Bomba de vácuo, para filtração sob pressão (Figs. 70 e 71);
- Frasco envolvido em papel alumínio (ou dessecador), contendo sílica gel, onde os envelopes com as amostras são armazenados e mantidos sobrefrigeração.

**Procedimentos:**

- Homogeneizar a amostra por cerca de dez vezes antes de iniciar a filtração. O volume de água a ser filtrado pode variar de 0,05 L a 1L, dependendo da concentração de organismos ou partículas em suspensão existentes na amostra. Filtrar a maior quantidade possível, preferencialmente todo o volume coletado, e anotar esta informação (volume filtrado);
- Filtrar em membrana (47mm de diâmetro) de fibra de vidro ou membrana filtrante de celulose hidrofílica com porosidade entre 0,45µm e 1,0µm.;



- Este processo não deve exceder 10 minutos e a amostra deve permanecer protegida da luz;
- Após o término da filtração, lavar o funil internamente com água destilada;
- Com o auxílio da pinça, dobrar o filtro contendo o material nele retido, uma única vez ao meio, sem que haja contato manual;
- Guardar o filtro em envelope contendo indicações do volume filtrado, identificação da amostra, ponto de amostragem, e data e outras informações que sejam necessárias;
- Colocar o envelope imediatamente em frasco escuro, ou envolvido em papel alumínio, contendo sílica gel;
- Devido ao fato de que, à temperatura ambiente e sob a ação da luz, as moléculas de clorofila degradam-se muito rapidamente, o frasco contendo as amostras filtradas deve ser colocado, imediatamente após a filtração, sob refrigeração até o momento de sua chegada ao laboratório;
- Transportar o frasco para o laboratório de destino, sob refrigeração, em caixa térmica com gelo. Se a amostra for demorar mais de 48 horas para ser entregue no laboratório, este frasco deve ser mantido congelado até a ocasião do transporte.

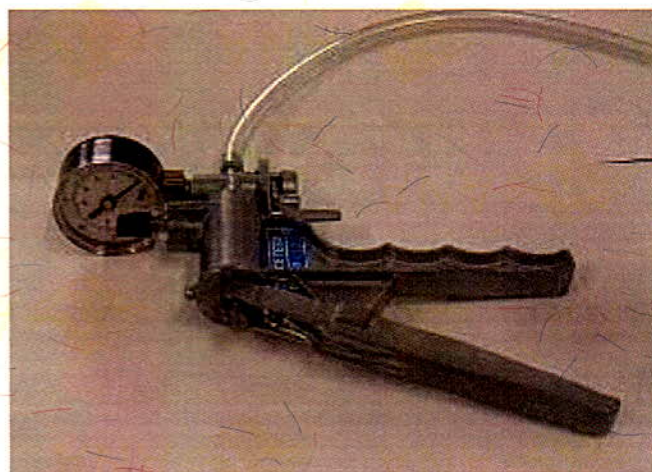


**Figura 68.** Sistema Porta Filtro para Filtração de Amostras para Ensaio de Clorofila *a* e Feofitina *a* em Laboratório (Foto: Carlos Jesus Brandão).

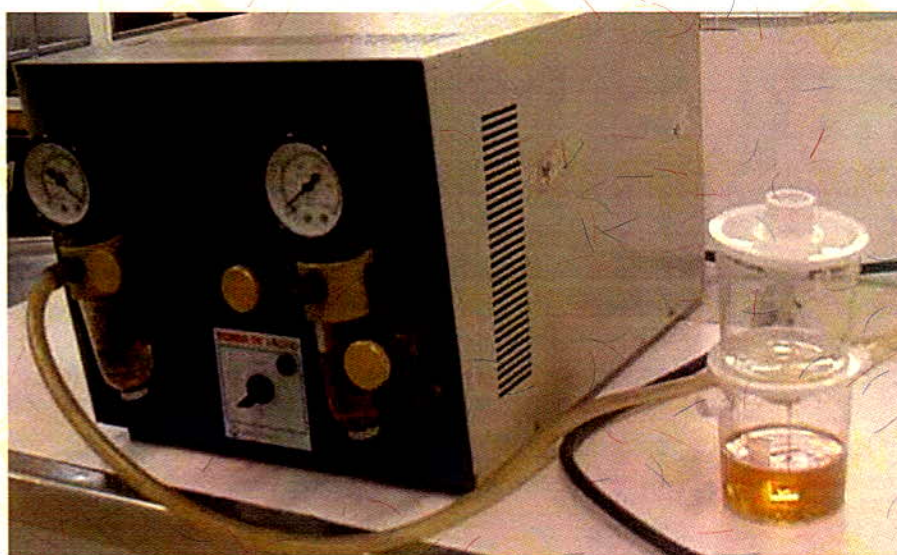


**Figura 69.** Sistema Porta Filtro para Filtração de Amostras para Ensaio de Clorofila *a* e Feofitina *a* em Campo (Foto: Carlos Jesus Brandão).





**Figura 70.** Bomba de Vácuo Manual para campo (Foto: Carlos Jesus Brandão).



**Figura 71.** Bomba de Vácuo Elétrica para campo (Foto: Carlos Jesus Brandão).

#### 6.1.7.2 Comunidade Fitoplanctônica

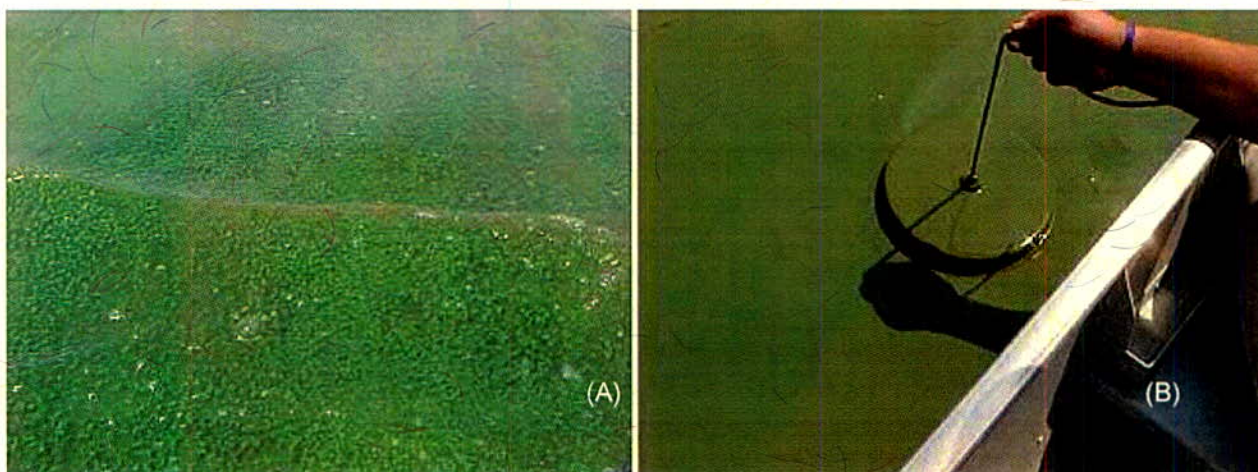
O termo fitoplâncton refere-se à comunidade de organismos microscópicos fotossintetizantes que vivem em suspensão nas diversas camadas de água. Em ambientes de água doce, o fitoplâncton é constituído principalmente por algas (clorofíceas, diatomáceas, euglenofíceas, crisofíceas, dinofíceas e xantofíceas) e cianobactérias.

A distribuição vertical está predominantemente associada à zona eufótica onde, devido à presença de energia luminosa, realizam a fotossíntese. Constituem parte da comunidade responsável pela produção primária de um ecossistema aquático sendo, portanto, a base da cadeia alimentar tanto de ambientes marinhos como de água doce.

A comunidade fitoplanctônica, de uma forma geral, é pouco abundante em ambientes pobres em nutrientes (oligotróficos). Entretanto, pode estar bem representada por organismos de vários



grupos. Já em ambientes ricos em nutrientes (eutróficos), a comunidade geralmente é abundante com presença de espécies pertencentes a um único grupo. Como principal consequência da eutrofização destaca-se a proliferação excessiva de algas e cianobactérias, fenômeno conhecido como floração ou “bloom”, sendo as cianobactérias os organismos mais frequentes em florações de águas continentais (Fig.72). Esses microrganismos podem produzir toxinas altamente potentes, conhecidas como cianotoxinas, as quais podem apresentar efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos ou dermatotóxicos.



**Figura 72.** Floração ou “Bloom” de Cianobactérias no Reservatório Billings – São Paulo-SP: (A) Proliferação excessiva de algas e cianobactérias; (B) Disco de Secchi recoberto por algas e cianobactérias (Foto: Carlos Jesus Brandão).

Outros fatores influenciam a composição e distribuição da comunidade de fitoplâncton, além da quantidade de nutrientes da água, tais como: vento, correnteza, estratificação, circulação, hora do dia, profundidade de penetração da luz, intensidade luminosa, estação do ano e presença de material tóxico, entre outros.

O desequilíbrio da comunidade fitoplanctônica pode trazer vários problemas à qualidade da água, como: gosto e odor, coloração acentuada, variação na concentração de oxigênio dissolvido, além de que algumas espécies apresentam potencial para produzir toxinas. Estes problemas se agravam principalmente quando o uso da água está direcionado para abastecimento público.

O ensaio de fitoplâncton, sua identificação e quantificação, são de grande interesse para avaliar as condições ecológicas de um ecossistema aquático, prevenir ou controlar situações indesejáveis ou incompatíveis com a finalidade de utilização de um determinado manancial.

#### ***Procedimentos de Coleta do Fitoplâncton***



A amostragem para ensaio de fitoplâncton pode ser feita de várias maneiras, dependendo do objetivo do estudo. Na água superficial pode ser realizada em uma única tomada, de uma forma integrada (quando várias coletas da água superficial são reunidas em uma amostra), ou em réplicas (duas ou mais, que serão analisadas individualmente). Na coluna d'água, pode ser feita em várias profundidades e compostas em uma única amostra ou analisadas individualmente (réplicas). É recomendável que em amostragens de rotina para programas de monitoramento a coleta seja realizada, se possível, no mesmo período do dia. É importante ressaltar que dentro do grupo das cianobactérias existem espécies que possuem aerótopos as quais podem migrar na coluna d'água de acordo com a intensidade luminosa. Esta característica é importante principalmente nas amostragens em águas captadas para consumo humano, nas quais a altura da tomada da água, bem como a integração de dados de toda coluna d'água, devem ser considerados.

**Procedimentos para coleta manual de amostras, para ensaio fitoplâncton, em águas superficiais:**

- A coleta manual pode ser realizada com o balde de inox ou, na falta deste, com o próprio frasco. Para tanto, deve-se submergir o frasco de 1 L (âmbar, de boca larga) na camada superficial (até 30cm) ou preenchê-lo com ajuda de um balde de aço inox AISI 316L; tomando-se o cuidado de não preenchê-lo completamente para facilitar a homogeneização em laboratório;
- Antes da amostragem, deve-se verificar se há análises correlatas como, por exemplo, nutrientes, clorofila *a* e teste de toxicidade, para se ter o cuidado de distribuir alíquotas da mesma amostragem nos diferentes frascos;
- Manter a amostra refrigerada e ao abrigo da luz. Se necessário, adicionar ainda em campo, formol até uma concentração final de 5%, ou lugol, procurando manter uma alíquota, em um frasco menor (100mL), refrigerada para observação do material vivo.

**OBS - Procedimentos para a coleta manual de amostras de florações de cianobactérias:** Quando há formação de "nata" superficial no ponto de coleta, proceder como descrito acima, tomando o cuidado ao se colocar o balde ou o frasco na água, para não movimentar muito a massa flutuante. Distribuir alíquotas da mesma amostragem nos diferentes frascos.

**Procedimentos para coleta de amostras para ensaio de fitoplâncton, com auxílio de equipamento:**

**Coleta com garrafas de profundidade van Dorn horizontal e vertical**

A coleta com garrafa pode ser utilizada para amostragem superficial e de profundidade.

- Após a coleta com a garrafa na profundidade desejada, desconectar a mangueira de látex;
- Desprezar a água contida na mangueira de látex e distribuir a amostra para o(s) frasco(s) o mais rápido possível tomando-se o cuidado de não preenchê-lo(s) completamente, para facilitar a homogeneização no laboratório. Neste caso também deve ser observado se há análises correlatas como clorofila *a* e teste de toxicidade para que as alíquotas distribuídas nos diferentes frascos sejam provenientes de uma mesma amostragem;
- Manter a amostra refrigerada e ao abrigo da luz. Se necessário, adicionar ainda em campo, formol até uma concentração final de 5%, ou lugol, procurando manter uma alíquota, em um frasco menor (100mL), refrigerada para observação do material vivo.

A coleta com redes de plâncton geralmente é empregada em estudos qualitativos e pode ser feita por meio de arrasto horizontal e vertical, principalmente. Há vários tipos de redes disponíveis, sendo as mais indicadas para o estudo do fitoplâncton as de malha de náilon com abertura de 20µm a 45µm. Recomendam-se as redes longas e de boca larga, que possibilitam



maior área de filtração. É importante destacar que a coleta com rede não permite a quantificação precisa do fitoplâncton. Além disso, algumas espécies muito pequenas (nanoplâncton) não são retidas no copo, impossibilitando o conhecimento da comunidade total. Para ambientes com muito material em suspensão, como alguns rios, recomenda-se a coleta com redes de até 60µm, pois as de malhas menores entopem e inviabilizam a filtragem do material.

***Procedimentos de coleta horizontal do fitoplâncton com rede:***

- Amarrar uma corda na extremidade da rede;
- Em seguida, mergulha-se a rede na água a uma profundidade até 30cm;
- Com auxílio de uma embarcação é realizado um arrasto na superfície por tempo determinado, tomando-se o cuidado de evitar a zona de turbulência provocada pelo deslocamento da embarcação;
- A amostra retida no copo da rede é transferida para um frasco. Com auxílio de uma pisseta de água destilada, efetuar a lavagem, de fora para dentro do copo, como forma de retirar o material aderido ao mesmo;
- Manter a amostra refrigerada e ao abrigo da luz. Se necessário, adicionar ainda em campo, formol até uma concentração final de 5%, ou lugol ou solução Transeau.

***Procedimentos de coleta vertical do fitoplâncton com rede:***

- Mergulhar a rede na água até a profundidade desejada;
- Suspender a rede lentamente até a superfície;
- A amostra retida no copo da rede é transferida para um frasco. Com auxílio de uma pisseta de água destilada, efetuar a lavagem de fora para dentro do copo, como forma de retirar o material aderido ao mesmo;
- Caso haja necessidade de uma quantidade maior de organismos fitoplanctônicos, repetir o procedimento descrito nos itens anteriores;
- Manter a amostra refrigerada e ao abrigo da luz. Se necessário, adicionar ainda em campo, formol até uma concentração final de 5%, ou lugol ou solução Transeau.

***Procedimentos de Coleta para Determinação de Cianotoxinas***

- A amostragem deve ser realizada na superfície da água, coletando-se apenas a "nata" superficial, diretamente com frasco ou balde de inox;
- Armazenar em frasco de polietileno de 5 litros sob refrigeração.

Obs. Quando não houver presença de "nata", pode-se realizar arrastos (vertical e/ou horizontal) com rede procurando concentrar o maior número de organismos, armazenar em frasco adequado sob refrigeração.

### **6.1.7.3 Comunidade Perifítica**

O perifíton, segundo Wetzel (1983) constitui uma complexa comunidade de microrganismos (algas, bactérias, fungos e animais) aderidos a substratos orgânicos (vivos ou mortos) ou inorgânicos.

Os primeiros amostradores artificiais de perifíton foram desenvolvidos por Moebius em 1883 para coleta de animais em ambientes marinhos, utilizando lâminas de microscópio



(SCHWARTZBOLD, 1990). A maioria dos estudos sobre a comunidade perifítica tem como foco as cianobactérias e algas, remetendo-se à raiz nomenclatural do termo (fiton).

O perifiton tem papel importante no metabolismo dos ecossistemas aquáticos continentais, sendo considerado um dos produtores primários mais significativos tanto em ambientes lênticos como em ambientes lóticos. Em muitos ecossistemas, o perifiton pode contribuir com cerca de 70 - 80% de matéria orgânica para a produtividade total. Além disso, destaca-se como regulador do fluxo de nutrientes.

Organismos perifíticos colonizam muitos habitats de rios e lagos e têm sido utilizados como indicadores bióticos de características do ambiente e para biomonitoramento.

Dentre as características que tornam esta comunidade boa indicadora da qualidade da água incluem-se:

- Sendo sésseis, estão sempre submetidos às condições do local e isso os torna até melhores indicadores de grau de trofia do que o fitoplâncton;
- Apresentam a relação volume/superfície grande, o que favorece o acúmulo de certas substâncias químicas e contaminantes como DDT, Dieldrin,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ , etc.;
- Tem ampla ocorrência e distribuição;
- Há dados disponíveis sobre sua autoecologia e limites de tolerância;
- Por seu ciclo de vida curto e alta taxa de reprodução, respondem rapidamente a mudanças ambientais e tem requerimentos ambientais específicos (sensibilidade a fatores impactantes), o que os torna excelentes indicadores de qualidade da água. Esta comunidade tem sido utilizada para monitoramento e avaliação da qualidade, tanto em água doce, como no meio marinho.

Estudos de perifiton de águas continentais podem incluir toda a comunidade ou partes desta, tais como diatomáceas. Com essa perspectiva, os equipamentos e aparelhos desenhados para coleta de perifiton também foram caracterizados para amostragem de toda a comunidade ou para a coleta de assembléias como as diatomáceas.

Uma revisão sobre metodologias de coleta utilizando substratos artificiais foi feita por SLÁDECKOVÁ (1962). PANITZ (1980) testou substratos artificiais variados para amostragem de perifiton em reservatórios e SCHWARTZBOLD (1990) fez uma comparação entre metodologias de amostragem de perifiton tanto em substratos artificiais como naturais.

### **Métodos comumente utilizados para coleta de perifiton de água doce.**

Os métodos de coleta de perifiton podem ser classificados como:

- coleta manual de substratos naturais – captura total ou de parte de substratos naturais (folhas, ramos, pedras);



- coleta com delimitador – captura em área determinada do substrato natural, mediante perturbação manual do substrato (como por exemplo com o perifitômetro com escova); e
- coleta com substrato artificial - captura, como substrato de colonização, sem destruir ou perturbar o ambiente em amostragem (como o flutuador com lâminas de vidro).

Quaisquer destes métodos podem ser utilizados para amostragens quantitativas, no entanto a comparação entre pontos só pode ser feita quando os habitats investigados forem similares. No caso de utilização de substratos artificiais, é necessária também a padronização do tempo de exposição.

- ***Cuidados e preparação da coleta***

A avaliação dos substratos naturais disponíveis no ambiente em estudo, comparando facilidade de coleta, constância de ocorrência em todos os pontos amostrais e possibilidade de uso, bem como a avaliação da possibilidade de uso do mesmo equipamento/aparelho para coleta, seja em substratos naturais ou artificiais, é parte da preparação da coleta.

Os substratos naturais devem ser padronizados, dentro do possível, quanto ao tamanho das pedras, o tipo de folhas (forma, rugosidade e desenvolvimento – maduras, mas não senescentes) e ramos (quanto à espessura, formato e rugosidade).

No caso de uso de substratos artificiais, estes devem ser instalados no local previamente à coleta propriamente dita, para teste do tempo de colonização.

Um procedimento comum em qualquer metodologia de coleta de perifíton é o cálculo de área raspada/coletada, que possibilita a expressão dos resultados posteriores em organismos por área. A exatidão dos resultados depende diretamente dessas medidas que precisam, portanto, ter a maior acurácia possível.

Outro cuidado que deve ser comum a qualquer metodologia é a limpeza de acessórios, aparelhos e equipamentos entre coleta de réplicas e principalmente entre pontos. Esta limpeza deve ser feita com água do local (entre réplicas) e com água potável (“de torneira”) entre um ponto de coleta e outro.

A seguir são descritos procedimentos de coleta de perifíton em substratos naturais (folhas, ramos e pedras) e artificiais (flutuador com lâminas de vidro).

- ***Procedimentos de coleta***

Pode-se amostrar a comunidade perifítica de substratos naturais orgânicos (folhas, ramos), inorgânicos (pedras) ou utilizar substratos artificiais. Substratos naturais podem ser amostrados em rios/riachos e margens de reservatórios.



A escolha dos substratos depende de sua disponibilidade no local, do tempo e orçamento disponíveis.

**Procedimentos para coleta de perifiton em substratos naturais (folhas, ramos, pedras pequenas):**

- Vistoriar o local em busca das melhores plantas, ramos e/ou pedras. A seleção deve levar em conta submersão, evitando-se substratos expostos, e padronização de réplicas, optando-se por substratos o mais semelhantes em textura e tamanho. Devem ser coletadas pelo menos três réplicas de cada substrato (Figs. 73 e 74);
- Cortar ramos e folhas selecionados com auxílio de tesoura, que deve ser lavada com água do local depois da coleta de cada réplica. Colocar o material coletado em bandeja, com o lado a ser raspado para cima (Figs. 75 e 76);
- Raspar cada um dos substratos com pincel macio, "lavando" o material raspado para o frasco de amostra com água destilada, com auxílio de pisseta. A água deve ter um volume conhecido (neste caso, 150mL). No caso das pedras e das folhas, raspar apenas a parte superior (Fig. 77);
- Homogeneizar as amostras e dividir em 2 frascos, sendo 80mL para análise de clorofila *a* e 70mL para análise da comunidade;
- Preservar a amostra para estudo da comunidade com 6mL de formol 4%, 3 gotas de lugol ou solução Transeau (1:1). Manter a amostra para análise de clorofila *a* refrigerada;
- Medir comprimento e diâmetro dos ramos, com auxílio de régua e paquímetro. Desenhar com lápis o contorno das folhas e pedras raspadas, em papel vegetal. Os desenhos serão usados posteriormente para medida da área, com medidor de área foliar. A área dos ramos é calculada por aproximação da figura geométrica mais próxima (cilindro). As medidas de área permitem a expressão dos resultados em organismos/cm<sup>2</sup> (Fig. 78, 79 e 80).



**Figura 73.** Seleção de substrato (Foto: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).



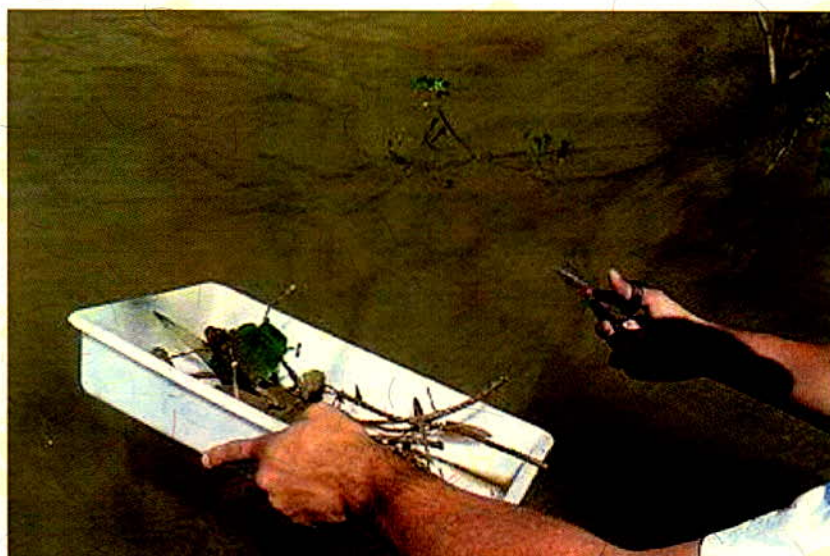


**Figura 74.** Detalhe da seleção de ramos e folhas (Foto: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).



**Figura 75.** Cortes dos ramos e folhas selecionadas (Foto: Márcia Janete Coelho Botelho).

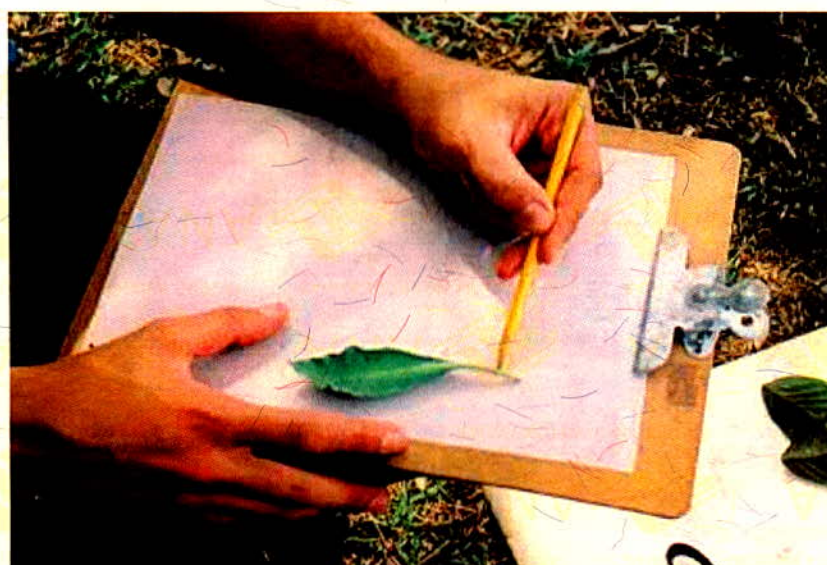




**Figura 76.** Seleção de ramos e folhas - Material coletado na bandeja com o lado a ser raspado para cima (Foto: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).



**Figura 77.** Raspagem do substrato com pincel macio (Foto: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).



**Figura 78.** Desenho manual das folhas e ramos (Foto: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).





**Figura 79.** Paquímetro utilizado para medida do comprimento e diâmetro dos ramos e tamanho das folhas (Foto: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).



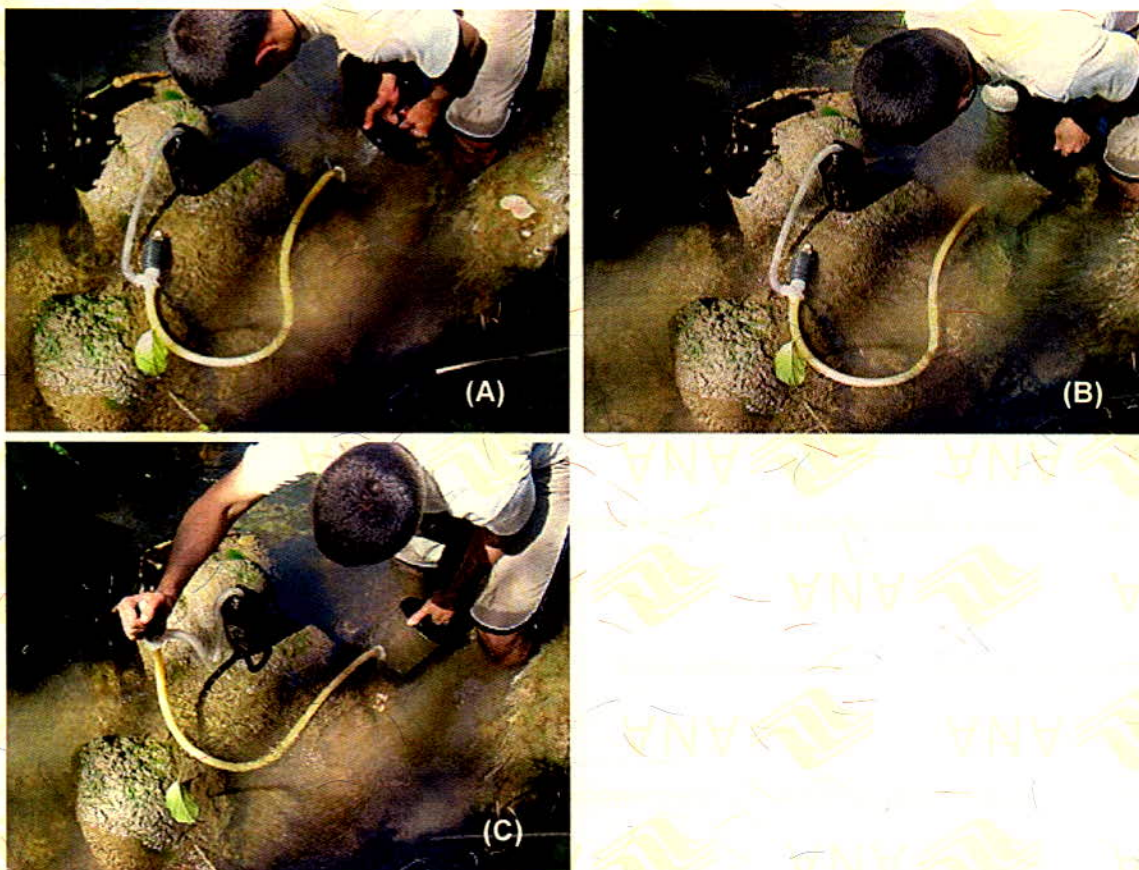
**Figura 80.** Medida do diâmetro dos ramos (Foto: Helena Mitiko Watanabe).

Em rios/riachos rasos onde ocorram pedras grandes que não possam ser removidas, a coleta do perifíton pode ser realizada com o perifitômetro com escova, modificado de Vis (VIS, 1997; VIS *et al*, 1998).

**Procedimentos para coleta de perifíton em substrato natural consolidado (pedras grandes demais para serem deslocadas) com perifitômetro com escova:**

- Selecionar as pedras a serem amostradas;
- Encostar a borracha da parte inferior do equipamento na pedra, no local mais plano possível evitando que água entre ou saia de dentro do tubo (Fig. 81 A);
- Escovar toda a superfície delimitada pelo equipamento, tentando retirar todo o perifíton sem usar muita força (Fig. 81 B);
- Colocar a extremidade com a mangueira livre no frasco de coleta. Levantar a mangueira com a pêra na extremidade e bombear até que toda a água e perifíton raspado tenham sido transferidos do interior do equipamento para o frasco de amostra (Fig.81, C);
- Preservar a amostra com lugol, formol 4% ou solução Transeau (1:1).





**Figura 81.** Coleta de amostras para Perifiton com perifitômetro com escova, modificado por VIS: (A) Introdução do amostrador no local selecionado, (B) Retirada do perifiton com a escova; (C) Bombeamento da água e perifiton raspado e preenchimento do frasco (Fotos: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).

Substratos artificiais, como flutuadores com lâminas de vidro podem ser usados em rios/riachos ou reservatórios onde haja razoável proteção contra vandalismo (locais mais distantes, com margens florestadas, propriedades privadas).

Os tubos de vidro cilíndricos e lâminas de microscópio são considerados excelentes substratos artificiais por seu baixo custo, boa aderência e colonização do perifiton, facilidade de remoção do biofilme aderido e fácil delimitação de área e volume.

**Procedimentos para coleta de perifiton em substrato artificial com flutuador de lâminas de vidro:**

- Selecionar o local para instalação do flutuador, evitando a exposição e acesso a estranhos, e determinar ponto de fixação na margem;
- Prender o flutuador ao ponto fixo. Desenhar um croqui do local, anotar coordenadas geográficas e registrar fotograficamente, de modo a possibilitar o resgate do equipamento;
- Deixar o flutuador no local pelo tempo pré-determinado, usualmente, 15 dias (Fig. 82 A);
- Depois do tempo pré-determinado, voltar ao local e retirar o equipamento da água, colocando-o em bandeja (Fig. 82 B);
- Abrir o flutuador soltando dois dos parafusos das extremidades.
- Retirar uma lâmina de cada vez, raspar o perifiton com pincel macio no frasco de amostra, lavando com pisseta e água. Preservar as amostras com lugol, formol 4% ou solução Transeau (1:1).
- Pode-se optar por analisar a amostra completa em laboratório. Nesse caso, a lâmina deverá ser colocada sem raspagem, diretamente no frasco de coleta e preservada.





**Figura 82.** Coleta de amostras para Perifiton. (A) Flutuador de Lâminas de vidro; (B) Retirada do Flutuador de Lâminas de vidro (Fotos: Rita Cerqueira Ribeiro de Souza).

#### **Fixação e preservação de amostras de perifiton**

Para a fixação e conservação do perifiton existem vários processos e produtos citados na literatura:

- Congelamento - é uma forma de preservação utilizada para análise de biomassa, composição de diatomáceas e abundância semi-quantitativa de táxons como clorófitas e cianobactérias. Este é o único método prático para preservação de grandes amostras para análise de biomassa;
- Solução Transeau - a desvantagem deste preservante é a grande quantidade de solução necessária, o que torna o custo elevado e inviabiliza o seu uso em excursões de coletas de maior duração ou com grande número de amostras;
- Solução de formol 4 a 10% neutralizado - pode ser usada para preservação de amostras pequenas ou subamostras, para análise quantitativa e composição taxonômica;
- Lugol acético 5% - pode ser usado para amostras pequenas ou subamostras, para análise quantitativa e composição taxonômica.

A solução de Lugol facilita a sedimentação (particularmente de pequenas diatomáceas) e mantém estruturas celulares frágeis. Entretanto, este preservante só se mantém ativo por 1 -2 anos, e as amostras devem ser armazenadas no escuro e em frascos âmbar.

Tanto o formol como o Lugol mantém as formas das algas sem carapaças. Formol é o preservante usado mais comumente porque não degrada as estruturas das organelas ou coloração de algas sem carapaça. Este preservante permanece ativo indefinidamente.

#### **6.1.7.4 Comunidade Zooplantônica**

Os organismos zooplantônicos são aqueles que vivem em suspensão devido à sua limitada capacidade de locomoção; podem ocupar toda a coluna de água, desde a superfície até grandes profundidades. A maioria dos invertebrados está representada no zooplâncton, seja como



adultos, larvas, ou ambos, assim como os ovos e larvas de peixes (vertebrados), e podem ocupar diferentes níveis tróficos. Alguns dos organismos permanecem no ambiente planctônico durante todo o seu ciclo de vida (holoplâncton), outros, só parte dele (meroplâncton), como larvas de diversos grupos (poliquetos, crustáceos, insetos e peixes). São encontrados em praticamente todos os ambientes aquáticos, como lagos, charcos, lagoas, estuários, oceanos e em muitos rios.

Apesar de apresentarem capacidade limitada de deslocamento horizontal, demonstram uma excepcional capacidade de migração vertical. Por isso, além de uma distribuição horizontal heterogênea, apresentam movimentos verticais diferenciados em resposta a diversos estímulos, como alimento, reprodução, luminosidade, correntes etc. Essa migração vertical pode ser dividida basicamente em dois tipos:

- sazonal: associada à reprodução ou a fatores físico-químicos. Animais que vivem em águas profundas podem deslocar-se para a superfície numa determinada época do ano para se reproduzir, por exemplo, e animais que vivem na superfície no inverno podem mover-se para águas mais profundas e frias no verão, e vice-versa;
- diária: associada principalmente à intensidade luminosa. Cada espécie tem preferência por determinada intensidade de luz, movendo-se mais para a superfície ou mais para o fundo, à medida que o sol se eleva ou se põe durante o dia, sendo que a nebulosidade também pode influenciar esse movimento.

A concentração máxima do zooplâncton ocorre, em geral, nas camadas superficiais onde há, entre outros fatores, concentrações mais elevadas de alimento. Contudo, a quantidade de zooplâncton de um local depende da resposta a estímulos promovidos por diversos outros fatores, como período do dia, estação do ano, concentração de nutrientes, presença de substâncias tóxicas na água, entre outros. O tamanho dos organismos zooplancônicos geralmente varia de poucos micrômetros até mais de 20mm e incluem flagelados, ciliados, rotíferos, copépodes, cladóceros e outros invertebrados (Tab. 4).

**Tabela 4.** Classificação do zooplâncton em função do tamanho dos organismos

Grupo	Limites de tamanho	Principais organismos
Ultrananoplâncton ou Picoplâncton	< 2 $\mu$ m	Bactérias livres
Nanoplâncton	2 $\mu$ m - 20 $\mu$ m	Pequenos flagelados, ciliados e alguns rotíferos
Microplâncton	20 $\mu$ m - 200 $\mu$ m	Foraminíferos, ciliados, flagelados, rotíferos, cladóceros e copépodes
Mesoplâncton	200 $\mu$ m - 2mm	Cladóceros, copépodes, quetognatos e larváceos
Macroplâncton	2mm - 20mm	Pterópodos, copépodes, eufausiáceos e quetognatos
Micronecton	20mm - 200mm	Cefalópodes, eufausiáceos, sergestídeos e mictofídeos
Megaloplâncton	> 200mm	Cifozoários, Taliáceos



Fonte: OMORI & IKEDA, 1984, modificado.

A comunidade zooplânctônica responde rapidamente às alterações ambientais devido ao curto ciclo de vida dos organismos, fazendo com que possam ser empregados como indicadores da qualidade da água. Apesar disto, a natureza transitória e a distribuição frequentemente agrupada muitas vezes tornam necessária a interpretação de seus resultados conjuntamente com outros dados biológicos, físicos e químicos, coletados simultaneamente. Além disso, o ambiente planctônico conta com a presença comum, ainda que normalmente em baixas densidades, de organismos bentônicos que fazem incursões na massa d'água ou são ressuspensos na coluna d'água em função de turbulência e mistura de água, como na zona de influência de rios, ocorrência de chuvas e ventos fortes, especialmente em locais rasos (<20m).

Muitos aparelhos de coleta foram desenvolvidos para essa comunidade em função, principalmente, da variabilidade na distribuição do zooplâncton, da diversidade de ambientes e da capacidade de fuga e de escape dos zooplânctontes e, por isso, não há um método que colete toda a variedade de organismos. Na tabela 5 encontram-se algumas recomendações para a escolha do aparelho de coleta.

**Tabela 5.** Recomendações para a seleção do equipamento de coleta de zooplâncton em diferentes ambientes.

Equipamento	Amostras pontuais	Amostras integradas horizontalmente	Amostras integradas verticalmente		Amostras em vegetação
			Águas pelágicas ou profundas	Águas litorâneas ou rasas	
Garrafas	+	-	-	+	++
Armadilhas	++	+	-	++	++
Bombas	++	+	+	++	++
Redes	-	++	++	+	-

Legenda: (-) Pouco recomendado; (+) Recomendado; (++) Muito recomendado.

Como a distribuição do zooplâncton geralmente é agregada e durante a coleta ocorre fuga e escape dos organismos, torna-se necessário aumentar o volume coletado por amostra ou adicionar réplicas (ou ambos). Apesar de não existir definição quanto ao volume mínimo a ser amostrado, pois depende da finalidade da investigação, sabe-se que, em ambientes oligotróficos, estuarinos e costeiros, é necessário coletar um volume muito maior (geralmente centenas de litros) do que em ambientes eutróficos; já nesses últimos a concentração de zooplâncton frequentemente é alta. Recomenda-se coletar um volume mínimo, por réplica, de 100L para o zooplâncton de água doce e de 5m<sup>3</sup> para o costeiro/estuarino e a obtenção de pelo menos duas réplicas em cada ponto de amostragem. Uma vez estabelecido o procedimento e o equipamento de coleta, é muito importante que estes não sejam alterados ao longo do estudo, a fim de possibilitar a comparação dos resultados. Na necessidade de informações adicionais, deve-se complementar com mais outro tipo de amostragem.



A seguir serão descritos os procedimentos para as coletas mais rotineiramente empregadas, sem mencionar técnicas bioacústicas e de observação “in situ”. Maiores detalhes sobre coleta de zooplâncton poderão ser encontrados em APHA (2005), BOLTOVSKOY (1981), De BERNARDI (1984), OMORI & IKEDA (1984), PINTO-COELHO (2004) e UNESCO (1968).

#### **i - Procedimentos de coleta com garrafas e armadilhas**

A garrafa do tipo van Dorn é a mais utilizada, porém há diversos outros tipos de garrafas que podem ser empregados na coleta de zooplâncton. É bastante eficiente para capturar organismos pequenos, que apresentam baixa capacidade de locomoção e fuga, como protozoários e rotíferos. Por coletarem um volume pequeno (2L a 30L), quase sempre necessitam de vários lances para capturar as formas raras ou de maior mobilidade. Por isso, não são recomendadas para ambientes oligotróficos ou profundos. Para organismos maiores (cladóceros e copépodes), são preferidas bombas, armadilhas e redes. A armadilha (ou trampa) é uma associação de uma garrafa de maior capacidade e uma rede.

As amostras obtidas com garrafas van Dorn ou com armadilha de Schindler-Patalas são geralmente filtradas em redes de náilon de malha conhecida. Podem ser utilizadas para ensaio qualitativo ou quantitativo, em estudos para o conhecimento da distribuição vertical do zooplâncton, sendo estes equipamentos mais práticos para ambientes aquáticos pequenos, como lagoas rasas ou pequenos lagos.

As principais vantagens que as garrafas e armadilhas exibem são a possibilidade de coleta em qualquer profundidade e o conhecimento do volume preciso de água em que os organismos foram capturados. Ambas podem ser empregadas satisfatoriamente em ambientes eutróficos, onde a abundância de zooplâncton e matéria orgânica em suspensão podem reduzir a eficiência de outros equipamentos, em estudos de microdistribuição e da zona litorânea. Recomenda-se que a garrafa e a armadilha sejam transparentes e sem partes brilhantes, a fim de reduzir a fuga de organismos mais velozes.

Estes equipamentos podem ser empregados para obter amostras pontuais ou integradas. A amostra pontual é obtida simplesmente lançando-se em um determinado local, uma única vez, o equipamento de coleta. Já a amostra integrada é o resultado de diversos lances realizados no mesmo intervalo de tempo e reunidos em uma única amostra.

##### ***Coleta de amostras para ensaio de zooplâncton com garrafa van Dorn:***

- Lançar a garrafa de van Dorn e coletar na profundidade desejada, quantas vezes forem necessárias;
- A cada lance efetuado, filtrar o seu conteúdo em rede de plâncton (a seleção da malha depende de que classe de tamanho ou grupo de organismos se deseja avaliar);
- Remover o copo da rede, vertendo a amostra para o frasco de coleta;
- Limpar o copo da rede, vertendo seu conteúdo para o frasco de coleta quantas vezes forem necessárias para a completa remoção dos organismos (Fig. 83 A, B, C, D, E, e F);
- Adicionar formol e completar com água filtrada (zooplâncton de água doce) ou com água do local (zooplâncton marinho) até obter uma solução de formol 10% neutralizado. Em amostras de água doce, adicionar previamente ao formol, 100mL de água gasosa e esperar por 15 minutos, aproximadamente;



- Sempre que possível, adicionar de 5mL a 10mL de solução do corante rosa de bengala 0,1%;
- Fechar bem o frasco coletor e mantê-lo ao abrigo da luz.

A coleta integrada de zooplâncton ao longo da coluna d'água com garrafa ou armadilha deve ser realizada de forma homogênea (a mesma quantidade de lances) em cada estrato, desde a superfície até próximo do fundo (geralmente de 0,5m a 1m do fundo).

***Coleta de amostras para ensaio de zooplâncton com armadilha de Schindler-Patalas***

- Lançar a armadilha e coletar na profundidade desejada;
- Retirar a armadilha da água;
- Remover o copo, vertendo a amostra para o frasco de coleta;
- Limpar o copo da rede, vertendo seu conteúdo para o frasco de coleta quantas vezes forem necessárias para a completa remoção dos organismos (fig. 83 A, B, C, D, E, e F);
- Ao final de todos os lances, adicionar formol ao frasco de coleta e completar com água filtrada (zooplâncton de água doce) ou com água do local (zooplâncton marinho), até obter uma solução de formol 10% neutralizado. Em amostras de água doce, adicionar previamente ao formol, 100mL de água gasosa e esperar por 15 minutos, aproximadamente;
- Sempre que possível, adicionar de 5mL a 10mL de solução do corante rosa de bengala 0,1%;
- Fechar bem o frasco coletor e mantê-lo ao abrigo da luz.



**Figura 83:** Coleta de amostras de zooplâncton com armadilha de Schindler-Patalas (A) Equipamento posicionado para descida; (B) Equipamento içado após coleta, (C) Amostra sendo filtrada, (D) Desconexão do copo coletor, (E) Transferência da amostra retida no copo coletor para o frasco, (F) Lavagem externa do copo coletor para a retirada de material aderido nas paredes (Fotos: José Jorge Neto).

## ii - Procedimentos de coleta com bombas

As bombas podem ser usadas em estudos qualitativos e quantitativos do zooplâncton. Contam com a facilidade de manejo, precisão da profundidade de coleta e facilidade de cálculo do volume de água coletado. Contudo, deve-se selecionar uma bomba cujas engrenagens não fragmentem os organismos, que precisam permanecer intactos para identificação.

As bombas contam com a limitação da profundidade em que podem operar e do diâmetro relativamente pequeno do tubo de entrada, que dificulta a captura de organismos maiores, mais ativos e que podem evitar facilmente a sucção na entrada do tubo. Para evitar esse problema, um funil pode ser colocado no bocal para diminuir a velocidade de entrada da água e aumentar a área de ação do equipamento, principalmente em ambientes pouco turbulentos, nos quais podem ocorrer erros maiores de amostragem.



### iii - Procedimentos de coleta com redes de plâncton

As redes de plâncton são a aparelhagem mais empregada no estudo do zooplâncton geral. Apesar disto, há um considerável número de erros associados à amostragem com redes, desde aqueles decorrentes do arrasto propriamente dito (volume, fuga, escape, seletividade, estrato amostrado, contaminação, colmatagem, distribuição agrupada, eficiência de filtração etc) até aqueles associados à perda de organismos, que ficam aderidos à malhagem, durante a transferência do material para o frasco de coleta. No entanto, as redes de plâncton são preferíveis às garrafas e armadilhas para amostragem em ambientes oligotróficos, onde o zooplâncton é menos abundante ou onde elevada quantidade de biomassa é necessária para as análises.

De uma forma geral, deve-se utilizar redes cujos poros sejam, pelo menos, 25% menores que a largura dos organismos desejados (BOLTOVSKOY, 1981). Para o estudo do zooplâncton geral de água doce recomenda-se usar malha com porosidade de 60µm a 75µm e para o zooplâncton marinho entre 150µm e 250µm.

A fuga de organismos, um dos principais problemas relacionados à amostragem com rede, pode ser reduzida pelo uso de redes maiores, de cores discretas, sem partes brilhantes, velocidades aumentadas (entre 0,5m/s e 1,0m/s), e remoção de acessórios da frente da rede.

Se o objetivo for um estudo quantitativo, deve-se equipar as redes com fluxômetro calibrado entre o centro e a borda da boca da rede, para estimar o volume de água filtrado pelo arrasto. O procedimento para a calibração do fluxômetro está descrito em Hubold (1979). Quando não se dispõe de fluxômetro, pode-se estimar o volume filtrado (m<sup>3</sup>) durante o arrasto vertical por meio da fórmula:

$$\text{volume de água filtrado (m}^3\text{)} = \text{área da boca da rede (m}^2\text{)} \times \text{profundidade de coleta (m)}.$$

Esse procedimento, contudo, não é recomendado por levar a uma estimativa pouco precisa do volume filtrado, devido ao erro introduzido pela colmatagem.

Os arrastos mais empregados na coleta de zooplâncton são o horizontal e o vertical.

#### **(a) Arrasto horizontal**

Dá-se preferência à amostragem por arrastos horizontais em determinados estratos, em lugares rasos, próximos às margens, ou onde é grande a influência de fatores físicos, como o vento e correntezas. Este tipo de coleta tem a finalidade de estimar a distribuição e abundância do zooplâncton dentro de uma camada de água em particular. Deve-se fixar um flutuador junto à boca da rede para mantê-la na profundidade desejada.



#### **Procedimentos de coleta por meio de arrasto horizontal**

- Lançar a rede na água, tomando-se o cuidado de anotar a leitura inicial do fluxômetro;
- Estando a rede na profundidade desejada, iniciar lentamente o seu deslocamento de forma que a rede fique longe da zona de turbulência causada pelo motor da embarcação;
- A velocidade do arrasto não deve ser superior a 0,5m/s;
- Depois de decorrido o tempo determinado de arrasto, puxar lentamente o cabo no qual a rede está amarrada e retirar a rede da água lentamente. Imediatamente após a saída da boca da rede da água, anotar a leitura final do fluxômetro;
- Remover o copo da rede com o zooplâncton concentrado, vertendo a amostra para o frasco de coleta;
- Limpar o copo da rede, vertendo seu conteúdo para o frasco coletor, quantas vezes forem necessárias para a completa remoção dos organismos;
- Adicionar formol neutralizado até uma concentração final de 10% (proporção de 1 parte de formol para 9 partes de amostra) e completar o frasco coletor com água filtrada (no caso de zooplâncton de água doce) ou com água do local (no caso de zooplâncton marinho);
- Sempre que possível, adicionar de 5mL a 10mL de solução do corante rosa de bengala 0,1%;
- Fechar bem o frasco coletor e mantê-lo ao abrigo da luz.

#### **(b) Arrasto vertical**

A coleta por meio de arrasto vertical é, em geral, mais apropriada do que o arrasto horizontal pois o zooplâncton pode apresentar-se verticalmente descontínuo, com tendência a se concentrar nas camadas mais profundas durante o dia, por exemplo. Entretanto, esse tipo de amostragem deve ser realizado em regiões onde os fatores físicos, como correntezas, interferem pouco na coleta da amostra.

#### **Procedimentos de coleta por meio de arrasto vertical**

- Lançar a rede na água lentamente, tomando-se o cuidado de anotar a leitura inicial do fluxômetro;
- Descer a rede até 0,5m-1,0 m do fundo. É importante evitar que a rede não bata no fundo, o que ressuspenderia o sedimento e contaminaria a amostra;
- Subir lentamente a rede e, imediatamente após a saída da boca da rede da água, anotar a leitura final do fluxômetro. A velocidade do arrasto deve ser de 0,5m/s, aproximadamente;
- Retirar a rede da água. No caso da rede subir com muito material aderido à malha, é recomendável submergi-la (deixando a boca da rede fora d'água) a fim de que a água do local empurre, de fora para dentro, os organismos que ficaram aderidos;
- Remover o copo da rede com o zooplâncton concentrado, vertendo a amostra para o frasco de coleta;
- Limpar o copo da rede com a água da pisseta, vertendo o conteúdo do copo para o frasco coletor quantas vezes forem necessárias para a completa remoção dos organismos, principalmente das malhas laterais;
- Adicionar formol neutralizado até uma concentração final de 10% (proporção de 1 parte de formol para 9 partes de amostra) e completar o frasco coletor com água filtrada (no caso de zooplâncton de água doce) ou com água do local (no caso de zooplâncton marinho);
- Sempre que possível, adicionar de 5mL a 10mL de solução do corante rosa de bengala 0,1%;
- Fechar bem o frasco coletor e mantê-lo ao abrigo da luz.

#### **(c) Cuidados a serem tomados na coleta de zooplâncton com redes:**

- a coleta com rede deve ser realizada com o maior cuidado possível, evitando-se sacudidas e golpes contra o casco da embarcação para evitar fuga dos organismos;
- os arrastos com redes finas devem ser suficientemente breves para não permitir o entupimento da malha (colmatagem);



- as redes devem ser inspecionadas entre uma coleta e outra, a fim de verificar a existência de furos ou outro tipo de dano à malha, o que exigiria correção imediata;
- é importante limpar a rede entre dois pontos de coleta com água do local; esse procedimento ajuda na desobstrução dos poros do cone filtrante (caso estejam um pouco entupidos) e evita a contaminação pela presença de organismos de outro local.

#### iv - Fixação e preservação de amostras de zooplâncton

Existem vários produtos empregados na fixação e conservação do zooplâncton, sendo o formol (5 a 10%) neutralizado e o etanol (70 a 95°GL) os mais amplamente utilizados. Recomenda-se a adição da solução de formol neutralizado com sacarose (item 3.5.2.) para prevenir a distorção da carapaça e a perda de ovos em cladóceros de água doce e a adição da solução corante rosa-de-bengala 0,1% (10mL, dentro de 24 horas após a coleta), tanto como forma de destacar organismos em ambientes turbidos, como para controlar a perda de organismos durante a manipulação para o ensaio.

A fixação do zooplâncton deve ser realizada imediatamente após a coleta (de 5 a 10 minutos), para evitar a deterioração e reduzir a predação ainda no frasco. Contudo, alguns grupos zooplancônicos contraem o corpo com a aplicação do fixador, como alguns rotíferos, dificultando a identificação posterior. Para reduzir esta contração, pode-se refrigerar rapidamente a amostra viva, ou adicionar um pouco de água quente ou água gasosa (100mL, aproximadamente) logo após a coleta da amostra. Esperar 5 a 10 minutos e preencher o frasco completamente com a solução fixadora (para reduzir as perdas do zooplâncton que fica aderido às paredes do frasco), sendo recomendada a proporção mínima de 2/3 desta solução.

Amostras de zooplâncton conservam-se por longos períodos, desde que estejam armazenadas em locais abrigados de luz, com temperaturas entre 5°C e 20°C, e o nível da solução conservadora seja periodicamente verificado.

##### 6.1.7.5 Macrófitas Aquáticas

O termo macrófitas aquáticas refere-se a plantas superiores de tamanho macroscópico que habitam os ambientes aquáticos. Este grupo apresenta uma grande heterogeneidade filogenética e taxonômica, podendo incluir desde macroalgas, pteridófitas até angiospermas. Alguns dos gêneros mais conhecidos são os aguapés (*Eichhornia*), alface-d'água (*Pistia*), vitória-régia (*Victoria*) e taboa (*Typha*). Sua presença é mais notada na região litorânea dos ambientes aquáticos, incluindo ambientes de água doce, estuarinos e marinhos, sendo possível classificá-las em cinco grupos distintos, conforme seu biótipo. Elas podem ser plantas enraizadas, emersas, com folhas flutuantes ou submersas. Outros grupos são as plantas livres submersas ou flutuantes. A sua distribuição espacial no ambiente depende do grupo a que pertencem. Plantas enraizadas com folhas emersas ou flutuantes estão condicionadas à profundidade, já que seus pecíolos têm um limite físico de comprimento, sobretudo no que diz respeito às trocas



gasosas. As plantas submersas enraizadas são limitadas pela transparência da água. Já as plantas flutuantes e as submersas livres têm outras limitações como nutrientes, vento e correnteza, por isso não são frequentes em ambiente lóticos, mas sim em reservatórios, podendo inclusive se transformar em um problema para o abastecimento, geração de energia e navegação. A contribuição das macrófitas aquáticas na produtividade de um ecossistema e na criação de habitats para o desenvolvimento de outras espécies justifica a sua importância.

As metodologias de utilização de macrófitas aquáticas como instrumento de monitoramento de ambientes aquáticos podem ser divididas em duas linhas básicas: a primeira que utiliza as alterações na composição das comunidades como indicadoras de um impacto (estudos fitossociológicos) e a segunda que utiliza ensaios químicos do material vegetal para determinar a eventual bioacumulação de contaminantes (estudos de bioacumulação).

Macrófitas aquáticas são amplamente utilizadas como bioindicadoras da qualidade da água de ambientes lênticos e lóticos. Entretanto torna-se necessário que haja o conhecimento prévio das suas características, bem como das condições que limitam sua ocorrência e crescimento; da proliferação e manejo da espécie utilizada.

#### **i - Estudos fitossociológicos**

Esses estudos pressupõem um levantamento detalhado da composição específica dos diferentes ecossistemas e levam em consideração tanto as variações de habitats como as variações sazonais. Alguns artigos apresentam a listagem de espécies encontradas em diferentes regiões do Brasil (IRGANG; GASTAL JÚNIOR, 2003), mas muitas delas são consideradas semicosmopolitas. Para a identificação até nível de espécie, algumas vezes é necessário recorrer às partes reprodutivas, apesar de existirem chaves mais direcionadas às partes vegetativas (COOK, 1996; HOEHNE, 1979).

Existem algumas metodologias para levantamentos qualitativos e quantitativos, sendo mais utilizados para ambientes aquáticos os métodos de parcelas, por meio de amostragem aleatória, ou em transectos. Em POTT e POTT (2003) são apresentados métodos de levantamento em transectos com diagrama de distribuição de espécies em relação à profundidade e distância da borda. Pode-se ainda, a partir destes levantamentos, calcular a porcentagem de cobertura ou de abundância/dominância das diferentes espécies. Em APHA (2005), são apresentados métodos de mapeamento, incluindo o sensoriamento remoto, métodos de levantamento das populações de macrófitas aquáticas, metodologias de coleta e abordagens quantitativas, bem como métodos para a avaliação de produtividade. Para avaliações de biomassa deve-se considerar que a biomassa de plantas enraizadas está em grande parte enterrada.

Técnicas de levantamento utilizadas:

- Imagens de satélite (Landsat)
- Imagens de satélite de alta resolução (Ikonos)
- Fotografias aéreas georreferenciadas
- Levantamentos em campo (GPS e SIGs)



- Videografia digital
- Ecobatimetria tridimensional

### Determinação da biomassa de macrófitas

A biomassa de macrófitas é o peso do material vegetal contido acima e abaixo da lâmina d'água, inclusive do material presente no interior do sedimento, expresso por unidade de área.

Por intermédio de um amostrador de área conhecida, um quadro ou parcela introduzida no local selecionado do banco de macrófitas aquáticas, coleta-se em sacos plásticos todo o material vegetal vivo e morto contido em seu interior. Posteriormente, o material é seco e pesado e o resultado final é expresso por unidade de área (maiores detalhes encontram-se descritos em POMPÊO & MOSCHINI-CARLOS, 2003).

### ii - Estudos de bioacumulação

Os estudos de bioconcentração por macrófitas objetivavam, inicialmente, a redução da concentração de nutrientes no ambiente, por meio das plantas. No entanto, um trabalho realizado por SEIDEL (1966) demonstrou que *Scirpus lacustri* também era capaz de absorver grandes quantidades de compostos orgânicos, como pentaclorofenol e EDWARD (1975) demonstrou a sua utilidade em estudos com pesticidas (DDT) e PCBs.

MAURI *et al.* (1988) fizeram estudos de absorção de mercúrio com *Elodea densa* e determinaram que a absorção podia ocorrer tanto pelas raízes como pelas folhas das macrófitas aquáticas. Também estudaram o processo de descontaminação, que consiste na eliminação dos contaminantes para a água, podendo ainda ocorrer a translocação desses contaminantes do tecido velho para o jovem, ou vice-versa.

Os estudos podem ser passivos (Tab. 6), quando se coleta o material em determinado ambiente para ensaio posterior, ou ativos, quando introduz-se material não contaminado no meio, para ser recolhido e analisado posteriormente.

**Tabela 6.** Características principais dos estudos passivos e ativos e determinação de biomassa de macrófitas aquáticas.

TIPO DE COLETA	DEFINIÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Bioacumulação Passiva	Coleta de macrófitas aquáticas presentes no ambiente	Utiliza-se espécimes que ocorrem nos locais a serem estudados; Leva em consideração um possível desenvolvimento de resistência (genético) das populações dos diferentes locais.	Em estudos sazonais, ou com comparações temporais algumas espécies podem "desaparecer" do ambiente;
Ativa (ou Método de Transplante) - Bioacumulação ativa.	Consiste em introduzir material não contaminado, no meio, que será posteriormente recolhido e analisado.	Padronização da idade e material vegetal transplantado. Podem ser realizadas comparações em qualquer época do ano, e para qualquer período de exposição.	Deve-se realizar ensaios preliminares dos contaminantes nas amostras. As amostras introduzidas devem ser marcadas e fixadas para poderem ser recolhidas.
Determinação da biomassa	Coleta de macrófitas aquáticas presentes no ambiente	Utiliza-se espécimes que ocorrem nos locais a serem estudados;	Método destrutivo que elimina material de uma área determinada.



#### **6.1.7.6 Comunidade Bentônica de Água Doce**

Em projetos que integrem ensaios químicos, físicos, biológicos e ecotoxicológicos dos sedimentos, a coleta de amostras para ensaio da comunidade bentônica deve anteceder as dos demais parâmetros, minimizando-se assim o efeito da perturbação do sedimento pelo equipamento de coleta, que pode provocar a fuga ou a “lavagem” dos organismos.

A escolha do amostrador a ser empregado na coleta da fauna bentônica depende do objetivo do trabalho, do tipo de ambiente a ser estudado e do substrato encontrado no local de coleta. Os amostradores podem ser classificados em:

- Pegador - captura, em área, uma porção do sedimento do ambiente em amostragem;
- Corer - captura, em profundidade, uma porção do sedimento do ambiente em amostragem;
- Rede e Delimitador - capturam, em área, mediante perturbação manual do substrato; e
- Substrato artificial - captura, como armadilha de colonização, sem destruir ou perturbar o ambiente em amostragem.

Amostragens qualitativas e semi-quantitativas de bentos de água doce podem ser obtidas com o uso de qualquer tipo de amostrador, mas no segundo caso, o esforço amostral, em geral medido como tempo de coleta para redes ou número de unidades amostrais para pegadores, corer, delimitadores e substratos artificiais, deverá ser padronizado. Amostragens deste tipo em geral se destinam a um levantamento faunístico completo, em que todos os tipos de habitat do ponto de coleta devem ser investigados, mesmo que para isso seja necessária a utilização de mais de um método e/ou equipamento. Comparações entre pontos de coleta diferentes só serão válidas quando habitats similares forem considerados. Embora este tipo de coleta consuma menos tempo, a experiência e habilidade do operador tornam-se fundamentais, pois é necessário que se defina, em campo, todos os diferentes tipos de habitat a serem amostrados.

No ensaio de bentos a pegada total é considerada, inclusive a água que acompanha a amostra e o material orgânico e inorgânico grosseiro.

Nem todo tipo de amostrador se presta para amostragens quantitativas, já que é necessária a existência de uma área amostral definida, como em pegadores, corers e delimitadores. Embora o número de réplicas necessário para tais amostragens seja calculável a partir de dados obtidos em estudos piloto, freqüentemente estabelece-se como três a quantidade mínima de unidades amostrais, considerando-se o tempo de processamento das análises e a necessidade de fornecimento rápido dos dados. Entretanto, a obtenção de cinco réplicas aumentaria a precisão e a exatidão estatística do dado e, portanto, seria ideal.



Ao se realizar amostragem de organismos bentônicos ou de sedimento para ensaio físico-químico, é desaconselhável a coleta sobre pontes; uma vez que o sedimento sob ponte não é o natural do curso do rio.

Muitos pegadores, ao descer, formam ondas de choque na coluna d'água que promovem uma lavagem na superfície a ser coletada e, conseqüentemente, subestimam as populações bentônicas amostradas. O controle da velocidade de descida minimiza esse problema, mas o ideal é adotar aparelhos que apresentem mecanismos ou estruturas que evitem essa perturbação do substrato.

O pegador Ekman-Birge solucionou satisfatoriamente esse problema ao apresentar portinholas duplas em sua face superior, que se abrem na sua descida e se fecham na subida. Sua eficiência na coleta de amostras da zona profunda de lagos e reservatórios, onde predominam sedimentos finos, tem sido demonstrada em uma série de trabalhos comparativos e, de fato, esse é o equipamento mais empregado em estudos de bentos destes locais. O corer múltiplo pode ser também uma boa opção, principalmente na amostragem de populações de menor tamanho e que se enterram profundamente, como de vermes *Oligochaeta*. Já o corer simples, que possui área amostral restrita, requererá um maior número de réplicas para estimativas populacionais confiáveis. Em ambos os casos, a amostragem de organismos de maior porte, como os grandes bivalves sul-americanos, é comprometida pela pequena área de captura deste tipo de equipamento. A Ekman modificada por Lenz e os equipamentos do tipo corer permitem fracionamento da amostra de sedimento e, conseqüentemente, estudos da distribuição vertical das populações bentônicas.

Na zona marginal de lagos e reservatórios e em rios, onde o substrato tende a ser mais grosso e duro, o pegador do tipo Ponar é o que tem sido considerado o melhor equipamento para amostragens quantitativas de bentos, sendo, por essa razão, o mais freqüentemente usado. Sua versão maior (523cm<sup>2</sup>) tem sido recomendada para ambientes preservados, enquanto que, para ambientes poluídos, tem se considerado suficiente a área de pegada da versão menor (232cm<sup>2</sup>). Os pegadores Petersen e van Veen, assim como o modelo modificado que funde esses dois aparelhos, também têm sido utilizados, embora não apresentem soluções eficientes ao problema da formação de ondas de choque.

Em riachos rasos (profundidade inferior a 30cm) a rede "D" para coleta com o método "kick sampling" e os delimitadores, que apresentam áreas de amostragem definida, são ideais para a coleta de organismos bentônicos. No caso do "kick sampling", onde o coletor perturba o fundo com os pés, deslocando os organismos para dentro da rede, é fundamental padronizar e anotar o tempo de amostragem. A abertura de malha da rede pode variar (de 0,35 a 0,6mm) e, embora as malhas mais finas retenham populações de menor tamanho e indivíduos em estágios iniciais de desenvolvimento, essas promovem maior perda de material por refluxo. Na amostragem com equipamentos do tipo Surber ou Hess, em que o substrato é perturbado com as mãos, é



recomendado o uso de luvas grossas para proteção contra objetos cortantes. Nas coletas com redes e delimitadores, organismos de maior porte, visualizados no momento da coleta, podem ser retirados manualmente da área de coleta e colocados em frasco, sem serem jogados na rede. Com este cuidado preserva-se sua integridade estrutural, facilitando sua identificação.

A amostragem com substrato artificial tem como maiores vantagens não ser destrutiva e padronizar o substrato de coleta. Porém, é preciso que se tenha em mente que as comunidades que colonizam os substratos freqüentemente diferem daquela encontrada no substrato natural. Na instalação desses equipamentos é preciso se preocupar em minimizar perdas por vandalismo e inundações e a recuperação deve ser realizada ao mesmo tempo, de forma a que todos tenham sido teoricamente submetidos ao mesmo processo de colonização.

Assim como o método, o local de amostragem variará também com o objetivo do trabalho. Por exemplo, em estudos que se destinem à avaliação da qualidade de sedimento, a coleta da fauna bentônica deverá ser realizada na zona de deposição de sedimentos finos, ou seja, na margem deposicional ou remansos em rios e na região profunda em reservatórios e lagos. Neste caso, é adequado o uso de pegadores ou corer. Por outro lado, amostragens do bentos da zona sublitoral servem aos estudos de gradientes ambientais dentro de um reservatório. Já a aplicação de índices bióticos em riachos pede uma amostragem exaustiva, ou seja, de todos os tipos de habitat existente no ponto de coleta, devendo, dependendo do índice a ser aplicado, ser qualitativa ou semi-quantitativa.

Alguns dados físicos e químicos devem acompanhar a amostragem de bentos para facilitar a discussão posterior dos resultados. A listagem completa de variáveis dependerá do local e do objetivo do projeto, mas pode-se considerar como medidas mínimas a serem tomadas: profundidade, área do amostrador ou tempo de colonização, granulometria, teor de matéria orgânica e de umidade no sedimento, transparência da água, velocidade da corrente, tipo de ambiente coletado (canal ou margem/corredeira ou remanso para rios e riachos; litoral, sublitoral ou profunda para reservatórios e lagos) e oxigênio de fundo.

### **Cuidados na coleta**

Alguns cuidados para prevenir erros de amostragem ou contaminação da amostra por organismos que não pertençam ao local devem ser tomados na coleta. Essas ações dependerão do tipo de amostrador usado e estão apontadas a seguir.

#### **Pegadores e Testemunhadores**

- Desconsiderar amostras quando o pegador ou corer não tiver fechado corretamente.
- Amostras ideais devem ter volume correspondente a cerca de 2/3 da capacidade total do amostrador.
- Lavar o amostrador entre dois pontos de coleta.
- Cada amostra corresponderá ao volume de uma pegada.



#### **Substrato artificial (cesto com pedras)**

- Retirar rapidamente o cesto.
- Inserir o cesto em sacos plásticos etiquetados ou rede antes de passar pelo filme de tensão superficial, de forma a evitar a lavagem dos organismos.
- Cada amostra corresponderá ao conteúdo de um cesto

#### **Redes e Delimitadores**

- Amostrar todo tipo de habitat (p.ex.: canal, margens, vegetação, remansos) existente no ponto de coleta.
- Não perturbar o ambiente a montante do amostrador, ou seja, processar a amostragem de jusante para montante.
- Evitar o escape de material pelas laterais da rede e pela face inferior dos delimitadores.
- Concentrar no fundo da rede o conteúdo aprisionado lavando-a com água de torneira e despejar o concentrado em frasco de coleta etiquetado.
- Cada amostra corresponderá ao conteúdo de um esforço amostral (tempo para a rede e unidade de área para os delimitadores).

Quando a coleta for realizada em local muito distante, envolvendo um período de amostragem prolongado, é adequado que as lavagens de amostras coletadas com pegador ou corer sejam efetuadas em campo para facilitar o transporte. Para tanto é necessário levar para campo a rede ou peneira de lavagem, cuja malhagem será definida de acordo com o objetivo do estudo. A lavagem deverá ser feita sob água corrente e o material retido armazenado em potes plásticos devidamente etiquetados e fixados em formol em concentração final na amostra de 10% ou álcool 70° GL.

#### **6.1.7.7 Comunidade Bentônica Marinha**

Esta comunidade abrange organismos sésseis, cavadores ou que se locomovem ou se arrastam sobre o substrato. Seus representantes ocupam toda a área desde o nível da maré alta até profundidades abissais, compreendendo diversos tipos:

- formas sésseis: animais tais como esponjas, cracas, mexilhões, poliquetas, algas macroscópicas e muitas diatomáceas;
- formas que se locomovem ou arrastam: caranguejos, lagostas, copépodos, anfípodos, outros crustáceos, protozoários, bivalvos, gastrópodos e alguns peixes;



- formas cavadoras: maioria dos bivalvos e poliquetas, alguns crustáceos e equinodermos.

De acordo com o tamanho, os organismos do bentos são geralmente classificados em:

- **Macrofauna ou macrobentos:** compreende os organismos retidos pela peneira com malha de 0,5mm (equivalente à ABNT n.º 35). Enquadram-se nesta categoria a maioria dos organismos cavadores ou perfuradores de sedimentos não compactados, e os organismos que se locomovem sobre sedimentos duros, incluindo os mais ativos;
- **Meiofauna ou meiobentos:** inclui a maioria dos menores metazoários, que passam através da malha de 0,5mm (ABNT n.º 35), e se subdivide em:
  - **Meiofauna temporária:** composta pelos representantes jovens pertencentes a qualquer grupo da macrofauna que possuem estágios juvenis bentônicos; podem ser muito abundantes em certos locais de amostragem;
  - **Meiofauna permanente:** composta por animais adultos de pequenas dimensões, tais como: rotíferos, gastrotríqueos, tardígrados, ostrácodos, nemátodos, alguns poliquetas, gastrópodos, holoturóides, tunicados etc.;
- **Microfauna:** organismos que necessitam de técnicas microscópicas especiais para serem examinados. Incluem protozoários e outros seres de dimensão semelhante.

Sob certos aspectos, o estudo da fauna bêntica que habita a região entre as marés é mais fácil (por ser mais acessível) do que nas áreas localizadas abaixo delas, mas como o habitat está sujeito tanto a condições aquáticas como aéreas, os fatores que influenciam sua distribuição são mais complexos. Deve-se assinalar que uma determinada comunidade bentônica vive em um determinado tipo de substrato, o qual, por sua vez, representa um certo conjunto de condições físico-químicas do local de coleta.

Outros aspectos gerais influenciam a distribuição da comunidade bentônica:

- **Profundidade:** A densidade e a diversidade dos organismos tende a decrescer com o aumento da profundidade das estações de amostragem; quanto maior a profundidade, mais superficialmente serão encontrados os organismos cavadores;
- **Latitude:** A densidade e a variedade de organismos aumentam da região polar em direção ao equador;
- **Sedimento:** O número e a diversidade de organismos diminuem com o substrato mais grosso e aumentam com o mais fino; em geral, locais de sedimentos mais finos não estão tão sujeitos às ações de ondas ou correntes e estão localizados perto de estuários ou desembocadura de rios, onde há maior taxa de precipitação de partículas orgânicas e certa oscilação na salinidade. Em sedimentos arenosos há grande quantidade de organismos cavadores, e em fundos mais finos e moles a fauna cavadora é menos abundante.



### **i - Costão rochoso**

Costões rochosos compreendem formações de rochas cristalinas basálticas ou graníticas, presentes entre a terra e o mar, podendo apresentar diferentes configurações como falésias (substratos íngremes e elevados), costões amplos com superfície homogênea ou recortada, ou campos de matações de diferentes formas, tamanhos e grau de agregação.

A superfície rochosa favorece a colonização e o desenvolvimento de uma comunidade biológica muito rica, a qual se encontra adaptada tanto a se aderir / fixar nesse tipo de substrato, como a suportar as adversidades ambientais ocorrentes principalmente nos limites da zona da oscilação das marés (zona entre-marés).

Na zona entre-marés as algas e animais estão sujeitos a níveis variáveis de dessecação, temperatura, salinidade, hidrodinamismo etc, e cada espécie encontra-se adaptada a exigências ambientais específicas. Dessa forma a comunidade biológica desses ambientes apresenta uma estrutura espacial em estratos (zonação) ao longo do gradiente vertical do substrato. As flutuações abióticas e bióticas alteram marcadamente a composição da comunidade em diferentes locais e ao longo das estações do ano (variações espaço/temporais).

Tendo em vista essas particularidades, para o estudo dessas comunidades é fundamental estabelecer um protocolo de coleta e amostragem que atenda os objetivos do pesquisador, cujas principais abordagens estão contempladas a seguir. Ressalta-se que para esse tipo de coleta, as mesmas devem ser realizadas durante baixamares de sizígia, com consulta prévia à Tábua das Marés editada pela DHN (Diretoria de Hidrografia e Navegação).

#### **(a) Coleta para determinação da porcentagem de cobertura por espécies sésseis dominantes (amostragem quantitativa)**

##### **Contagem "in loco":**

- Selecionar uma área no costão, cuja largura deve estar relacionada ao grau de homogeneidade da superfície. Superfícies mais heterogêneas devem ter largura maior (a ordem de grandeza das áreas de amostragem é de algumas dezenas de metros);
- Em caso de locais formados por matações, estabelecer subáreas similares quanto à inclinação, orientação geográfica e hidrodinamismo;
- Demarcar a largura da área de amostragem por meio de dois pinos de aço cravados à rocha, acima da zona ocupada pela comunidade biológica. Os pinos além de marcar a área, servem como encaixe para parafusos utilizados na amarração das cordas e como sustentação ao pesquisador (EPI);
- Unir os dois pinos por meio de uma corda graduada a intervalos regulares de 22cm, o qual está associado à largura do delimitador de campo utilizado que apresenta 22cm x 18cm de área;
- Sortear, previamente em laboratório, as marcas da corda que irão orientar a colocação do delimitador sobre a área de ocupação da espécie a ser amostrada;



- Em campo, posicionar o delimitador (ver Capítulo 5) na direção da marcação sorteada, sobre a população a ser amostrada, em sua área mais densa de ocupação, e contar as interseções sob as quais os indivíduos dessa população ocorrem;
- Anotar o resultado em uma ficha de campo contendo local, data, horário do registro, espécie, denominação do ponto de amostragem e do número da réplica.

#### **Coleta pelo método fotográfico:**

Consiste na utilização de uma câmera fotográfica subaquática, com lente “close-up” que enquadra a fotografia por meio de um suporte com um delimitador e “flashes” estroboscópicos. Para realizar a coleta pelo método fotográfico, deve-se:

- Selecionar uma área no costão, cuja largura deve estar relacionada ao grau de homogeneidade da superfície. Superfícies mais heterogêneas devem ter largura maior;
- Em caso de locais formados por matacões, estabelecer subáreas similares quanto à inclinação, orientação geográfica e hidrodinamismo;
- Demarcar a largura da área de amostragem por meio de dois pinos de aço cravados à rocha, acima da zona ocupada pela comunidade biológica;
- Unir os dois pinos por meio de uma corda graduada. A graduação da corda apresenta intervalos regulares, os quais são da mesma largura da área padronizada pelo delimitador da máquina. Sortear, em laboratório, as marcas da corda que irão orientar a colocação do delimitador sobre a população da espécie a ser amostrada;
- Em campo, posicionar o delimitador da câmera fotográfica na direção da marcação sorteada, sobre a população a ser amostrada, e tirar a fotografia. Devido à presença dos flashes, as fotos podem ser tiradas durante a noite desde que observados os EPIs adequados;
- Em laboratório, as fotos são analisadas no computador, por meio de editores de fotos, sendo subdividida em 100 pontos de interseção homogeneamente distribuídos. Este procedimento pode ser feito também com o auxílio de um projetor de “slides” ou projetor multimídia, sendo as fotos projetadas contra uma cartolina branca subdividida da mesma forma;
- São contados os pontos de interseção sob os quais indivíduos da população estão presentes.

#### **(b) Coleta para determinação da estrutura espacial (zonação)**

##### **Contagem “in loco”:**

- Estabelecer um transecto vertical no costão, com 50cm de largura. A delimitação do transecto é feita com a utilização de dois pinos de aço cravados à rocha acima da comunidade biológica, distanciados em 50cm. Dois pinos também podem ser cravados na rocha no limite inferior da zona entre-marés, para que assim a área de amostragem esteja perfeitamente fixada;



- Deve-se unir os pinos com uma corda que desce em ambos os lados do transecto até a base da rocha ou linha d'água, formando um trilho que vai orientar a colocação do delimitador (ver Cap. 5) de forma correta ao longo do transecto;
- A corda é previamente marcada com lápis dermatográfico ou tinta indelével a intervalos de 10cm, para auxiliar o posicionamento do delimitador nos diferentes níveis do costão;
- Posiciona-se o delimitador próximo à linha d'água ou base da rocha, conforme o caso, e conta-se o total de quadrículas no interior das quais determinada espécie encontra-se presente;
- Organismos (animais e vegetais) com identificação duvidosa devem ser coletados para confirmação taxonômica em laboratório ou para envio a especialistas;
- Os organismos devem ser coletados vivos e acondicionados em frascos com tamanho proporcional ao tamanho dos indivíduos e com tampa de boa qualidade. Os vidros devem ser etiquetados, com identificação do local e data de coleta, nível do transecto, quando for o caso. É importante que além das etiquetas externas, sejam feitas etiquetas internas, em papel vegetal, escritas a lápis, pois as externas podem borrar ou ser perdidas;
- Repete-se o procedimento paulatinamente, nível a nível no costão, obedecendo-se as marcações da corda, até o limite superior de distribuição da comunidade;
- Sugere-se a realização de, pelo menos, 10 réplicas para as amostragens quantitativas e três transectos para a amostragem estratificada.

#### **Coleta pelo método fotográfico:**

- Estabelecer um transecto vertical no costão. A delimitação do transecto é feita com a utilização de dois pinos de aço cravados à rocha, um acima dos limites da comunidade biológica, e outro próximo à linha d'água ou base da rocha;
- Os pinos são unidos por uma corda com marcações feitas a intervalos de 18cm, constituindo um transecto perpendicular à linha d'água;
- São tiradas fotografias digitais contíguas, desde o nível superior até o nível próximo à base da rocha ou linha d'água;
- Em laboratório, as fotos são analisadas no computador, por meio de editores de fotos, sendo subdividida em 100 pontos de interseção homogeneamente distribuídos. Este procedimento pode ser feito também com o auxílio de um projetor de "slides" ou projetor multimídia, sendo as fotos projetadas contra uma cartolina branca subdividida da mesma forma;
- São contados os pontos de interseção sob os quais indivíduos das diferentes populações estão presentes;
- Sugere-se a realização de, pelo menos, 10 réplicas para as amostragens quantitativas e três transectos para a amostragem estratificada.



### **(c) Coleta para amostragem qualitativa**

- Estabelecer uma área padrão de amostragem, representativa do costão de estudo, a qual comporte a estrutura fisiográfica dominante da área de interesse;
- Deve-se padronizar, tanto quanto possível, o tamanho da área amostral, o tempo de coleta (esforço amostral) e o nível de detalhamento em coletas sucessivas e entre pontos de coleta;
- As observações devem ser feitas minuciosamente, sendo as ocorrências dos organismos registradas em ficha de campo. As identificações devem ser realizadas de acordo com o conhecimento do técnico coletor;
- Organismos (animais e vegetais) com identificação duvidosa devem ser coletados para confirmação taxonômica em laboratório ou para envio a especialistas.
- Os organismos devem ser coletados vivos e acondicionados em vidros com tamanho proporcional ao tamanho dos indivíduos e com tampa de boa qualidade. Os vidros devem ser etiquetados, com identificação do local e data de coleta, nível do transecto, quando for o caso. É importante que além das etiquetas externas, sejam feitas etiquetas internas, em papel vegetal, escritas a lápis, pois as externas podem borrar ou ser perdidas.
- Os invertebrados e as algas devem ser fixados com formol neutralizado, diluído a 10%. Animais pequenos podem ser alternativamente preservados com álcool 70°GL.
- Estocar as amostras em local escuro até o ensaio.

### **ii - Praias**

As praias são ambientes costeiros compostos basicamente de material inconsolidado mineral, mais freqüentemente areias, podendo conter também lodo (silte, argila), cascalhos, pedras roladas, seixos, calhaus, conchas de moluscos, restos de corais, algas calcárias etc.

Estes ambientes se estendem, perpendicularmente à linha da costa, desde o nível de baixa-mar até a zona de vegetação permanente, restingas, dunas e falésias, sendo divididos em porções denominadas ante-praia e pós-praia. A ante-praia representa a zona entre-marés propriamente dita, a qual recebe os efeitos das ondas, enquanto que a pós-praia só é atingida pelos borrifos das ondas, ou ocasionalmente em marés vivas excepcionais.

As praias são ambientes costeiros extremamente importantes ecologicamente, seja pela sua própria riqueza biológica, seja pelo importante papel que desempenham em relação aos outros ecossistemas costeiros. A riqueza e composição biológica são extremamente variáveis, dependendo do tipo e localização da praia. A riqueza em espécies de uma praia pode chegar a várias dezenas de espécies, principalmente pertencentes aos grupos dos moluscos, anelídeos - poliquetos e crustáceos. Vários outros grupos estão presentes, mas em menor abundância e variedade de espécies.



Da mesma forma que em costões rochosos, as praias são ambientes bastante complexos, com grande variedade de fauna, ocupando os diferentes microhabitats disponíveis. A caracterização das comunidades de praias baseia-se em sua composição de espécies, riqueza, densidade das populações, distribuição espacial das comunidades (zonação horizontal e vertical), variações temporais (sazonais, anuais, bianuais etc.), entre muitos outros fatores.

Comumente, para avaliação dessa variável, utilizam-se amostradores ou delimitadores (cilíndricos ou em forma de caixa) com tamanhos variáveis, aplicados em transectos contínuos ou não, perpendiculares à linha d'água, também com largura e número de réplicas definidas pelo pesquisador.

Para a coleta, os delimitadores são introduzidos no sedimento até a profundidade de objetivo do estudo (10cm ou mais) sendo o material coletado com o próprio delimitador ou com o auxílio de uma pequena pá.

As amostras devem ser lavadas preferencialmente com água do próprio local, logo após a amostragem, para evitar choque osmótico.

Considerando que durante a preservação muitos organismos se contraem, dificultando a observação de estruturas importantes para a sua identificação, alguns taxonomistas solicitam que os organismos sejam "anestesiados" antes da fixação com formol ou com álcool. Deste modo, é importante que se contate os especialistas que colaborarão com os trabalhos de identificação, que indicarão, se ou qual, anestésico deverá ser utilizado.

Procedimentos detalhados a respeito dessas metodologias podem ser encontrados em Amaral *et al.* (1994a; 1994b; 1988; 1995a; 1995b; 1991;1990), Belúcio *et al.* (1989; 1995), Leite *et al.* (1988; 1992), Lopes (1993); Lopes *et al.* (1989); Monteiro (1980), Morgado *et al.* (1994), Pardo *et al.* (1993; 1994), Reis *et al.* (1994), Rodrigues *et al.* (1986), Rodrigues *et al.* (1988), Salvador *et al.* (1995), Shimizu (1990; 1992; 1994).

No que diz respeito às praias, as principais variáveis ambientais determinantes da estrutura das comunidades biológicas são o declive e a topografia (perfil), as características granulométricas do sedimento e o hidrodinamismo. A metodologia de amostragem de declive e perfil de praias encontra-se na Tabela 7, a seguir.

**Tabela 7.** Metodologia de amostragem de declive e perfil de praias.

<b>Equipamento</b>	Declivímetro, metros dobráveis.
<b>Forma de amostragem</b>	Ao longo do transecto, perpendicular à linha d'água, em medidas lineares contíguas.
<b>Área de amostragem</b>	Limitada pelas franjas do infralitoral e supralitoral.
<b>Réplicas</b>	Depende do objetivo do trabalho. Coletas nos cantos das praias possibilitam uma melhor caracterização. Se for viável apenas uma réplica em cada ponto, devem-se padronizar as coletas no meio das praias.



### iii - Infralitoral

bentos marinho - infralitoral é composto pelos organismos que habitam os sedimentos permanentemente submersos. Segundo sua posição no substrato, os organismos bentônicos podem ser classificados como:

- epifauna - vivem sobre o substrato;
- infauna - vivem no interior de tubos e galerias no sedimento e
- fauna intersticial - vivem nos interstícios dos grãos.

#### (a) Coleta para amostragem no infralitoral

- **Coleta quantitativa**

Em regiões estuarinas ou costeiras, de um modo geral, as coletas são realizadas com o auxílio de um pegador de fundo, do tipo Petersen modificado, que amostra uma área correspondente a  $1/17\text{m}^2$ . Em casos onde a profundidade é grande, é preferível lançar mão de pegadores mais pesados, para favorecer a coleta do sedimento. Em ambiente marinho o pegador mais utilizado é o tipo van Veen, com capacidade de  $1/10\text{m}^2$ .

#### **Procedimento de coleta:**

Após “agarrar” o fundo, o pegador é puxado à bordo (com auxílio de guincho elétrico ou manual, preferencialmente com o auxílio de um “pau de carga”) e aberto no interior de uma cuba de polietileno de tamanho adequado. Se o volume de sedimento amostrado não for representativo em relação ao volume interno do pegador, deve-se desprezar a amostra e repetir o procedimento. Para isso, deve-se orientar a embarcação para outra posição no local. Para uma boa caracterização da comunidade biológica, deve-se trabalhar com replicações, cujo número (n) deve ser estabelecido por ocasião de amostragens preliminares.

É importante que se considere cada local de amostragem não como um ponto mas como uma área, e que as réplicas sejam obtidas nessa área e não exatamente no mesmo local, para que a variabilidade natural seja explorada. Esse aspecto é de fundamental importância para minimizar conclusões equivocadas sobre o ambiente. Recomenda-se, portanto, que se alterne as coletas nas bordas da embarcação e que se derive um pouco entre as coletas das amostras.

As amostras devem ser transferidas para o interior de sacos plásticos reforçados ou lavadas em campo, onde são empregadas peneiras de malha 0,5mm (no caso de triagem de macrobentos) e água do local.

Muitos organismos se contraem durante a preservação dificultando a observação de estruturas importantes para a sua identificação, sendo recomendado por alguns taxonomistas que os organismos sejam “anestesiados” antes da fixação com formol ou com álcool. É importante que



esses especialistas, que colaborarão com os trabalhos de identificação, sejam contatados para indicar se ou qual o anestésico deverá ser utilizado.

Os sacos plásticos de amostra e os frascos de material preservado devem ser etiquetados por dentro (com etiqueta vegetal) e por fora (com etiqueta a caneta, ou lapis dermatográfico), contendo informações tais como o número da amostra, o número do ponto de coleta e da réplica, nome do projeto, data de coleta.

- **Coleta qualitativa**

Pegadores amostram uma área definida, podendo-se então a partir daí calcular a densidade populacional da comunidade bentônica em estudo sendo, portanto, uma amostragem quantitativa. Dependendo do objetivo do estudo, uma amostragem qualitativa apenas, oferece informações suficientes. Nesse caso o que se obtém é uma estimativa da riqueza em espécies da comunidade em questão, sem, no entanto, saber o número de indivíduos presentes de cada espécie.

Nesse tipo de coleta, utiliza-se uma draga que opera por arrasto horizontal. Como uma grande área é amostrada, esse tipo de coleta permite avaliar de modo eficiente a riqueza em espécies da comunidade de determinado sítio, principalmente se o tempo de arrasto for elevado. Após coletado o sedimento, o mesmo deve ser lavado e estocado conforme descrito no item acima.

#### **6.1.7.8 Comunidade Nectônica**

O nécton é constituído pelos organismos capazes de nadar ativamente contra as correntes. Fazem parte deste grupo a grande maioria dos peixes, mamíferos aquáticos (baleia, peixe-boi, por exemplo), crustáceos (como o camarão), e moluscos cefalópodes (como as lulas).

O maior grupo dentre os organismos nectônicos é constituído pelos peixes, e são eles que normalmente são estudados com mais intensidade no ambiente aquático. Esses organismos distribuem-se em cerca de 20 mil espécies, das quais mais de 8 mil são comerciáveis e comestíveis, sendo cerca de 41% em água doce e 58% nos oceanos.

Os peixes são vertebrados aquáticos, pecilotérmicos cujos corpos podem apresentar diferentes formas e tamanhos, podendo ainda ser ou não recobertos por escamas. Movimentam-se por meio de nadadeiras e, geralmente, possuem brânquias para absorver o oxigênio dissolvido na água.

A coleta de nécton exercida unicamente com fins de pesquisas por instituições ou pessoas devidamente habilitadas é denominada “pesca científica”. Antes de realizar um procedimento de amostragem de nécton é fundamental consultar a legislação de aquicultura e pesca vigente no Brasil.



De acordo com o Código de Pesca (*Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967 - Código de Pesca - Dispõe sobre a Proteção e Estímulos à Pesca e dá outras providências*), é necessária autorização pelos órgãos competentes para expedição científica cujo programa se estenda à pesca, que dependerá de prévia anuência. O Instituto Chico Mendes (ICMBio) mantém em sua página na Internet uma seção destinada a serviços on-line, onde é possível o acesso ao Sisbio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), inclusive para obter "Autorizações e Licenças para Fins Científicos e Didáticos". O Sisbio é um serviço de atendimento à distância que permitirá aos pesquisadores, por meio do preenchimento e envio de formulários eletrônicos pela Internet, solicitar autorizações, licenças e incluir coleções científicas, didáticas e particulares no Cadastro Nacional de Coleções Científicas.

Diversos Estados possuem legislações específicas de pesca que devem ser consultadas. No caso do Estado de São Paulo, o Código de Pesca Estadual (*Lei Estadual (São Paulo) nº 11.165, de 27 de junho de 2002 - Código de Aquicultura e Pesca do Estado de São Paulo*) estabelece que nas investigações relacionadas à pesca, com coleta de seres vivos, as instituições e pessoas devidamente habilitadas deverão ser autorizadas pelo órgão estadual competente, que decidirá sobre a manutenção da execução dos projetos e avaliará os relatórios que lhe serão obrigatoriamente encaminhados.

Os tipos de estudo com a comunidade nectônica mais frequentemente realizados são:

- Ensaio da contaminação dos organismos (peixes, crustáceos, moluscos etc).
- Ensaio para determinação de metais, micronúcleo e cometa em sangue de peixe
- Ensaio de episódios de mortandades de peixes e/ou outros organismos nectônicos.
- Ensaio da estrutura da comunidade de peixes.

#### **i - Contaminação dos organismos**

Os organismos para ensaio de contaminantes podem ser coletados de qualquer uma das formas descritas no item "ensaio da estrutura da comunidade de peixes", podendo, inclusive, ser adquiridos de pescadores locais, desde que estejam em boas condições (não podem estar em decomposição). Caranguejos e siris também podem ser adquiridos de coletores locais. Quando o material for adquirido dos pescadores, deve-se ter a certeza do local onde foram coletados.

Devido aos baixos limites de detecção de várias substâncias, os procedimentos laboratoriais e de campo para ensaio de contaminantes em organismos aquáticos são especialmente importantes, pois uma contaminação das amostras pode ocorrer durante qualquer estágio da coleta, manuseio, armazenamento ou ensaio.

##### **Procedimentos de coleta:**

- Lavar os organismos coletados na água do ambiente logo após a coleta para remover qualquer material estranho da superfície externa.



- Os peixes e ou outros organismos aquáticos nectônicos devem ser enviados ou trazidos para o laboratório, em gelo, dentro de um prazo de 24 horas após a coleta. O material coletado deve ficar coberto por uma camada de gelo durante o transporte.
- Reduzir ao máximo a manipulação das amostras em campo e evitar contato com fontes de contaminação (fumaça do motor do barco, graxas, poeira) e o gelo.
- Evitar a contaminação pelo gelo usado para refrigerar as amostras. Os moluscos como concha, os crustáceos e os peixes inteiros devem ser embrulhados individualmente em papel alumínio ou pelo menos por espécie e colocados em sacos plásticos limpos que evitem a entrada da água e devidamente etiquetados com a data, ponto de coleta e espécie.
- As amostras devem ser colocadas no gelo o mais rapidamente possível após a coleta. Se o tempo de trânsito das amostras até o laboratório for maior que 24 horas, é preferível o uso de gelo seco.
- Amostras para ensaio microbiológico devem chegar no laboratório em um prazo máximo de 24 h e NÃO devem ser congeladas, apenas refrigeradas.
- Caso o objetivo do trabalho seja o ensaio de contaminantes orgânicos e/ou inorgânicos, os organismos, após o devido acondicionamento, poderão ser congelados diretamente no freezer.
- O estudo de metais em sangue de peixes tem o seu procedimento descrito a seguir.

## ii - Determinação de metais, micronúcleo e cometa em sangue

Para complementar os estudos de monitoramento ambiental, o biomonitoramento tem sido amplamente usado para avaliar a exposição de um sistema biológico a substâncias xenobióticas.

O uso de biomarcadores, como os de exposição e efeito, pode fornecer informações relevantes, como a real exposição dos organismos a contaminantes presentes no meio, o que pode levar a ações imediatas de prevenção e controle. A determinação de metais em sangue pode ser utilizada para refletir a exposição recente dos organismos a essas substâncias químicas. Pode-se avaliar também a atividade genotóxica de xenobióticos pelo aumento na frequência de micronúcleos nas células sanguíneas de peixes expostos ou pela avaliação de quebras na molécula de DNA nestas mesmas células no ensaio cometa.

### **Procedimentos de coleta:**

- Realizar punção caudal, ou outra técnica adequada à espécie em estudo, com seringas previamente heparinizadas ou com EDTA;
- Para os testes de cometa e micronúcleo, o sangue deve ser coletado no indivíduo vivo;
- Transferir as amostras de sangue para microtubos contendo aproximadamente 50 µL de heparina ou EDTA, a fim de evitar sua coagulação;
- Homogeneizar os microtubos imediatamente por inversão, de oito a dez vezes;
- Manter os microtubos sob refrigeração e ao abrigo de luz para posterior processamento laboratorial.

## iii - Mortandades de peixes e/ou outros organismos nectônicos

Para que se consiga determinar a(s) causa(s) de uma mortandade de peixes, a preocupação principal é que o atendimento seja feito o mais rápido possível.



As coletas das amostras de água (e sedimento, caso seja necessário), devem ser definidas conforme as suspeitas de possíveis causas e preservadas conforme as metodologias descritas neste guia.

A escolha das variáveis físicas e químicas a serem determinadas depende de vários fatores, tais como: características de ocupação do solo na região, presença de despejos de indústrias ou de esgotos domésticos etc. Os ensaios biológicos incluem fitoplâncton (em casos de florações de algas), coliformes (em casos de contaminação pelo lançamento de esgotos) e teste de toxicidade.

É essencial que seja coletada uma amostra de água à montante e no próprio local onde está ocorrendo a mortandade e, caso se julgue necessário, uma amostra à jusante.

**Procedimentos de coleta:**

- Coletar água e sedimento para os ensaios considerados necessários, conforme orientações descritas neste guia;
- Coletar, pelo menos, 5 peixes moribundos ou que acabaram de morrer, de cada espécie.
- Envolver os peixes em papel alumínio colocá-los num saco plástico, guardar numa caixa térmica com gelo e encaminhá-los ao laboratório para ensaio;
- NÃO coletar peixes mortos há algum tempo e que já estão em decomposição;
- Observar o comportamento dos peixes que estão morrendo (se vêm à superfície abocanhar o ar, se apresentam movimento descoordenado etc.);
- Observar alteração no aspecto externo dos peixes, como: presença de fungos, manchas, coloração das brânquias, etc.;
- Todos os dados observados em campo devem ser sistematicamente anotados em ficha específica e, sempre que possível, devem ser retiradas fotos dos peixes e do local de coleta.

#### **iv. Estrutura da Comunidade de Peixes**

Em estudos quantitativos, os equipamentos de captura devem ser colocados por um tempo padronizado (normalmente 4 horas), como as redes de espera. Estudos qualitativos não envolvem coleta padronizada, mas sim a utilização de vários tipos de equipamentos, uma vez que todas são seletivas.

A escolha de aparelhos de coleta (redes de espera de diversas malhagens, cercos, etc.), depende das características físicas do meio aquático, como presença ou não de rochas, pedras, águas paradas, vegetação aquática, entre outras.

Deve-se coletar nos locais mais adequados para obtenção da maior diversidade possível de espécies, que devem ser escolhidos levando-se em consideração principalmente as informações de pescadores da região a ser estudada. Deve-se considerar também a época do ano, tendo em vista que algumas espécies são migratórias, o que significa que só é possível capturá-las em períodos muito específicos.



**Procedimentos de coleta:**

- Capturar alguns exemplares das espécies presentes no local e colocar em sacos plásticos, refrigerar e enviar para o laboratório, onde podem ser congelados.
- Colocar, adicionalmente, alguns exemplares de cada espécie em frascos ou sacos plásticos reforçados, contendo uma solução neutra de formol (10% a 20%) para identificação taxonômica. Esses exemplares devem permanecer nesta solução por, pelo menos, 1 a 2 semanas, pois a fixação pode levar de poucos dias (para espécimes pequenos) a uma semana (para os espécimes maiores). Pode-se inclusive aplicar a solução com auxílio de uma seringa.
- Se possível, fotografe em campo um exemplar de cada espécie. Para tanto, seleciona-se um exemplar recém tirado da água, quando ainda apresenta todas as tonalidades das cores, e que esteja inteiro (principalmente a nadadeira caudal).
- Recomenda-se a colocação de uma etiqueta numerada no exemplar fotografado, para a confirmação posterior da identificação, e de uma régua, para se ter noção do tamanho do exemplar.

## **6.2 Ensaios de Contaminantes e Nutrientes em Sedimentos**

Sedimento é todo material originado da destruição (decomposição) de qualquer tipo de rocha ou material de origem biológica, transportado e depositado (alóctone) ou apenas depositado (autóctone) na superfície terrestre. Os sedimentos compõem-se de partículas de diferentes tamanhos, formas e composição química.

Um diagnóstico ambiental abrangente deve integrar informações dos compartimentos água e sedimento. As concentrações de poluentes na água indicam a carga que o ambiente recebe no momento da coleta, enquanto que o sedimento reflete a contaminação ocorrida e acumulada no sistema ao longo de um período de tempo.

Contaminantes e nutrientes adsorvidos nos sedimentos podem ser disponibilizados à coluna d'água e à biota por meio de processos físicos, químicos e biológicos, servindo como fonte interna e contínua de poluentes.

Por essas razões, o uso do sedimento como instrumento de avaliação da qualidade dos ecossistemas aquáticos, vem ganhando crescente atenção da comunidade científica mundial desde a década de 80.

Deve ser salientado que o ensaio do sedimento auxilia a tomada de decisões sobre as medidas que devem ser adotadas no estabelecimento de programas de controle, mitigação e recuperação do ambiente como, por exemplo, na avaliação do processo de dragagem e disposição de sedimentos em canais de navegação. O gerenciamento ambiental deve ser subsidiado por uma classificação da qualidade do sedimento, que preferencialmente integre as características físicas, químicas, biológicas e ecotoxicológicas deste compartimento.

Considerando outros objetivos, o sedimento pode ser também classificado segundo, por exemplo, sua granulometria, teor de matéria orgânica, teor de água, textura, cor e origem geológica.



Devido à complexidade do ensaio do sedimento, a sua coleta deve ser realizada de acordo com procedimentos específicos, estabelecidos de acordo com o objetivo do estudo.

Como procedimento geral, a água que cobre o sedimento deve ser retirada por sifonamento ou vertendo o equipamento de coleta. O material orgânico deve ser mantido no ensaio de teor orgânico (COT e resíduos), enquanto que o inorgânico (por exemplo, pedras e cascalhos) deve ser mantido no ensaio de granulometria. Para os outros parâmetros, pode-se efetuar uma catação do material grosseiro antes de se armazenar as amostras nos recipientes.

Cuidados devem ser tomados para que as condições de oxi-redução do sedimento amostrado sejam mantidas, já que os sedimentos oxidam-se rapidamente quando em contato com o ar, alterando a disponibilidade de contaminantes. Para tanto, a amostra deve ser o mínimo exposta ao ar e o recipiente de coleta preenchido até à boca.

Para coleta de amostra composta é necessário que exatamente o mesmo volume seja tomado de cada réplica e que a homogeneização seja bem executada. Para evitar a oxidação, os volumes das réplicas a serem misturados devem ser mantidos, até o momento da homogeneização, em saco plástico ou bandeja de aço inox ou qualquer outro recipiente, de acordo com os ensaios a serem realizados.

Durante a coleta, deve-se evitar alguns efeitos negativos, tais como: ondas de pressão na descendência do equipamento, resistência e inclinação na penetração do sedimento, lavagem durante a retirada e transbordamento. Uma descida muito rápida, por exemplo, pode provocar ondas de choque e mau funcionamento do equipamento.

Todos os procedimentos de coleta acarretam um certo grau de distúrbio na integridade da coluna de sedimento. Em estudos geocronológicos, paleolimnológicos, de biorrevolvimento e de trocas químicas na interface sedimento-água, por exemplo, torna-se necessário a obtenção de amostras mais íntegras possíveis. Nestes casos é indicado o uso de amostradores em tubo (corer) que também permitem o fracionamento da amostra, fundamental para estudos do perfil do sedimento.

Na amostragem do depósito recente (camada superficial de sedimento de 2cm a 6cm) devem ser usados pegadores que possibilitam o fracionamento da amostra (Ekman-Birge modificada por Lenz e tubo). Nesses casos, muitas vezes não se consegue volume suficiente em uma só pegada, sendo necessário compor várias pegadas numa mesma réplica antes de distribuir o material nos recipientes de amostragem. Do mesmo volume devem ser retiradas amostras para ensaios químicos e ensaios ecotoxicológicos.

O volume de coleta para ensaio ecotoxicológico com sedimento depende do tipo e número de testes que serão realizados por amostra e da distribuição para os diferentes laboratórios. O ideal é coletar um recipiente para cada tipo de teste e uma amostra de sedimento controle, obtida em local não degradado.



Amostras efetuadas com “corer” e destinadas a ensaios químicos do perfil vertical do sedimento devem ser manuseadas cuidadosamente, de forma a evitar mistura dos estratos, e podem ser congelados em campo, com nitrogênio líquido, para posteriores fracionamentos.

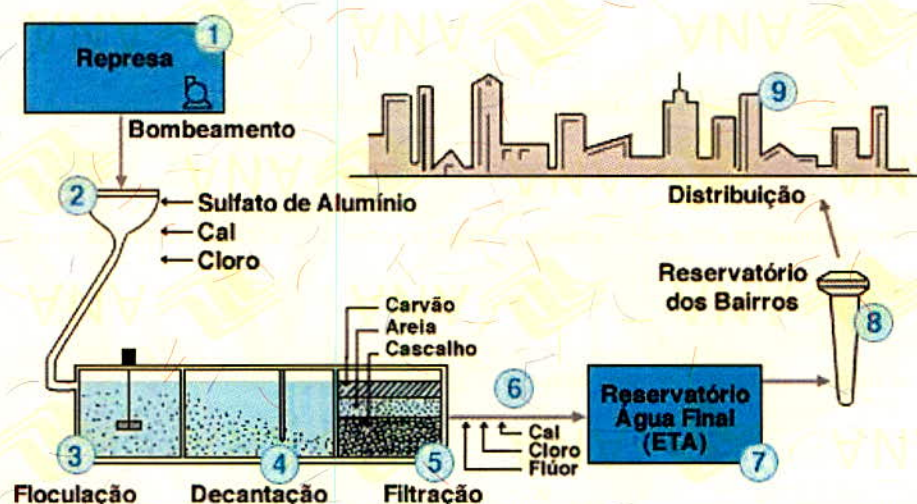
Conforme os ensaios a serem realizados no sedimento, deve -se utilizar frascos e equipamentos adequados as atividades de coleta de amostras, bem como materiais de apoio, como por exemplo colheres de aço inox ou polietileno inerte, bandejas de aço inox ou polietileno inerte, caixas térmicas etc. Podemos citar como exemplo os compostos orgânicos que podem ser absorvidos em plásticos (exceto teflon) ou degradados em vidro alcalino. Nestes casos é necessário utilizar frascos de borossilicato, de cor âmbar com tampa rosqueável e septo de teflon. No caso de metais, como sódio, lítio e potássio, recomenda-se que as amostras sejam acondicionadas em frascos de polietileno ou polipropileno, pois os mesmos podem ser adsorvidos em superfícies de vidro ou aumentar sua concentração por absorção. Os ensaios, tipos de frascos, prazo de análises, encontram-se no Apêndice1.



## 7 AMOSTRAGEM DE ÁGUAS PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO

A água tratada deve ser coletada em locais que foram submetidos a algum tipo de tratamento (convencional ou simplificado), como sistemas de produção (Estação de Tratamento de Água - ETA), de reservação, rede de distribuição e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água.

Para definição dos locais de amostragem e ensaios a serem analisados em um sistema de tratamento de água para consumo humano é necessário o conhecimento das etapas da produção desde a retirada da água do manancial, passando pela adução, tratamento, reservação e distribuição, até a entrega ao consumidor final, levando-se em conta ainda as características específicas de cada unidade de produção (Fig. 84), trabalhando em consonância com o Plano de Segurança da Água (PSA), conforme orientação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) e com as legislações de água de consumo humano vigentes.



**Figura 84.** Esquema de um sistema de produção e distribuição de água. – Fluxo operacional: (1) Manancial de abastecimento; (2) Aplicação de produtos químicos; (3) Sistema de Floculação; (4) Sistema de decantação; (5) Sistema de filtração; (6) Aplicação de cloro, flúor e cal; (7) Reservatório da ETA; (8) Reservatório elevado; (9) Rede de distribuição (Fonte: CETESB, 2009).

Os procedimentos operacionais que devem ser adotados nesse contexto dependem de fatores como: tipo de manancial de abastecimento (rio, lago, represa, subsolo, chuva etc.); qualidade inicial da água (composição química e biológica); distâncias percorridas; fatores climáticos, topográficos e ambientais; aplicação de produtos químicos durante o processo e tempo de contato necessário para as respectivas reações químicas e biológicas; tipo de tratamento requerido etc.



A frequência, o número mínimo de amostras, os locais, os parâmetros a serem analisados e os valores máximos permitidos são definidos pela legislação vigente sobre qualidade da água para consumo humano. Além disso, os responsáveis pelo abastecimento de água devem manter avaliação sistemática do sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água, sob a perspectiva dos riscos à saúde, com base na ocupação da bacia contribuinte ao manancial, no histórico das características de suas águas, nas características físicas do sistema, nas práticas operacionais e na quantidade da água distribuída, conforme os princípios dos Planos de Segurança da Água (PSA) recomendados pela Organização Mundial de Saúde ou definidos em diretrizes vigentes no país.

### **7.1. Vigilância da qualidade da água para consumo humano**

O monitoramento da qualidade da água pode ser entendido como uma atividade de vigilância ou de investigação e consiste em avaliar, continuamente, a qualidade da água consumida pela população, permitindo a identificação de fatores de riscos e a definição de estratégias de melhoria da situação existente, além do acompanhamento dos impactos resultantes das medidas implementadas.

Considerando que o objetivo do controle da qualidade é comprovar a potabilidade da água fornecida para consumo humano, verificar pontos críticos do sistema e fornecer subsídios para a área operacional, corrigindo de imediato as possíveis anomalias detectadas, é natural que seu plano de amostragem seja o mais abrangente possível.

Os pontos de coleta de amostras podem ser selecionados por uma composição entre os pontos críticos e não críticos, endereços fixos e variáveis. A escolha deve objetivar a obtenção de informações do abastecimento e consumo de água no município. A representatividade desejada pode ser composta por critérios de distribuição geográfica e identificação de situações de riscos.

Os critérios a serem observados na definição dos pontos de amostragem do monitoramento de vigilância da qualidade da água devem incluir:

- Distribuição geográfica: saída do tratamento ou entrada no sistema de distribuição; saída de reservatórios de distribuição; pontos na rede de distribuição; áreas mais densamente povoadas; pontos não monitorados pelo controle (soluções alternativas, fontes individuais no meio urbano, escolas na zona rural, etc.).
- Locais estratégicos: áreas com populações em situação sanitária precária; consumidores mais vulneráveis (hospitais, escolas, creches, etc.); áreas próximas a pontos de poluição (indústrias, lixões, pontos de lançamento de esgoto, cemitérios, etc.); áreas sujeitas à pressão negativa na rede de distribuição; pontos em que os resultados do controle indiquem problemas recorrentes; soluções alternativas desprovidas de tratamento ou de



rede de distribuição; veículo transportador e áreas que, do ponto de vista epidemiológico, justifiquem atenção.

## 7.2. Coleta em Estação de Tratamento de Água (ETA)

Os locais de amostragem para o controle das condições de operacionalidade da estação e consequente caracterização da qualidade da água produzida, devem ser escolhidos no decorrer do processo (entrada da ETA, floculação, decantação, filtração, desinfecção/fluoretação/saída da ETA), cujos pontos de tomada de amostras geralmente estão disponíveis no laboratório da estação (Fig. 85). Recomenda-se não alterar a vazão das torneiras, pois haverá alteração significativa nas características da água, comprometendo o controle de qualidade realizado pelo operador.



**Figura 85.** Torneiras localizadas no laboratório da ETA para controle das etapas do processo de tratamento (Foto: Carlos Jesus Brandão).

Parâmetros operacionais importantes para serem monitorados na água captada (fonte) incluem turbidez, tempo de vazão e retenção, cor, condutividade, condições meteorológicas, absorvância em UV, algas; e no processo de tratamento deve-se controlar a concentração do desinfetante e tempo de contato, pH, turbidez e cor entre outros, dependendo do tipo de tratamento a ser aplicado.

## 7.3. Coleta em Sistemas de Distribuição

A proteção do sistema de distribuição é essencial para assegurar a qualidade da água de consumo humano. Os sistemas de distribuição por incluírem longas extensões de tubulações,



reservatórios de estocagem, interconexões e por estarem sujeitos a adulteração e vandalismo, são vulneráveis à contaminação química e microbiológica.

Quando o suprimento de água é intermitente, a baixa pressão de água resultante possibilita o ingresso de água contaminada no sistema através de fraturas, fendas, juntas e furos presentes na tubulação. Apesar de não desejável, a intermitência no suprimento de água é muito comum e o controle de água nessa situação é um desafio, uma vez que os riscos de infiltração e refluxo aumentam significativamente.

Os microrganismos naturalmente presentes na água (amebas de vida livre, bactérias heterotróficas, fungos), sob condições favoráveis podem colonizar o sistema de distribuição formando biofilmes. Não há evidência que os microrganismos normalmente presentes nos biofilmes constituam risco para a saúde da população em geral, com algumas exceções como é o caso da *Legionella* que coloniza tubulações de edifícios, bem como a população de indivíduos seriamente imunocomprometidos (WHO, 2003).

A água que entra no sistema de distribuição deve ser microbiologicamente segura e biologicamente estável. O sistema de distribuição por si só deve fornecer uma barreira segura para evitar a contaminação da água no sistema de distribuição durante o transporte até o consumidor. É importante manter um residual de desinfetante no sistema de distribuição para proteger contra a contaminação e limitar problemas de crescimento bacteriano (WHO, 2006).

Fenômenos naturais, como enchentes, seca e movimentos sismológicos, e atividades antrópicas como tráfego pesado e obras civis podem afetar significativamente as tubulações de água dos sistemas de distribuição e levar ao aparecimento de epidemias. Medidas específicas e imediatas devem ser tomadas para prevenir a saúde da população incluindo o aumento da frequência de amostragem.

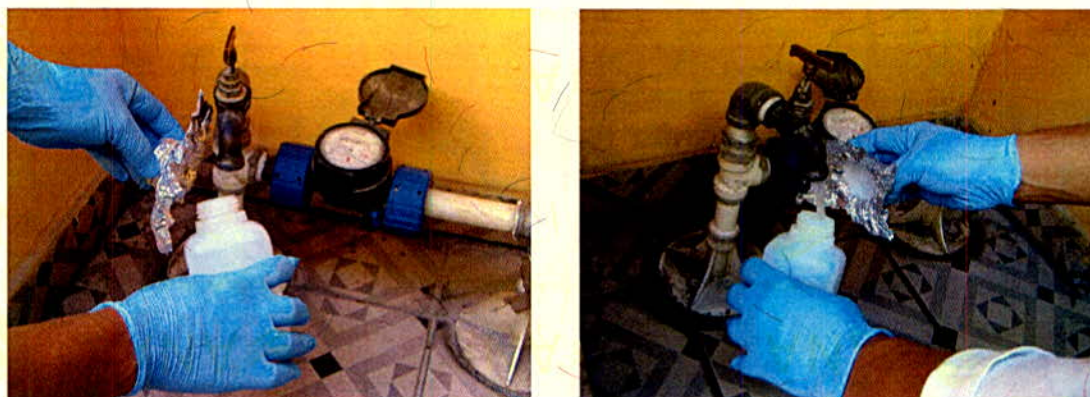
O monitoramento operacional de sistemas de distribuição canalizados deve incluir parâmetros como: cloro residual, indicadores bacterianos de contaminação fecal (*E.coli*, coliformes termotolerantes), coliformes totais, bactérias heterotróficas, pH, fluoreto, cor e turbidez. A escolha dos pontos de amostragem dependerá de cada sistema de abastecimento. As amostragens para análises microbiológicas e seus parâmetros associados como cloro residual são realizadas em maiores frequências e em pontos de coleta dispersos. Atenção especial deve ser dada também aos pontos de coleta e frequência de amostragem para constituintes químicos provenientes de tubulações e soldas e que não são controlados diretamente pela legislação e por constituintes que podem ser formados no sistema de distribuição como trihalometanos (THMs).

O uso de amostragem estratificada randomizada para os sistemas de distribuição tem se mostrada efetiva (WHO, 2006).



### 7.3.1. Procedimentos de coleta na rede de distribuição

A retirada de amostra para ensaio da água contida na rede de distribuição geralmente é feita em uma torneira próxima ao hidrômetro da residência ou outra que receba água diretamente da rede de abastecimento público (Figs. 86 e 87).



**Figura 86.** Coleta de amostra na torneira, após o hidrômetro (Foto: Venício Pedro Ribeiro).



**Figura 87.** Coleta de amostra na torneira do jardim, após hidrômetro (Foto: Venício Pedro Ribeiro).

Abrir a torneira e deixar escoar por dois a três minutos ou o tempo suficiente para eliminar a água estagnada na tubulação. A torneira não deverá ter aeradores ou filtros, nem apresentar vazamento.

É necessário ter certeza que a água seja proveniente da rede de distribuição e não de caixas ou reservatórios internos, por meio do **teste de cavalete**. Esse teste consiste em fechar o registro de entrada de água da rede de distribuição e abrir a torneira indicada para a coleta; se não houver escoamento de água pela torneira, conclui-se que realmente a água é proveniente da rede de distribuição.



Se necessário a torneira pode ser desinfetada com aplicação de uma solução de hipoclorito de sódio 100mg/L. Neste caso, o excesso de hipoclorito de sódio deve ser removido antes da coleta.

Abrir a torneira a meia secção, para que o fluxo seja pequeno e não haja respingos, deixar escoar por aproximadamente um a dois minutos. Posicionar o frasco de maneira que não tenha contato com a torneira para evitar possíveis contaminações. No momento da coleta deve ser realizada a determinação de cloro residual livre.

### 7.3.2. Procedimentos de coleta em reservatório domiciliar

A coleta de amostra pode ser realizada na torneira de saída de água do reservatório, na saída do registro de controle ou diretamente do reservatório com auxílio de balde de aço inox e cordas estéreis (Fig. 88). No momento da coleta deve ser realizada a determinação de cloro residual livre.



**Figura 88.** Coleta de amostras em reservatório com balde e corda estéreis: (A) Balde estéril, (B) Balde e corda estéril em procedimento de coleta (Foto: Venício Pedro Ribeiro).

### 7.4. Procedimentos de Coleta em Soluções Alternativa Coletiva de Abastecimento de Água

Solução alternativa coletiva de abastecimento de água para consumo humano é toda modalidade de abastecimento coletivo, destinada a fornecer água potável, com captação subterrânea ou superficial, com ou sem canalização e sem rede de distribuição incluindo as indústrias, fontes, poço comunitário, distribuição por veículo transportador, entre outras.

Os procedimentos para coleta de amostra devem levar em consideração as características individuais de cada unidade que, de forma geral, encontram-se mencionados neste capítulo.



#### 7.4.1. Poços Freáticos e Profundos Equipados com Bomba

A água do poço deve ser bombeada por tempo suficiente para eliminar a água estagnada na tubulação. A coleta deve ser realizada em uma torneira próxima da saída do poço ou na entrada do reservatório. Se necessário, a torneira pode ser desinfetada com aplicação de uma solução de hipoclorito de sódio 100mg/L. Neste caso, o excesso de hipoclorito de sódio deve ser removido antes da coleta. Realizar a determinação de cloro residual livre se o poço for clorado.

#### 7.4.2. Poços Freáticos Sem Bomba

A coleta deve ser realizada com auxílio de balde de aço inox e corda estéril. O conjunto balde e corda só deve ser desembalado no momento da coleta, para evitar contaminação.

Utilizar um conjunto para cada ponto de amostragem, para evitar a contaminação cruzada de um ponto de coleta para outro e, conseqüentemente, da própria amostra. Descer o balde até que afunde na água evitando-se o contato com as paredes do poço e da corda com a água. Após enchimento, retirá-lo com os mesmos cuidados. Realizar a determinação de cloro residual livre se o poço for clorado. Para coleta de amostras em veículo transportador de água, pode ser adotado esse mesmo procedimento.

##### Procedimento de coleta em ETA, rede de distribuição, reservatórios ou soluções alternativas de abastecimento público

- Encher todos os frascos diretamente da torneira ou com auxílio de equipamentos;
- Para o ensaio microbiológico<sup>1</sup>, remover a tampa do frasco juntamente com o papel alumínio protetor, mantendo-a a uma distância de aproximadamente 10 centímetros, para evitar contaminação;
- Encher o frasco com a amostra até aproximadamente  $\frac{3}{4}$  (três quartos) do seu volume, para possibilitar sua homogeneização;
- Fechar imediatamente o frasco, fixando o papel alumínio protetor em volta da tampa;
- Para os demais ensaios, repetir o item 1 acima, até que todos os frascos estejam com o volume necessário para os ensaios. No caso de compostos orgânicos voláteis, não deverá haver espaço vazio;
- Preservar as amostras conforme "Apêndice e acondicioná-las em caixa térmica, sob refrigeração para transporte.

<sup>1</sup>O frasco para ensaio microbiológico não deve ser ambientado. A coleta deve ser realizada sempre antes de qualquer outro procedimento e a amostra não pode ser composta.

Para pesquisa de microrganismos patogênicos em água tratada grandes volumes devem ser analisados considerando a baixa concentração desses microrganismos nessas águas. Nesse caso volumes de 400L a 1000L devem ser concentrados na própria ETA ou nos pontos da rede de interesse, empregando sistemas específicos de filtração, com cartuchos e membranas filtrantes variáveis de acordo com o patógeno a ser pesquisado (APHA, 2005).