

INDICADORES BIOLÓGICOS DE QUALIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

Métricas e recortes para análises



INDICADORES BIOLÓGICOS DE QUALIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

Métricas e recortes para análises



Copyright © 2021 da edição brasileira
by RFB Editora

Copyright © 2021 do texto
by Autores

Todos os direitos reservados



Todo o conteúdo apresentado neste livro, inclusive correção ortográfica e gramatical, é de responsabilidade do(s) autor(es).

Obra sob o selo *Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional*. Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.

Conselho Editorial:

Prof. Dr. Ednilson Sergio Ramalho de Souza - UFOPA (Editor-Chefe)

Prof.ª Drª. Roberta Modesto Braga - UFPA

Prof. Dr. Laecio Nobre de Macedo - UFMA

Prof. Dr. Rodolfo Maduro Almeida - UFOPA

Prof.ª Drª. Ana Angelica Mathias Mace- do - IFMA

Prof. Me. Francisco Robson Alves da Silva - IFPA

Prof.ª Drª. Elizabeth Gomes Souza - UFPA

Diagramação e design da capa:

Pryscila Rosy Borges de Souza

Imagens da capa:

Rio Itaquerê, Município de Nova Euro- pa, Estado de São Paulo-Foto de Juliano J. Corbi

Revisão de texto:

Os autores

Prof.ª Dra. Neuma Teixeira dos Santos - UFRA

Prof.ª Me. Antônia Edna Silva dos San- tos - UEPA

Prof. Dr. Carlos Erick Brito de Sousa - UFMA

Prof. Dr. Orlando José de Almeida Filho - UFSJ

Prof.ª Drª. Isabella Macário Ferro Caval- canti - UFPE

Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares - UFPI

Prof.ª Drª. Welma Emidio da Silva - FIS

Bibliotecária:

Janaina Karina Alves Trigo Ramos

Gerente editorial:

Manoel Souza



Home Page: www.rfbeditora.com

E-mail: adm@rfbeditora.com

Telefone: (91)98885-7730

CNPJ: 39.242.488/0001-07

R. dos Mundurucus, 3100, 66040-033, Belém-PA

Juliano J. Corbi
(Organizador)

INDICADORES BIOLÓGICOS DE QUALIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS: MÉTRICAS E RECORTES PARA ANÁLISES

Edição 1

Belém-PA



2021

<https://doi.org/10.46898/rfb.9786558891321>

**Catalogação na publicação
Elaborada por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166**

I39

Indicadores biológicos de qualidade em ambientes aquáticos continentais: métricas e recortes para análises / Juliano J. Corbi (Organizador) – Belém: RFB, 2021.

Livro em PDF

240 p.

ISBN: 978-65-5889-132-1

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321

1. Vida aquática. I. Corbi, Juliano J. (Organizador). II. Título.

CDD 578.76

Índice para catálogo sistemático

I. Vida aquática

Nossa missão é a difusão do conhecimento gerado no âmbito acadêmico por meio da organização e da publicação de livros digitais de fácil acesso, de baixo custo financeiro e de alta qualidade!

Nossa inspiração é acreditar que a ampla divulgação do conhecimento científico pode mudar para melhor o mundo em que vivemos!

Equipe RFB Editora

Dedicatória

Vanessa, minha esposa, dedicou-se muito para que o sonho de uma família pudesse ser concretizado e para que este professor pudesse dar continuidade aos seus estudos. Nesse momento, realizo aqui um sonho de que esta obra possa contribuir para o desenvolvimento de projetos de alunos de graduação e pós-graduação em Universidades brasileiras.

Na minha vida de estudante de graduação e pós-graduação e, posteriormente como docente da Universidade de São Paulo (USP), tive o privilégio e a “sorte” de conviver com grandes mestres. Foram muitos, mas quero registrar os nomes de alguns deles, os que mais me influenciaram positiva e decididamente, em ordem cronológica: professor Roberto da Gama Alves (UFJF), professor Pedro Paulo Corbi (UNICAMP), professora Susana Trivinho-Strixino (UFSCar), professor Fabio de Oliveira Roque (UFMS), professor Claudio Gilberto Froehlich (USP), professor Marcius Fantozzi Giorgetti (USP), Professora Maria do Carmo Calijuri (USP), Professora Maria Bernadete Amâncio Varesche (USP) e Professor Marcelo Zaiat (USP). A estes grandes mestres, meu reconhecimento e minha gratidão eterna. Dedico este trabalho aos meus estudantes de pós-graduação, por acreditarem nesse projeto!

Sumário

PREFÁCIO.....9

CAPÍTULO 1

COLETA, ACLIMATAÇÃO E MANUTENÇÃO LABORATORIAL DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS11

Aline Christine Bernegossi

Mayara Caroline Felipe

Fernanda Rodrigues Pinheiro

Gleyson Borges Castro

Guilherme Rossi Gorni

Bruna Nayara Cardoso Silva

Maria Helena Viana Carrascossi

Tallyson Tavares Cunha de Souza

Daniel Peroni Abrahão

Juliano José Corbi

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.1

CAPÍTULO 2

ELABORAÇÃO E APLICAÇÃO DE ENSAIOS DE TOXICIDADE UTILIZANDO ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS NATIVOS DO BRASIL.....35

Aline Christine Bernegossi

Mayara Caroline Felipe

Fernanda Rodrigues Pinheiro

Gleyson Borges Castro

Tallyson Tavares Cunha de Souza

Guilherme Rossi Gorni

Daniel Peroni Abrahão

Bruna Nayara Cardoso Silva

Juliano José Corbi

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.2

CAPÍTULO 3

ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DO IMPACTO AMBIENTAL POR EFLUENTES DOMÉSTICOS.....63

Fernanda Rodrigues Pinheiro

Aline Christine Bernegossi

Mayara Caroline Felipe

Gleyson Borges Castro

Tallyson Tavares Cunha de Souza

Caroline Fabiane Granatto

Maria Bernadete Amancio Varesche

Juliano José Corbi

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.3

CAPÍTULO 4

FERRAMENTAS ECOTOXICOLÓGICAS APLICADAS AO BIOMONITORAMENTO DE EFLUENTE DE REFINARIA SUCRALCOOLEIRA.....93

Mayara Caroline Felipe

Aline Christine Bernegossi

Fernanda Rodrigues Pinheiro

Gleyson Borges Castro

Mara Rúbia de Lima e Silva

Juliano José Corbi
Marcelo Zaiat
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.4

CAPÍTULO 5
APLICAÇÃO DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E ANÁLISE DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS DE CÓRREGOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS115

Bruna Nayara Cardoso Silva
Maria Helena Viana Carrascossi
Daniel Peroni Abrahão
Juliano J. Corbi
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.5

CAPÍTULO 6
EXPERIÊNCIAS UTILIZANDO UM MÉTODO DE TAXA DE CRESCIMENTO INSTANTÂNEO DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS, EM RIACHOS TROPICais143

Daniel Peroni Abrahão
José Leonardo Mell
Matt While
Juliano J. Corbi
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.6

CAPÍTULO 7
BIOINDICADORES DE QUALIDADE AQUÁTICA: NOVAS POSSIBILIDADES DE ANÁLISES UTILIZANDO LARVAS DE AEDES AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE) E CHIRONOMUS SANCTICAROLI (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)161

Lidia Moura
Barbara Lepretti de Nadai
Maria Eduarda Yumi Oyamaguti
Natália da Silveira
Juliano J. Corbi
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.7

CAPÍTULO 8
TECNOLOGIA NO MONITORAMENTO AMBIENTAL DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE DOENÇAS: QUAIS SÃO OS DESAFIOS? UMA BREVE REVISÃO181

Barbara Lepretti de Nadai
Lídia Moura
André Gustavo Maletzke
Gustavo E. A. P. A. Batista
Juliano J. Corbi
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.8

CAPÍTULO 9
RESPOSTA DA COMUNIDADE OLIGOCHAETA (ANNELIDA: CLITELLATA) EM AMBIENTES AQUÁTICOS SOB DIFERENTES USO DO SOLO195

Guilherme Rossi Gorni
Mariana Futenma de Lima
Douglas Aparecido Girolli

Juliano J. Corbi
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.9

CAPÍTULO 10	
GUIA PRÁTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNEROS OLIGOCHAETA	
(ANNELIDA: CLITELLATA) EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS	207
Guilherme Rossi Gorni	
Douglas Aparecido Girolli	
Mariana Futenma de Lima	
DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.10	
ÍNDICE REMISSIVO.....	229

Prefácio

A decisão sobre organizar este livro surgiu essencialmente por dois motivos: Primeiro: em observações pessoais, observei que muitos alunos de graduação e de pós-graduação tinham dúvidas e dificuldades em encontrar bibliografias contendo métodos claros e objetivos sobre a utilização de invertebrados aquáticos em análises ambientais, em especial, muitas dúvidas sobre procedimentos básicos para a aclimatação, cultivo e a realização de ensaios ecotoxicológicos utilizando invertebrados aquáticos, sobretudo para a fauna de Chironomidae (Diptera) e Oligochaeta (Annelida). Na bibliografia geral, de maneira específica em artigos publicados em periódicos, há metodologias fragmentadas que dificultam a busca por métodos gerais, especialmente por estudantes em início de carreira. Segundo: intensas conversas com alguns colegas do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS-USP), especialmente em longos diálogos com o Professor Marcio Fantozzi Giorgetti, grande pessoa, amigo e professor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) (USP). Em algumas dessas profícias conversas, o professor Giorgetti explanava sobre suas convicções em relação a importância dos livros didáticos para o desenvolvimento do nosso país e sobre as contribuições dos livros para a formação de alunos de graduação e pós-graduação. Os nossos diálogos foram desenvolvendo um desejo de contribuir com a formação inicial dos alunos de graduação e pós-graduação de Universidades brasileiras, sobre o estudo dos invertebrados aquáticos em análises ambientais.

De tal modo, esta obra organizada por mim e contando com a participação dos meus queridos e dedicados alunos do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA - USP), apresenta como objetivo descrever algumas experiências de campo e laboratório em diversos projetos desenvolvidos em estudos sobre as análises de ambientes aquáticos continentais, durante os últimos 20 anos. Este livro busca cooperar para uma “parcela” de alunos de graduação e de pós-graduação, procurando auxiliar, de modo didático, em estudos sobre a utilização de invertebrados aquáticos em análises ambientais, especialmente abordando as ciências “Ecologia e Ecotoxicologia”. O livro está organizado em 10 capítulos, iniciando com a nossas experiências na coleta, aclimatação e manutenção laboratorial de invertebrados aquáticos, perpassando pela elaboração e aplicação de ensaios de toxicidade utilizando espécies de invertebrados aquáticos nativos do Brasil, além de experiências em análises do impacto ambiental por efluentes domésticos, novas abordagens utilizando outras espécies de mosquitos, além de dois capítulos abordando o estudo da importante fauna de Oligochaeta aquáticos, grupo ainda pouco estudado e com poucos especialistas no território nacional.

Anseio que os trabalhos apresentados nesse livro contribuam para a formação de estudantes e auxiliem na preparação de pesquisadores com novas abordagens para o desenvolvimento da Ecologia e Ecotoxicologia.

Professor Dr. Juliano J. Corbi

CAPÍTULO 1

COLETA, ACLIMATAÇÃO E MANUTENÇÃO LABORATORIAL DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS

COLLECTION, ACCLIMATIZATION AND LABORATORY MAINTENANCE OF AQUATIC INVERTEBRATES

Aline Christine Bernegossi¹
Mayara Caroline Felipe²
Fernanda Rodrigues Pinheiro³
Gleyson Borges Castro⁴
Guilherme Rossi Gorni⁵
Bruna Nayara Cardoso Silva⁶
Maria Helena Viana Carrascossi⁷
Tallyson Tavares Cunha de Souza⁸
Daniel Peroni Abrahão⁹
Juliano José Corbi¹⁰

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.1

1 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-8237-6567>. aline.bernegossi@usp.br

2 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-4728-5958>. mayarafelipe@usp.br

3 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-8847-673X>. frpinheiro@usp.br

4 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-5706-904X>. gleysongorges@usp.br

5 Universidade de Araraquara. ORCID. <https://orcid.org/0000-0002-9156-6864>. grgorni@gmail.com

6 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-7569-1710>. brunanayara@usp.br

7 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-9255-2798>. mahelenacarrascossi@usp.br

8 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-9113-5434>. tallysontavares@usp.br

9 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-6727-7130>. danielperoniabrahao@gmail.com

10 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0249-9370>. julianocorbi@usp.br

Resumo

Sabendo-se da importância da utilização de bioindicadores nas diversas vertentes do estudo e monitoramento de recursos hídricos, a coleta e monitoramento de invertebrados aquáticos em campo e seu possível cultivo em laboratório está diretamente relacionado à aplicação dessas análises. Para a obtenção de sucesso nesses estudos, a utilização de equipamentos de coleta específicos deve ser muito bem analisada, e dependerá de uma análise se os organismos de interesse são bentônicos (de fundo), de coluna d'água ou se vivem em ambas as situações, como por exemplo os insetos da família Chaoboridae, que fazem migrações diárias. Neste capítulo iremos abordar, de forma didática, algumas etapas para a coleta, lavagem das amostras e a aclimatação dos organismos em laboratório, caso seja de interesse do pesquisador realizar a manutenção do cultivo de uma espécie capturada em campo. Por fim, neste capítulo, descrevemos as diretrizes básicas para o cultivo de quatro espécies nativas de invertebrados, duas representativas do bentos, uma que vive na coluna d'água e uma espécie que pode viver nos dois ambientes. Para facilitar os estudos desses animais para pesquisadores em início de carreira, alternativas de utilização de materiais de baixo custo são apresentadas.

Palavras-chave: Invertebrados aquáticos. Organismos nativos. Ecotoxicologia. Ecologia Aquática.

Abstract

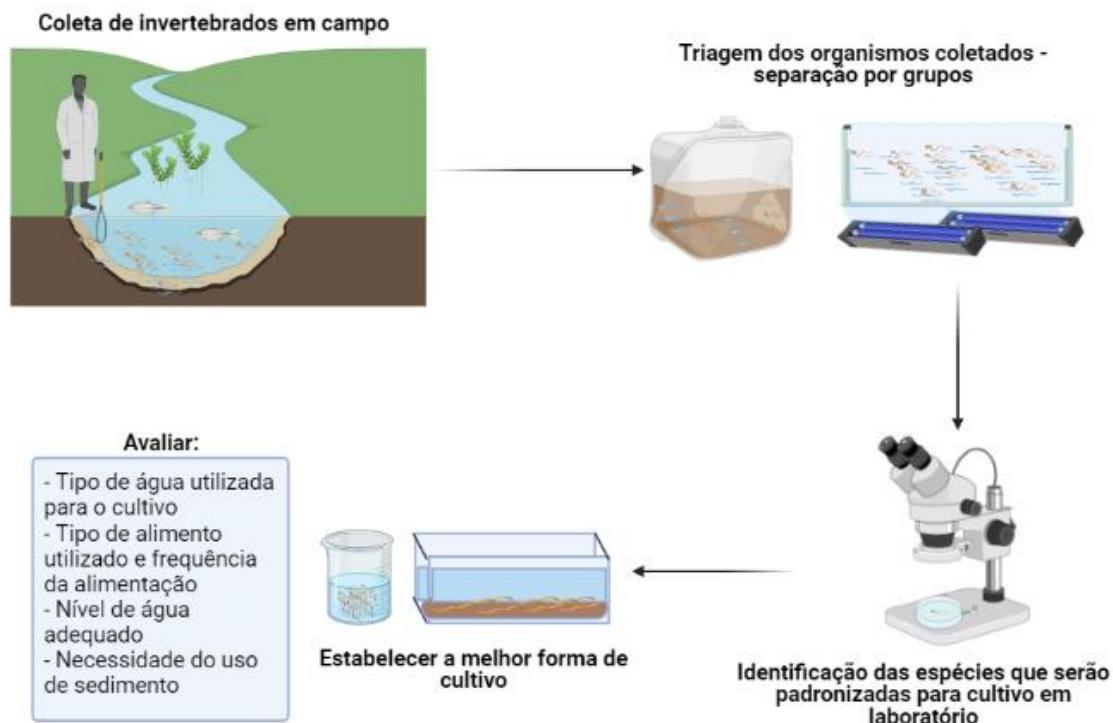
Considering the importance of using bioindicators in the various aspects of the study and monitoring of water resources, the collection and monitoring of aquatic macroinvertebrates in the field and their cultivation in the laboratory is directly related to the success of the analyses. In order to be successful, the choice of collection equipment must be carefully analyzed. It depends on whether the organisms of interest are benthic (bottom), water column or if they live in both habitats, such as insects of the Chaoboridae family, which migrate daily. If the researcher is interested in maintaining the cultivation of a species captured in the field, this chapter didactically addresses some steps for the collection, washing of prims and acclimatization of the organisms in the laboratory. Finally, in this chapter, we describe the basic guidelines for the cultivation of four native species of invertebrates, two representative of the benthic habitat, one that lives in the water column and one species that can live in both environments. To facilitate the studies of these animals for researchers at the beginning of their careers, alternatives for the use of low-cost materials are given.

Keywords: Aquatic invertebrates. Native organisms. Ecotoxicology. Aquatic Ecology.

Prólogo:

Neste capítulo, nós, do grupo do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), da Universidade de São Paulo, apresentaremos para os leitores um pouco da nossa experiência no estabelecimento de cultivos de invertebrados aquáticos em laboratório, desde sua coleta até a manutenção em laboratório (Fluxograma 1.1).

Fluxograma 1.1 - Etapas seguidas para o estabelecimento de cultivo de invertebrados aquáticos nativos em condições laboratoriais.



Fonte: elaboração nossa (2021).

A avaliação da qualidade ambiental de recursos hídricos pode ser feita analisando as espécies presentes na coluna da água e no sedimento de rios, riachos, lagos e reservatórios. A adaptação e manutenção desses organismos em laboratório podem proporcionar análises específicas em condições controladas, permitindo comparações entre situações distintas.

1.1. Procedimentos de coleta de invertebrados aquáticos em campo

Existem diversas formas de coletar invertebrados aquáticos e, dentre elas, as mais utilizadas são as redes em "D", as dragas, o surber e o "core". A escolha da me-

todologia adequada varia de acordo com o objetivo do estudo (por exemplo, uma análise quantitativa ou qualitativa), com a profundidade do corpo hídrico, tipo de sedimento de fundo, área de amostragem estabelecida no estudo e grupo de organismos que estão sendo visados para amostragem.

Para riachos, a rede em “D” (Figura 1.1) é uma ótima opção quando a área de amostragem necessária não é profunda (ex., no máximo 90 centímetros), uma vez que o operador do equipamento precisa seguir um padrão de amostragem e a frequência de “arrastos” no fundo do leito do riacho ao longo do tempo. O funcionamento deste equipamento depende da malha da rede e do operador, pois seu uso é baseado em “varrer” a área de amostragem, geralmente próxima às margens e no meio do riacho, no sentido contrário ao fluxo de água. O mais recomendado é utilizar uma rede de malha entre 0,21 e 0,25 mm de abertura para evitar a perda de organismos pequenos, como larvas de 1º instar de Chironomidae, ou alguns Oligochaeta, como os do gênero *Chaetogaster*, Von Baer, 1827.

Figura 1.1 - Amostrador tipo Rede em D.



Fonte: Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) (2021).

Para ambientes lênticos profundos ou áreas de difícil acesso, são utilizadas dragas, como a de Eckman, Van Veen ou Petersen (Figura 1.2). Esse tipo de coletor permite que o operador desça o equipamento “armado” (com os dois lados da “boca da draga” abertos) até que atinja o nível do sedimento, no fundo. Para facilitar a amostragem e o bom funcionamento do equipamento, é importante que a corda que liga a Draga ao operador esteja na posição vertical e esticada. Para desarmar o equipamento, o peso (conhecido como “mensageiro”) deve ser solto para o fechamento da draga e posterior coleta do sedimento. Quando a coleta é realizada dentro de um barco, recomenda-se primeiro colocar o sedimento coletado em um

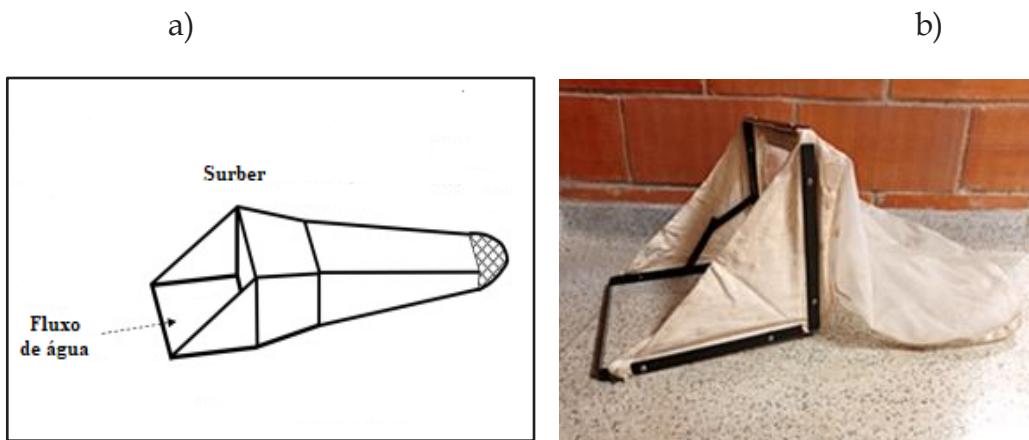
balde com abertura maior e depois acondicioná-lo em potes menores, para diminuir as possibilidades de perda de material.

Figura 1.2 - Amostrador do tipo Draga de Eckman-Birge (área padrão de 255 cm²).



Fonte: LEAA (2021).

Quando a coleta for direcionada para organismos de vida livre em riachos e ribeirões, ou seja, que ficam parte ou todo seu ciclo de vida na coluna d'água, o equipamento recomendado são as redes em "D" e o surber (Figura 1.3). O surber consiste em uma rede em forma de trapézio que é apoiada no fundo do corpo hídrico (em ambientes lóticos) para capturar os organismos em uma área específica (padrонizada), utilizando o fluxo da água como auxílio para que os organismos fiquem "presos" dentro da Rede. Desse modo, os organismos que ficam retidos no final da rede afunilada devem ser alocados em potes de coleta para o processo de triagem (separação dos organismos) em laboratório ou em campo. O surber é indicado para rios de pequeno porte (riachos), córregos e nascentes, com pouca profundidade (no máximo 30 cm). Apesar do objetivo desse tipo de amostrador ser a coleta de organismos do sedimento de fundo, dentro de uma área específica, alguns organismos de vida livre na coluna d'água, acabam, por vezes, ficando retidos na malha.

Figura 1.3 - Amostrador tipo surber.

Fonte: a) Adaptado de HAUER; RESH (2017) b) LEAA (2021).

Para trabalhos mais específicos nos quais o pesquisador necessita coletar um perfil vertical de sedimento aquático, pode-se utilizar o equipamento conhecido como “core” (Figura 1.4). Este amostrador, coletará organismos de vida livre e os que se encontram no sedimento. O *core* é um instrumento que possui diferentes estruturas, por exemplo aço galvanizado de 20 cm de diâmetro e 50 cm de altura (pode haver outras medidas). Quando colocado e fixado no fundo do riacho, todos os organismos em sua área são coletados. Para isso, todo o sedimento presente na área do amostrador pode ser coletado com o auxílio de um pote plástico, por exemplo. A coleta do sedimento finaliza quando a água do riacho volta a entrar na área amostrada. Um exemplo da aplicação desse equipamento pode ser observado no Capítulo 6 deste livro.

Figura 1.4 - Um exemplo de amostrador tipo *core*.

Fonte: LEAA (2021).

O sedimento coletado pode ser acondicionado em potes, sacos plásticos ou em baldes (conhecidos como bujões) contendo as informações como a data e o local

da coleta (Figura 1.5). A correta identificação dos recipientes garante que não haja nenhuma confusão no momento em que a triagem será feita.

Figura 1.5 - Recipientes de armazenamento do sedimento.



Fonte: LEAA (2021).

A triagem do sedimento consiste na separação dos organismos de interesse do restante da amostra e é iniciada com a lavagem desse material em peneiras de 0,25 mm, seja de aço (Figura 1.6a) ou de malha (Figura 1.6b). É recomendado que esse procedimento seja feito sob ação de água em corrente branda, para que não ocorra a fragmentação dos organismos. O pesquisador deve tomar bastante cuidado para não utilizar, nesse processo, uma rede com abertura de malha maior do que aquela utilizada no processo de coleta em campo.

Figura 1.6 - Peneiras para lavagem do sedimento: a) aço; b) malha.



Fonte: LEAA (2021).

Posteriormente à lavagem do sedimento, é realizada a separação manual (triagem) dos organismos de interesse utilizando bandejas translúcidas de polietileno.

Essas bandejas são dispostas sob uma caixa de madeira e vidro (ou vinil) com lâmpadas fluorescentes (bandejas transiluminadas) (Figura 1.7a), para a melhor visualização dos animais (Figura 1.7b). Nesse processo, em geral, utiliza-se pipetas Pasteur e pinças de diferentes tamanhos para a captura dos animais.

Figura 1.7 - Material de triagem: a) bandeja de polietileno sob fonte luminosa; b) vista de dentro da bandeja.



Fonte: LEAA (2021).

O material coletado pode ser triado no campo ou no laboratório. No caso da triagem em campo, em geral, há mais dificuldade para visualizar e identificar os organismos, pela falta de uma fonte de luz abaixo da bandeja. O pesquisador, por outro lado, pode realizar uma adaptação desse procedimento em campo. Por exemplo, é possível colocar por baixo da bandeja translúcida, lâmpadas portáteis, que possuem uma bateria interna recarregável, para a triagem dos organismos no campo. Um exemplo dessa adaptação será apresentado no Capítulo 6 deste livro. Sugemos que o processo de triagem seja realizado com os organismos ainda vivos, para facilitar a coleta e possibilitar a observação da movimentação do corpo dos espécimes coletados (comportamento). Esse processo permite ao pesquisador conhecer um pouco sobre a biologia dos invertebrados aquáticos! Esse momento pode ser considerado de grande aprendizado aos estudantes, em especial, aqueles em início de carreira científica nessa fascinante área de estudo!

1.2. Aclimatação de espécies em laboratório

Quando há intenção de tentar estabelecer o cultivo de uma espécie em laboratório, a preparação do meio de cultivo deve ser feita antes da coleta. Geralmente, para animais bentônicos, são preparados potes plásticos contendo sedimento estéril (utilizamos areia de aquário submetida à 550°C em forno mufla por 4 h) e alimento (utilizamos ração de peixe da marca Tetramin®). É importante que os potes não sejam totalmente preenchidos com a água do cultivo de acordo com protocolos ofi-

ciais (por exemplo, água de torneira sem cloro) para que seja feita a mistura com uma parte da água do local de coleta. Assim, os organismos tendem a sentir menos a mudança entre os ambientes (natural e de laboratório) e as chances de sucesso no cultivo são maiores.

Sugerimos que esses cultivos se iniciem com 50% ou mais de água de cultivo (verificar padrões aceitos na literatura) e o restante da água proveniente dos ambientes de coleta (não utilizar a água coletada quando o ponto de coleta sofrer alguma indicação de contaminação). Cada espécie a ser cultivada apresenta uma necessidade específica para o cultivo, portanto, consideramos importante a consulta a normas estabelecidas (por exemplo, ABNT e EPA) ou contato com outros laboratórios e especialistas nos diferentes grupos de invertebrados aquáticos. Como forma de otimizar o espaço disponível no laboratório, utilizamos estantes de aço para acondicionar os potes para o cultivo de espécies (Figura 1.8a).

Caso os organismos coletados sejam comumente utilizados em cultivos laboratoriais, como larvas de Chironomidae e alguns Oligochaeta, sugere-se seguir protocolos existentes na literatura (FONSECA, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004a; CORBI, GORNI, CORREA, et al., 2015; DORNFELD et al., 2019; CASTRO et al., 2020; FELIPE et al., 2020). Se for um organismo ainda pouco conhecido, os cuidados na aclimatação devem ser redobrados para se evitar o “stress” da espécie às condições laboratoriais. Nesse caso, como orientação, sugerimos novamente a consulta a especialistas na área. No nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), temos experiências no cultivo de Chironomidae e Oligochaeta aquáticos, além de alguns microcrustáceos.

Os organismos coletados e transportados ao laboratório devem ser mantidos sob constante aeração nas bandejas ou potes plásticos. Há vários modos de aerar as amostras, utilizando desde bombinhas de aquário comuns (mais baratas) até pequenos compressores (um pouco mais caros, porém são mais duráveis e mais efetivos para aerar muitas amostras) (Figura 1.8b). Os organismos de interesse que serão cultivados (por exemplo, Chironomidae, Oligochaeta, Odonata, Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera, Coleoptera, Crustacea, entre outros) deverão ser adicionados aos potes plásticos atóxicos contendo a mistura de água, sedimento e alimento.

Figura 1.8 - Estante utilizada para o cultivo de espécies em laboratório (a); pequeno compressor da marca Boyu®, utilizado para aerar as amostras (b).

a)



b)



Fonte: LEAA (2021).

Em geral, por experiências anteriores do nosso grupo de pesquisa, os Oligochaeta são de mais fácil adaptação ao laboratório quando comparados aos insetos. Na maioria das vezes, os insetos não conseguem fechar seu ciclo de vida em laboratório, ou seja, não há viabilidade de cópula e posterior desova, em razão da ausência de condições ambientais necessárias. Desse modo, a manutenção das espécies em laboratório por longos períodos se torna pouco prática. Como já foi afirmado anteriormente, em nosso laboratório temos boas experiências no cultivo de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Insecta: Diptera), *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 e *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Annelida: Clitellata), *Daphnia magna* Straus, 1820 e *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera). Há também boas experiências no cultivo do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta: Diptera), tema que será abordado com mais detalhamento no Capítulo 7 deste livro.

Alguns organismos já possuem normas e protocolos (por exemplo OECD, EPA, ISO e ABNT) indicando as condições ideais para o cultivo controlado em laboratório. Porém, normas voltadas para cultivo e utilização de organismos em ensaios ecotoxicológicos que sejam nativos do Brasil ou de regiões tropicais são escassas quando comparadas àquelas existentes para organismos de clima temperado. Como consideramos importante que os estudos ecotoxicológicos devam buscar analisar alterações na biota aquática nativa dos ambientes aquáticos, os pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), da USP, São Carlos, vem unindo esforços para conseguir desenvolver adaptações necessárias para o cultivo de organismos nativos. Apesar das dificuldades comuns nesse processo, temos conseguido êxito no cultivo de algumas espécies nativas como *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis*, *Pristina longiseta* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Como dica importante

para a aclimatação e manutenção de invertebrados aquáticos em laboratório ressaltamos o acompanhamento constante dos cultivos.

1.3. Manutenção do cultivo de espécies nativas em laboratório

São mantidos no LEAA quatro organismos-teste nativos, que são bioindicadores de qualidade ambiental e podem ser utilizados em ensaios ecotoxicológicos. São eles: *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae); *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera: Daphniidae); *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae); *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Oligochaeta: Naididae). A seguir, descreveremos nossas experiências na manutenção do cultivo e algumas adaptações que não influenciam na qualidade do cultivo, mas que podem reduzir custos ou facilitar procedimentos, em razão da limitação de espaços. Os parâmetros básicos seguidos conforme recomendação das metodologias existentes estão na Tabela 1.1 e serão posteriormente detalhados.

O leitor poderá observar que, em algumas partes desse capítulo, realizamos sugestões de adaptações para possibilitar o cultivo em espaços menores e com menor custo. Esse é um dos objetivos deste capítulo e decerto dessa obra como um todo. Nesse caso, um dos apontamentos tem relação quanto à utilização da ração de peixe Tetramin® para a alimentação dos espécimes em laboratório, que tem se mostrado muito adequada, mas com um custo um pouco elevado. Nesse sentido, entendemos que o pesquisador também pode tentar adaptar outro tipo de ração de peixe, com um custo menor! Há outrossim, sugestões de utilização de bandejas menores e caixas sifonadas, cobertas com materiais mais baratos encontrados facilmente no mercado. Vejam detalhes no decorrer do capítulo.

Tabela 1.1 - Condições de cultivo mantidos no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos

Espécie	Temperatura	Fotoperíodo	Composição do meio	Alimentação	Metodologia
<i>Allonais inaequalis</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Areia, água filtrada sem cloro, alimento	Tetramin®	CORBI; GORNI; CORREA, 2015; FELIPE et al., 2020
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Água reconstituída	Aditivo alimentar e suspensão algácea	ABNT, 2017
<i>Chironomus sancticaroloi</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Areia, água filtrada sem cloro, alimento	Tetramin®	FONSECA; ROCHA, 2004a; OECD 235, 2011; DORNFELD et al., 2019
<i>Pristina longiseta</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Areia, água filtrada sem cloro, alimento	Tetramin®	CASTRO et al., 2020

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Durante a manutenção dos organismos em laboratório, é importante avaliar a “saúde” de cada espécie, a fim de analisar se a sensibilidade está compatível com os valores esperados pelos protocolos estabelecidos para a utilização de invertebrados em ensaios ecotoxicológicos (Tabela 1.1). Para isso, geralmente é utilizada uma substância de referência, como por exemplo, cloreto de potássio (KCl). A partir de uma faixa de concentrações deste sal (mg/L), é possível compreender o estado de sensibilidade das espécies pelo cálculo da concentração de efeito que causa imobilidade ou a mortalidade em 50% nos organismos amostrados para o teste de sensibilidade. Os meios para o cálculo destes valores são descritos por estes protocolos. É importante que a avaliação da sensibilidade das espécies seja feita rotineiramente (a cada 3 meses, no mínimo), e sempre que a espécie for utilizada para ensaios de toxicidade, para que os efeitos de substâncias ou amostras de interesse não sejam confundidos ou imprecisos devido a uma baixa ou alta sensibilidade dos organismos.

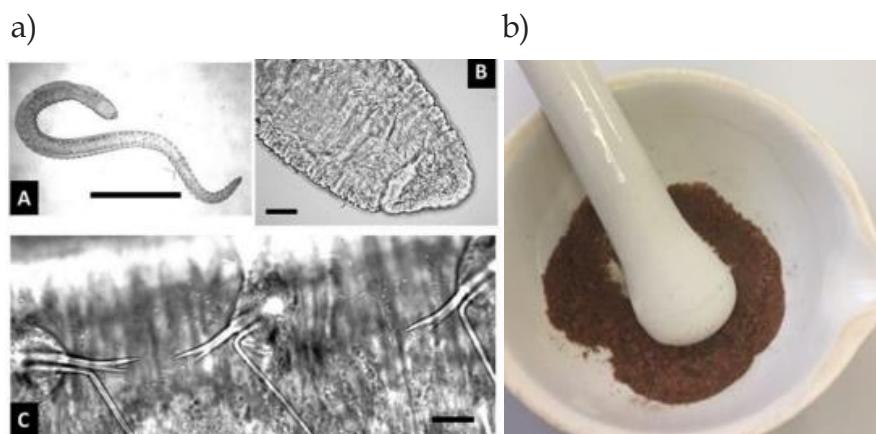
1.3.1 *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911

Como estruturas diagnósticas, *Allonais inaequalis* possui comprimento corporal variando de 3 a 9 mm (37 a 85 segmentos), sem pigmentação. A região do prostô-

mio (primeiro segmento do corpo do animal) tem uma forma arredondada, os olhos e a tromba estão ausentes. A cerda dorsal começa no segmento VI e consiste em 1-2 cerdas capilares acompanhadas de 1-2 cerdas aciculares. As cerdas aciculares são pectinadas, com dentes laterais irregulares associados com 1-4 dentes intermediários mais finos. As cerdas ventrais são bífidas com nó ligeiramente proximal (Figura 1.9a). Esta espécie tem ampla distribuição, com registros na América do Norte, América do Sul, África, Austrália e Sudeste Asiático (BRINKHURST; JAMIESON, 1971).

No nosso laboratório, os primeiros indivíduos de *A. inaequalis* foram obtidos em corpos d'água localizados no Parque Ecológico Municipal de São Carlos (São Paulo, Brasil). O cultivo da espécie *A. inaequalis* é realizado em bandejas ou potes plásticos contendo sedimento esterilizado (areia fina mantida em mufla por 4h à 550°C), água filtrada sem cloro, aeração constante (aproximadamente 1 bolha de ar por segundo) e alimentação uma vez por semana com 15 ± 1 mg de composto alimentar de peixe triturado (Tetramin®) (Figura 1.9b). O cultivo da espécie também se adaptou ao recipiente do tipo caixa sifonada, sendo esse ambiente mais escuro propício para o aumento populacional dos organismos. Para iniciar um cultivo de *A. inaequalis*, a partir de um cultivo existente, recomenda-se incubar de 10 a 30 indivíduos, nas condições de cultivo, bandejas e potes plásticos citados anteriormente.

Figura 1.9 - a) *Allonais inaequalis* (A: visão geral; B: prostômio; C: cerdas dorsais; Escala: A = 1 mm, B = 150 µm, C = 10 µm); **b)** ração de peixe triturada com auxílio de cadiño, pistilo e almofariz (Tetramin®).



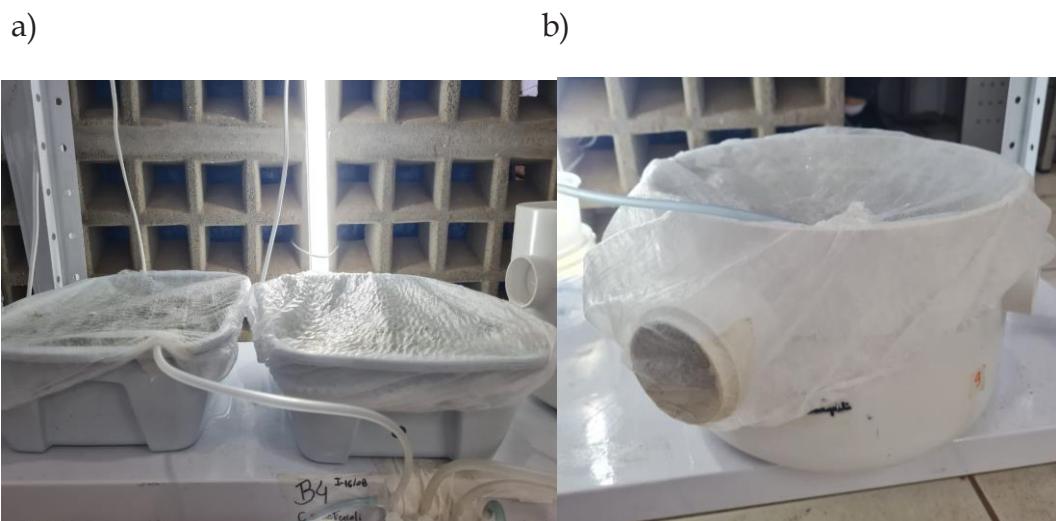
Fonte: a) CORBI; GORNI; CORREA, 2015 b) LEAA (2021).

O tipo de bandeja utilizada depende do material que se tem acesso e do espaço disponível no laboratório. Esse organismo se adapta facilmente às condições de laboratório. Já mantivemos cultivos em potes de plástico transparente de 1L (atóxicos) (nesse caso, apesar da população crescer e se manter, observamos um elevado surgimento de algas); em vasilhames de plástico comprados em lojas de utensílios

de cozinha (Figura 1.10a) e, em caixas sifonadas de PVC (Figura 1.10b), utilizadas em encanamentos residenciais.

Dentre os recipientes utilizados, percebemos que o cultivo se manteve muito bem na caixa sifonada, podendo ser esse sucesso associado à altura de coluna d'água e de espaço vazio do recipiente, à baixa luminosidade que chega no sedimento. Uma adaptação que fazemos para o cobrimento das bandejas (feita principalmente para evitar que partículas do ar se depositem na água de cultivo e para evitar que outros organismos se estabeleçam nela) é a utilização de toucas cirúrgicas. As toucas além de serem mais baratas que o tule fino, tem alta durabilidade e cumprem com a função desejada.

Figura 1.10 - Recipientes de cultivo de *Allonais inaequalis*: a) vasilhames de plástico (atóxicos); b) caixa sifonada.



Fonte: LEAA (2021).

Para manter as condições de cultivo, a água apresenta pH entre 6,5 e 7,4; condutividade elétrica entre 20 e 60 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e dureza total entre 12-56 mg/L CaCO_3 . É essencial que, quando for feita a alimentação semanal dos organismos, o nível da água seja verificado e, sempre que necessário, preenchido com água filtrada sem cloro.

1.3.2 *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902

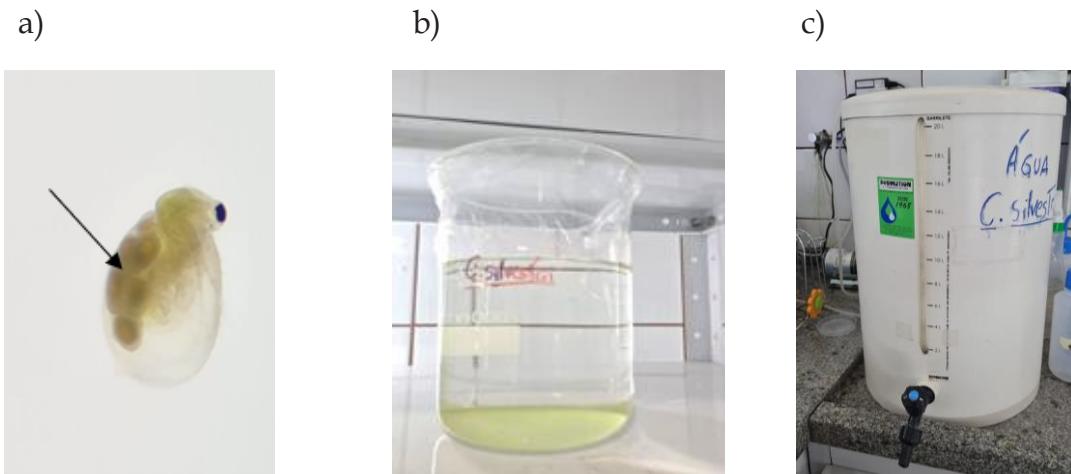
Os microcrustáceos da Ordem Cladocera, pertencentes à Classe Crustacea e à Família Daphniidae são organismos geralmente transparentes, que possuem uma carapaça única composta por quitina (um polissacarídeo) e, devido sua forma de natação, são conhecidos pelo nome de “pulga d’água”. O microcrustáceo filtrador *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Figura 1.11a) possui comprimento corporal em

laboratório de 0,5 a 0,6 mm e é recomendado em ensaios ecotoxicológicos e na avaliação da qualidade da água por apresentar sensibilidade a pequenas mudanças de qualidade ambiental e estabilidade genética (FONSECA; ROCHA, 2004b; ABNT, 2017). Seu ciclo de vida dura cerca de 29 dias e é composto por quatro estágios: ovo, neonato (recém-nascidos com máximo de 24 horas de vida), juvenil (fase que contempla até o desenvolvimento dos ovos) e adultos (quando realiza a primeira postura) (FONSECA; ROCHA, 2004b). Além disso, este organismo-teste apresenta algumas vantagens decorrentes de suas características como: serem pequenos e necessitarem de pequena infraestrutura, fáceis de cultivar em laboratório e requerem pouco volume de amostras.

Os primeiros indivíduos de *C. silvestrii* foram obtidos com autorização da professora Odete Rocha, coordenadora do Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia Aquática, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) - Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos (SP). Novos organismos também foram adquiridos no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEAA), Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) - Universidade de São Paulo, em Itirapina (SP).

Para iniciar um novo cultivo recomenda-se incubar 80 neonatos em condições próximas do cultivo onde os indivíduos foram adquiridos. A transição para a nova água de cultivo deve ocorrer com um troca parcial da água (50% da água do cultivo anterior e 50% da água reconstituída utilizada no seu laboratório). O cultivo de *C. silvestrii* é feito em bêqueres de vidro de 1 L (80 organismos por bêquer) e 2 L (120 organismos por bêquer) (Figura 1.11b), ambos mantidos nas condições apresentadas na Tabela 1.1. O meio de cultivo é substituído três vezes por semana, sendo composto por água reconstituída preparada com a adição de 20 mL/L da solução 1 (1,5 g sulfato de cálcio dihidratado dissolvido em 1 litro de água deionizada) e 10 mL/L da solução 2 (0,2 g de cloreto de potássio, 4,8 g de bicarbonato de sódio e 6,1 g de sulfato de magnésio heptahidratado dissolvidos em 1 litro de água deionizada), ambas preparadas conforme a norma técnica NBR 13373 (ABNT, 2017).

Figura 1.11 - Cultivo de *Ceriodaphnia silvestrii* a) Indivíduo adulto (com ovos); b) Béquer e meio de cultivo; c) Tanque de armazenamento da água reconstituída.



Fonte: LEAA (2021).

A água reconstituída deve ser preparada e aerada por 24 horas antes de sua utilização para que haja a completa dissolução das soluções em um tanque de armazenamento (Figura 1.11c). Além disso, quando estiverem sendo preparados os novos bêqueres de cultivo, é recomendado que o meio seja filtrado (podendo ser utilizado peneira específica ou filtro de café) para que sejam retiradas impurezas que possam formar no fundo do tanque de armazenamento. Para suplementação do cultivo, nós utilizamos a vitamina Fishtamin®, adicionando 1 gota de vitamina por litro de água reconstituída. Antes de preparar novamente a água reconstituída, é necessário fazer a limpeza do tanque utilizando água e gaze para esfregar as paredes. O conteúdo dos cultivos antigos deve ser descartado, podendo passar por um filtro para reter os organismos e utilizá-los como alimento para peixes. Os bêqueres são lavados com água e gaze a fim de retirar todo material aderido à vidraria.

Os requisitos da água de cultivo são dureza total entre 40-48 mg CaCO₃/L e pH entre 7,0 e 7,6. Uma dica importante é sempre manter um bêquer com os organismos (neonatos ou parental) que sobraram após a troca no meio de cultivo antigo. Assim, o cultivo pode ser recuperado caso o novo bêquer preparado apresente alguma alteração nos organismos. Caso seja observado elevado número de indivíduos imóveis durante a troca do meio, deve-se verificar os parâmetros da água reconstituída novamente. Também é recomendado verificar a data de validade dos alimentos.

O cultivo é alimentado a cada troca do meio utilizando suspensão algal de *Raphidocelis subcapitata* (2×10^5 células/mL) (Figura 1.12) e aditivo alimentar (0,1 mL/L).

Vale ressaltar que, para evitar a entrada de bolhas de ar na carapaça dos organismos durante a troca de meio, o novo meio é mantido sem agitação por 15 minutos antes da colocação dos organismos e os organismos são retirados cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro de ponta larga e colocados diretamente abaixo no limite da água no bêquer contendo o novo meio.

Figura 1.12 - Suspensão algácea de *Raphidocelis subcapitata*.



Fonte: LEAA (2021).

Para o preparo do aditivo alimentar, inicialmente serão pesados e triturados 5 g de ração de peixe Tetramin® em 1 L de água deionizada. Essa mistura deve ser deixada sob aeração constante por 7 dias nas mesmas condições do cultivo. Como é importante haver uma saída para troca gasosa durante esse período, é indicado colocar um tampão feito de algodão e gaze ou espuma inerte. Após esse período, essa mistura deve ser alocada em recipientes de 50 mL e congelada até sua utilização. Recomendamos que o armazenamento desse alimento não deva ultrapassar 8 meses em freezer. Para utilizar essa mistura, deve-se descongelar o recipiente. Em seguida, 0,25 g de fermento biológico em pó deve ser diluído completamente em 50 mL de água deionizada (por exemplo, 10 min em agitador magnético). Assim, o aditivo alimentar preparado (100 mL) será constituído pela ração fermentada (50 mL) e pelo fermento diluído (50 mL). Essa mistura será armazenada em geladeira para ser utilizada após 24h, uma vez que é recomendada a utilização apenas do sobrenadante.

1.3.3 *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981

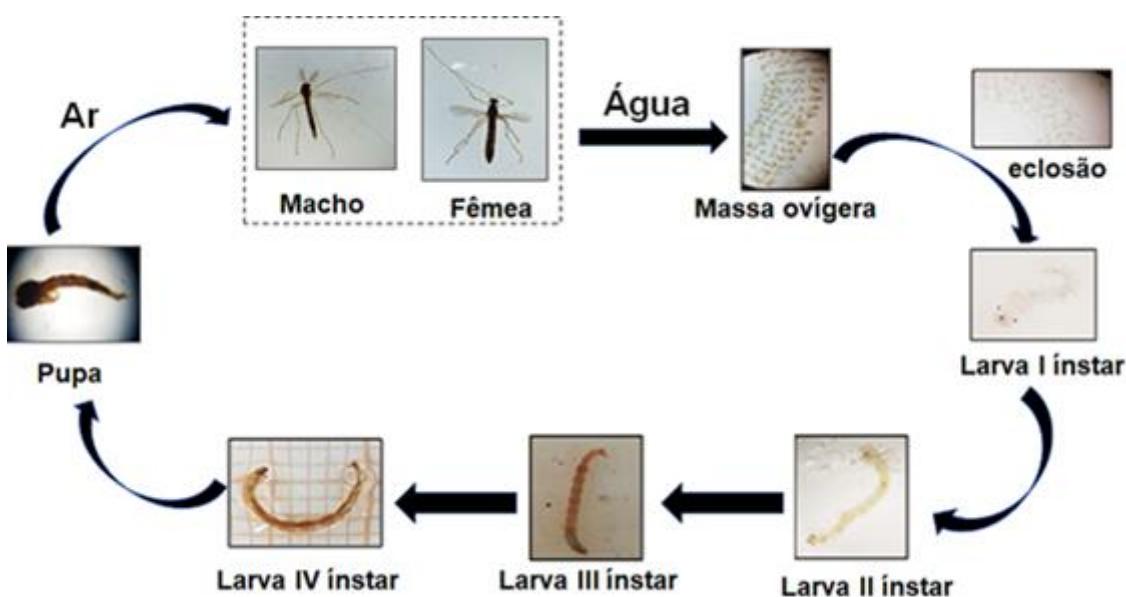
Na distribuição ecológica, as larvas de alguns Chironomidae podem ocupar os diferentes tipos de ambientes aquáticos devido ao seu mecanismo de respiração, que, em algumas espécies possui hemoglobina e que garante a sobrevivência ao ocupar ambientes com baixa concentração de oxigênio dissolvido. A espécie *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981, é um macroinvertebrado aquático pertencente

à família Chironomidae descrita a partir de exemplares coletados no município de São Carlos (São Paulo, Brasil). Aqui, utilizamos o nome *Chironomus sancticaroli*, baseado nas fundamentações apresentadas em artigo publicado no ano de 2011, pela professora Susana Trivinho-Strixino (ver TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Essa espécie possui desenvolvimento com metamorfose completa e seu ciclo de vida é consideravelmente curto, sendo os quatro estágios do organismo (ovo; instares larvais - I instar, II instar, III instar e IV instar; pupa e adulto) desenvolvido em cerca de 13 dias (Figura 1.13). O período larval é predominante (em tempo) no ciclo de vida, seguido pelo período de pupa e adulto (FONSECA, 1997; MUGNAI; NESSIMIAN; BAPTISTA, 2010). Após a emergência dos adultos, é possível diferenciar o sexo dos mosquitos, sendo que os machos possuem coloração amarelo-esverdeada com abdômen afinado e antena plumosa, enquanto as fêmeas apresentam coloração acastanhada, com abdômen mais encorpado e antena pilosa (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

A peça bucal dos adultos da espécie é reduzida, sendo assim, os adultos não se alimentam e possuem apenas função reprodutiva. Após a fase de cópula, os ovos (média de 550 por fêmea) são depositados na água como uma massa ovígera gelatinosa, com formato espiral e demoram entre 44 e 48 horas para a eclosão das larvas de 1º instar (FONSECA; ROCHA, 2004a).

Figura 1.13 - Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* contemplando as fases aquática (larvas e pupa) e terrestre (adultos alados).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Nos primeiros ínstares, as larvas possuem comportamento planctônico, enquanto nas fases subsequentes, passam a ter hábitos bentônicos. Em sua fase bentônica, as larvas dessa espécie constroem casulos a partir de partículas do substrato e secreção salivar, ficam alojadas nas camadas superficiais do sedimento e a alimentação ocorre por meio de pequenas partículas que ficam aprisionadas na entrada do casulo. O processo de alimentação é beneficiado pelo movimento da larva (que cria um fluxo da água para dentro do casulo), ou pela obtenção direta, quando as larvas impulsionam o corpo para fora do casulo (OLIVER, 1971). A espécie se alimenta de algas, detritos suspensos (matéria orgânica, bactérias) e da própria massa ovígera, no início do desenvolvimento larval (OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

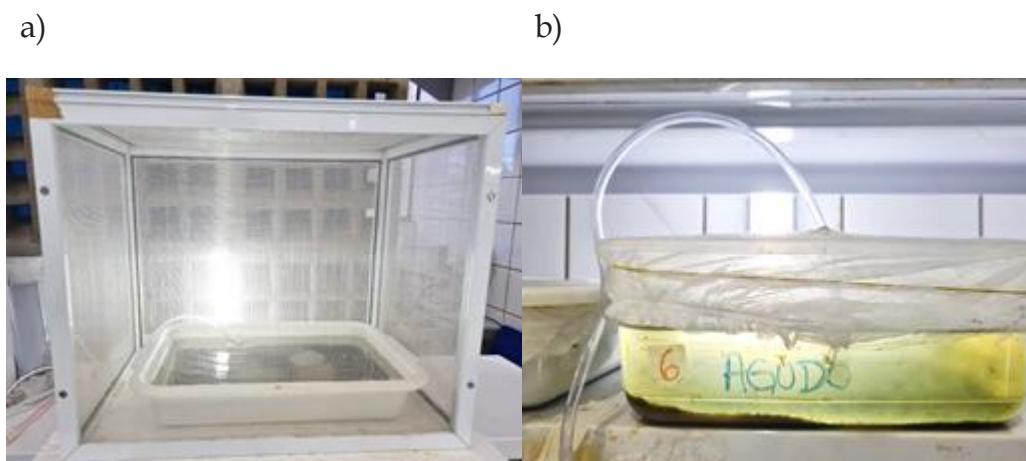
Os primeiros indivíduos de *C. sancticaroli* foram obtidos a partir de amostras de água e sedimento coletados em lagoas de estabilização do abatedouro de Frango (BR-Aves) localizado em São Carlos (São Paulo, Brasil). O cultivo da espécie *C. sancticaroli* pode ser realizado utilizando diferentes configurações. A configuração sugerida para o cultivo da espécie (TRIVINHO-STRIXINO, 1980) é em bandejas de plástico (dimensões 38 cm de comprimento x 33 cm de largura x 6 cm de altura) cobertas por gaiolas de madeira cobertas por nylon, dimensões 42 cm de comprimento x 36 cm de largura x 38 cm de altura para evitar a evasão dos organismos adultos (Figura 1.14a).

Com o intuito de reduzir a necessidade de espaço e o investimento na fabricação de gaiolas (diminuir custos), como sugestão, indicamos que o cultivo também pode ser mantido em bandejas de plástico cobertas por toucas cirúrgicas (Figura 1.14b). Nesse caso é necessário adicionar dois cuidados extras, o primeiro refere-se à menor quantidade do número de organismos em bandejas menores, pois não é ideal que haja elevada densidade de larvas para que a competição por alimento e espaço não ocorra (competição intraespecífica).

Para iniciar um novo cultivo é necessário preparar as bandejas de plástico, anteriormente citadas, adicionando uma lâmina de sedimento de aproximadamente 1 cm ao fundo. É importante que a água para o cultivo (2 a 4 L de água de torneira sem cloro) seja preparada previamente e mantida sob aeração com alimento (23 ± 1 mg de Tetramin® triturada) por pelo menos 24 h. Recomenda-se incubar de 1 a 2 desovas ao iniciar um cultivo. Se possível, coletar um pouco da água dos cultivos já existentes e misturar com a água do novo cultivo, assim, as larvas irão eclodir em um ambiente que não é totalmente diferente da bandeja em que a desova foi coletada.

O segundo cuidado refere-se ao manejo de adultos. Como nesse tipo adaptado de cultivo não há muito espaço livre para a emergência de adultos (entre a bandeja e a touca cirúrgica), é mais difícil fazer a manutenção do nível da água e realizar a alimentação. Assim, sugere-se o uso de um elástico para prender a touca na lateral da bandeja e no meio da touca fazer um furo no qual será alocada a mangueira de aeração e pelo qual serão adicionados o alimento e a água de reposição necessários. Observe na Figura 1.14b como o espaço necessário para o cultivo em laboratório torna-se menor com esse método adaptado pelo Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA).

Figura 1.14 - Cultivo de *Chironomus sancticaroli*: a) método tradicional; b) método adaptado no LEAA.



Fonte: LEAA (2021).

Em todos os casos, o cultivo é mantido sob aeração constante (aproximadamente 2 bolhas por segundo) e a alimentação é feita duas vezes por semana com 23 ± 1 mg de Tetramin® triturada. É possível fazer uma solução para a alimentação dos organismos na qual 5 g de Tetramin® é diluída em 1 L de água deionizada e batida em liquidificador por 5 minutos. Nesse caso, a solução deve ser mantida em geladeira (por até 7 dias) e a quantidade adicionada por bandeja é de 25 mL. Sempre que necessário, o nível da água deve ser preenchido com água filtrada sem cloro. As condições de cultivo são mantidas em pH entre 6,5 e 7,5; condutividade entre 25-55 μ S/cm e dureza entre 12 e 16 mg CaCO₃/L.

1.3.4 *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828

O Naididae *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Figura 1.15) tem um tamanho de comprimento normalmente de 2-4 mm, com diâmetro de 0,15 a 0,20 mm e segmentos variando de 15 a 35 (ZATTARA; BELY, 2011). Essa espécie tem a capacidade de se regenerar totalmente, sendo a reprodução influenciada pela temperatura e

disponibilidade de nutrientes, com maior densidade nas estações mais quentes (primavera e verão) (VAN CLEAVE, 1937; BELY; SIKES, 2010). Além disso, *P. longiseta* apresenta reprodução sexuada e assexuada. A reprodução assexuada ocorre por fissão da paratomia (formando cadeias de zoóides) e é a forma mais frequente na natureza. Em condições de laboratório, a reprodução ocorre também preferencialmente por esse processo (ÖZPOLAT et al., 2016).

Figura 1.15 - *Pristina longiseta* a) visão geral; b) cerdas ventrais; c) cerdas aciculares e capilares. Escala: a) 100 µm; b) e c) 10 µm.



Fonte: CASTRO et al., 2020.

Os primeiros indivíduos de *P. longiseta* foram obtidos a partir de amostras de água e sedimento coletados em lagoas de estabilização do abatedouro de Frango (BR-Aves) localizado em São Carlos (São Paulo, Brasil). Os indivíduos *P. longiseta* são mantidos em potes plásticos semi-opacos de 500 mL contendo sedimento esterilizado, água filtrada sem cloro, aeração constante e alimentação uma vez por semana com 20 ± 1 mg de composto alimentar para peixe triturado (Tetramin®). Os parâmetros químicos da água de cultivo são mantidos nas condições de pH entre 5,0 e 7,4; condutividade elétrica entre 40 e 150 µS/cm; dureza total entre 12-54 mg/L CaCO₃. Sempre que necessário, o nível da água é preenchido com água filtrada sem cloro. Após a aclimatação dessa espécie no laboratório, observamos melhor reprodução quando seus recipientes estavam mais afastados da luz e envolto com papel.

Para iniciar um cultivo de *P. longiseta* é importante que os potes plásticos (atóxicos) sejam semi-opacos, contenham 100g de sedimento ao fundo (areia fina), e sejam preenchidos até a sua capacidade (500 mL) com água de cultivo. Além disso, pelo menos 20 indivíduos a cada 100 g de sedimento deverão ser incubados. Para

manter a qualidade e quantidade de indivíduos, uma vez por mês, 20% da água de cultivo deve ser descartada e substituída por água da torneira sem cloro. Para verificar a densidade de organismos no cultivo, os tubos de aeração deverão ser retirados manualmente, e durante 40 segundos, o meio líquido da cultura deverá ser levemente agitado usando pipeta Pasteur, a fim de suspender os oligoquetos na coluna d'água. Após, 10% do meio deve ser vertido em placa de Petri para contagem dos indivíduos. Entre 20 e 40 indivíduos móveis são esperados nesta amostragem.

No geral, a boa adaptação dessa espécie às condições de laboratório, a boa taxa de reprodução, a rápida execução de ensaios ecotoxicológicos, a representatividade de ambientes tropicais, ajuste de sensibilidade e resultados de testes de toxicidade aguda apoiam a proposta de adaptação da utilização de *P. longiseta* como organismo teste para fins ecotoxicológicos em regiões tropicais (CASTRO et al., 2020).

1.4. Considerações finais

Sabemos que foram dadas muitas informações no decorrer deste capítulo, mas o importante é que você entenda que até chegarmos numa situação em que temos um cultivo estável de espécies em laboratório existem diversas etapas. Esperamos ter esclarecido algumas dúvidas sobre a coleta de macroinvertebrados aquáticos e o estabelecimento de seu cultivo em laboratório, mostrando um pouco sobre as espécies cultivadas pelo LEAA. Mostramos no decorrer do capítulo os materiais, soluções, vitaminas e alimentos que geralmente utilizamos e trazemos algumas alternativas para baratear essas práticas.

Agradecimentos: Agradecemos a todos os pesquisadores e parceiros do LEAA que de alguma forma contribuíram para a realização da escrita deste trabalho, sendo pelo compartilhamento de experiências com os cultivos de invertebrados em seus laboratórios, no auxílio da identificação das espécies e na leitura e aperfeiçoamento da escrita do capítulo. Além disso, somos gratos às agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (#88887.353028/2019-00; 88887.602984/2021-00; 88887.339518/2019-00; 88887.339553/2019-00; 88887.499485/2020-00), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (#168736/2018-7; 131664/2020-4) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (#2018/21901-0) pelas bolsas concedidas para realização de nossas pesquisas.

Referências

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2017.
- BELY, A.E.; SIKES, J.M. Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, p. 1464-9, 2010.
- BRINKHURST, R.O.; JAMIESON, B.G.M. Aquatic Oligochaeta of the world. Toronto, **University of Toronto Press**, 860p, 1971.
- CASTRO, G. B. et al. Update on the use of *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 38360-38369, 2020.
- CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 7-11, 2015.
- DORNFELD, C. B. et al. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a Sensitive Tropical Test Species in Laboratory Bioassays Evaluating Metals (Copper and Cadmium) and Field Testing. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 1, p. 42-50, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00244-018-0575-1>>.
- FELIPE, M. C. et al. The use of an *Allonais inaequalis* reproduction test as an ecotoxicological bioassay. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 5, p. 634-638, 2020.
- FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 220 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1997.
- FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 16, n. 2, p. 153-161, 2004a.
- FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphniidae). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 16, n. 4, p. 319-328, 2004b.
- HAUER, F. R.; RESH, V. H. Macroinvertebrates. In: **Methods in Stream Ecology**, Volume 1. Academic Press, p. 297-319. 2017.
- MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: **Technical Books Editora**, 2010.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No 235: *Chironomus* sp. - Acute Immobilisation Test. **OECD Publishing**, 2011.

OLIVER, D. R. Life story of the Chironomidae. **The Annual Review of Entomology**. v.16, p. 211-230, 1971.

ÖZPOLAT B. D., SLOANE E. S., ZATTARA E. E, BELY A. E. Plasticity and regeneration of gonads in the annelid *Pristina leidyi*. **EvoDevo**, v. 7, n. 1, p. 1 - 22, 2016.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlen-sis* sp. (Diptera: Chironomidae)**. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1980.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11 (Supl. 1), p. 675 - 684, 2011.

VAN CLEAVE, C. D. A Study of the Process of Fission in the Naid *Pristina longiseta*. **Physiological Zoology**, v. 10, n. 3, p. 299-314, 1937.

ZATTARA, E. E.; BELY, A. E. Evolution of a novel developmental trajectory: Fission is distinct from regeneration in the annelid *Pristina leidyi*. **Evolution and Development**, v. 13, n. 1, p. 80-95, 2011.

CAPÍTULO 2

ELABORAÇÃO E APLICAÇÃO DE ENSAIOS DE TOXICIDADE UTILIZANDO ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS NATIVOS DO BRASIL

*FORMULATION AND APPLICATION OF TOXICITY
TESTS USING BRAZILIAN NATIVE AQUATIC
SPECIES*

Aline Christine Bernegossi¹
Mayara Caroline Felipe²
Fernanda Rodrigues Pinheiro³
Gleyson Borges Castro⁴
Tallyson Tavares Cunha de Souza⁵
Guilherme Rossi Gorni⁶
Daniel Peroni Abrahão⁷
Bruna Nayara Cardoso Silva⁸
Juliano José Corbi⁹

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.2

1 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-8237-6567>. aline.bernegossi@usp.br

2 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-4728-5958>. mayarafelipe@usp.br

3 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-8847-673X>. frpinheiro@usp.br

4 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-5706-904X>. gleysonborges@usp.br

5 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-9113-5434>. tallysontavares@usp.br

6 Universidade de Araraquara. <https://orcid.org/0000-0002-9156-6864>. grgorni@gmail.com

7 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-6727-7130>. danielperoniabrahao@gmail.com

8 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-7569-1710>. brunanayara@usp.br

9 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0249-9370>. julianocorbi@usp.br

Resumo

Para garantir um ecossistema aquático com qualidade satisfatória para a manutenção da biota, ferramentas que auxiliam no conhecimento sobre a qualidade ambiental têm sido cada vez mais aplicadas. A utilização de ensaios ecotoxicológicos como uma ferramenta complementar às técnicas já aplicadas para monitoramento ambiental e de efluentes vem aumentando devido à percepção de como essa vertente da ecologia aplicada enriquece o entendimento sobre os impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos. Além disso, a utilização de espécies nativas, além daquelas padronizadas internacionalmente, ajuda a compor uma avaliação e representação mais específica dos impactos da contaminação aquática no ecossistema local. No capítulo anterior, foram relatadas experiências no cultivo de espécies nativas e não nativas de invertebrados em laboratório e adaptações de materiais e espaços. Neste capítulo são abordadas as respostas comumente analisadas em ensaios ecotoxicológicos e as metodologias aplicadas para realização dos bioensaios utilizando as espécies nativas do Brasil: *Allonais inaequalis*, *Chironomus sancticaroli*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Pristina longiseta*. Estes organismos são cultivados com êxito no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA-EESC/USP). Ademais, serão apresentados os testes estatísticos mais empregados para análise de dados. Detalhes sobre métodos de cultivo dessas espécies foram abordados no Capítulo 1 deste livro.

Palavras-chave: Bioensaios. Respostas ecotoxicológicas. Toxicidade aguda. Toxicidade crônica.

Abstract

To guarantee an aquatic ecosystem with satisfactory life quality, tools for the assessment of environmental quality have been being increasingly applied. The use of ecotoxicological tests as a complementary tool to the techniques already applied for environmental and effluent monitoring has been increasing due to the perception of how this aspect of applied ecology enriches the understanding of environmental impacts on aquatic ecosystems. Furthermore, the use of native species, in addition to those internationally standardized, help to compose a more specific assessment and representation of the aquatic contamination impacts on local ecosystems. In this chapter, the description of the outcomes commonly analyzed in ecotoxicological tests are addressed, in a didactic way, as well as the methodology applied to carry out the bioassays with the organisms *Allonais inaequalis*, *Chironomus sancticaroli*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Pristina longiseta*, cultivated in the Laboratory of Ecology of Aquatic Environments (LEAA-EESC/USP).

Keywords: Bioassays. Ecotoxicological responses. Acute toxicity. Chronic toxicity.

2.1 Relevância dos estudos utilizando invertebrados nativos

A manutenção da qualidade da água e dos sedimentos é uma prioridade para a manutenção da vida do planeta, a fim de garantir os usos múltiplos da água (consumo humano, lazer, irrigação, navegação, pesca, aquicultura e geração de energia). Assim, a qualidade da água pode ser avaliada por diferentes indicadores físicos, químicos e biológicos. Entre os biológicos, há estudos com enfoque nas mudanças da estrutura da comunidade de invertebrados aquáticos, com posteriores análises qualitativas e/ou quantitativas da biota e, muitas vezes, com a aplicação de índices de riqueza e diversidade, dominância, equitabilidade, proporção de organismos sensíveis/tolerantes, composição dos grupos funcionais de alimentação e índices bióticos (estudos detalhados no capítulo 5 deste livro). Há também análises da produção secundária utilizando organismos dessa comunidade, as quais buscam avaliar a absorção do carbono sintetizado pelos organismos autótrofos, produção primária, processos envolvidos no consumo e o desenvolvimento da biomassa de organismos heterotróficos ao longo do tempo (estudos detalhados no capítulo 6 deste livro). Neste Capítulo, os bioensaios de toxicidade (também chamados de testes ecotoxicológicos ou testes de ecotoxicidade) utilizando invertebrados aquáticos serão descritos com mais detalhes. Basicamente, os bioensaios de toxicidade podem ser conduzidos para amostras de campo (água e sedimento), amostras compostas de efluentes e para substâncias ou misturas de interesse.

Os invertebrados aquáticos possuem relevância ecológica por estarem nas camadas intermediárias da cadeia alimentar. Isso significa que eles são responsáveis pelo consumo de produtores (plantas e algas), zooplâncton e detritos, além de servir como alimento para consumidores superiores (peixes, aves etc.) (ANDERSON, 1944; BAUN, et al., 2008; SILVA et al., 2008; DODSON et al., 2010). Além disso, muitos desses organismos possuem mobilidade reduzida no ambiente e podem evidenciar alterações recentes e perturbações crônicas no ecossistema (GOMES et al., 2018; BAE; PARK, 2019; CAMARGO, 2019; MOLINERI et al., 2020).

A investigação de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos é de suma importância, tendo em vista a necessidade de compreender os possíveis efeitos tóxicos e riscos de impactos ambientais para organismos que sejam representativos do ambiente de estudo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; MARTINS; BIANCHINI, 2011). Ao selecionar as espécies para realização de testes de toxicidade, é necessário analisar a viabilidade do cultivo e manutenção dos organismos em laboratório. Deve-se dar prioridade, quando possível, para espécies nativas, já que as exóticas

(por exemplo, de clima temperado) apresentam limitações para avaliar os efeitos de contaminantes em ambientes tropicais (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; FREITAS; ROCHA, 2011).

Os invertebrados aquáticos têm sido amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos. Isso acontece devido à diversidade, abundância, facilidade de cultivo em laboratório, estabilidade genética e importância no equilíbrio da cadeia trófica. Além disso, vale lembrar que estudos envolvendo animais vertebrados necessitam de aprovação prévia das Comissões de Ética em Pesquisa no uso de animais (CEPs). Por outro lado, essa demanda não é necessária para invertebrados no Brasil (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; CHAUMOT, 2014; ROSNER et al., 2021). A Plataforma Brasil pode ser consultada para obter maiores informações sobre esse assunto (BRASIL, 2021). Para o nosso leitor, cabe ressaltar que não consideramos isso uma “vantagem”, mas apenas uma questão de otimização de tempo para o início dos ensaios. Portanto, consideramos que o exercício da pesquisa em geral, especialmente as que utilizam seres vivos, deve ser conduzida somente por pessoas qualificadas e sob constante supervisão.

Além disso, investigar organismos com distintos papéis na cadeia alimentar pode ser uma alternativa para abranger os efeitos em diferentes níveis tróficos da biota aquática (RAND, 1995). Alguns desses organismos são responsáveis por filtrar continuamente grandes volumes de água, sendo excelentes indicadores para avaliar os efeitos de poluentes em baixas concentrações no meio, como é o caso da *Ceriodaphnia silvestrii*. Já os organismos da Classe Oligochaeta (*Allonais inaequalis* e *Pristina longiseta*) são organismos detritívoros, consumindo tanto matéria orgânica, quanto inorgânica, podendo interagir com poluentes em sedimentos do ambiente aquático. Logo, é possível analisar os efeitos tóxicos tanto do contato do organismo com o poluente, quanto do seu consumo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; PRICHAR; GRANEK, 2016; ROSNER et al., 2021;).

Assim, quando pensamos na análise dos impactos à biota aquática, é importante considerarmos indivíduos representativos de todos os níveis tróficos do ambiente aquático, com enfoque em espécies nativas representativas da biota local, englobando organismos de coluna d’água, de vida livre e do bentos. Observem que, neste capítulo, utilizamos duas espécies de Oligochaeta que foram coletadas inicialmente em campo e tiveram que ser identificadas corretamente para evitar qualquer tipo de problemas em estudos futuros. Sugerimos muita cautela nessa etapa! Infelizmente, há grupos de animais muito negligenciados em estudos científicos e, por isso, há poucos especialistas para auxiliar em algumas áreas da Zoologia.

2.2 Metodologias de bioensaios de toxicidade utilizando organismos nativos brasileiros

Neste subitem serão apresentados os princípios básicos para o desenvolvimento de bioensaios de toxicidade para os organismos *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911, *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981, *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 e *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828. Nesse ponto, vale ressaltar a importância de consulta a especialistas da área para a realização de uma correta identificação das espécies. Além disso, gostaríamos de destacar o importante papel dos taxonomistas (profissional cada vez menos comum nos dias atuais (MARQUES; LAMA, 2006)) nessa fase dos trabalhos de proposição da utilização das espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos.

Em relação à realização dos bioensaios com substâncias isoladas, é indicado utilizar, pelo menos, cinco concentrações além da situação controle (quando o teste é conduzido em água ou meio de cultivo não contaminado) para que as análises estatísticas possam ser realizadas com maior robustez (ver item 2.3). Quando os bioensaios forem aplicados para avaliação da toxicidade de efluentes (industriais ou domésticos), sugere-se o uso de, pelo menos, cinco diluições para avaliar a eficiência de remoção da toxicidade antes e após o tratamento (para mais informações sobre toxicidade de efluentes ver capítulo 3).

Para amostras provenientes do campo (água ou sedimento), não são necessárias diluições, uma vez que o objetivo é entender como aquele meio está impactando a biota aquática (por exemplo, alterações decorrentes do uso do solo). A fim de garantir que não houve mudanças abruptas nas variáveis químicas das soluções avaliados, para todos os bioensaios recomenda-se a leitura das variáveis pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido no início e ao final dos bioensaios.

2.2.1 *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911

A utilização de oligoquetas em ensaios ecotoxicológicos para análise de mortalidade, reprodução, comportamento e bioacumulação de substâncias ou misturas tóxicas tem ganhado destaque no Brasil, tanto no setor científico quanto na área regulatória de contaminantes (NIVA; BROWN, 2019). Esses organismos são abundantes entre a fauna aquática e terrestre, podendo ser encontrados tanto no sedimento quanto na coluna de água de ambientes de águas doces (GORNI; ALVES, 2006; FELIPE, 2019).

Nesse contexto, *Allonais inaequalis* é uma espécie nativa brasileira que vem sendo utilizada como organismo teste por ser de vida livre e representativa da biota

bentônica e da coluna de água (CORBI et al., 2015; FELIPE et al., 2019). Além disso, é um organismo de fácil cultivo e manutenção em laboratório (consulte o Capítulo 1 deste livro). A reprodução ocorre geralmente de forma assexuada, por fissão paratômica, o que garante estabilidade genética do cultivo (BELY; SIKES, 2006; FELIPE et al., 2019).

Embora o *A. inaequalis* seja um excelente organismo para ensaios ecotoxicológicos, ainda há poucos registros na literatura. Alguns trabalhos do LEAA (USP) e em laboratórios parceiros (Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos - DEBE-UFSCar) obtiveram respostas relevantes a partir de resultados de toxicidade dessa espécie. Corbi et al. (2015) iniciaram os estudos e sugeriram a utilização deste organismo para ensaios ecotoxicológicos em exposições agudas (96h) para o cloreto de zinco ($ZnCl_2$). Felipe et al. (2019) realizaram testes de reprodução do organismo para definição de metodologia em ensaios de toxicidade utilizando exposições de longa duração. Felipe (2019) avaliou os efeitos do surfactante Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS), um detergente muito utilizado em lavanderias industriais, em exposições crônicas (10 dias) e agudas (96h). Rocha et al. (2018), DEBE (UFSCar), realizaram ensaios ecotoxicológicos em exposições agudas (96h) utilizando pesticidas (Carbofuran e Furadan). Castro et al. (2020) avaliaram a toxicidade de microplásticos associada a estresse térmico e de substrato ao longo de exposições curtas (96H) e crônicas (240H).

No contexto da ecotoxicologia de oligoquetas, as metodologias de teste existentes para bioensaios utilizando esse grupo de espécies são majoritariamente para organismos terrestres. Para o *A. inaequalis*, foram padronizados os parâmetros para bioensaios de toxicidade aguda e crônica de acordo com as recomendações de Corbi; Gorni; Correa (2015) e Felipe et al. (2020) (Tabela 2.1). Para esses ensaios, são utilizados bêqueres de 100 mL ou potes plásticos atóxicos de 100 mL, para que a solução ou sedimento analisados não sejam contaminados por substâncias adsorvidas ou absorvidas pelo material.

Por se tratar de um organismo epibentônico, normalmente é adicionado 10 g de sedimento esterilizado em mufla (4 h à 500°C) para análise de soluções líquidas ou 10 g do sedimento natural que será avaliado. Adiciona-se o mínimo de 60 mL e o máximo de 100 mL da solução-teste. Após a adição da alimentação, os potes deverão ser levemente agitados e mantidos em repouso por pelo menos 15 minutos nas mesmas condições do cultivo. Após a aclimatação, são adicionados 6 organismos (de tamanho médio de 5 mm) abaixo da superfície da água em cada réplica. Reco-

menda-se que os potes sejam cobertos para reduzir a evaporação do meio e evitar a contaminação externa. Não é necessário manter os bioensaios sob aeração.

Tabela 2.1 – Parâmetros utilizados para a realização dos bioensaios de toxicidade aguda e crônica utilizando *Allonais inaequalis*

	Bioensaio de toxicidade aguda	Bioensaio de toxicidade crônica
Volume	60 – 100 mL	
Sedimento	10 g	
Quantidade de organismos	6	
Exposição	48h/96 h	10 d
Número de réplicas mínimo	3	
Temperatura	25 ± 2 °C	
Fotoperíodo	12h Luz : 12h Escuro	
Alimentação	2 mg apenas no início	2 mg no início do teste e após 5 dias
Aeração	Ausente	
Resposta	Imobilidade/Mortalidade	Imobilidade/Mortalidade Reprodução

Fonte: Elaboração nossa (2021).

2.2.2 *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981

A família Chironomidae (Insecta, Diptera) está presente em matrizes aquáticas preservadas e impactadas (áreas com pouca vegetação ripária, cercadas por cultivos e pastos ou que recebem contaminação pontual e difusa). A abundância numérica de Chironomidae pode ser atribuída à capacidade desse gênero de se adaptar fisiologicamente às diferentes condições ambientais (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995).

Chironomus sancticaroli é um organismo-teste bentônico presente abundantemente no Brasil, de fácil manutenção em laboratório e que demonstra manter sua estabilidade ao longo da criação quando comparado a outros organismos coletados no campo (CORBI et al., 2019). Os insetos da família Chironomidae são comumente utilizados como bioindicadores e têm diversos pontos de resposta (“endpoints”),

como mortalidade, crescimento, taxa de emergência e deformidades morfológicas. O objetivo de avaliar essas respostas é apontar o resultado das perturbações antrópicas no compartimento aquático (WATTS; PASCOE, 1996; OCDE 233, 2010; GOMES et al., 2018). Por esses motivos, essa espécie vem sendo utilizada em diversos estudos ecotoxicológicos (ANDRADE-MORRAYE et al., 2004; FONSECA; ROCHA, 2004a; ALMEIDA, 2007; CAMPAGNA et al., 2013; COLOMBO-CORBI et al., 2017; DORNFELD et al., 2019; PINTO et al., 2021).

Não existe nenhuma normativa nacional descrevendo os bioensaios de toxicidade aguda ou crônica utilizando esse organismo. Contudo, existem publicações contendo recomendações que guiam os pesquisadores no desenvolvimento dos bioensaios agudos, crônicos ou de emergência e intergeracionais (consulte: FONSECA; ROCHA (2004a); DORNFELD et al. (2019); BERNEGOSSI et al. (2019)).

Os parâmetros básicos para a realização de bioensaios utilizando esta espécie estão expostos na Tabela 2.2. Para os bioensaios, são utilizados bêqueres ou potes plásticos (ver item 2.1) de 500 mL ou 1 L, sendo recomendada a adição de sedimento esterilizado em mufla (4 h à 500°C). Após a adição do alimento e da solução-teste, os potes devem ser agitados e mantidos na condição do cultivo por pelo menos 15 minutos antes da inserção dos indivíduos. Recomenda-se que os potes sejam cobertos com plástico filme para reduzir a evaporação do meio e evitar a contaminação por partículas externas.

Tabela 2.2 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda, crônica e de gerações utilizando *Chironomus sancticaroli*.

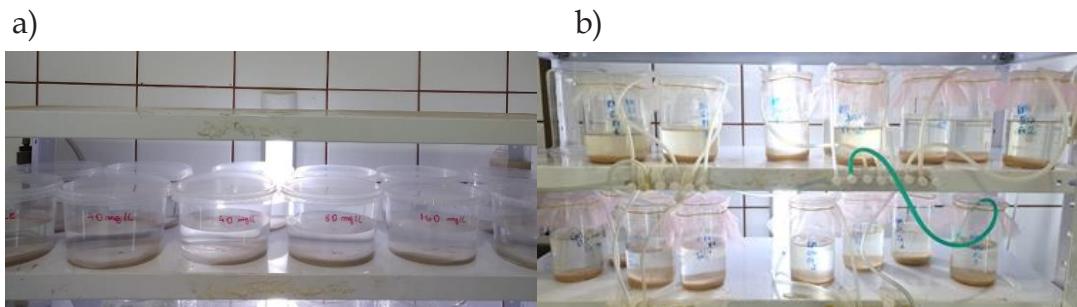
	Bioensaio de toxicidade aguda	Bioensaio de toxicidade crônica	Bioensaio de emergência	Teste de geração
Volume	250 mL	250 mL	250 mL	340 - 500 mL
Sedimento			50 g	
Quantidade de organismos	6 larvas III ou IV ínstar	6 larvas I ínstar	10 larvas I ínstar	20 larvas de I ínstar
Exposição	96 h	10 d	Até que a última larva emerja ou morra	Até que a última larva emerja ou morra em cada geração analisada
Mínimo de réplicas	3	3	4	4
Temperatura			25 ± 2°C	

Fotoperíodo		12h L: 12h E		
Alimentação	2 mg apenas no início	2 mg no início do teste e após 5 dias		2 mg a cada 5 dias
Aeração	Ausente	Presente	Presente	Presente
Resposta	Mortalidade	Mortalidade	Mortalidade, crescimento corporal, deformidade do mento, emergência	Mortalidade, crescimento corporal, deformidade do mento, fecundidade potencial, emergência, razão sexual.

Fonte: Elaboração nossa (2021).

A diferença entre esses bioensaios consiste na fase de vida do organismo a ser avaliada e na resposta a ser analisada. No bioensaio de toxicidade aguda (Figura 2.1a) são utilizadas larvas em seus estágios finais (III e IV instares), que serão expostas durante um curto período (96h), objetivando analisar a mortalidade. O bioensaio de toxicidade crônica (Figura 2.1b) visa observar as alterações no desenvolvimento larval e são utilizadas larvas recém-eclodidas dos ovos (larvas de 1 dia). Nesse caso, pode-se fazer o bioensaio convencional, que engloba 10 dias de exposição e permite a observação de características de crescimento ou deformidade do mento, ou o bioensaio de emergência de adultos. No bioensaio de emergência, os organismos ficam expostos às soluções-teste até que ocorra a total emergência dos mosquitos. Quando o pesquisador optar por fazer um bioensaio de emergência, recomenda-se a utilização de 10 larvas por réplica e a adição de mais uma réplica por tratamento para que se faça a amostragem de larvas ao décimo dia e permita continuar o experimento até que ocorra a emergência para a fase adulta.

Figura 2.1- a) bioensaio de toxicidade aguda (menos tempo e sem aeração) **b)** bioensaio de toxicidade crônica (mais longo e com aeração constante).



Fonte: LEAA (2021).

O bioensaio intergeracional, intitulado como “Teste de Geração”, refere-se ao desenvolvimento de um bioensaio de emergência ao longo de mais de uma geração do mosquito. O bioensaio consiste na exposição de larvas de I instar (Geração Parental-GP) nas diferentes soluções-teste, por tempo indeterminado (até que todos os organismos se tornem adultos ou até que a última larva seja encontrada morta). Nesse caso, uma quarta réplica é indispensável para que no décimo dia seja feita a coleta das larvas para analisar os parâmetros de desenvolvimento larval e modificações no mento.

Quando se inicia a emergência de adultos, é necessário realizar observações diárias até que uma desova seja depositada na bandeja. Devido à necessidade da obtenção de pelo menos uma desova para dar continuidade ao teste, é indicado fazer o manejo de fêmeas e machos entre as réplicas da mesma concentração para aumentar as chances de copulação. É indispensável fazer anotações quando qualquer tipo de manejo for realizado, para evitar que a contagem total de adultos por potes ou bêqueres seja incorreta. A seguir é apresentado um modelo de tabela que pode auxiliar no controle da emergência de adultos (Tabela 2.3). Nessa tabela, deve-se anotar, dia a dia, o número de novos organismos emergidos. Por exemplo, no dia 10/04 emergiram três machos (3M) na réplica 1 (R1) e duas fêmeas (2F) na réplica 2 (R2). Deve-se anotar também se houve remanejo (ex., as fêmeas da R2 foram alocadas na R1). Além disso, são anotados a presença de desova e o total de adultos que irá permanecer no pote para o próximo dia (ex., no dia 10/04 a R2 ficou zerada após o remanejo, portanto, os adultos observados no dia 11/04 são todos novos; enquanto na R1 no total havia 2F e 3M e no dia 11/04 foi contabilizado apenas um macho a mais). Percebe-se que, por não ter sido observada desova no dia 11/04, o pesquisador optou por deixar os organismos mais um dia (recomenda-se deixar os adultos por no máximo 2 dias quando não houver obtido a desova; mais do que isso não é interessante, pois as asas podem ser deterioradas caso o indivíduo morra e caia na

água). Após obter a desova necessária para continuar o teste na 2^a geração (Geração Filial 1 - F1), o pesquisador pode começar a fixar os adultos em álcool isopropílico logo após a emergência, sem necessidade de remanejo.

Tabela 2.3 - Tabela modelo para anotações e controle de emergência de adultos de *Chironomus sancticaroli*.

Réplica 1 - Tratamento 1					
Data	Fêmeas	Machos	Desova	Remanejo	Total
10/04	0	3	0	2F (R2)	2F 3M
11/04	0	1	0	0	2F 4M
12/04	1	0	2	0	0 (fixados)

Réplica 2 - Tratamento 1					
Data	Fêmeas	Machos	Desova	Remanejo	Total
10/04	2	0	0	2F->R1	0
11/04	1	1	0	0	1F 1M

Fonte: Elaboração nossa (2021).

A desova obtida para cada tratamento na geração parental deve ser coletada do bêquer com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico e colocada em placas de Petri ou Béquer de 50 mL contendo o meio da solução-teste correspondente até que ocorra a eclosão das larvas (normalmente ocorre em no máximo 48 h). Após a obtenção de larvas de I ínstar, os bioensaios para a geração F1 devem ser conduzidos nas mesmas condições que na geração P. Pode-se fazer quantas gerações achar necessário (ou possíveis) para responder às perguntas de sua pesquisa. Em teoria, quanto mais gerações forem realizadas, melhor serão as respostas para se observar os efeitos de longo prazo de um determinado tóxico para essa espécie.

2.2.3 *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902

Entre o grupo dos invertebrados aquáticos continentais, os organismos da Ordem Cladocera e Família Daphniidae estão entre os mais utilizados em ensaios ecotoxicológicos mundialmente (MOUNT; NORBERG, 1984). São organismos que apresentam ampla distribuição geográfica, pequeno porte, fácil cultivo, ciclo de vida curto, elevada sensibilidade e estabilidade genética (reprodução majoritariamente por partenogênese) (RAND, 1995; FONSECA e ROCHA, 2004b). A *Ceriodaphnia sil-*

vestrii é uma espécie nativa brasileira que faz parte da Ordem Cladocera (Daphnidae), sendo utilizada por diversos autores em ensaios ecotoxicológicos (MOREIRA et al., 2014; CASALI-PEREIRA et al., 2015; MANSSANO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; RODGHER et al., 2020).

Diferente dos demais organismos-teste apresentados, a *C. silvestrii* apresenta uma normativa para o bioensaio de toxicidade crônica, a NBR 13373 (ABNT, 2017). Para o bioensaio de toxicidade aguda foram feitas atualizações de acordo com o período de teste recomendado pela NBR 12713 para *Daphnia* spp. (ABNT, 2016).

Os bioensaios utilizando essa espécie podem ser conduzidos em bêqueres de 50 mL ou potes plásticos (ex., copo de café de 50 mL), lembrando que a utilização de plástico não é recomendada para substâncias que podem ser absorvidas ou adsorvidas pelo material ou que possam ser contaminadas por ele. As diluições das concentrações ou amostras de afluentes e efluentes devem ser feitas na água reconstituída usada no cultivo do organismo (ver Capítulo 1) contendo a adição de uma gota de vitamina Fishtamin® por litro. Na preparação dos bioensaios, os bêqueres são preenchidos com as soluções-testes e deixados aclimatando por pelo menos 15 minutos antes da inserção dos indivíduos. Não é necessário adicionar alimento para os bioensaios de toxicidade aguda. Porém, nos bioensaios de toxicidade crônica, são adicionados 10 µL/L de aditivo alimentar e solução algal a cada troca do meio. As trocas devem ocorrer pelo menos a cada dois dias até o término do bioensaio. Em ambos, as neonatas são colocadas abaixo da superfície da água ou gentilmente na parede do pote para evitar a entrada de ar na carapaça. Os potes devem ser cobertos com plástico filme ou outro material de proteção para reduzir a evaporação do meio e evitar a contaminação por partículas externas.

Tabela 2.4 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*.

	Bioensaio de toxicidade aguda	Bioensaio de toxicidade crônica
Volume	15 - 30 mL	15 mL
Sedimento	Ausente	Ausente
Quantidade de organismos	5 - 10 neonatos com menos de 24 h de vida	1 neonato com menos de 24 h de vida
Exposição	48 h	7 d
Mínimo de réplicas	3	10

Temperatura	25 ± 2°C	25 ± 2°C
Fotoperíodo	12h L: 12h E	12h L: 12h E
Alimentação	Ausente	A cada 2 dias
Aeração	Ausente	Ausente
Resposta	Imobilidade	Imobilidade, reprodução, produção de mudas

Fonte: Elaboração nossa (2021).

2.2.4 *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828

A indicação da *Pristina longiseta* como organismo-teste para bioensaios foi feita inicialmente por Smith (1991). A metodologia de teste foi atualizada para ser aplicada em condições de clima tropical no ano de 2020 pelo grupo do LEAA (CASTRO et al., 2020). A elaboração de bioensaios de toxicidade aguda é feita em bêqueres ou potes plásticos de 100 mL seguindo os parâmetros apresentados na Tabela 2.5. Esse organismo se mostrou bastante sensível à agitação e à luz direta, portanto, a utilização de sedimento esterilizado em mufla (4 h à 500°C) é indispensável e todos os conjuntos de potes devem ser colocados dentro de um recipiente opaco, que diminua a incidência luminosa. No caso de não ser possível utilizar um recipiente opaco, sugerimos cobrir os recipientes com papel toalha, por exemplo.

Tabela 2.5 - Parâmetros utilizados para a realização do bioensaio de toxicidade aguda utilizando *Pristina longiseta*.

Bioensaio de toxicidade aguda	
Volume	60 mL
Sedimento	10 g
Quantidade de organismos	6
Exposição	48 h
Número de réplicas	3
Temperatura	25 ± 2°C
Fotoperíodo	12h L: 12h E
Alimentação	2 mg apenas no início

Aeração	Ausente
Resposta	Mortalidade

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Na preparação dos bioensaios, os béqueres são preenchidos com sedimento, alimento e as soluções-testes e permanecem nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo do cultivo (Figura 2.2). Após pelo menos 15 minutos, os indivíduos podem ser adicionados às réplicas. Durante a seleção dos indivíduos recomenda-se utilizar organismos sem a zona de ficção visível (parte mais clara que pode ser observada no corpo do organismo quando está sofrendo a reprodução assexuada). Todos os béqueres devem ser cobertos com plástico filme ou outro material protetor para reduzir a evaporação do meio e evitar a contaminação por partículas externas.

Figura 2.2 - Ensaio agudo sendo conduzido com a espécie *Pristina longiseta*.



2.3 Respostas ecotoxicológicas usuais em bioensaios

2.3.1. *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 e *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828

Ao final dos bioensaios utilizando essas duas espécies de minhocas aquáticas, o sedimento deve ser levemente agitado (ao fazer um movimento lateral com o pote, normalmente os organismos se desprendem do sedimento e vão para coluna d'água), para possibilitar a coleta e a contagem de organismos móveis. Pode-se fazer o uso de uma pipeta Pasteur para “soprar” ar no sedimento para os organismos vivos se movimentarem. Quando o organismo é observado no fundo do pote parado, é necessário “incentivá-lo” a se movimentar para verificar se apesar de vivo (ex., pequenas movimentações em alguma parte do corpo) ele se encontra imóvel. Devem ser contabilizados todos os organismos que se encontram móveis para o cálculo da taxa de sobrevivência/mortalidade.

Em casos de ensaios para avaliar a ingestão de partículas específicas, como microplásticos, indica-se não adicionar sedimento para garantir que as partículas ingeridas sejam as do contaminante estudado. Quando finalizado o teste, estes organismos são colocados individualmente em placas de Petri contendo um pequeno volume de água (para possibilitar uma pequena mobilidade dos indivíduos). A transferência dos organismos poderá ser realizada por pipeta Pasteur. Após essa etapa, a placa pode ser alocada em microscópico óptico e as imagens do indivíduo podem ser capturadas utilizando diferentes lentes objetivas do aparelho. Para isso, acopla-se uma câmera ao aparelho e algum programa de processamento de imagens conectado a um computador deve ser usado.

Quando forem observados organismos vivos, porém imóveis, é interessante fazer a contagem desses indivíduos e adicionar esses dados na discussão dos seus resultados. Para fazer as análises estatísticas (ver item 2.4) comparando os tratamentos contaminados e a situação controle, indica-se usar a resposta (sobrevivência/mortalidade) que apresente a menor sequência de zeros.

No bioensaio de toxicidade crônica (onde analisa-se a reprodução), o procedimento para avaliar a resposta de reprodução é similar ao do bioensaio de toxicidade aguda, sendo necessário fazer a coleta de todos os organismos. Para isso, recomenda-se uma lupa para possibilitar a visualização dos indivíduos menores.

2.3.2 *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981

Assim como para as espécies de oligoquetas, no bioensaio de toxicidade aguda de *Chironomus sancticaroli* deve ser contabilizada, ao final do teste, a quantidade de larvas ou pupas vivas ou mortas. Quando houver presença de adultos, o número por réplica deve ser considerado como organismos vivos. No caso dessa espécie, além da agitação, a retirada dos organismos de dentro dos casulos para confirmar se estão vivos é necessária. Para isso, uma extremidade do casulo deve ser apertada delicadamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur ou bastão para que a larva ou pupa saia pela outra extremidade.

Ao final do bioensaio de toxicidade crônica, as larvas amostradas devem ser fixadas em álcool etílico a 70% para posterior análise do comprimento corporal e da deformidade bucal. Para medir o comprimento larval, as larvas são dispostas em lâminas transparentes contendo uma camada de álcool sob folha milimetrada. É importante que, durante esse processo, as larvas sejam mantidas molhadas com álcool 70% para não ressecarem. Após a organização dos indivíduos sob a lâmina, as imagens fotográficas são feitas. Uma dica é tirar mais de uma foto com a câmera sem inclinação para poder escolher a melhor no momento da medição. Essas imagens podem ser abertas no programa ImageJ (RASBAND, 2018) ou software similar, a escala é configurada de acordo com a milimetragem da folha e então o comprimento das larvas são medidos. A medição do comprimento se dá contornando a larva desde a cabeça até o final do corpo (Figura 2.3).

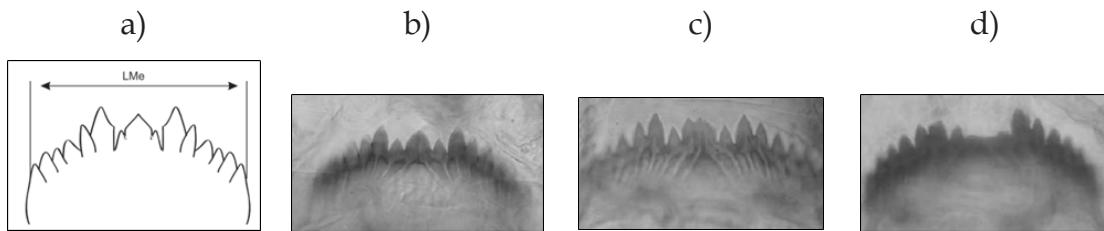
Figura 2.3 - Disposição das larvas de *Chironomus sancticaroli* sobre papel milimetrado para medição do comprimento do corpo.



Fonte: LEAA (2021).

O aparelho bucal das larvas também vem sendo objeto de estudo para a avaliação da qualidade ambiental, uma vez que pode apresentar deformidade quando o organismo se alimenta de partículas contaminadas. As deformidades podem ser leves ou severas (Figura 2.4) e estão relacionadas à redução ou adição de um ou mais dentes, presença de espaços vazios entre os dentes (GAP) e presença de dentes quebrados ou tortos (BIASI; RESTELLO, 2010; RICHARDI et al., 2013).

Figura 2.4 – Aparelho bucal da espécie *Chironomus sancticaroli*: a) e b) padrão normal, c) deformidade leve e d) deformidade severa.



Fonte: Adaptado de Biasi e Restello (2010); Richardi et al. (2013).

Para analisar se há presença de deformidade do mento, as cápsulas cefálicas (“cabeças”) dos organismos são dispostas de forma dorso-ventralmente (peça bucal da larva virada para cima) em lâminas semipermanentes. Ao apertar levemente as “cabeças”, os “dentes” geralmente ficam à mostra. Para fixar as cápsulas cefálicas sob as lâminas, pode-se utilizar meios como o Bálsmo do Canadá ou meio de Hoyer. Após a disposição das cápsulas no meio, estas são cobertas por lamínulas e mantidas em estufa para a secagem (72 h à 55°C). Após a secagem, as lâminas podem ser fotografadas por meio da captura de imagem no software TSView, ou software similar, acoplado a um microscópio óptico utilizando a lente objetiva de aumento de 10x (ex. Nikon Eclipse E200 - Figura 2.5). São consideradas deformidade do mento a falta e a adição de dentes, e deve-se tomar cuidado para que não haja a quebra de dentes na preparação da lâmina.

Figura 2.5 - Equipamentos utilizados para a fotografia e análise da deformidade do mento de *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: LEAA (2021).

A fecundidade das fêmeas pode ser calculada de duas maneiras, com a contagem manual dos ovos obtidos na desova ou pela estimativa da quantidade po-

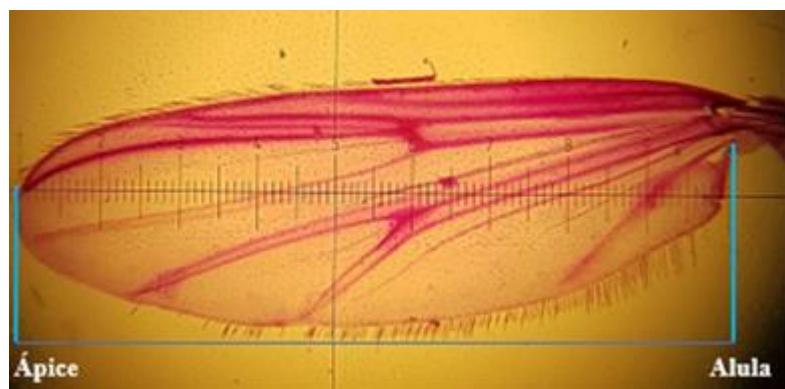
tencial de ovos que poderiam ser gerados pela fêmea por meio do tamanho de sua asa. Para isso, as asas (direita e esquerda) das fêmeas são desanexadas do corpo do indivíduo com o auxílio de uma pinça e bisturi. Para distinguir melhor as nervuras da asa, a mesma pode ser corada antes de ser montada em lâminas. Logo, as asas são mergulhadas em solução de hidróxido de potássio a 10% durante 1 hora e, em seguida, são lavadas com ácido acético a 20%. Após a lavagem, as asas são mergulhadas no corante Fucsina ácida e mantidas em geladeira por dois dias. Finalizado esse período, as asas são mergulhadas novamente em solução de ácido acético a 20%, seguido de álcool 80% e 100%.

Assim como para as cápsulas cefálicas, as asas são fixadas em lâminas contendo Bálsmo do Canadá, meio de Hoyer ou outro meio fixador, cobertas por lamínulas e mantidas por 4 dias à 50 °C em estufa para secagem do meio. A estimativa da fecundidade potencial da fêmea de *C. sancticaroli* é realizada segundo equação descrita por Trivinho-Strixino (1980), que estima o número de ovos da primeira desova presente no ovário das fêmeas (Equação 1.1).

$$F = (k * L) - m \quad (1.1)$$

Onde, "F" é a fecundidade potencial, "k" é uma constante (471,64), "L" é o comprimento da asa e "m" é uma constante (707,41). O comprimento da asa pode ser medido usando o mesmo passo a passo descrito para medição do corpo larval ou com o auxílio de uma lente graduada acoplada a uma lupa ou microscópio. É necessário fazer a conversão do valor medido considerando o aumento do equipamento utilizado. Para o comprimento é considerada a distância entre a alula e a ápice (Figura 2.6).

Figura 2.6 – Exemplificação da medição do comprimento da asa da fêmea de *Chironomus sancticaroli* usando lente graduada.



Fonte: LEAA (2021).

A emergência de adultos é observada e anotada diariamente. A emergência total (%) de indivíduos é calculada pela soma de mosquitos (machos e fêmeas) emergidos.

gidos por pote ou bêquer, dividido pelo número de larvas introduzidas por réplica, desconsiderando o número de larvas que foram amostradas no 10º dia. Caso o pesquisador também queira determinar a razão sexual, a emergência deve ser observada e registrada por sexo. Para mosquitos machos, a soma é contabilizada e dividida pelo número de mosquitos adultos emergidos por pote ou bêquer. Para as fêmeas, aplica-se o mesmo cálculo (OECD, 2010).

2.3.3 *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902

Assim como para os demais organismos-testes, ao final do bioensaio de toxicidade aguda as neonatas móveis são contabilizadas. Após agitação leve do meio líquido, os organismos que apresentarem natação nos primeiros 15 segundos são considerados como móveis. No bioensaio de toxicidade crônica, a contagem das neonatas pode ser feita diariamente ou a cada dois dias durante a troca do meio de teste, tendo em vista a rápida reprodução da espécie. O comprimento do corpo de espécies da Família Daphniidae pode ser medido considerando dois pontos: topo da cabeça e a base da coluna apical, como mostrado no exemplo para a espécie *D. magna* (Figura 2.7). Para isso, é necessário que os organismos móveis ao final dos ensaios sejam colocados, um por vez, em lâminas contendo um pequeno volume de água e submetidos às lentes objetivas de microscópio, de acordo com o aumento desejado. As fotografias e procedimentos para medição do comprimento podem ser realizadas nos mesmos softwares citados para medição do comprimento da asa de *C. sancticaroli*. Contudo, para dafnídeos, não é necessário aplicar corante no organismo.

Figura 2.7 - Marcação para medida de comprimento do corpo de um dafnídeo.



Fonte: LEAA (2021).

2.4. Análises estatísticas comumente empregadas nos estudos do LEAA

Primeiramente, os resultados para cada resposta analisada nos bioensaios de toxicidade aguda, crônica e teste de geração devem ser registrados em planilhas do software Microsoft Office® Excel ou similares. Normalmente, a análise descritiva dos resultados é realizada por meio de gráficos desenvolvidos em softwares (ex., Excel, Origin). As apresentações de dados mais comuns são em gráfico de barras contendo o desvio-padrão, boxplots ou curvas de dose-resposta.

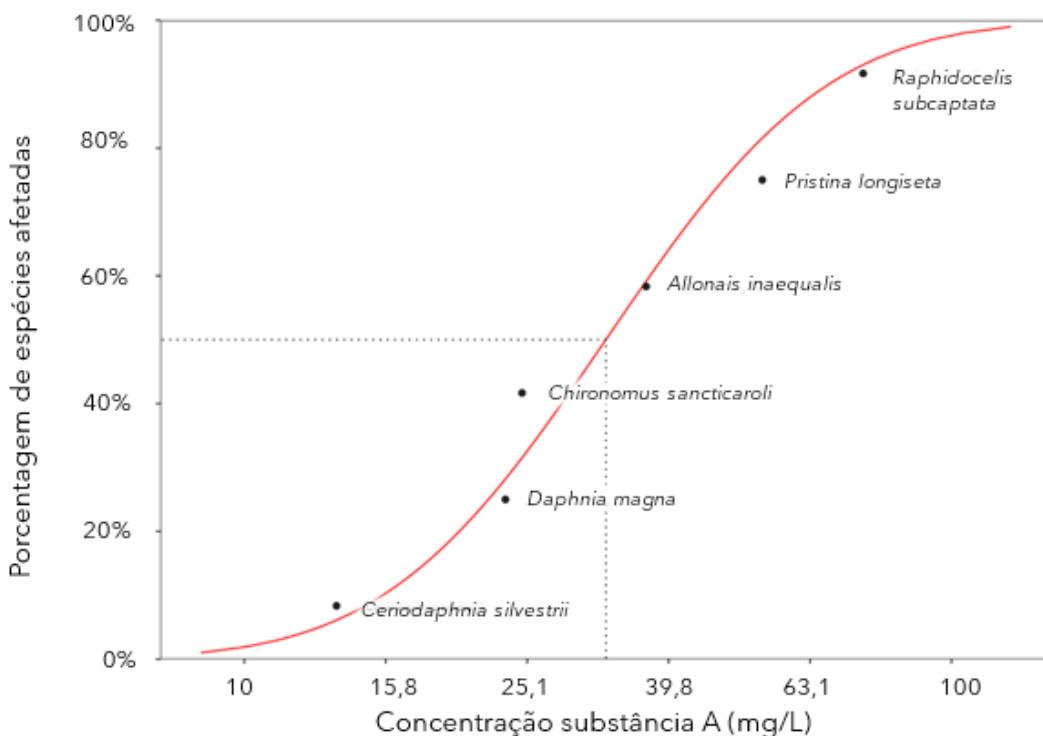
Como um dos objetivos de um teste de toxicidade é estimar as relações entre dose e resposta para as diversas formas de toxicidade da substância, um estudo dessa relação pode ser realizado por meio de ajustes a modelos matemáticos. A geração de uma curva dose-resposta, na qual se tem no eixo x a dose (ou concentração/diluição da substância) e no eixo y a resposta (ou *endpoint*), são definidas por 4 parâmetros: a linha de base da resposta (obtida no tratamento controle), o máximo da resposta, a inclinação e a concentração da substância-teste que provoca resposta como por exemplo, em 50% da população, ou CE_{50} (Concentração de Efeito em 50%) (USEPA, 1991). Pode-se analisar também, as concentrações que podem causar letalidade (CL), efeito na mobilidade, crescimento, reprodução (CE) e inibição de crescimento (CI). Assim, o ajuste das respostas ecotoxicológicas a modelos matemáticos buscam prognosticar os efeitos tóxicos no ambiente (USEPA, 2002).

Para o cálculo da $CL_x/CE_x/CI_x$ (contendo também o erro e os limites inferiores e superiores) é possível utilizar diversos programas, como o *software R* (*software* livre, disponível para download, necessita do desenvolvimento de um *script* e a utilização dos pacotes MASS e DRC) e o *software Statistica®* (ferramenta paga). Com os valores dessas concentrações é possível fazer uma comparação entre as espécies estudadas e os valores encontrados para a mesma substância ou amostras similares em outras literaturas ou bases de ecotoxicologia, como a Ecotox da EPA (<https://cfpub.epa.gov/ecotox>). Plotar graficamente esses dados em uma curva de sensibilidade de espécies (SSD - *species sensitivity distribution*) permite visualizar quais grupos de espécies são mais sensíveis ao contaminante estudado. Isso pode auxiliar na determinação de valores indicadores para serem considerados como limites para proteger X% das espécies encontradas no ecossistema.

Existe disponível uma ferramenta online (<https://bcgov-env.shinyapps.io/ssdtools/>) que permite que o pesquisador entre com os dados (pelo menos seis concentrações) e gere a SSD (Figura 2.8) Além disso, a ferramenta indica a concentração com potencial de efeito em 50% (ou a porcentagem que você escolher) das espécies

analisadas. No caso hipotético apresentado, a CE_{50} corresponde a 32,5 mg da substância A por litro.

Figura 2.8 - Curva SSD hipotética para a substância A.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

É importante conhecer o tipo de dado que está sendo trabalhado para estabelecer durante o delineamento experimental os testes estatísticos que serão empregados. Neste Capítulo, falaremos brevemente sobre os testes mais utilizados pelos pesquisadores do LEAA. Para as análises estatísticas é recomendado o uso de softwares específicos, como exemplo de software gratuito usamos com frequência o “R” e o Past® (Paleontological Statistics), e para os softwares pagos o Statistica® é bastante utilizado.

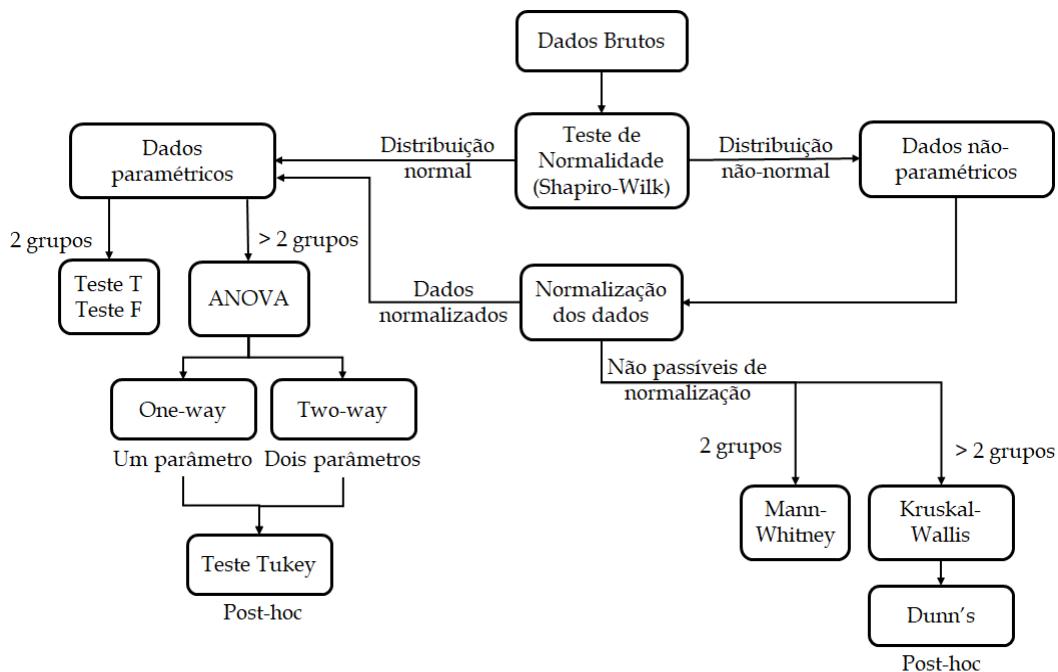
Antes de tudo, temos que lembrar que, em estatística, sempre avaliamos se a hipótese nula (H_0 - afirma que a resposta analisada é igual à um determinado valor hipotético, ou igual a situação controle e assim por diante) será aceita ou rejeitada. Para tanto, padronizamos que a H_0 será aceita com nível de significância de 5% (0,05). Como as respostas dos bioensaios são dados quantitativos, o primeiro passo é avaliar seu enquadramento em uma distribuição normal (ou Gaussiana). A normalidade pode ser analisada por meio de testes específicos, como o Shapiro-Wilk, que pode ser aplicado com “n” mínimo igual a três. Nesse caso, um tratamento será

considerado com distribuição normal quando o p-valor encontrado for superior a 0,05 e a hipótese H_0 (a distribuição dos meus dados seguem uma distribuição normal) for aceita. Caso seja encontrado $p\text{-valor} < 0,05$; a H_0 é rejeitada e a hipótese alternativa (a distribuição dos meus dados não seguem a distribuição normal) é aceita.

Após confirmar a normalidade dos dados, podem ser aplicados os testes paramétricos, como o teste T ou teste F (comparando as médias a cada dois tratamentos independentes ou dependentes, respectivamente), o teste de análise de variância das médias entre os tratamentos usados (ANOVA), o Two-way ANOVA (avaliando a influência de dois parâmetros nos resultados), entre outros. Após verificar que existe indicação de diferenças estatísticas entre as respostas obtidas nos bioensaios com 95% de confiança ($p\text{-valor} < 0,05$), pode-se aplicar testes estatísticos do tipo post-hoc, que fazem a comparação entre todos os possíveis pares de médias, como o Teste de Tukey.

Para dados não normais, primeiro é indicado tentar a normalização dos dados, uma vez que os testes paramétricos utilizam a comparação entre médias. Caso os dados não sejam normalizados deve-se utilizar testes não-paramétricos, que fazem as comparações entre medianas. Nesse caso, utilizamos com frequência o teste de Kruskal-Wallis e o Post-hoc de Dunn's (analisa os pares específicos para dados não pareados, ou seja, independentes). Caso seja do seu interesse identificar diferenças estatísticas entre dois grupos de dados independentes não normais, como investigar se existe diferença estatística no tempo de emergência entre mosquitos machos e fêmeas, o teste de Mann-Whitney pode ser utilizado, com interpretação do p-valor similar aos dos testes descritos anteriormente. A escolha de quais testes aplicar em cada etapa está discretizada no fluxograma a seguir (Figura 2.9).

Figura 2.9 - Resumo esquemático de sugestão de aplicação estatística dos resultados para diferentes tipos de dados.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Os agrupamentos de Cluster podem ser aplicados quando há o objetivo de fazer comparação entre os resultados para diferentes áreas de amostragem ou deseja-se entender como os indivíduos respondem a diferentes situações. Essa série de análises descritivas divide os resultados em grupos baseados nas respostas ecotoxicológicas (agrupamentos). O resultado do agrupamento é de caráter exploratório e se dá por um gráfico do tipo dendrograma. Para isso, o programa utiliza análises de similaridade ou dissimilaridade (distância) entre as condições de estudo, procurando, por exemplo, quais concentrações de certa substância que apresentaram taxa de sobrevivência próximas e quais foram totalmente diferentes. É necessário entender os tipos de dados que se está trabalhando para escolher a melhor medida de similaridade a ser utilizada. Um índice de aplicação comum na área da ecologia é o Índice de Similaridade de Bray-Curtis (que pode ser expresso pela proporção de similaridade ou dissimilaridade e varia de 0 a 1). De qualquer modo, não pretendemos, neste livro, entrar em detalhes sobre testes estatísticos. Sugerimos aqui algumas formas de análise que utilizamos em nossos estudos, mas aconselhamos a consulta a especialistas no tema, para garantir a confiabilidade dos resultados.

2.5. Considerações finais

No decorrer deste capítulo vocês puderam conhecer e entender mais sobre a utilização dos invertebrados cultivados no LEAA em bioensaios de toxicidade.

Agora já deve estar mais claro sobre a utilização de ensaios de curta duração (geralmente para avaliar os efeitos de toxicidade aguda) e de longa duração (comumente empregado para avaliar os efeitos de toxicidade crônica). Resumimos as principais respostas analisadas ao término dos testes e apresentamos meios de avaliar esses resultados para entender com maior clareza como que a substância ou amostra ambiental interferiu no ciclo de vida da espécie analisada. Aproveite para ver os capítulos subsequentes para ver as aplicações dos conceitos e das análises estatísticas apresentados neste capítulo.

Agradecimentos: Agradecemos a todos os pesquisadores e parceiros do LEAA que, de alguma forma, contribuíram para a realização da escrita deste trabalho, sendo pelo compartilhamento de experiências com cultivos e desenvolvimento dos ensaios ecotoxicológicos de invertebrados em seus laboratórios e na leitura e aperfeiçoamento da escrita do capítulo. Além disso, somos gratos às agências de fomento CAPES (#88887.353028/2019-00; 88887.602984/2021-00; 88887.339518/2019-00; 88887.499485/2020-00), CNPq (#168736/2018-7; 131664/2020-4) e FAPESP (#2018/21901-0) pelas bolsas concedidas para realização de nossas pesquisas.

Referências

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ALMEIDA, C. A. de. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios.** 181 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

ANDERSON, B. G. The toxicity threshold of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. **Sewage Works Journal**, v. 16, n. 6, p. 1156-1165, 1944.

ANDRADE-MORRAYE, M. et al. A Method for Preparing Remains of Cladocera (Crustacea) and Chironomid (Diptera: Insecta) for Scanning Electron Microscopy. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n.4, p. 911-912, 2004.

ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges.** Chapman; Hall, 1995.

- BAE, M.J.; PARK, Y.S. Evaluation of precipitation impacts on benthic macroinvertebrate communities at three different stream types. *Ecological Indicators*, v. 102, p. 446–456, 2019.
- BAUN, A. et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: A brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 387–395, 2008.
- BELY, A.E. Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integrative and Comparative Biology*, v. 46, p. 508–518, 2006.
- BERNEGOSSI, A. C. et al. *Chironomus sancticaroli* generation test: A new methodology with a Brazilian endemic insect. *MethodsX*, v. 6, 2019.
- BIASI, C.; RESTELLO, R. M. Incidência de deformidades morfológicas em larvas de Chironomidae (Insecta: Diptera) como ferramenta de avaliação da qualidade de água em riachos de Erechim - RS. *Revista Eletrônica de Extensão da URI, Vivências*, v. 6 (9), p. 136–148, 2010.
- BRASIL. Plataforma Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/plataforma-brasil-conep?view=default>. Acesso em março 2021.
- CAMARGO, J.A. Positive responses of benthic macroinvertebrates to spatial and temporal reductions in water pollution downstream from a trout farm outlet. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, v. 420, n. 16, 2019.
- CAMPAGNA, A.F. et al. Use of artificial sediment to assess toxicity of chromium on *Chironomus xanthus*, *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. *Acta Limnologica Brasilien-sia* (Online), v. 25, p. 42-53, 2013.
- CASALI-PEREIRA, M.P. et al. Botta Toxicity of Vertimec 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* *Chemosphere*, v. 139, p. 558-564, 2015.
- CASTRO, G. B. et al. Update on the use of *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 1828, n. Guideline 315, 2020.
- CHAUMOT, A. et al. Ecotoxicology, Aquatic Invertebrates. *Encyclopedia of Toxicology*. Ed. Elsevier, v. 3, p.284-288, 2014.
- COLOMBO-CORBI, V. et al. Genetic diversity loss in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) exposed to pyrimethanil fungicide: an analysis using RAPD technique. *Water, Air & Soil Pollution*, v. 228, n. 10, 2017.
- CORBI, J. J. et al. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a sensitive test species: can we rely on its use after repeated generations, under laboratory conditions? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 103, n. 2, 2019.

CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 7-11, 2015.

DAMASCEN, O.L.L. et al. Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 229, 2018.

DODSON, S. L.; CÁCERES, C. E.; ROGERS, D. C. **Cladocera and other Branchiopoda**. In: Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Third ed. Elsevier Ltd, p. 1008-1013. 2010.

DORNFELD, C.B. et al. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a Sensitive Tropical Test Species in Laboratory Bioassays Evaluating Metals (Copper and Cadmium) and Field Testing. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, p. 42-50, 2019.

FELIPE, M.C. et al. The use of an *Allonais inaequalis* reproduction test as an ecotoxicological bioassay. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 5, p. 634-638, 2020.

FELIPE, M.C. **Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado**. Tese, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil, 2019.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera - Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensis**, Botucatu, SP, v. 16, n.2, p. 153-161, 2004a.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 16, n.4, p. 319-328, 2004b.

FREITAS, E.C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 241-249, 2011.

GOMES, W.I.A. et al. Functional attributes of Chironomidae for detecting anthropogenic impacts on reservoirs: A biomonitoring approach. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 404-410, 2018.

GORNI, G.R.; ALVES, R.G. Naididae (Annelida, Oligochaeta) associated with *Pomacea bridgesii* (Reeve) (Gastropoda, Ampullariidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23(4), p., 1059-1061, 2006.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.

MANSANO, A.S. et al. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 723-733, 2018.

MARQUES, A.C.; LAMAS, C.J.E. Taxonomia zoológica no Brasil: estado da arte, expectativas e sugestões de ações futuras. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 46, n. 13, p. 139 - 174, 2006.

MARTINS, S.E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p.1866-75, 2011.

MOLINIERE, C.; TEJERINA, E.G. et al (2020) Indicative value of different taxonomic levels of Chironomidae for assessing the water quality. **Ecological Indicators**, v. 108, 2020.

MOREIRA, R. A. et al. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2014.

MOUNT, D.I; NORBERG, T.J. A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 3, p. 425-434, 1984.

NIVA, C.C.; BROWN, G.G. (Eds.). Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas. **Embrapa Florestas**, Brasília, v1, p: 261, 2019.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. **OECD Publishing**, 2010.

OLIVEIRA, L.L.D. et al. Acute and Chronic Effects of three pharmaceuticals on the tropical freshwater cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 229, 2018.

PINTO, T.S. et al. Impact of 2,4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 2021.

PRICHARD, E.; GRANEK, E.F. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 23, p. 22365-22384, 2016.

RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2^a edição. Washington, 1995.

RASBAND, W. **ImageJ**. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>.

RICHARDI, V. S. et al. Determination of larval instar in *Chironomus sancticaroli* using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211-216, 2013.

ROCHA, A.C. et al. Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Research**, v. 161, p. 354-363, 2018.

RODGHER, S. et al. Effects of Phosphorus and Zinc on the Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* by Dietary Routes. **Water, Air & Soil Pollution**, p. 231-239, 2020.

ROSNER, A. et al. Stem cells of aquatic invertebrates as an advanced tool for assessing ecotoxicological impacts. **Science of the Total Environment**, v. 771, 144565, 2021.

SCHMELZ, R.M. et al. Diversity of terrestrial Enchytraeidae (Oligochaeta) in Latin America: Current knowledge and future research Potential. **Applied Soil Ecology**, v. 69, p. 13-20, 2013.

SILVA, F.L. MOREIRA, D.C. et al. Hábitos alimentares de larvas de Chironomidae (Insecta: Diptera) do córrego Vargem Limpa, Bauru, SP, Brasil. **Biotemas**, v. 21, 2008.

SMITH, D. P.; KENNEDY, J. H.; DICKSON, K. L. An evaluation of a naidid oligochaete as a toxicity test organism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1459-1465, 1991.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Technical support document for water quality-based toxic control. **USEPA**, 344 p., 1991.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. **USEPA**, 275 p., 2002.

WATTS, M. M.; PASCOE, D. Use of the freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in the assessment of sediment toxicity. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 7-8-8 pt 4, p. 101-107, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00730-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00730-5)>.

ZAGATTO, P.A. BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. RiMa, São Carlos, SP, Brazil, p. 486, 2008.

CAPÍTULO 3

ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DO IMPACTO AMBIENTAL POR EFLUENTES DOMÉSTICOS

ECOTOXICOLOGY AS TOOL FOR ANALYZING ENVIRONMENTAL IMPACTS OF DOMESTIC EFFLUENTS

Fernanda Rodrigues Pinheiro¹

Aline Christine Bernegossi²

Mayara Caroline Felipe³

Gleyson Borges Castro⁴

Tallyson Tavares Cunha de Souza⁵

Caroline Fabiane Granatto⁶

Maria Bernadete Amancio Varesche⁷

Juliano José Corbi⁸

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.3

¹ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-8847-673X>. frpinheiro@usp.br

² Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-8237-6567>. aline.bernegossi@usp.br

³ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-4728-5958>. mayarafelipe@usp.br

⁴ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-5706-904X>. gleysonborges@usp.br

⁵ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-9113-5434>. tallysontavares@usp.br

⁶ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-2206-5716>. carol_granatto@hotmail.com

⁷ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-3124-7471>. varesche@sc.usp.br

⁸ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0249-9370>. julianocorbi@usp.br

Resumo

A avaliação da toxicidade da comunidade aquática a efluentes como o esgoto doméstico é um importante instrumento na compreensão das consequências do seu lançamento nos corpos receptores. Os efluentes produzidos nos centros urbanos dão origem a veiculação de inúmeros patógenos, xenobióticos, poluentes emergentes, fármacos e toda substância utilizada ou metabolizada pelo ser humano, por conseguinte, fonte de contaminação ambiental e, por esse motivo, também foi selecionada como alvo na avaliação da qualidade em ambientes aquáticos continentais. Dessa forma, neste capítulo são apresentados os métodos para a análise ecotoxicológica de efluentes obtidos em diferentes processos de tratamento, metodologia de diluição, legislações, processo de amostragem e métricas coletadas ao longo de diferentes pesquisas relacionadas à temática. Por último, será apresentado um estudo de caso indicando as possíveis inferências e ferramentas na interpretação dos dados e suas implicações na seleção de tecnologias de tratamento ou conformidade com legislações vigentes. Estes estudos fazem parte de uma ampla parceria com estudantes e docentes do grupo do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), da Universidade de São Paulo, São Carlos. Muitos desses estudos em parceria estão inseridos em um projeto Temático da FAPESP (processo número 15/06246-7).

Palavras-chave: Toxicidade de efluentes. Remoção da Toxicidade. Regulamentação.

Abstract

The evaluation of the aquatic community toxicity towards effluents such as domestic sewage is an important tool in understanding the consequences of its release in the water bodies. The effluents produced in urban centers give rise to the transmission of numerous pathogens, xenobiotics, emerging pollutants, drugs and any substance used or metabolized by humans, therefore, a source of environmental contamination and, for this reason, was also selected as a target in quality assessment in continental aquatic environments. Thus, in this chapter are presented the methods for the ecotoxicological analysis of effluents obtained in different treatment processes, dilution methodology, legislation, sampling process and metrics collected over different research related to the theme. Finally, a case study will be presented indicating the possible inferences and tools in the interpretation of the data and their implications in the selection of treatment technologies or compliance with current legislation. These studies are part of a broad partnership with students and professors of the group of the Laboratory of Biological Processes (LPB), of the

University of São Paulo, São Carlos. Many of these studies in partnership are part of a FAPESP Thematic project (process number 15 / 06246-7).

Keywords: Effluent toxicity. Toxicity Removal. Regulation.

3.1 Introdução

Os efluentes domésticos são a fonte mais recorrente de poluição ambiental (MUSHITAQ et al., 2020). No mundo, estima-se que 80% das águas residuárias são devolvidas ao meio ambiente sem nenhum tratamento (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS-ONU, 2020). De acordo com a Agência Nacional das Águas (ANA) de 2017, são gerados diariamente cerca de 9,1 toneladas de esgoto no Brasil, desse montante, 1,7 ton é coletada, mas não tratada, e 2,4 ton são despejados diretamente nos corpos receptores sem serem ao menos coletados (AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS-ANA, 2017). Consequentemente, há necessidade de maior a demanda de investimentos em processos cada vez mais avançados de tratamento para o abastecimento público (SANTANA et al., 2014; GHERNAOUT, 2017; LIU et al, 2017), além da necessidade de programas de saúde direcionados para o atendimento de pacientes acometidos por doenças de veiculação hídrica, bem como a divulgação de como prevenir essas doenças.

A diversidade de compostos que fazem parte da constituição do esgoto, com combinação de compostos derivados de dejetos humanos, infiltração de escoamentos urbanos, resíduos líquidos hospitalares, fármacos, lavagem de oficinas, laboratórios, restaurantes, entre outros compostos orgânicos e inorgânicos fazem dessa efluente fonte de contaminação ambiental. Nesse efluente em função da caracterização analítica foram observadas variadas substâncias como metais, nutrientes, microrganismos, matéria orgânica e inorgânica, assim como materiais radioativos e micropoluentes emergentes provenientes de várias fontes (GOGOI et al. 2018; OUDA et al, 2020). O tratamento visando a remoção dos compostos e a diminuição da toxicidade dos efluentes é ação indispensável para um plano de mitigação dos impactos antrópicos sobre o meio ambiente.

Um importante parâmetro a ser considerado na seleção de tecnologias de tratamento de esgoto é a toxicidade final do efluente. Alguns processos de remoção de matéria orgânica, nutrientes e desinfecção podem exigir a adição de métodos ou substâncias que tornem o efluente ainda mais tóxico (KLAMERTH et al, 2010; RIZZO, 2011; MAGDEBURG et al., 2014), o que não justificaria a escolha de determinada alternativa. Mais que a caracterização físico-química de efluentes, a análise ecotoxicológica dá uma indicação mais próxima dos reais impactos à qualidade da

vida aquática e suas repercuções à saúde humana, uma vez que, a detecção de substâncias e parâmetros isolados pode não indicar o real efeito da combinação desses fatores, ocultando possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos.

Nesse sentido, alguns organismos já estão sendo utilizados ao redor do mundo como bioindicadores de eficiência da remoção de tóxicos em efluentes após tratamento. Workagegn et al. (2013) obtiveram eficiência de 53% na remoção de agentes tóxicos em efluentes da estação de tratamento da indústria têxtil em Hawassa (Etiópia) e observaram a letalidade do peixe *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) em diferentes diluições tanto do afluente como efluente da estação. Os autores também alertaram que apesar da redução da toxicidade, há necessidade de melhorias no tratamento e desaconselharam a aplicação dessa água na irrigação, além de seu uso para fins domésticos.

Gholami-Borujeni et al. (2018) testaram a toxicidade de efluentes de uma estação de tratamento de esgoto doméstico da cidade de Urmia (Irã) e constataram a ausência de toxicidade para o microcrustáceo *Daphnia magna* (Straus, 1820). Luo et al. (2019), por outro lado, utilizaram respostas toxicológicas da microalga *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) para selecionar o procedimento de ozonização como a melhor solução de desinfecção, para a estação de tratamento de esgoto hospitalar na cidade de Pequim (China).

No Brasil, a toxicidade de efluentes se tornou alvo de estudos nas universidades principalmente em atenção às legislações vigentes, tendo como principal foco a avaliação ecotoxicológica de estações de tratamento industriais (MELO, 2012; ALMEIDA, 2013). Na cidade de São Carlos, no Laboratório de Ecologia e Ambientes Aquáticos (LEAA) da Universidade de São Paulo (USP) são realizados estudos sobre a influência dos efluentes de estações de tratamento de esgoto (ISSA, 2019) e de diferentes configurações de reatores do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da mesma instituição (FELIPE, 2019), como ferramenta paralela de avaliação de eficiência e impacto ambiental. Neste capítulo serão discutidas as principais fundamentações teóricas utilizadas nas metodologias experimentais para avaliação da toxicidade de efluentes, experiências coletadas ao longo de alguns anos de aplicação delas e um estudo de caso aplicado utilizando amostras de efluente doméstico.

3.2 Legislações e Metodologias para Toxicidade de Efluentes

3.2.1. Metodologias Internacionais

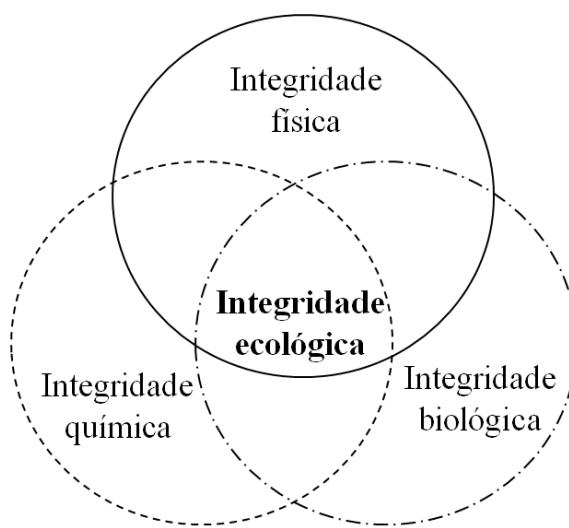
Dependendo do objetivo da avaliação ecotoxicológica dos efluentes, diferentes diretrizes internacionais podem ser aplicadas. Nas normas internacionais estão, no

geral, estabelecidos os limites de toxicidade para a descarga de efluentes nos corpos d'água, com proposições de índices baseados em respostas de letalidade e sub-letalidade dos organismos (LIBRALATO et al, 2010). Para avaliar de forma integral os efluentes, o conceito de Whole Effluent Toxicity (WET) ou avaliação da toxicidade total do efluente é o mais aplicado nas normas internacionais.

O WET foi primeiramente estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) no seu relatório técnico para o controle de tóxicos com base na qualidade da água (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-USEPA, 1991). Essa avaliação consiste em ensaios de toxicidade realizados em amostras de águas residuárias e suas diluições, com o principal objetivo de proteção à vida aquática por meio dos resultados de toxicidade monitorados nessas águas residuárias, sem a necessidade de maiores investigações a respeito da sua constituição. Dentro desse conceito, a amostra de efluente não passa por nenhum processo de modificação, ela é coletada na fonte geradora, devidamente armazenada e levada ao laboratório a fim de serem utilizadas nos ensaios toxicológicos com organismos já padronizados pela própria agência norte-americana.

Também nessa norma foi firmada a importância de testes de toxicidade para garantir a qualidade das águas, incluindo a avaliação biológica da água como elemento fundamental na garantia da chamada integridade ecológica, juntamente com a avaliação de critérios físico-químicos, conforme exemplificado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Relação entre integridade física, química e biológica e a integridade ecológica.



Fonte: Adaptado de USEPA (USEPA, 1991).

Para a determinação da toxicidade total do efluente, algumas considerações são recomendadas para a estrutura dos testes, local, regime de escoamento e coleta. Como visto no Capítulo 2 deste livro, para a montagem dos testes de toxicidade e melhor adequação estatística, são utilizados pelo menos seis tratamentos, no caso do WET aplica-se cinco diluições da amostra de efluente mais o controle, tanto para avaliar a toxicidade aguda quanto para avaliar a toxicidade crônica. Os ensaios podem ser realizados em campo ou em laboratório, ambos têm aceitação e pouca variação entre as respostas, exceto se - for conhecido que a amostra contém substâncias voláteis e se essas são alvo de monitoramento.

Quanto ao regime de escoamento do teste (estático, semi-estático e contínuo) deve-se levar em consideração se o efluente é despejado no corpo receptor de maneira contínua ou intermitente. Para descargas contínuas, tanto o teste estático quanto o semi-estático (com renovação do meio) são apropriados, observando-se um critério de coleta apropriado para a reposição do meio, normalmente uma nova amostra fresca é coletada. Para qualquer alternativa selecionada, fatores como o investimento financeiro, volume de amostra, quantidade de dados necessários para uma representação aceitável e logísticas são levados em consideração na metodologia escolhida.

O regime de coletas é definido de acordo com o objetivo da análise, e amostragens pontuais são recomendadas quando se conhece o pico de descarga do efluente como forma de determinar a toxicidade máxima ou quando se tem pouca variabilidade de composição para o efluente em questão. Utiliza-se o regime de amostragem composta para efluentes com grande variabilidade, em que a coleta é feita continuamente ao longo de um período (24h é sugerido como bom período) e a mistura dessas amostras é utilizada para a realização dos bioensaios. Aspectos econômicos e viabilidade de acesso e logística também são levados em consideração na escolha do tipo de coleta.

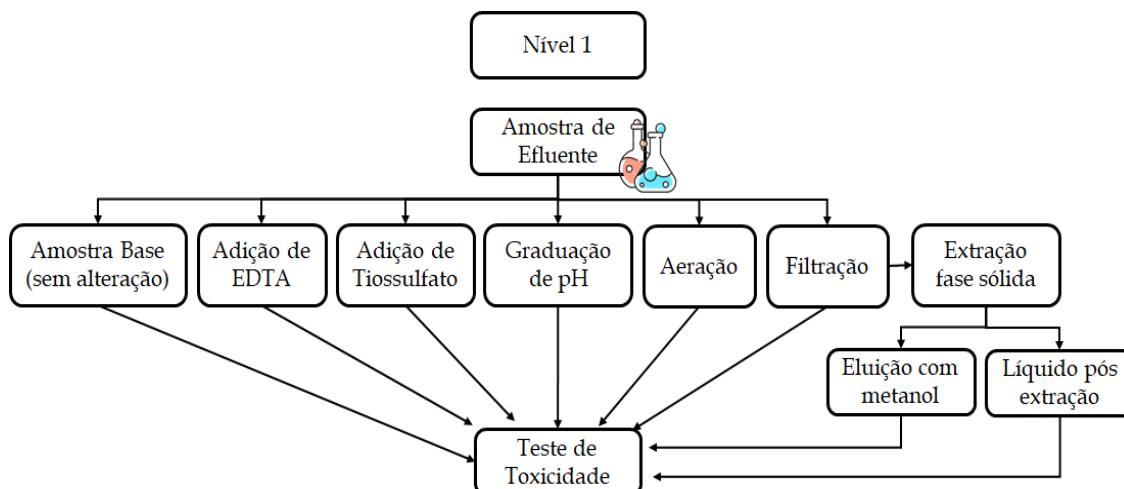
Paralela à metodologia do teste integral de toxicidade, também foi sugerida pela USEPA, uma metodologia que investiga a causa da toxicidade em amostras de efluentes, conhecida como - TIE (Toxicity Identification Evaluation) ou AIT (Avaliação de Identificação da Toxicidade), (MOUNT; ANDERSON-CARNAHAN, 1988). Diferente da avaliação de toxicidade total do efluente, por meio do TIE determina-se quais substâncias ou parâmetros geram a toxicidade do efluente testado. Para essa metodologia a determinação dos elementos constituintes da amostra é etapa indispensável para a conclusão do teste.

O teste de identificação de toxicidade de efluentes é dividido em 3 etapas, Fase I de caracterização, Fase II de identificação e Fase III de confirmação. A primeira está relacionada com a identificação da natureza (química ou física) do agente tóxico que causa efeito nos organismos, através de separação de determinadas propriedades; para tanto, é feito a modificação da amostra com processos de filtração, aeração, adição de álcoois, sais, ácidos e bases. Para cada alteração é montado um teste de toxicidade com no mínimo 4 diluições, em duplicata, feitas em dois dias seguidos com a amostra recém coletada, em testes de toxicidade aguda ou crônica. Devido à alta demanda de tempo e organismos, essa metodologia permite a adaptação no número de diluições, réplicas, duração do teste e número de indivíduos por réplicas.

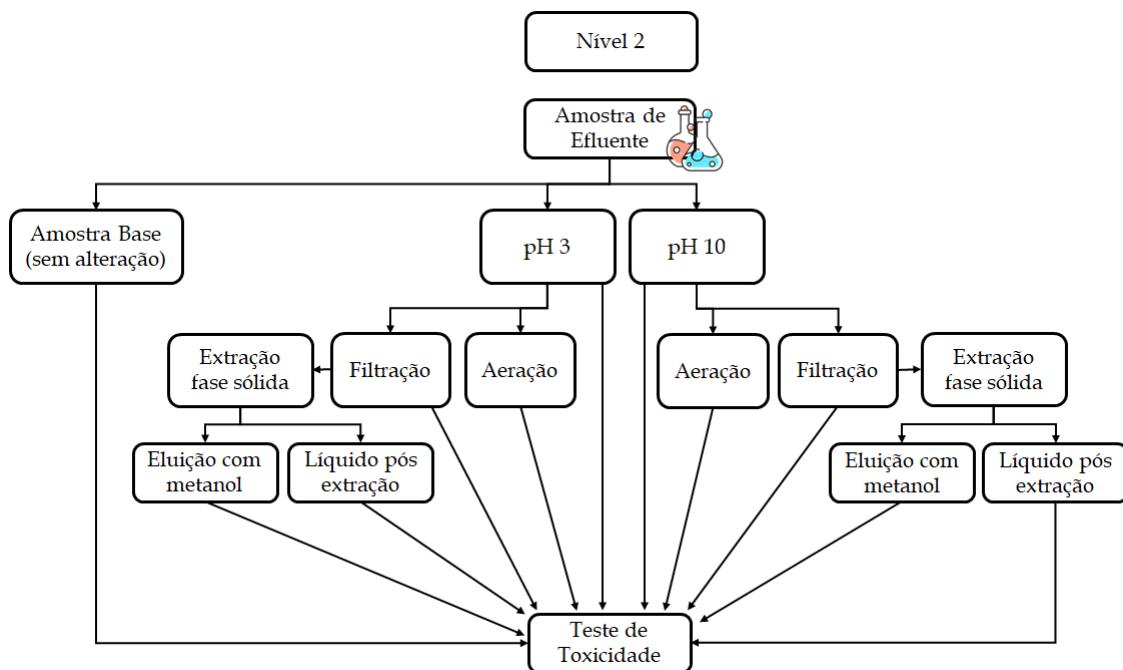
Cada manipulação tem o objetivo de identificar a característica do agente tóxico quanto à sensibilidade, à mudança de pH, filtrabilidade, volatilidade, solubilidade, degradabilidade, redução ou quelação por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As manipulações podem ser feitas em dois níveis subsequentes, caso no primeiro nível não seja obtido informações suficientes, aplica-se o segundo nível, como por exemplo, aeração da amostra, filtração, extração em fase sólida (SPE), quelação com EDTA, oxidação ou redução com tiosulfato de sódio e mudança de pH com a adesão de ácidos e bases. O fluxograma a seguir (Figura 3.2) sintetiza a metodologia da Fase I em seus dois possíveis níveis.

Figura 3.2 - Metodologia de manipulação da amostra de efluente para a identificação da natureza da toxicidade do TIE. a) Nível 1; b) Nível 2.

a)



b)



Fonte: Adaptado de USEPA (NORBERG-KING, 1991).

A partir das informações obtidas sobre a característica dos agentes tóxicos, na Fase II, novas bateladas de testes de manipulações são feitas nessa amostra para identificar quais compostos estão presentes em concentrações tóxicas. Por meio dos resultados obtidos na Fase I pode-se indicar se a toxicidade é causada por compostos orgânicos apolares, amônia, metais, cloro ou sólidos retidos no filtro. No manual da USEPA para a Fase II (DURHAN et al, 1993), uma metodologia é descrita para detalhar e identificar os compostos tóxicos dentro de cada um desses grupos. Parte dessas manipulações são operadas com a separação e concentração de compostos identificados na fase anterior, através de mudanças de pH, adição de álcoois, retirada de amostras dos processos de filtragem e extração em fase sólida. Técnicas de cromatografia são imprescindíveis para a determinação de concentrações.

O intuito da Fase III é realizar a confirmação da toxicidade dos compostos identificados na Fase II, considerando tanto o método de identificação quanto a toxicidade de substâncias isoladas (MOUNT; NORBERG-KING, 1993). Nessa fase, são discutidos os métodos de identificação da fase anterior e métodos que confirmem se todos os agentes tóxicos foram corretamente detectados além das dificuldades na confirmação para compostos de características sinérgicas ou antagônicas. Por meio dos processos de confirmação é possível analisar técnicas básicas de correlação, tipos de respostas encontradas, sensibilidade intraespecífica, aumento da concentra-

ção de determinado composto e balanço de massa. Paralelo a cada processo, são apresentados exemplos de experimentos realizados nessa confirmação dos tóxicos.

Embora o teste de identificação da toxicidade seja uma ferramenta valiosa no controle de poluentes específicos e um recurso útil na administração de estações de tratamento, devido à sua complexidade ela é pouco exigida em legislações nacionais e internacionais. Em pesquisas sobre a eficiência de reatores de tratamento, o TIE auxilia principalmente a investigação sobre a remoção de toxicidade por determinados compostos-alvo do tratamento, ajudando a compreender se a toxicidade da amostra está relacionada a alguma substância específica ou a qualquer outra variável presente no efluente. Para normativas referentes ao despejo de efluentes em corpos d'água, as agências de proteção ambiental recomendam a análise da toxicidade total como indicador suficiente de lançamento de esgoto, como é o caso das legislações nacionais.

3.2.2. Normativas Nacionais

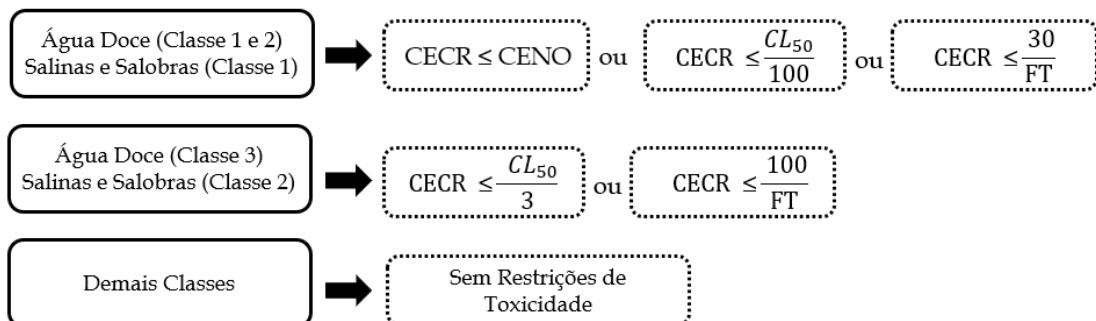
No âmbito da avaliação de qualidade dos despejos de estações de tratamento de esgoto, a investigação da toxicidade de efluentes é um parâmetro exigido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na sua Resolução 430 de 2011. Essa Lei, na Seção sobre Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes (Seção II), artigo 18, define que o efluente não poderá ter ação tóxica a nenhum organismo presente no meio aquático do corpo receptor, sendo de responsabilidade de órgãos ambientais competentes o estabelecimento dos limites de toxicidade (BRASIL, 2011).

O Brasil possui 28 agências ambientais, uma para cada estado, e para cada realidade, respeitando-se as especificidades de vegetação, biodiversidade e condições econômico-sociais, é esperado a adoção de parâmetros próprios para o lançamento de efluentes. No entanto, ao longo dos anos, apenas seis companhias ambientais desenvolveram suas diretrizes ecotoxicológicas, a pioneira no Brasil foi a agência do Estado de São Paulo, seguida da agência de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro (GAZOLA et al., 2020). Dentro do recorte estudado no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), situado no Estado de São Paulo, as diretrizes seguidas também são as publicadas pela companhia estadual local.

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é a autoridade estadual responsável nesse estado por estabelecer critérios adicionais para a avaliação da toxicidade de efluentes, essa, por sua vez, acatou o sugerido pela Resolução

CONAMA nº 430 a respeito da toxicidade permitida para cada classe de águas, conforme indicado na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Cálculo de toxicidade permitida em Corpos Receptores segundo a CONAMA nº 430/2011.



Sendo CECR (Concentração de Efluente no Corpo Receptor) = [(vazão do efluente) / (vazão do efluente + vazão de referência do corpo receptor)] x 100; CENO = Concentração de Efeito Não Observado; CL50 = Concentração Letal a 50% da população e FT = Fator de Toxicidade.

Fonte: Adaptado de CONAMA 430 (BRASIL, 2011).

A Concentração de Efeito Não Observado (CENO) corresponde a menor concentração avaliada no estudo, sem nenhum efeito deletério ao organismo exposto (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). As famílias, classes ou espécies de organismos sugeridos pela CETESB são aqueles de metodologia estabelecida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889), *Daphnia spp.*, *Ceriodaphnia spp.*, *Chlorophyceae* e *Cyprinidae*, que correspondem às NBR 15.411, 12.713, 13.373, 12.648 e 15.088, respectivamente.

Dessa forma, as metodologias aplicadas no LEAA estão dentro da série de manuais intitulada “Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo” (BERTOLETTI, 2008), vinculado à CETESB, e serão apresentadas no tópico seguinte, com detalhamento dos processos e adaptações necessárias às limitações e condições do laboratório.

3.3 Metodologia para Teste de Toxicidade com Amostras de Efluente

3.3.1 Amostragem e Armazenamento

O período para a amostragem do efluente a ser avaliado é uma importante escolha nos estudos de toxicidade de esgoto. No caso de efluente, algumas questões nortearão a melhor amostra a ser coletada, como a finalidade da análise, aspectos logísticos entre outros, que podem ser adaptados segundo as condições de cada laboratório.

O manual de controle ecotoxicológico de efluentes da CETESB segue as mesmas recomendações das normas da USEPA em relação à amostragem. Para melhor representação do efluente sugere-se a amostragem composta, cuja coleta do efluente deve ocorrer em intervalos de tempo específicos em período de 24 horas, de modo que as misturas são utilizadas para a verificação da toxicidade média da amostra. A coleta simples, determinada como uma coleta pontual do efluente é indicada para a determinação de picos de toxicidade durante o dia, para efluentes com tempo de retenção superior a 15 dias ou para efluentes com variação dos efeitos tóxicos já conhecidos.

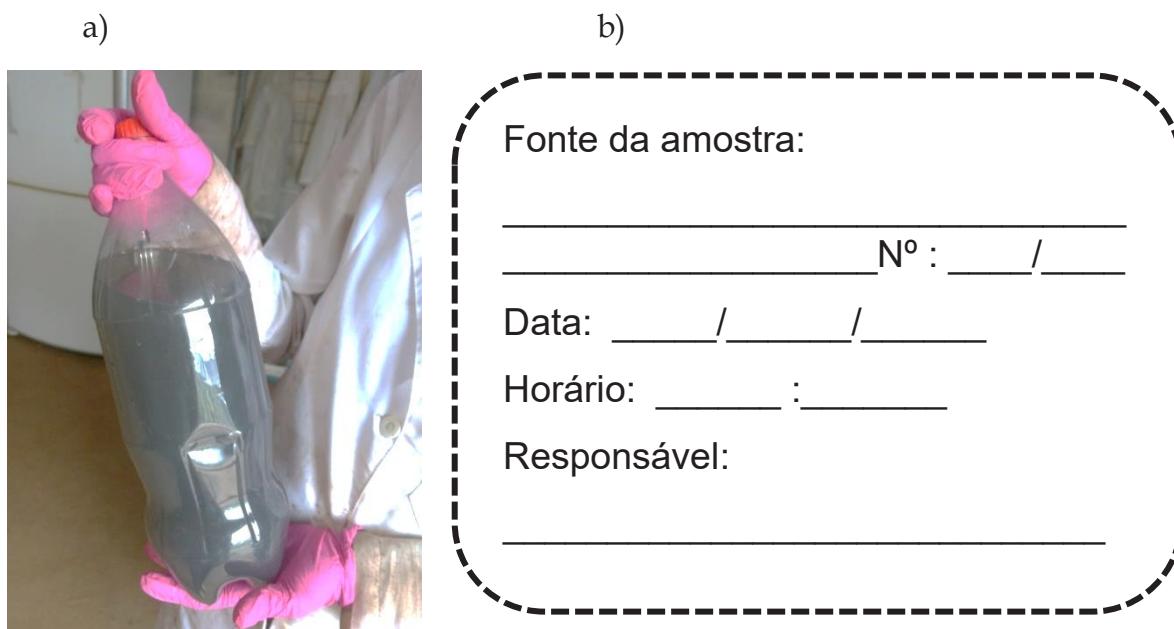
A realidade do LEAA e de muitos outros laboratórios de pesquisa, no entanto, não permite uma coleta composta de efluentes provenientes de reatores de escala de bancada ou piloto, seja pelo volume de efluente necessário e disponibilizado, seja pela limitação de equipamentos. Estabeleceu-se então, que, para a avaliação da eficiência de reatores de tratamento, o período de amostragem suficientemente representativo de determinado efluente seria qualquer período de tempo em que o reator fosse considerado estável em suas propriedades físico-químicas, principalmente no que se refere a demanda biológica de oxigênio (DBO) ou demanda química de oxigênio (DQO), estando esta constante em pelo menos 5 análises seguidas. Ressalta-se que, no caso de avaliação de eficiência de reatores, é possível aplicar essa premissa porque normalmente existe um monitoramento químico regular e um conhecimento sobre a caracterização do efluente, feitos pelos próprios administradores das estações ou por pesquisadores que estão testando novas tecnologias de tratamento.

Quanto ao armazenamento, sugere-se que após a coleta, a amostra seja mantida resfriada por até 12h, ou até 48h em temperatura abaixo de 10°C. Caso haja a necessidade de congelar a amostra, sugere-se manter em refrigerador a temperaturas abaixo de -10°C por período máximo de 60 dias, período recomendado pela ABNT NBR 15469 “Ecotoxicologia aquática-Preservação e Preparo de amostras” (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS-ABNT, 2007). No entanto, essa prática não é recomendada, a menos que já se conheça o efeito do congelamento para o efluente em questão e esse efeito não altere o objetivo da pesquisa. Para efluentes de reator em escala piloto no tratamento de água residuária municipal, em algumas experiências no LEAA foram relatadas interferência do congelamento das amostras sobre a toxicidade.

Os frascos utilizados para o armazenamento podem ser de vidro ou de plástico, sendo mais apropriada a utilização de frascos de vidro, uma vez que alguns compostos têm a propriedade de se ligar ao plástico. Os frascos devem ser preen-

chidos até o topo para evitar a entrada de ar na amostra. No entanto, para o congelamento é importante verificar se o frasco suporta temperaturas baixas, sendo preferível, nestes casos, a utilização de recipientes de plástico, e deixando-se o espaço para a expansão do líquido durante o resfriamento (ver Figura 3.4a). Na Figura 3.4 é mostrado um exemplar dos recipientes usados no LEAA para armazenamento e coleta de efluentes, assim como sugestão de etiqueta de identificação (Figura 3.4b) com informações básicas a serem preenchidas na hora da coleta.

Figura 3.4 - Exemplar de frasco de coleta; a) Volume preenchido com sobra para congelamento; b) Etiqueta de identificação



Fonte: LEAA (2021).

3.3.2 Seleção dos Organismos

Conforme abordado no Capítulo 2, a seleção dos organismos deve ser realizada da maneira que melhor represente a comunidade aquática local. No caso da avaliação da ecotoxicidade de efluentes líquidos, recomenda-se o emprego de pelo menos dois organismos de níveis tróficos diferentes para satisfazer a legislação do estado de São Paulo supracitada, mas de acordo com as especificações do manual da CETESB são suficientes os resultados com testes de toxicidade aguda com *Daphnia Similis* (Claus, 1976) e toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1894). Não obstante, no LEAA, além da característica trófica, é considerado importante entender quais espécies de animais são típicos da região, qual a sua função no corpo hídrico e sua sensibilidade às substâncias de referência.

Dependendo da função do organismo no meio aquático, esse organismo pode ser mais ou menos sensível a determinado contaminante presente na parcela líquida do efluente (CASTILLO et al., 2000; BARAN; TARNAWSKI, 2015). Para organismos filtrantes (p.e. *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii*, etc.), normalmente substâncias voláteis, sólidos suspensos e outros contaminantes em maior concentração na coluna d'água são mais tóxicos e, se presentes na composição do efluente, podem elevar a toxicidade da amostra total (HYNE, 1993; CHERRY et. al, 2005; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019). Já organismos de habitat bentônicos (p.e. *Chironomus spp.*, *Pristina longiseta*, etc.) costumam ser mais sensíveis a substâncias de maior densidade que água e sólidos sedimentáveis, como é o caso de alguns dos metais pesados e do lodo gerado no processo de tratamento (ANTUNES et al., 2007; SIZMUR et al., 2019; STEYN, 2019). No entanto, embora exista uma tendência de diferença de toxicidade para determinados compostos, mesmo se conhecida a composição química do efluente, recomendamos a aplicação de testes de toxicidade com no mínimo dois organismos de “funções” ecológicas diferentes, uma vez que a reação possibilitada pela mistura de substâncias pode causar efeitos imprevisíveis em diferentes animais.

No manual da CETESB é recomendado a utilização de organismos com metodologias já estabelecidas nacionalmente pela ABNT, conforme já mencionado em tópicos anteriores. Por exemplo, para águas doces, são indicadas espécies de cladóceros, algas, peixes e bactérias. Além disso, em função de experiência do LEAA são sugeridas a inclusão de espécies bentônicas, com a finalidade de melhor compor análises ecotoxicológicas em espécies que habitam diferentes compartimentos.

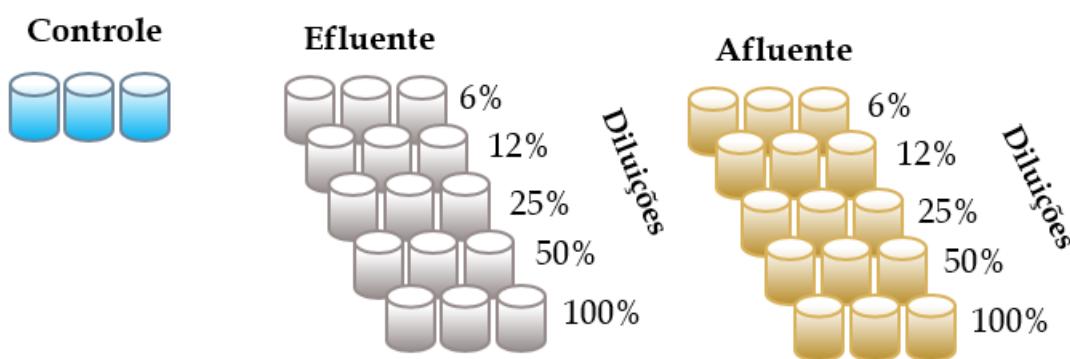
3.3.3 Materiais e Métodos

Os testes ecotoxicológicos com efluentes devem seguir as premissas já apontadas no Capítulo 2 referentes ao número de diluições, tempo de exposição, água de controle, variáveis a serem medidas antes e depois do teste, e todas as configurações de teste de acordo com o organismo escolhido, ou seguindo uma padronização consolidada em meio científico. Os testes apresentados no capítulo 2 são referentes a organismos cultivados pelo LEAA, próprios de ambientes de águas doces continentais, e a adequação de volume de amostra, tempo de exposição, fotoperíodo, deve ser feita para cada espécie seguindo a sua especificação.

As escolhas por testes de regime semi-estático ou de fluxo contínuo devem ser feitas respeitando a finalidade do teste, como já mencionado nos tópicos anteriores. Para as espécies criadas no LEAA, padronizadas com testes estáticos, uma aplicação única da amostra (sem renovação do meio) é utilizada para a determinação

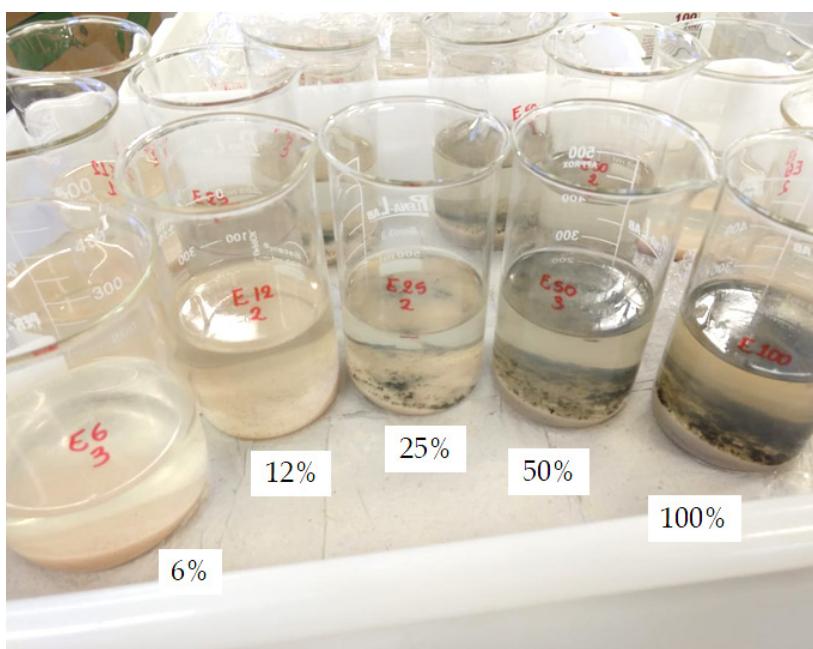
da toxicidade aguda. Para essa determinação, as diluições são efetuadas seguindo sugestão inserida em figura no Manual da CETESB (BERTOLETTI, 2008) (Figura 3.5), que também é seguida em trabalhos internacionais, nas porcentagens de 100% (amostra bruta), 50%, 25%, 12% e 6%, correspondentes a quantidade de efluente por tratamento diluídas em água controlada. Sugere-se, preferencialmente, a utilização de recipientes de vidro na acomodação de cada diluição, para evitar a adsorção de compostos nos frascos, conforme a Figura 3.6.

Figura 3.5 - Representação esquemática do Teste de Toxicidade com efluentes.



Fonte: LEAA (2021).

Figura 3.6 - Exemplo de frasco-teste e diluições reais de testes com efluentes.



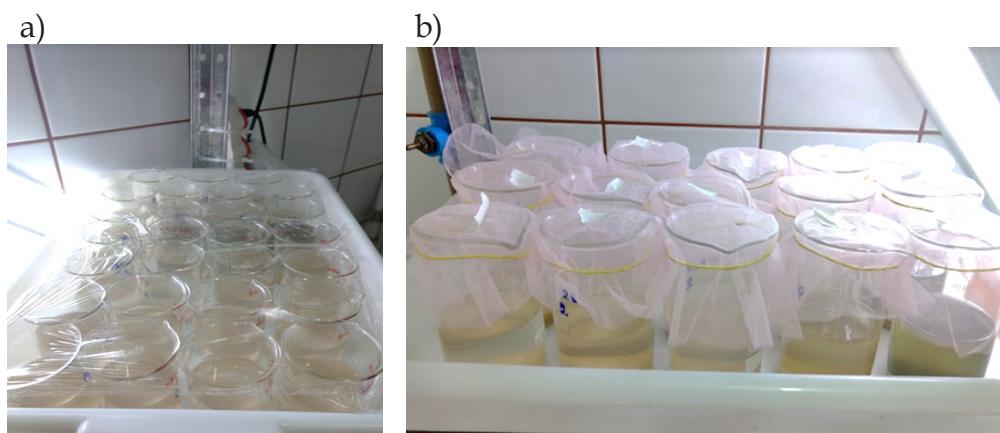
Fonte: LEAA (2021).

Testes de longa duração, para avaliação da toxicidade crônica do efluente, são recomendados em função de maior similaridade com a realidade do corpo receptor quando realizados no regime semi-estático ou de fluxo contínuo. Organismos

como o *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii* já preveem em sua padronização a renovação do meio em intervalos determinados, nestes casos, a coleta de uma nova amostra deve ser feita para cada renovação. Conforme citado anteriormente a mesma amostra poderá ser utilizada em 48h se respeitado o procedimento de armazenagem, a menos que a toxicidade da amostra já seja conhecida e suas propriedades não causam alteração significativa quando submetidas ao congelamento. Para estes testes segue-se o padrão de 5 diluições, que são determinadas de acordo com o CENO ou o CEO demonstrados em testes de toxicidade aguda preliminares.

Para a montagem do teste é necessário a utilização de balões volumétricos com capacidade suficiente para cobrir todos os volumes das réplicas desejadas para cada diluição/tratamento no intuito de mitigar as possibilidades de erro. No LEAA, as espécies bentônicas são cultivadas com a mesma água, portanto, as diluições são as mesmas, divididas apenas em recipientes diferentes, o que contribui na comparação final dos resultados uma vez que se sabe que as espécies estão submetidas no mesmo cenário (Figura 3.7). Outros utensílios de laboratório, tais como pipetadores, provetas ou qualquer outro acessório utilizado para montar o teste devem ser utilizados da mesma forma para todas as soluções, ou seja, se a alternativa de medição utilizada para a montagem de determinada diluição foi a proveta, essa mesma ferramenta deve ser utilizada para todas as outras diluições, salvo impossibilidades de medição. A amostra deve ser homogeneizada cada vez que ela for retirada do frasco coletor, através de agitação manual.

Figura 3.7 - Exemplo de Teste de Toxicidade com organismos bentônicos; a) Teste de toxicidade com oligoquetas aquáticas; b) Teste de toxicidade com o inseto *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: LEAA (2021).

Outra consideração importante a ser feita diz respeito à realização de testes com o afluente e o efluente de determinada amostra, quando o objetivo é analisar a eficiência do tratamento. A verificação da toxicidade inicial da amostra (anterior ao

tratamento) é imprescindível para a discussão da eficiência em remover toxicidade de diferentes configurações de um mesmo reator, pois somente a comparação entre efluentes pode levar a uma conclusão equivocada sobre a eficiência. Nestes casos, coleta-se tanto afluente quanto efluente do mesmo período, seguindo-se a mesma metodologia para ambos. Os testes com afluentes e efluentes devem ser realizados preferencialmente em conjunto (ao mesmo tempo), evitando-se assim qualquer modificação química da amostra e sua toxicidade seja alterada. As tréplicas (discutido no Capítulo 2), são suficientes na verificação da toxicidade dos efluentes, uma vez que o volume de testes, contando com afluentes, cinco diluições e mais de uma espécie de animal, muitas vezes impossibilitam a realização de mais exemplares, cabendo a cada contexto as adaptações necessárias.

3.4 Respostas e Inferências

No significado do termo “Concentração Efetiva” (CEx), abordado no capítulo 2, é possível incluir a diluição efetiva de esgoto que causa efeito em determinada porcentagem da população submetida a teste. Por meio desta padronização tem-se uma comparação entre amostras de afluentes e efluentes, sem a necessidade de inserção de novas nomenclaturas, consolidando a toxicidade de efluentes como vertente da ecotoxicologia clássica. Dessa forma, ao utilizar a expressão CEx refere-se a porcentagem de efluente no meio do teste que causa um efeito de interesse (mortalidade, imobilidade, entre outras respostas) a “x” por cento da população exposta. Da mesma forma pode-se aplicar os conceitos de CENO, CEO e outros termos já mencionados em outros capítulos. O CEx é calculado da mesma forma descrita no Capítulo 2.

As concentrações de efeitos são importantes principalmente na adequação da toxicidade aos requisitos pedidos pelas leis. A partir dos valores obtidos nos ensaios ecotoxicológicos pode-se verificar se a Diluição do Efluente no Corpo Receptor (D.E.R) é adequada para o seu lançamento em determinado meio aquático, conforme as fórmulas descritas a seguir (Equação 3.1).

Equação 3.1 - Fórmulas para cálculo de diluição do efluente no corpo receptor; a) fórmula para o cálculo da diluição de efluente no corpo receptor; b) parâmetros de comparação com os resultados dos ensaios de toxicidade segundo Resolução SMA-03/2000.

$$a) D.E.R. = \frac{V.M.E}{V.M.E + V.M.C.R \text{ (em } Q_{7,10})} \times 100$$

$$D.E.R. (\text{em \%}) \leq \frac{CE(I)_{50;48h} \text{ ou } CL(I)_{50;96h}}{100}$$

b)

$$\text{ou} \quad D.E.R. (\text{em \%}) \leq \frac{CENO(I); 7 \text{ dias}}{10}$$

Sendo, V.M.E = Vazão média do efluente; V.M.C.R = Vazão mínima do corpo receptor; D.E.R = (Diluição de Efluente no Corpo Receptor); CENO(I);7 dias = Concentração de Efeito Não Observado em sete dias de exposição (para *Ceriodaphnia dubia*); CL(I)50,96h = Concentração Letal (ou de Imobilidade) a 50% da população de *Danio rerio* ou *Pimephales promelas* em 96h, CE(I)50,48h = Concentração Efeito Agudo (Imobilidade) a 50% da população de *Daphnia dubia* em 48h

Fonte: Adaptado de Manual CETESB (BERTOLETTI, 2008)

Ensaios ecotoxicológicos em efluentes também são ferramentas auxiliares na avaliação de eficiência de tratamento em estações, reatores de bancadas, reatores em escala piloto, entre outros. Como já mencionado, somente o conhecimento das características físico-químicas pode não ser suficiente para indicar o potencial dano ao meio ambiente de descargas de esgoto. Por outro lado, o entendimento das respostas de organismos vivos pode-se auxiliar na avaliação integral dos riscos. Normalmente, a composição do esgoto de diversas fontes é bastante variável, podendo causar alterações nos efeitos tóxicos à espécie estudada. Por esse motivo, uma correta análise da eficiência de tratamento leva em consideração a toxicidade inicial e final da amostra, denominado de toxicidade do afluente e efluente ao tratamento. A eficiência de determinada configuração reacional de tratamento está atrelada a diminuição da toxicidade em cada etapa e não a valores brutos de toxicidade.

No LEAA o cálculo dessa “remoção de toxicidade” (RT) é dado pela diferença simples entre toxicidade do afluente e do efluente conforme a Equação 3.2. Resalta-se que, para fins de conformidade com os padrões exigidos nas legislações, somente a redução da toxicidade não justifica o lançamento em corpos receptores. As informações sobre a toxicidade do efluente são as únicas respostas que definem se o corpo receptor poderá receber o esgoto, porém a RT pode indicar quais possibilidades de tratamentos são mais eficazes na remoção da toxicidade. O estudo de caso apresentado no próximo tópico traz aplicações desses conceitos.

Equação 3.2 - Fórmula para cálculo de remoção de toxicidade

$$RT = CEaflu - CEeflu$$

Sendo RT = Remoção da Toxicidade; CEaflu = a concentração de efeito obtida no teste de toxicidade com afluente; CEeflu = a concentração de efeito obtida no teste de toxicidade com efluente.

Fonte: LEAA (2021).

Por último, com os dados de concentração efetiva, sensibilidade de diferentes espécies e variáveis físico-químicos pode-se inferir sobre a origem da toxicidade daquela amostra e auxiliar na melhor tomada de decisão em relação ao tratamento. Por exemplo, quando se obtém para os organismos bentônicos maior toxicidade em relação aos organismos da coluna d'água, pode-se sugerir que a toxicidade esteja mais atrelada aos sólidos sedimentáveis, o que indica a necessidade de mais uma etapa de decantação no tratamento, caso contrário, maior tempo de detenção hidráulica ou aeração é suficiente para reduzir a toxicidade da coluna d'água do efluente. As informações sobre o oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica em si também ajudam na interpretação dos dados de toxicidade, que podem ser confirmados caso haja uma tentativa de correção desses valores, uma vez que os organismos têm uma tolerância máxima de sobrevivência em condições em que esses valores são muito elevados ou muito reduzidos.

Embora seja possível indicar a origem da toxicidade através dessas análises, ressalta-se que somente o TIE é indicado para confirmar o composto causador de toxicidade, o que também é sugerido pelo manual de controle ecotoxicológico de efluentes líquidos do estado de São Paulo (BERTOLETTI, 2008).

3.5 Estudo de Caso: Influência do Tempo de Detenção Hidráulica na Toxicidade do Efluente Doméstico em Reator Escala Piloto

3.5.1 Contextualização

Esse estudo de caso é composto pelas avaliações ecotoxicológicas realizadas em paralelo às avaliações físico-químicas de um reator anaeróbio em escala piloto, uma parceria entre o LEAA e o LPB. Os efluentes foram obtidos na Estação de Tratamento de Águas Residuais, sendo o esgoto bruto (afluente) representativo do esgoto municipal após tratamento preliminar e o efluente proveniente de um reator anaeróbio de leito granular expandido em escala piloto, com a injeção de fármacos e de surfactante. O reator foi operado pela doutoranda Caroline Granatto sob orientação da Prof^a. Maria Bernadete Varesche, e todas as análises das variáveis física-químicas, bem como as concentrações de fármacos Diclofenaco, Ibuprofeno e Propranolol, bactericida Triclosan e o surfactante alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), também foram realizadas pela doutoranda e os resultados compartilhados conosco para correlacionar com as respostas ecotoxicológicas. A concentração de matéria orgânica, diclofenaco, triclosan, propranolol, ibuprofeno e surfactante LAS foi medida em duas fases (FI - tempo de detenção hidráulica - TDH de 36 h e FII - TDH de 20 h).

3.5.2 Metodologia

Os bioensaios de toxicidade aguda foram aplicados com *Allonais inaequalis* e *Daphnia magna* (organismo exótico também cultivado no LEAA e normatizado pela ABNT NBR 12713 (2016)) conforme indicações da Tabela 3.1. Para *A. inaequalis* foram aplicadas as diluições de 1, 25, 50 e 100% em ambas as fases, enquanto para *D. magna* as diluições foram aplicadas no FII, pois para este organismo o FI era exploratório e foi realizado com amostras brutas. É interessante ressaltar que as diluições sugeridas pela legislação brasileira, bem como, a sequência de análises não foi seguida por se tratar de um estudo exploratório, no qual o objetivo era entender um pouco sobre como o tempo de detenção hidráulica pode interferir na redução da toxicidade.

Tabela 3.1 - Parâmetros utilizados para realização dos testes de toxicidade aguda com as espécies *Allonais inaequalis* e *Daphnia magna* nas fases I e II de operação do reator.

	<i>A. inaequalis</i>	<i>D. magna</i>
Solução-teste - FI	Afluente do EGSB, efluente do EGSB e diluições (50%, 25% e 1%)	Afluente do EGSB, efluente do EGSB
Solução-teste - FII	Afluente do EGSB, efluente do EGSB e diluições (50%, 25% e 1%)	Afluente do EGSB, efluente do EGSB e diluições (50%, 25% e 1%)
Nº de organismos	6	10 neonatos (menos de 24h de vida)
Tempo de exposição (h)	96	48
Temperatura (°C)	25 ± 2	20 ± 2
Fotoperíodo	12 h luz: 12 h escuro	16 h luz: 12 h escuro
Resposta	Mortalidade	Imobilidade
Referência	Corbi et al., 2015	OECD, 2004

Fonte: Elaboração nossa (2021).

A concentração efetiva para efeito em 10 e 50% dos organismos (CE50 e CE10) foi calculada usando os pacotes MASS e DRC no software R versão 3.5 (R CORE TEAM, 2014). O Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo post-hoc de Dunn foi aplicado para verificar resposta diferente para alguma diluição em relação ao tratamento

controle (apenas água reconstituída) e se as duas fases foram diferentes entre si. Todas as análises foram calculadas via software Past® (Paleontological Statistics) versão 3.21 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

3.5.3 Resultados e Discussão

Eficiência do Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (EGSB)

A eficiência de remoção matéria orgânica do reator anaeróbio de leito granular expandido foi de 90% na Fase I (473 ± 179 mg/L para 41 ± 25 mg/L) e 88% na Fase II (716 ± 231 mg/L para 75 ± 21 mg/L); 37% (106 ± 32 - 98 ± 76 µg/L) de diclofenaco na FI e de 35% (462 ± 294 µg/L para 112 ± 67 µg/L), 43% (166 ± 55 µg/L para 98 ± 76 µg/L) na FI de ibuprofeno e 44% (462 ± 213 µg/L para 164 ± 117 µg/L) na FII; 46% (201 ± 113 µg/L para 55 ± 50 µg/L) de propranolol na FI e 51% (250 ± 141 µg/L para 134 ± 73 µg/L) na FII; 72% (127 ± 120 µg/L para 22 ± 16 µg/L) de triclosan na FI e 51% (135 ± 119 µg/L para 131 ± 72 µg/L) na FII e; 63% (13 ± 2 mg/L para 4 ± 2 mg/L) na FI e 65% (15 ± 2 mg/L para 6 ± 3 mg/L) na FII para o surfactante LAS. De acordo com as análises quantitativas, as concentrações de fármacos no esgoto na FII estavam superiores à da FI, porém, a remoção de matéria orgânica foi de 80% conforme requerida pela CONAMA 430 para descarga em corpo hídrico. Maiores informações sobre outros resultados do reator, consultar a tese de Granatto (2021).

Bioensaios

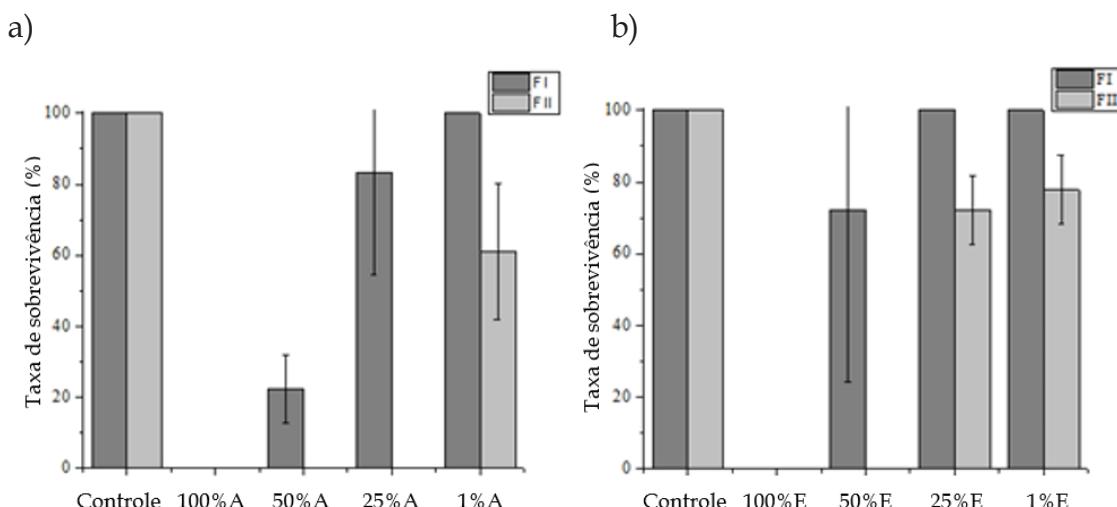
Nos bioensaios verificou-se para ambos os organismos maior sobrevivência na FI (TDH de 36 h), sendo que para *A. inaequalis* (Figura 3.8 a,b) na FI contendo 50% de efluente obteve-se sobrevivência acima de 60%. Na FII foram observadas sobrevivências nas soluções-teste contendo 25% e 1% para efluente do reator EGSB. De forma geral, o afluente do EGSB da FI também foi menos tóxico ao *A. inaequalis*, cuja sobrevivência observada foi de 80% e 100% para as soluções-teste contendo 25% e 1% do afluente, respectivamente, enquanto para a FII foi observada sobrevivência na solução composta por 1% do afluente.

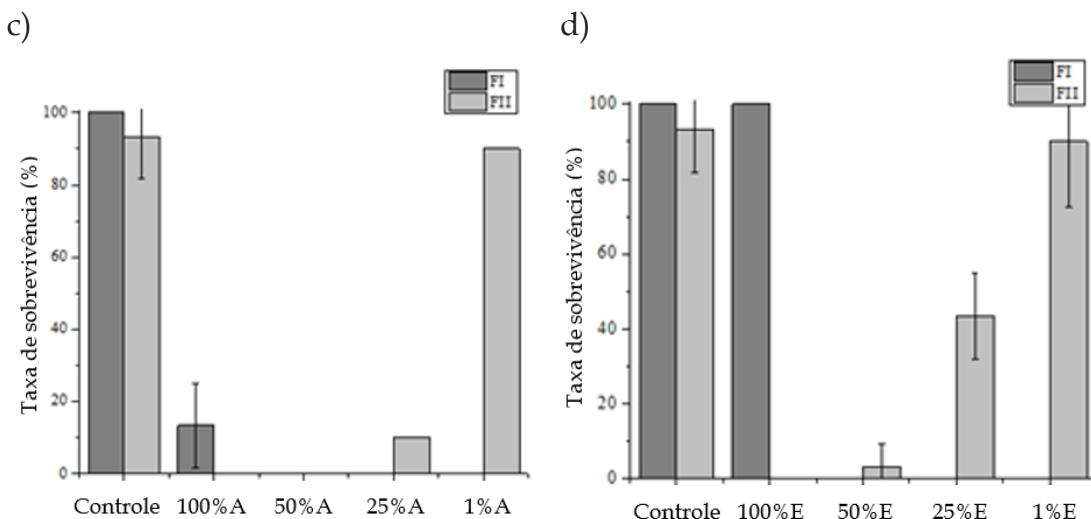
A taxa de sobrevivência de *D. magna* quando exposta ao afluente do EGSB foi abaixo de 20% para a FI e 0% para a FII (Figura 3.8 c,d). A sobrevivência do organismo foi de 100% para o efluente do EGSB (FI), enquanto para a FII (TDH de 20 h) não foi observada sobrevivência. A sobrevivência desse organismo foi de 50% com solução-teste contendo 25% de efluente do EGSB e 90% para solução-teste contendo 1% de efluente.

De maneira geral, a remoção dos compostos orgânicos por meio da aplicação do EGSB foi favorável para diminuir a toxicidade dos compostos no efluente a ser descartado no corpo hídrico, aumentando a taxa de sobrevivência dos organismos após o tratamento. O conhecimento da toxicidade relativa a cada diluição das amostras se faz necessária uma vez que as normas ambientais indicadas pela CETESB consideram a concentração dos compostos no efluente a ser lançado no corpo receptor (CECR), pode variar dependendo de sua vazão e da concentração de compostos orgânicos e também da classe do corpo receptor para o qual esse efluente é destinado.

A CETESB, por meio das suas diretrizes já citadas em tópicos anteriores do presente capítulo (BERTOLETTI, 2008), estabeleceu critérios de aceitabilidade para toxicidade de efluentes de acordo com o sugerido pelo CONAMA 430 (BRASIL, 2011). Em vista dos resultados obtidos no teste de toxicidade, o efluente do EGSB da fase I poderia ser descartado *in natura* em corpos receptores de água doce classe 3 com vazão apenas três vezes maior que a vazão do efluente do reator (efeito de toxicidade aguda não observado a partir da composição de 25% do efluente tratado para os dois organismos).

Figura 3.8 - Taxas de sobrevivência de *Allonais inaequalis* (a, b) e *Daphnia magna* (c, d) em esgoto (afluente do EGSB) e efluente do EGSB em bioensaios agudos.





(*) não foram realizados teste para essa diluição na FI.
 Sendo: A= Afluente do EGSB (esgoto); E = Efluente do EGGSB; FI= Fase 1; FII = Fase 2
 Fonte: Elaboração nossa (2021).

Por meio dos resultados da fase II, pode-se inferir que no mesmo corpo receptor, ainda que com vazão noventa vezes superior à do efluente lançado, não seria possível receber esse efluente do EGSB *in natura* (efeito de toxicidade aguda observado mesmo na composição com 1% do efluente tratado para os dois organismos). Vale ressaltar que para a verificação do lançamento em corpos receptores de água doce de classe 1 e 2 somente testes crônicos determinam a toxicidade aceitável.

Remoção da Toxicidade

Em relação à toxicidade aquática, foi observada redução na toxicidade do esgoto após o tratamento. Para a Oligochaeta *A. inaequalis*, a porcentagem de efluente na amostra referente à CE50 aumentou de 37% (afluente do EGSB) para 70% (efluente do EGSB) na FI, enquanto na FII, a CE50 variou de 1,23% no afluente do EGSB para 27,61% no efluente do EGSB (Tabela 3.2). Em relação a concentração de efeito para o crustáceo *D. magna* também foi observada diminuição da toxicidade, com CE50 de 1,52% para o afluente do EGSB e 23,56% para o efluente do EGSB na FII, e mesmo sem a obtenção de dados para o cálculo da CE50 na FI observou-se a diminuição da toxicidade aguda de 80% na amostra de afluente do EGSB para 0% no efluente do EGSB.

Tabela 3.2 - Concentração de efeito em 10 e 50% dos organismos para o afluente e efluente do EGSB das fases I e II de operação do reator.

Esgoto sanitário (Afluente do EGSB)	Fase I		Fase II	
	CE10	CE50	CE10	CE50
<i>Daphnia magna</i>	-	-	0,16%	1,52%
<i>Allonais inaequalis</i>	21,75%	37,01%	0,45%	1,23%
Efluente do EGSB	Fase I		Fase II	
	CE10	CE50	CE10	CE50
<i>Daphnia magna</i>	-	-	14,20%	23,56%
<i>Allonais inaequalis</i>	62,32%	70,77%	22,09%	27,61%

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Por meio da comparação resultante do teste de Kruskal-Wallis verificou-se diferença significativa entre esgoto sanitário (afluente do EGSB) e controle e melhor igualdade para efluente do EGSB e controle (Tabela 3.4). Por meio do teste a posteriori de Dunn verificou-se quais diluições tiveram diferença significativa em relação ao controle, como ilustrado na Tabela 3.4 a seguir.

Tabela 3.4 – Comparação entre as diluições do esgoto sanitário (afluente do EGSB) e efluente do EGSB (Fase I e II) e o controle, sendo considerado diferente significativamente do controle quando o p-valor encontrado no teste de Dunn foi < 0,05

Esgoto Sanitário	Fase I		Fase II	
	Similar ao controle	Diferente do controle	Similar ao controle	Diferente do controle
<i>Daphnia magna</i>	-	100%	1%	100%, 50% e 25%
<i>Allonais inaequalis</i>	50%, 25% e 1%	100%	1%	100%, 50% e 25%
Efluente do EGSB	Fase I		Fase II	
	Similar ao controle	Diferente do controle	Similar ao controle	Diferente do controle
<i>Daphnia magna</i>	100%	-	25% e 1%	100% e 50%
<i>Allonais inaequalis</i>	50%, 25% e 1%	100%	25% e 1%	100% e 50%

Fonte: Elaboração própria (2021).

A maior toxicidade tanto para o esgoto sanitário quanto para o efluente do EGSB da FII foi confirmada por meio da aplicação dos testes estatísticos. Para ambas as fases foram observadas as mesmas diferenças estatísticas entre controle e diluições, com aparente não alteração da toxicidade na Fase I para resultados obtidos com o organismo *A. inaequalis* (Tabela 4). Quando comparado os efluentes do EGSB com suas respectivas diluições com as diluições do afluente do EGSB, existe semelhança significativa nas taxas de sobrevivências dos organismos, excetuando-se os resultados das amostras brutas da FI para a *D. magna* ($p = 0,016$) e da diluição 25% da FII ($p = 0,038$) com o *A. inaequalis*.

Para o reator anaeróbio de leito granular expandido operado na ETE São Carlos, o tempo de detenção hidráulico de 36 h proporcionou maior taxa de sobrevivência dos organismos. Além disso, a aplicação dos bioensaios foram efetivos na comparação de parâmetros operacionais para viabilizar tratamentos mais eficientes, possibilitando minimizar os impactos de efluentes para o ecossistema aquático.

3.6 Considerações Finais

Espera-se que ao final deste capítulo seja mais fácil entender onde buscar as legislações vigentes para o lançamento de efluentes domésticos e industriais em corpos hídricos, bem como a importância de estudos ecotoxicológicos desses efluentes, para garantir a minimização do impacto à biota. Apesar de ter sido apresentado um estudo de caso com amostras de águas residuárias domésticas reais, ressalta-se que é possível utilizar amostras de esgoto sintético em estudos dedicados às novas tecnologias de tratamento voltadas para uma ou mais substâncias de interesse. O esgoto sintético é formulado em laboratório para simular às condições reais do esgoto sanitário em relação às variáveis como matéria orgânica, além de garantir a observação de substâncias de interesse em uma matriz complexa. Nesse sentido, os bioensaios de toxicidade podem auxiliar os pesquisadores que estão operando os reatores para determinação da melhor configuração de tratamento, para garantir além da conformidade com o padrão de tratamento exigido para lançamento em corpos hídricos, a maior minimização da toxicidade para a biota aquática.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA). Situação da Coleta e do tratamento de esgotos. **Atlas Esgotos**, 2021. Disponível em: <<http://atlasesgotos.ana.gov.br/>>. Acesso em 03 de Maio de 2021.
- ALMEIDA, I. S. **Avaliação de toxicidade aguda de efluentes industriais utilizando organismos de três níveis tróficos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 142 p.
- ANTUNES, S. C. et al. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. **Science of the Total Environment**, v. 374, n. 2-3, p. 252-259, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). ABNT NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15469: **Ecotoxicologia aquática-Preservação e Preparo de amostras**. Rio de Janeiro: ABNT, 2007.
- BARAN, Agnieszka; TARNAWSKI, Marek. Assessment of heavy metals mobility and toxicity in contaminated sediments by sequential extraction and a battery of bioassays. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 6, p. 1279-1293, 2015.
- BERTOLETTI, Eduardo. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. **Série Manuais. São Paulo: CETESB**, 2008.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, n. 92, 2011.

CASTILLO, Gabriela C.; VILA, Irma C.; NEILD, Ella. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 15, n. 5, p. 370-375, 2000.

CHERRY, Donald S. et al. Potential effects of Asian clam (*Corbicula fluminea*) die-offs on native freshwater mussels (Unionidae) I: water-column ammonia levels and ammonia toxicity. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24, n. 2, p. 369-380, 2005.

CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta : Naididae) as a toxicity test organism. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 7-11, 2015.

DAUD, M. K. et al. Drinking water quality status and contamination in Pakistan. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

DURHAN, E. J.; NORBERG-KING, T. J.; BURKHARD, Lawrence Paul. **Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity**. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, 1993.

FELIPE, Mayara Caroline. **Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil. 215p.

GAZOLA, Letícia et al. **Análise das legislações estaduais brasileiras sob ensaios ecotoxicológicos como ferramenta no controle de lançamento de efluentes industriais**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil. 76p.

GHERNAOUT, Djamel. Water Reuse (WR): The Ultimate and Vital Solution for Water Supply Issues. **International Journal of Sustainable Development Research**, v. 3, n. 4, p. 36, 2017.

GHOLAMI-BORUJENI, Fathollah; NEJATZADEH-BARANDOZI, Fatemeh; AGHDASI, Hamed. Data on effluent toxicity and physicochemical parameters of municipal wastewater treatment plant using *daphnia magna*. **Data in brief**, v. 19, p. 1837-1843, 2018.

GOGOI, Anindita et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: a review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 169-180, 2018.

GRANATTO, C. F. **Remoção e degradação de fármacos e produtos de higiene em esgoto sanitário em reatores anaeróbios: estratégias de uso de cossubstratos e ca-**

racterização taxonômica dos microrganismos. 2021. 229 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

GROSS, Mark A. **Wastewater Characterization. University curriculum development for decentralized wastewater management**, 2005.

HAMMER; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HARTMANN, Cintia Cristina. **Avaliação de um efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas.** 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 101p.

HENZE, Mogens; COMEAU, Yves. **Wastewater characterization. Biological wastewater treatment: Principles modelling and design**, p. 33-52, 2008.

HYNE, R. V. et al. Increased fecundity of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* on a diet supplemented with a green alga, and its use in uranium toxicity tests. **Marine and Freshwater Research**, v. 44, n. 3, p. 389-399, 1993.

ISSA, Carina Graminha. **Testes ecotoxicológicos para avaliação do potencial impacto ambiental em corpos receptores por efluente de Estação de Tratamento de Esgoto.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. 69p.

KLAMERTH, Nikolaus et al. Degradation of fifteen emerging contaminants at $\mu\text{g L}^{-1}$ initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. **Water research**, v. 44, n. 2, p. 545-554, 2010.

LIBRALATO, Giovanni; ANNAMARIA, Volpi Ghirardini; FRANCESCO, Avezzù. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 7, p. 1602-1611, 2010.

LIU, Gang et al. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. **Water research**, v. 116, p. 135-148, 2017.

LUO, Yuchen et al. Disinfection by-products formation and acute toxicity variation of hospital wastewater under different disinfection processes. **Separation and Purification Technology**, p. 116405, 2019.

MAGDEBURG, Axel et al. Evaluating the efficiency of advanced wastewater treatment: target analysis of organic contaminants and (geno-) toxicity assessment tell a different story. **Water Research**, v. 50, p. 35-47, 2014.

MELO, E. D. **Avaliação e identificação da toxicidade de efluentes líquidos de uma indústria de cosméticos.** 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 115p.

MOUNT, Donald I.; NORBERG-KING, Teresa J. **Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase 3 toxicity confirmation. Procedures for samples ex-**

hibiting acute and chronic toxicity. Final technical report. ASci Corp., Duluth, MN (United States), 1993.

MOUNT, Donald Irvin; ANDERSON-CARNAHAN, Linda. **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I: Toxicity Characterization Procedures**. US Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, National Effluent Toxicity Assessment Center, 1988.

MUSHTAQ, Nighat et al. Freshwater contamination: sources and hazards to aquatic biota. In: **Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation**. Springer, Singapore, 2020. p. 27-50.

NORBERG-KING, T. J. **Toxicity identification evaluation: Characterization of chronically toxic effluents: Phase I**. Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 1991.

ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test**. OECD Publishing, 2004.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Banco Mundial: esgoto tratado beneficia a saúde, o meio ambiente e a economia. **ONU News**, 2020. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2020/03/1707982>>. Acesso em 03 de Maio de 2021.

OUDA, Mariam et al. Emerging contaminants in the water bodies of the Middle East and North Africa (MENA): A critical review. **Science of The Environment**, p. 142177, 2020.

R CORE TEAM, 2014. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RIZZO, Luigi. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water research**, v. 45, n. 15, p. 4311-4340, 2011.

RUBINGER, Carla Ferreira. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil. 71p.

SANTANA, Mark VE; ZHANG, Qiong; MIHELCIC, James R. Influence of water quality on the embodied energy of drinking water treatment. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 5, p. 3084-3091, 2014.

SIZMUR, Tom et al. Relationships between Potentially Toxic Elements in intertidal sediments and their bioaccumulation by benthic invertebrates. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0216767, 2019.

STEYN, Maronel et al. Treated acid mine drainage and stream recovery: Downstream impacts on benthic macroinvertebrate communities in relation to multispe-

cies toxicity bioassays. **Journal of environmental management**, v. 235, p. 377-388, 2019.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). OFFICE OF WATER REGULATIONS. **Technical support document for water quality-based toxics control**. Office of Water Enforcement and Permits, Office of Water Regulations and Standards, US Environmental Protection Agency, 1991.

WORKAGEGN, Kassaye Balkew et al. Toxicity evaluation of wastewater treatment plant of textile effluent using fish: nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Aquaculture**, v. 3, 2013.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. Ed. RiMa, São Carlos, 2008. 478p.

ZOCCHI, Myriam; SOMMARUGA, Ruben. Microplastics modify the toxicity of glyphosate on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 697, p. 134194, 2019.

CAPÍTULO 4

FERRAMENTAS ECOTOXICOLÓGICAS APLICADAS AO BIOMONITORAMENTO DE EFLUENTE DE REFINARIA SUCROALCOOLEIRA

ECOTOXICOLOGICAL TOOLS APPLIED TO BIOMONITORING OF ALCOHOL REFINERY EFFLUENTS

Mayara Caroline Felipe¹

Aline Christine Bernegossi²

Fernanda Rodrigues Pinheiro³

Gleyson Borges Castro⁴

Mara Rúbia de Lima e Silva⁵

Juliano José Corbi⁶

Marcelo Zaiat⁷

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.4

1 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-4728-5958>. mayarafelipe@usp.br

2 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-8237-6567>. aline.bernegossi@usp.br

3 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-8847-673X>. frpinheiro@usp.br

4 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-5706-904X>. gleysonborges@usp.br

5 Queen's University. <https://orcid.org/0000-0002-0352-8762>. mrubia.limasilva@gmail.com

6 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0249-9370>. julianocorbi@usp.br

7 Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0001-7336-9093>. zaiat@sc.usp.br

Resumo

Avinhaça é o principal efluente líquido gerado no processo produtivo do etanol em usinas sucroalcooleiras, sendo caracterizada como um subproduto rico em matéria orgânica e de pH ácido. Atualmente, o principal destino dado à vinhaça é a sua aplicação no setor agrícola como um agente fertilizante. Devido ao grande volume gerado desse efluente - 13 litros (em média) de vinhaça para cada litro de etanol, a fertirrigação em excesso e por longos períodos pode causar problemas ambientais como: acidificação do solo, contaminação da água subterrânea e dos corpos d'água vizinhos, entre outros. Assim, a ecotoxicologia como metodologia para análises de toxicidade de contaminação ambiental tem sido um dos principais focos de pesquisas, visando monitorar o impacto ambiental de contaminantes. O objetivo deste capítulo é discorrer sobre o impacto ambiental da vinhaça da cana-de-açúcar *in natura* em duas espécies de invertebrados aquáticos: *Allonaia inaequalis* e *Daphnia magna*. Também abordaremos o conceito de fitotoxicidade e mostraremos sua aplicação em duas espécies de plantas: *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*. A partir dos resultados foi possível observar a relevância de testes de ecotoxicidade e fitotoxicidade como importantes ferramentas para ao biomonitoramento de efluentes. Nota-se que a vinhaça pode apresentar efeitos tóxicos para a germinação das sementes de *L. sativa* e *E. sativa*. Além disso, o escoamento sub/superficial pode carrear esse subproduto fertirrigado para dentro dos cursos d'água, possibilitando mais um efeito tóxico, agora na matriz aquática, já que 50% de mortalidade/ imobilidade para os organismos *A. inaequalis* e *D. magna* em exposição à vinhaça foi evidenciado a partir de diluições de 0,7%. Tais resultados ressaltam a importância dos cuidados com a utilização da vinhaça em fertirrigação, a necessidade de tratamento desse efluente e demonstraram como análises ecotoxicológicas podem ser aplicadas como ferramenta para diferentes impactos ambientais.

Palavras-chave: Vinhaça. Cana-de-açúcar. Biomonitoramento.

Abstract

Vinasse is the main liquid effluent generated in the ethanol production process in sugar and alcohol plants and is characterized as a by-product rich in organic matter and acidic pH. Currently, the main destination given to vinasse has been the application in the agricultural sector as a fertilizing agent. Due to the large volume generated by this effluent, on average 13 liters of vinasse for each liter of ethanol, excess fertigation and for long periods can cause environmental problems such as soil acidification, contamination of the groundwater and surface water bodies, among others. Ecotoxicology as a methodology for toxicity analysis of environmental con-

tamination has been one of the main research focuses with the objective of monitoring the environmental impact of contaminants. The purpose of this chapter is to discuss the environmental impact of sugarcane vinasse *in natura* on two species of aquatic invertebrates: *Allonais inaequalis* and *Daphnia magna*. In addition, we will introduce the concept of phytotoxicity and show its application in two species of plants: *Lactuca sativa* and *Eruca sativa*. From the results it was possible to conclude that ecotoxicity and phytotoxicity tests are important tools combined with the bio-monitoring of effluents. Vinasse can have toxic effects on the germination of *L. sativa* and *E. sativa* seeds. In addition, the sub/superficial runoff can carry this fertigated by-product into the water courses causing mortality/immobility for 50% of the organisms *A. inaequalis* and *D. magna* on exposure from the 0.7% dilution of vinasse. Such results highlight the importance of care with the use of vinasse in fertigation, and the need to treat this effluent and demonstrate how ecotoxicological analyzes can be applied as a tool for different environmental problems.

Keywords: Vinasse. Sugarcane. Biomonitoring.

4.1 Introdução

Os principais impactos ambientais da produção da cana-de-açúcar estão na utilização extensiva de agrotóxicos e desmatamento de áreas para plantio e instalação de biorrefinarias (ver capítulo 5 para mais dados sobre a produção da cana-de-açúcar no Brasil e no Estado de São Paulo). Além desses impactos, durante o processo de produção do etanol nessas instalações é gerado um efluente líquido, a vinhaça, que representa um dos principais ônus da indústria sucroalcooleira no Brasil. Para cada litro de etanol é gerado 13 litros (em média) de vinhaça (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016).

A vinhaça é altamente poluente e prejudicial para o meio ambiente aquático e terrestre quando descartada *in natura* (CHRISTOFOLLETTI et al., 2013). Esse subproduto é rico em nutrientes e matéria orgânica, com concentrações até 100 vezes maior que a encontrada no esgoto domésticos, além da sua característica ácida (pH entre 4,0 e 4,5) e corrosiva (FUESS; GARCIA, 2014). Em meados da década de 1970, foram outorgadas leis restritivas que proíbem o descarte direto e indireto de vinhaça em corpos hídricos (FUESS; GARCIA, 2014; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015), incentivando o descarte da vinhaça no solo por meio da fertirrigação, impulsionado tanto pela capacidade de reciclagem de nutrientes, como o potássio, quanto pela irrigação dos canaviais (DIAS et al., 2015).

Ainda que a fertirrigação da vinhaça possa aumentar a produtividade das culturas, agindo como fonte de água e nutrientes para as plantas (OLIVEIRA et al., 2009; JIANG et al., 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2013), seus impactos ambientais têm gerado preocupações devido à presença elementos potencialmente tóxicos como, metais, álcool e compostos fenólicos (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Quando aplicada em excesso, a vinhaça pode causar modificações nas propriedades físicas do solo (LEAL et al., 1983; UYEDA et al., 2013), gerando desequilíbrio de nutrientes e saturação de sais no solo, levando à lixiviação de íons para as águas subterrâneas, aumento do escoamento sub e superficial, contaminação das águas superficiais e, também, ter efeitos adversos sobre a biota em geral (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007; RIBEIRO et al., 2010).

Devido aos efeitos tóxicos da vinhaça, muitas tecnologias vêm sendo estudadas a partir do conceito de biorrefinaria, visando o aproveitamento energético, assim como o tratamento desse subproduto para reduzir sua toxicidade (MORAES et al., 2014; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; FUESS; GARCIA, 2015; FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018; FUESS et al., 2018). Portanto, a biodigestão da vinhaça em reatores anaeróbios, é aliada à análise e controle da poluição ambiental e precisa ser monitorada com tecnologias eficientes e confiáveis.

Nesse contexto, a ecotoxicologia é considerada uma importante ferramenta de biomonitoramento da qualidade das águas e da carga poluidora de efluentes, uma vez que as análises físicas e químicas comumente realizadas, como: a demanda química de oxigênio (DQO), a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, assim, não são totalmente eficazes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (ver capítulo 3 e 5 para mais detalhes). Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Pois, enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito da mistura dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Sendo assim, as análises químicas e os testes ecotoxicológicos se complementam (COSTA et al., 2008; FRUTOS et al., 2010; WALKER et al., 2012; LOURENÇO et al., 2013; BLUHM et al., 2014; CHEN et al., 2015; JUÁREZ-SANTACRUZ et al., 2015; PARK et al., 2015; RODRIGUEZ-JORQUERA et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

As avaliações de toxicidade mais simplificadas são realizadas pela quantificação dos compostos encontrados nas amostras ambientais por meio de análises químicas. Esses dados são comparados com níveis tóxicos presentes na literatura, desconsiderando a sensibilidade de diferentes organismos, a interação dos compostos tóxicos com o meio, a biodisponibilidade e a presença de diferentes compostos tóxicos (ALEXANDER, 2000; DE ZWART; POSTHUMA, 2005; O'HALLORAN, 2006). Esses resultados podem levar a considerações errôneas sobre a real toxicidade do composto em estudo (ALEXANDER, 2000; OLLSON et al., 2009; GARCÍA-GÓMEZ et al., 2014).

Visando avaliar os efeitos nocivos de uma determinada substância, ou amostra de interesse, e descrever em qual condição de exposição esses riscos são induzidos, a ecotoxicologia nos informa os riscos de contaminação ambiental (HODGSON, 2004; COSTA et al., 2008). Entretanto, a aplicabilidade de bioensaios para avaliar ecotoxicidade depende de uma seleção apropriada dos organismos-testes e das respostas de interesse (prováveis efeitos que os organismos estão passíveis de apresentar durante uma contaminação (ANTONIOUS, 2011).

Além da toxicidade na biota aquática, existem metodologias de ensaio para avaliar a toxicidade em plantas aquáticas e terrestres, ou seja, efeitos de fitotoxicidade. A fitotoxicidade é definida como um atraso na germinação das sementes, inibição de seu crescimento ou qualquer efeito adverso às plantas causado por substâncias específicas (fitotoxinas) ou condições de crescimento (BLOK et al., 2008).

Mediante o exposto, neste capítulo, segue-se a discussão sobre o impacto ambiental de vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* por meio de ferramentas da ecotoxicologia, com o objetivo de avaliar e monitorar a toxicidade deste efluente nas biotas aquática e terrestre. Utilizamos 4 organismos-teste: o microcrustáceo *Daphnia magna*, o Oligochaeta *Allonais inaequalis* e as sementes dos vegetais *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*.

O microcrustáceo filtrador *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera: Daphniidae) é representativo do zooplâncton de região temperada e é recomendado para avaliação da qualidade da água por apresentar sensibilidade às pequenas mudanças e serem organismos partenogenéticos, ou seja, com estabilidade genética (SANTOS; VICENSOTTI; MONTEIRO, 2007; NOVELLI, 2010; DA COSTA et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; GROSSELI, 2016; MIGUEL, 2016; GRZESIUK et al., 2018; COLOMER et al., 2019; CASTRO et al., 2020a)

O invertebrado aquático *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) é espécie nativa (ver Capítulo 1) utilizada em bioensaios por possuir tolerância a diferentes condições do meio, desde os mais impactados até os mais preservados e, por serem de fácil obtenção e manutenção, além de suas ocorrências nos corpos hídricos brasileiros (SMITH; KENNEDY; DICKSON, 1991; CORBI, GORBI, CORREA, 2015; CASTRO et al., 2020b; FELIPE et al., 2020)

Os vegetais *Lactuca sativa* (Linnaeus, 1753) e *Eruca sativa* (Linnaeus, 1753) são comumente utilizados em testes de fitotoxicidade devido a sua sensibilidade aos contaminantes, rápida germinação, baixo custo e por serem consumido em diversos países (CHANDLER et al., 2020; DE PAIVA PINHEIRO et al., 2020; LI et al., 2020; MOREIRA; MARTINS; MOURATO, 2020; SHARIATINIA et al., 2021; WAHID et al., 2021).

Neste capítulo discutiremos a aplicação de bioensaios de toxicidade em organismos aquáticos e plantas terrestres e, para isso, utilizaremos um exemplo prático de sua aplicação no monitoramento da toxicidade da vinhaça da cana-de-açúcar.

4.2 Estudo de caso

4.2.1 Obtenção da vinhaça da cana-de-açúcar

A vinhaça *in natura* utilizada para a realização dos bioensaios de toxicidade foi fornecida por uma usina de grande porte (Anexa na produção de açúcar e álcool) localizada no município de Pradópolis - SP. A vinhaça utilizada é referente a safra de 2019/2020, e suas características estão apresentadas na Tabela 4.1. Nesta safra, a usina produziu em média 1,172 bilhão de litros de etanol (NOVACANA, 2020). As amostras de vinhaça foram armazenadas em garrafas plásticas anóxicas e congeladas a -20°C até sua utilização.

Tabela 4.1: Caracterização da vinhaça *in natura*.

Parâmetros	Vinhaça <i>in natura</i>
	(mg/L)
pH	4,7
DQO total	33400
DQO filtrada	24200
Sulfato	2559,9
Ácido Lático	2039,9
Fenol	1750

Carboidrato	5903,3
Glicerol	1680
Sólidos Totais	267,8
Sólidos Totais Fixos	82,7
Sólidos Totais Voláteis	185,1
Fosfato (PSR)	4,99
Fósforo Total	31,12
Acetona	20,18
Metanol	29,13
Etanol	256,09
Nitrogênio Total	557,4

Fonte: Elaboração nossa (2021).

4.2.2 Aplicação dos testes de toxicidade aguda

O cultivo e manutenção de *A. inaequalis* estão descritos no Capítulo 1 deste livro. *Daphnia magna* por ser uma espécie exótica de clima temperado e muito utilizada em ensaios ecotoxicológicos, foi cultivada e mantida no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, Brasil. O cultivo da espécie foi realizado em recipientes de vidro de 2 L, contendo 40 dafnídeos inoculados, mantidos em incubadora BOD, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro. A dureza foi controlada entre 175 a 225 mg CaCO₃ / L e o pH entre 7,6 e 8,0 (ABNT, 2016).

As sementes das plantas *Lactuca sativa* e *Eruca sativa* foram adquiridas em lojas de agropecuária, mantendo o padrão de germinação superior a 95% e livre de agrotóxicos.

Além da exposição à vinhaça *in natura*, os organismos-teste foram testados, quanto a sua sensibilidade, à vinhaça *in natura* com pH ajustado em 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH 50%)

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas como soluções-teste vinhaça *in natura* V (1) e vinhaça *in natura* com pH ajustado V (2) e suas respectivas diluições, na proporção de 1:1000, 1:20, 1:10, 1:2 e 1:1 (0,1; 5; 10; 50 e 100%) (BOTELHO et al., 2012; BERTOLETTI, 2013; VILAR et al., 2018) em água filtrada sem cloro para *A. inaequalis* e as sementes e água reconstituída para *D. magna*. As diluições da vinhaça

foram realizadas a critério de investigação da diluição média de efeito de germinação/imobilidade/letalidade (CE/CL) aos organismos-teste, para os diferentes cenários de infiltração e escoamento superficial.

O ensaio de fitotoxicidade aguda foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos na germinação e alongamento das raízes nas sementes de *L. sativa* e *E. sativa* com as soluções-teste, mas a situação controle composta de água filtrada sem cloro, seguindo o protocolo estabelecido por USEPA – OPPTS 850.4200 (1996).

O ensaio de fitotoxicidade aguda foi realizado em placa de petri de vidro (10,0 x 1,5 cm) forradas com uma folha de papel filtro (porosidade 3 micras, 80 g m²) como substrato qualitativo, utilizado para manter a taxa de umidade para possibilitar a germinação. Este conjunto foi esterilizado previamente. Posteriormente, 10 sementes foram dispostas uniformemente, em 3 réplicas e adicionado 1 mL de solução-teste. As placas foram colocadas sobre abrigo de luz, durante 4 dias (96 h), a 21 ± 2°C. Após esse período, o número de sementes germinadas em cada diluição de vinhaça, para cada cenário, foi contado e o tamanho da plântula medido (radícula e hipocôtilo) (USEPA, 1996).

Os resultados de fitotoxicidade foram avaliados quanto ao índice de germinação (GR) (Equação 1).

O GR foi calculado como uma porcentagem da germinação de sementes na amostra por germinação de sementes no controle, conforme descrito por Priac et al. (2017).

$$GR = \frac{\text{Sementes germinadas na amostra}}{\text{Sementes germinadas no controle}} \quad (1)$$

Os parâmetros seguidos para a realização dos testes de toxicidade aguda com *A. inaequalis* e *D. magna* estão descritos na Tabela 4.2. As premissas seguidas para a execução dos bioensaios para *A. inaequalis* foram as sugeridas por CORBI; GORNI; CORREA (2015) e estão apresentadas no Capítulo 2 deste livro, e para *D. magna* foram as recomendadas por ABNT NBR 12713 (2016) e OECD (2004).

Tabela 4.2 – Características dos ensaios de toxicidade aguda utilizando os invertebrados aquáticos *Allonais inaequalis* e *Daphnia magna*.

	<i>A. inaequalis</i>	<i>D. magna</i>
Volume da Solução-teste	100 mL	100 mL
Sedimento	Sem Substrato	Sem Substrato
Organismo-teste	6	10
Fase do ciclo de vida	Qualquer fase	Neonatos até 24h
Número de réplicas para cada diluição	3	3
Temperatura	25 ± 2 °C	20 ± 2 °C
Fotoperíodo	12h luz/ 12h escuro	16h luz/ 8h escuro
Alimentação	Sem alimentação	Sem alimentação
Aeração	Sem aeração	Sem aeração
Duração do teste	96 horas (4 dias)	48 horas (2 dias)

Fonte: Elaboração nossa (2021).

4.2.3 Análise dos dados

A fim de decidir a melhor análise estatística a ser aplicada nos resultados, primeiramente foi verificado se os dados seguiram distribuição normal pelo Teste de Shapiro-Wilk considerando 95% de intervalo de confiança com o auxílio do software Past® (Paleontological Statistics) versão 3.21 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Caso observada a normalidade foram aplicados os testes one-way ANOVA e Tukey's *post hoc* (teste posterior), caso contrário foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn's *post hoc*. Em ambos, o objetivo foi identificar as diluições que provocam um efeito estatisticamente diferente do tratamento controle.

Para comparar se a vinhaça *in natura* V (1) e a vinhaça *in natura*, com pH ajustado V (2) resultaram em taxas de germinação/imobilidade/mortalidade similares nos organismos aquáticos e nas plantas terrestres foi aplicado o teste *two-way* ANOVA. A partir deste teste foi possível verificar se V (1) e V (2) se comportaram da mesma forma do ponto de vista de toxicidade e se houve alguma diluição que apresentou resultado diferente dentre as amostras. Em ambos resultados considera-

mos estatisticamente diferentes aqueles que apresentarem p -valor $\leq 0,05$, mantendo o padrão de 95% de confiabilidade.

A concentração letal média (CLx - diluição de vinhaça que causa efeito agudo (mortalidade) a uma porcentagem $x = 10$ e 50% de *A. inaequalis* no tempo de exposição) e a concentração de efeito (CEx - diluição de vinhaça que causa efeito (imobilidade e germinação) a uma porcentagem $x = 10$ e 50% de *D. magna* e sementes das plantas-teste) foram calculadas com auxílio do software R versão 3.5.0 e pacotes MASS e DRC.

4.3 Resultados e discussões

A validação do teste de germinação de sementes se deu a partir de 70% das sementes germinadas no tratamento controle, para todas as plantas utilizadas.

Na Tabela 4.3 pode-se observar que a planta *Lactuca sativa* foi mais sensível aos efeitos tóxicos da vinhaça. Entre as duas amostras analisadas, a vinhaça V (1) foi mais tóxica para *L. sativa* com germinação de 62,5% na diluição de 10%, enquanto na vinhaça V (2) houve 10,3% de germinação nas sementes foi na diluição de 50%. A planta *E. sativa* apresentou maior resistência à toxicidade da vinhaça para a germinação das sementes. Houve aumento na germinação das sementes de *E. sativa* para a vinhaça V (2) na diluição de 100% com 20% de germinação quando comparada à germinação de 14,3% para a vinhaça V (1).

As plântulas de *L. sativa* e *E. sativa* resultaram em maior desenvolvimento radicular expostas à vinhaça V (2) (Figuras 4.1 e 4.2). *Lactuca sativa* apresentou crescimento aéreo e radicular apenas para as diluições mais baixas (0,1; 5 e 10%) nas duas vinhaças testadas. *Eruca sativa* apresentou crescimento radicular em todas as diluições testadas, porém, maior crescimento quando expostas a vinhaça V (2).

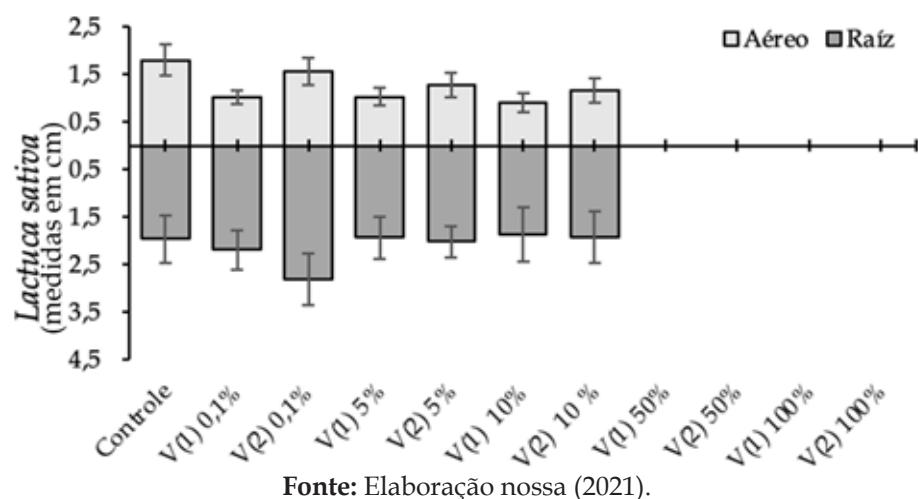
A partir desses resultados, observa-se que o pH da vinhaça influencia na fitotoxicidade das plantas testadas, tanto para o índice de germinação, quanto para o desenvolvimento da plântula. Esse resultado é interessante, pois mostra que para reduzir os efeitos da toxicidade da vinhaça é necessário, além da redução da carga orgânica já discutida na introdução, a correção de seu pH.

Tabela 4.3 – Índice de germinação das sementes das plantas *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*.

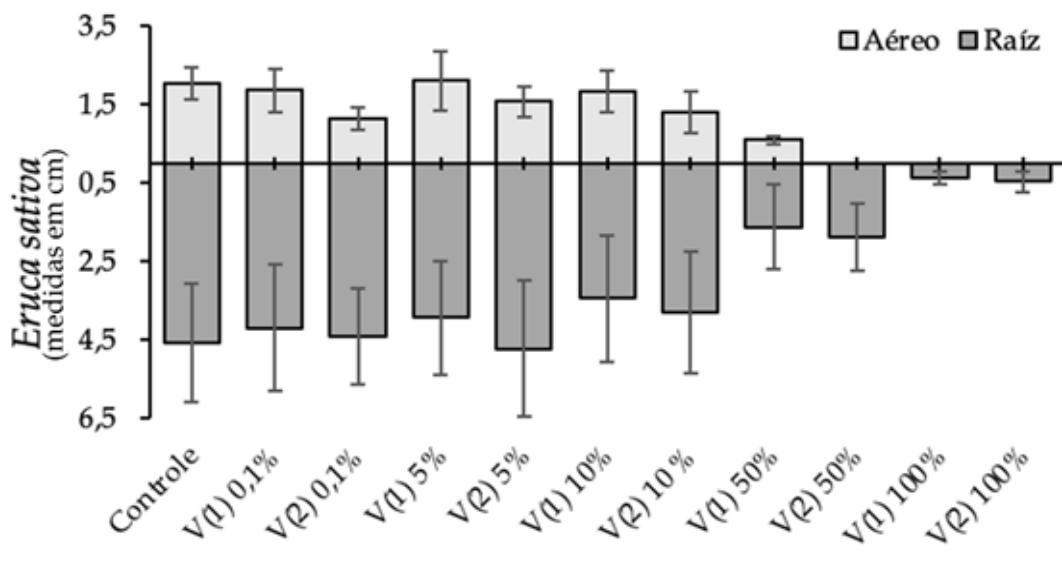
	V (1) Diluição	Germinação (GR)	Desvio padrão	V (2) Diluição	Germinação (GR)	Desvio padrão
<i>Lactuca sativa</i>	0,1%	87,5%	1,0	0,1%	100,0%	0,0
	5%	91,7%	1,5	5%	96,6%	2,0
	10%	62,5%	0,0	10%	82,8%	1,7
	50%	0,0%	0,0	50%	10,3%	0,0
	100%	0,0%	0,0	100%	0,0%	0,0
<i>Eruca sativa</i>	0,1%	96,4%	1,7	0,1%	96,7%	5,8
	5%	100,0%	0,0	5%	100,0%	0,0
	10%	96,4%	1,7	10%	90,0%	10,0
	50%	60,7%	2,0	50%	60,0%	36,1
	100%	14,3%	2,0	100%	20,0%	10,0

V (1)= vinhaça *in natura* (pH 4,7); V (2)= vinhaça *in natura* com pH ajustado para 6,5
Fonte: Elaboração nossa (2021).

Figura 4.1 – Desenvolvimento da plântula de *Lactuca sativa* exposta à vinhaça da cana-de-açúcar.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Figura 4.2 – Desenvolvimento da plântula de *Eruca sativa* exposta à vinhaça da cana-de-açúcar.

Fonte: Elaboração nossa (2021).

O teste de germinação de sementes mostrou que *E. sativa* foi a planta mais resistente à vinhaça, apresentando CE50 para germinação acima de 54% de diluição de vinhaça *in natura* em todas as situações testadas (Tabela 4.4). Vilar et al. (2018) observaram que diluições de 25, 50, 75 e 100% de vinhaça *in natura* (pH 3,7) causaram um alto efeito de toxicidade para as sementes de *L. sativa*. Além disso, estes autores obtiveram CE50 de 41,25% e afirmam que *L. sativa* é um organismo-teste fundamental para indicar os níveis tóxicos das substâncias químicas presentes nos diferentes tipos de efluentes e resíduos. Os resultados dos CE50 obtidos para a vinhaça *in natura* (pH 4,7) variaram de 18 a 57%, para *L. sativa* e *E. sativa*, respectivamente (Tabela 4.4), sendo estes resultados semelhantes aos encontrados na literatura.

Tabela 4.4 - Diluição de vinhaça que causa efeito em 10 e 50% na germinação das sementes das plantas *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*.

		V (1) (%)	V (2) (%)
<i>L. sativa</i>	CE10	6,86	2,80
	CE50	18,33	8,96
<i>E. sativa</i>	CE10	22,28	25,06
	CE50	57,63	54,12

V (1)= vinhaça *in natura* (pH 4,7); V (2)= vinhaça *in natura* com pH ajustado para 6,5
 Fonte: Elaboração nossa (2021).

Os resultados estatísticos do teste *two-way* ANOVA mostraram que não houve diferença significativa entre a diluição de 0,1% de vinhaça V (1) e V (2) e a situação controle para *L. sativa* e *E. sativa* com *p*-valor= 0,8734 e 0,999, respectivamente. As-

sim como as diluições de 50 e 100% resultaram em similaridade estatística entre si, para V (1) e V (2) para *L. sativa* com *p*-valor = 0,8734. Para *L. sativa* o efeito tóxico da vinhaça V (1) foi diferente estatisticamente da vinhaça V (2) com *p*= 7,73.10⁻⁷. Já o efeito tóxico da vinhaça V (1) não apresentou diferença estatística significativa à vinhaça V (2) para *E. sativa* com *p*= 0,5585.

Sousa et al. (2019) analisaram o efeito da vinhaça de destilaria de vinho no índice de germinação em sementes de 6 espécies de plantas, entre elas *L. sativa*, e obtiveram CE50 = 25,8%. As características físico-químicas, como: pH 3,88 e DQO 29 g/L, desse efluente são muito semelhantes às características da vinhaça da cana-de-açúcar.

Segundo Silva; Gribeler; Borges (2007) a prática de aplicação da vinhaça *in natura* no solo por meio de fertirrigação pode ser danosa ao meio ambiente. Esse subproduto agroindustrial também é capaz de contaminar os recursos hídricos por meio da lixiviação e/ou percolação. Em nossos estudos utilizando os organismos aquáticos observou-se elevada toxicidade da vinhaça *in natura* (pH 4,7), conforme Tabela 4.5.

Botelho et al. (2012) realizaram teste de toxicidade com *D. magna* expostos por 48 h à vinhaça *in natura* (pH = 4 e pH = 7) e observaram efeito CE50 de 0,8 e 5,62%, respectivamente. Os resultados obtidos para essa mesma espécie, mediante nosso estudo, assemelham-se aos encontrados no estudo de Botelho et al (2012). A vinhaça *in natura* pH = 4,7 e a vinhaça *in natura* com o pH ajustado para 6,5, resultaram em CE50 = 0,72 e 22,54 %, respectivamente, para *D. magna* (Tabela 4.5). *Allonais inaequalis* apresentou maior sensibilidade à vinhaça *in natura*, sendo estimado que diluições a partir de 0,72 e 4,56% da vinhaça V (1) e V (2) podem causar efeito de imobilidade em 50% dos indivíduos dessa espécie. Tais resultados evidenciam a elevada toxicidade da vinhaça para a biota aquática.

Tabela 4.5 - Porcentagem da diluição das amostras de vinhaça que causam efeito de imobilidade/letalidade em *Daphnia magna* e *Allonais inaequalis*.

		V (1) (%)	V (2) (%)
<i>D. magna</i>	CE10	0,42	19,42
	CE50	0,72	22,54
<i>A. inaequalis</i>	CL10	0,42	3,34
	CL50	0,72	4,36

V (1)= vinhaça *in natura* (pH 4,7); V (2)= vinhaça *in natura* com pH ajustado para 6,5

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Os resultados do teste ANOVA (*two-way*), mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a diluição de 0,1% de vinhaça V (1) e V (2) e o controle para *A. inaequalis* e *D. magna* com p-valor= 0,999 em ambos casos. Da mesma maneira que as diluições de 50 e 100% resultaram em similaridade estatística entre si, para V (1) e V (2) com p-valor $\geq 0,05$, para os mesmos organismos-teste. Os efeitos tóxicos das vinhaças V (1) e V (2) para imobilidade/mortalidade foram estatisticamente diferentes com p-valor= 0,0005269 para os organismos *D. magna* e *A. inaequalis*.

Outros pesquisadores realizaram testes de toxicidade com a vinhaça da cana-de-açúcar com o intuito de investigar seu impacto à biota aquática. Verma e Dalela (1976) realizaram testes de toxicidade com duas espécies de peixes, *Puntius sophore* e *Mystus vittatus*, e constataram mortalidade de 50% desses organismos expostos por 96 h a $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ nas diluições 10 e 6,3% de vinhaça, respectivamente. Já Kumar e Gopal (2001) observaram que diluições a partir de 50% de vinhaça resultam no aumento da produção de muco e na redução da quantidade de proteínas em diversos órgãos, tais como: fígado, cérebro, rins e músculos do peixe *Channa punctatus*. Para os insetos aquáticos, Yesilada (1999) observou redução na taxa de fecundidade dos ovos, bem como na fertilidade de fêmeas de *Drosophila melanogaster* quando expostas a diluições a partir de 25% de vinhaça. Já Nyakeya et al. (2018) analisaram o efeito da vinhaça da cana-de-açúcar em Chironomidae, e verificaram diminuição e atraso na emergência dos insetos adultos ao longo do tempo a partir de 6,5% da diluição desse efluente. De modo geral, há pouca informação a respeito da toxicidade da vinhaça para invertebrados aquáticos, não sendo encontrados relatos dos efeitos da vinhaça em Oligochaeta aquáticos.

A partir dos resultados do nosso estudo foi possível concluir que testes de ecotoxicidade e fitotoxicidade são importantes ferramentas aliadas ao biomonitori-

ramento de efluentes. A vinhaça é um efluente complexo gerado durante a produção de álcool etílico, que pode apresentar efeitos tóxicos à biota decorrente de sua utilização na fertirrigação. Como exemplo, tem-se o efeito tóxico do lixiviado desse efluente na germinação das sementes de *L. sativa* e *E. sativa*. Além disso, tendo em vista que o escoamento sub/superficial pode transportar esse subproduto fertirrigado para dentro dos cursos d'água, espera-se que as populações de *A. inaequalis* e *D. magna* comecem a apresentar mortalidade em 50% de seus indivíduos a partir de uma diluição de 0,7% de vinhaça, com base nos resultados apresentados. Tais resultados ressaltam a importância dos cuidados com a utilização da vinhaça para fins de fertirrigação, bem como a necessidade de tratamento desse efluente, utilizando por exemplo, sistema combinado de reatores anaeróbios (reator acidogênico + reator metanogênico) na biodigestão desse subproduto, a fim de diminuir a toxicidade dessa água resíduária para espécies aquáticas e de plantas.

4.4 Considerações finais

Neste capítulo foi possível compartilhar a aplicação de bioensaios de toxicidade em matrizes líquidas não convencionais, no caso, a vinhaça. É importante ressaltar que aqui mostramos os resultados para a vinhaça *in natura*, e reforçamos a necessidade de estudos sobre o tratamento prévio desse subproduto antes de sua aplicação direta no solo. A utilização de diferentes organismos-teste para avaliar se o tratamento está reduzindo a toxicidade da vinhaça pode ajudar a garantir menor impacto nos ecossistemas terrestres e aquáticos.

Ademais, ressaltamos que a vinhaça por ser um subproduto de coloração escura requer algumas adaptações para garantir a contagem dos indivíduos ao final do teste, como a utilização de bandejas transiluminadas, verter os organismos em placas de Petri e a utilização de lentes. Por fim, ressaltamos a importância de se investigar o tipo e a origem da amostra que se está trabalhando para avaliar a necessidade, por exemplo, da utilização de equipamentos de proteção individual, tais como o uso de máscaras respiratórias e óculos de proteção, durante a manipulação dos testes.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processos nº 2018 / 21901-0 e 2015 / 06246-7)

Referências

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ALEXANDER, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 20, p. 4259–4265, 2000.
- ANTONIOUS, G. A Review of “Semi-Field Methods for the Environmental Risk Assessment of Pesticides in Soil”. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 46, n. 2, p. 198–199, 2011.
- BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. **CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**, p. 44, 2013.
- BLOK, C. et al. **Analytical methods used in soilless cultivation**. In: **Soilless Culture**. Elsevier, p. 245–289, 2008.
- BLUHM, K. et al. Impacts of Different Exposure Scenarios on Transcript Abundances in *Danio rerio* Embryos when Investigating the Toxicological Burden of Riverine Sediments. **PLoS ONE**, v. 9, 4, 2014.
- BOTELHO, R. G.; TORNISIELO, V.L.; de OLINDA, R. A.; MARANHO, L. A.; MACHADO-NETO, L. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 2035–2045, 2012.
- CASTRO, G. B. et al. Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics? **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 55, n. 8, p. 935–946, 2020a.
- CASTRO, G. B. et al. Update on the use of *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020b.
- CHANDLER, J. O. et al. Rocket Science: The Effect of Spaceflight on Germination Physiology, Ageing, and Transcriptome of *Eruca sativa* Seeds. **Life**, v. 10, n. 4, p. 49, 24, 2020.
- CHEN, G. et al. Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil. **Environmental Pollution**, v. 199, p. 253–260, 2015.
- CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, dez. 2013.
- COLOMER, J. et al. Mediated food and hydrodynamics on the ingestion of microplastics by *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 434–441, 2019.

CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 7-11, 2015.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DA COSTA, J. B. et al. Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 9, p. 1803-1813, 2014.

DE PAIVA PINHEIRO, S. K. et al. Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, v. 68, n. 2, p. 127, 2020.

DE ZWART, D.; POSTHUMA, L. Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2665, 2005.

DIAS, M. O. DE S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

FELIPE, M. C. et al. The use of an *Allonais inaequalis* reproduction test as an ecotoxicological bioassay. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 5, p. 634-638, 2020.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. et al. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252, abr. 2016.

FRUTOS, F. J. G. et al. Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1-3, p. 806-813, 2010.

FUESS, L. T. et al. Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and environmental approach. **Renewable Energy**, v. 122, p. 674-687, 2018.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210-229, 2014.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. **Journal of Environmental Management**, v. 162, p. 102-114, 2015.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 29-40, 2018.

GARCÍA-GÓMEZ, C. et al. Risk assessment of an abandoned pyrite mine in Spain based on direct toxicity assays. **Science of The Total Environment**, v. 470-471, p. 390-399, 2014.

GROSSELI, G. M. Contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto aeróbia e anaeróbia. **Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos, 2016.

GRZESIUK, M. et al. Environmental concentrations of pharmaceuticals directly affect phytoplankton and effects propagate through trophic interactions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, n. October 2017, p. 271-278, 2018.

HAMMER; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis** *Palaeontologia Electronica*, 2001.

HODGSON, E. **Introduction to toxicology**. A textbook of modern toxicology. 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, p. 2-11, 2004.

JIANG, Z.-P. et al. Effect of Long-Term Vinasse Application on Physico-chemical Properties of Sugarcane Field Soils. **Sugar Tech**, v. 14, n. 4, p. 412-417, 2, 2012.

JUÁREZ-SANTACRUZ, L. et al. DNA Damage in *Vicia faba* by Exposure to Agricultural Soils from Tlaxcala, Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 764-769, 18, 2015.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of Distillery Effluent on Physiological Consequences in the Freshwater Teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, n. 5, p. 617-622, 1, 2001.

LEAL, J. R. et al. Potencial redox e pH: variações em um solo tratado com vinhaça. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 7, p. 257-261, 1983.

LI, J. et al. Lead and copper-induced hormetic effect and toxicity mechanisms in lettuce (*Lactuca sativa L.*) grown in a contaminated soil. **Science of The Total Environment**, v. 741, p. 140-440, 2020.

LOURENÇO, J. et al. Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. **Science of The Total Environment**, v. 443, p. 673-680, 2013.

MIGUEL, M. Efeito do hormônio sintético 17 α - etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna*. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo**. São Carlos, 2016.

MORAES, B. S. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825-835, 2014.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, 2015.

MOREIRA, I. N.; MARTINS, L. L.; MOURATO, M. P. Effect of Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn on seed germination and seedling growth of two lettuce cultivars (*Lactuca sativa* L.). **Plant Physiology Reports**, v. 25, n. 2, p. 347-358, 13, 2020.

MOREIRA, R. A. et al. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabellicola*. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2014.

NOVACANA. **Lucro da São Martinho cresce 66,6%, para R\$ 142,7 milhões, no 4º tri da safra 2019/20.** Acessado em: 20/03/2021. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/industria/financeiro/lucro-sao-martinho-cresce-66-6-r-142-7-milhoes-4-tri-safra-2019-20-300620>. 2020.

NOVELLI, A. Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e *in situ*. **Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.** São Carlos, 2010.

NYAKEYA, K.; NYAMORA, J. M.; RABURU, P. O.; MASESE, F. O.; KERICH, E.; MAGONDU, E. W. Life cycle responses of the midge of *Chironomus* species (Diptera: Chironomidae) to sugarcane and paper pulp effluents exposure. **African Journal of Education, Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 1-13, 2018.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.** OECD Publishing, 2004.

O'HALLORAN, K. Toxicological Considerations of Contaminants in the Terrestrial Environment for Ecological Risk Assessment. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 12, n. 1, p. 74-83, 2006.

OLIVEIRA, E. L. DE et al. Uso de vinhaça de alambique e nitrogênio em cana-de-açúcar irrigada e não irrigada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1398-1403, 2009.

OLLSON, C. A. et al. Addressing arsenic bioaccessibility in ecological risk assessment: a novel approach to avoid overestimating risk. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 668, 2009.

PARK, S.-Y. et al. Ecotoxicity of bare and coated silver nanoparticles in the aquatic midge, *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 2023-2032, 2015.

PRIAC, A.; BADOT, P.-M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.

RIBEIRO, B. T. et al. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 441–447, ago. 2010.

RODRIGUEZ-JORQUERA, I. A. et al. Transcriptional and physiological response of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to urban waters entering into wildlife protected areas. **Environmental Pollution**, v. 199, p. 155–165, 2015.

SANTOS, V. S. V.; CAMPOS, C. F.; DE CAMPOS JÚNIOR, E. O.; et al. Acute ecotoxicity bioassay using *Dendrocephalus brasiliensis*: alternative test species for monitoring of contaminants in tropical and subtropical freshwaters. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 635–640, 2018.

SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. R. Sensitivity of four test organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 229–236, 2007.

SHARIATINIA, F. et al. Germination, growth, and yield of rocket populations show strong ecotypic variation under NaCl stress. **Scientia Horticulturae**, v. 278, 2021.

SILVA, M. A. S. DA; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.

SMITH, D. P.; KENNEDY, J. H.; DICKSON, K. L. An evaluation of a naidid oligochaete as a toxicity test organism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1459–1465, 1991.

SOUSA, R. M. O. F. et al. Hazardous impact of vinasse from distilled winemaking by-products in terrestrial plants and aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, 2019.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines OPPTS (850.4200): Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test** United States Environmental Protection Agency. 1996.

UYEDA, C. A. et al. Influence of vinasse application in hydraulic conductivity of three soils. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 4, p. 689–698, 2013.

VERMA, S. R.; DALELA, R. C. Toxicity of distillery wastes to *Puntius sophore* (HAM.) and *Mystus vittatus* (BLOCH) (Pisces, Cyprinidae, Bagridae) Part 3: Bioassay studies and TL_m determination. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 4, n. 6, p. 547–556, 1976.

VILAR, D. S. et al. Vinasse degradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological – Electrochemical oxidation treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 192, p. 287–296, 2018.

WAHID, F. et al. Growth responses and rubisco activity influenced by antibiotics and organic amendments used for stress alleviation in *Lactuca sativa*. **Chemosphere**, v. 264, 2021.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; et al. **Principles of Ecotoxicology**. 4th. ed. New York, 2012.

YESILADA, E. Genotoxic Activity of Vinasse and Its Effect on Fecundity and Longevity of *Drosophila melanogaster*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 5, p. 560-566, 1, 1999.

CAPÍTULO 5

APLICAÇÃO DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E ANÁLISE DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS DE CÓRREGOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS

*APPLICATION OF ECOTOXICOLOGICAL
TESTS AND STRUCTURE OF THE AQUATIC
MACROINVERTEBRATE COMMUNITY IN
AGRICULTURAL AREAS*

Bruna Nayara Cardoso Silva¹
Maria Helena Viana Carrascossi²
Daniel Peroni Abrahão³
Juliano J. Corbi⁴

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.5

¹ Universidade de São Paulo. brunanayara@usp.br

² Universidade de São Paulo. mahelenacarrascossi@usp.br

³ Universidade de São Paulo. danielperoniabrahao@gmail.com

⁴ Universidade de São Paulo. julianocorbi@usp.br

Resumo

Nos capítulos anteriores, buscamos abordar os estudos utilizando invertebrados aquáticos nos ramos da ciência "Ecotoxicologia". Neste capítulo, abordaremos duas ferramentas de estudo trabalhadas em conjunto utilizando os invertebrados aquáticos como indicadores da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos continentais. Este capítulo tem como objetivo apresentar a análise da estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos e os testes de ecotoxicológicos como ferramentas de biomonitoramento dos impactos da atividade canavieira. Os possíveis impactos foram avaliados por meio de um estudo realizado em seis córregos: três localizados em áreas de cana-de-açúcar e três localizados em áreas de mata ciliar preservadas, no Estado de São Paulo, Brasil. Os resultados indicaram alterações na estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos nos córregos localizados em áreas agrícolas e toxicidade do sedimento nos córregos em áreas de cana-de-açúcar, para a espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados comparativos dessas duas formas de "recorte" na utilização dessa biota aquática em análises de ambientes aquáticos continentais, podem auxiliar na tomada de decisão no que se refere a quais ferramentas são mais adequadas em estudos sobre impactos das atividades agrícolas nos córregos.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Métricas comunitárias. *Chironomus*.

Abstract

In the previous chapters, we sought to approach studies using aquatic invertebrates in the fields of "ecotoxicological" science. Within this chapter, we will address two research tools, applied in parallel, using aquatic invertebrates as indicators of the environmental quality of aquatic ecosystems. This chapter aims to present the structure of the aquatic macroinvertebrate community and ecotoxicological tests as instruments for biomonitoring the impacts of sugarcane on aquatic macroinvertebrates. The impacts were assessed through a study using three streams located in sugarcane areas and three streams in forest areas, located in the State of São Paulo, Brazil. The results indicated impacts in the structure of the aquatic macroinvertebrate community in streams located in agricultural areas and sediment toxicity for the species *Chironomus sancticaroli* in the sugarcane areas. The comparative results on these two approaches in the study of aquatic biota can be very useful for students at the beginning of their careers, when making a decision on which tool apply in studies on the impacts of agricultural streams activities.

Keywords: Biomonitoring. Community metrics. *Chironomus*.

Introdução

A cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância econômica no Brasil e tem se expandido principalmente no Estado de São Paulo (CONAB, 2020). Como consequência dessa expansão tem-se o aumento do desmatamento da mata ciliar e da aplicação de pesticidas e fertilizantes, o que resulta na contaminação dos sedimentos aquáticos (CORBI et al., 2006; CORBI et al., 2018). No ambiente aquático, os sedimentos podem ser fonte de alimento para os organismos, e, por outro lado, podem contribuir para o acúmulo de metais nesses sistemas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

As formas mais tradicionais de biomonitoramento dos impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos são realizadas por meio das análises físicas e químicas da água. No entanto, essas análises podem não ser suficientes para mensurar a qualidade ambiental do meio, por não contemplar aspectos relacionados à biologia dos organismos vivos que nele habitam (BAPTISTA, 2008). Nesse sentido, outras ferramentas têm surgido para complementar e integrar as análises tradicionais, como a utilização da comunidade de macroinvertebrados aquáticos juntamente com testes ecotoxicológicos. Por serem considerados bons bioindicadores (ver capítulo 2), os macroinvertebrados aquáticos podem, por exemplo, fornecerem bons indícios sobre os efeitos dos poluentes associados ao sedimento aquático. Os testes ecotoxicológicos, por sua vez, permitem avaliar efeitos da interação das misturas complexas presentes no sedimento, sobre os organismos-teste (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), especialmente em situações controladas em laboratório.

Nos capítulos anteriores, foram abordados estudos utilizando invertebrados aquáticos nos ramos da ciência "ecotoxicologia". Neste capítulo, abordaremos duas ferramentas trabalhadas em conjunto, os testes ecotoxicológicos e as alterações na estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos, aplicadas em estudos de campo em córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. O capítulo apresentará um estudo de caso com três córregos localizados em áreas de cana-de-açúcar e três córregos em áreas de mata no Estado de São Paulo, integrando ambas as ferramentas na avaliação da qualidade ambiental desses ecossistemas aquáticos. Por fim, o capítulo compartilhará as experiências obtidas nas análises de campo e em laboratório e indicará qual ferramenta de estudo se mostrou mais adequada para a análise deste tipo de impacto ambiental.

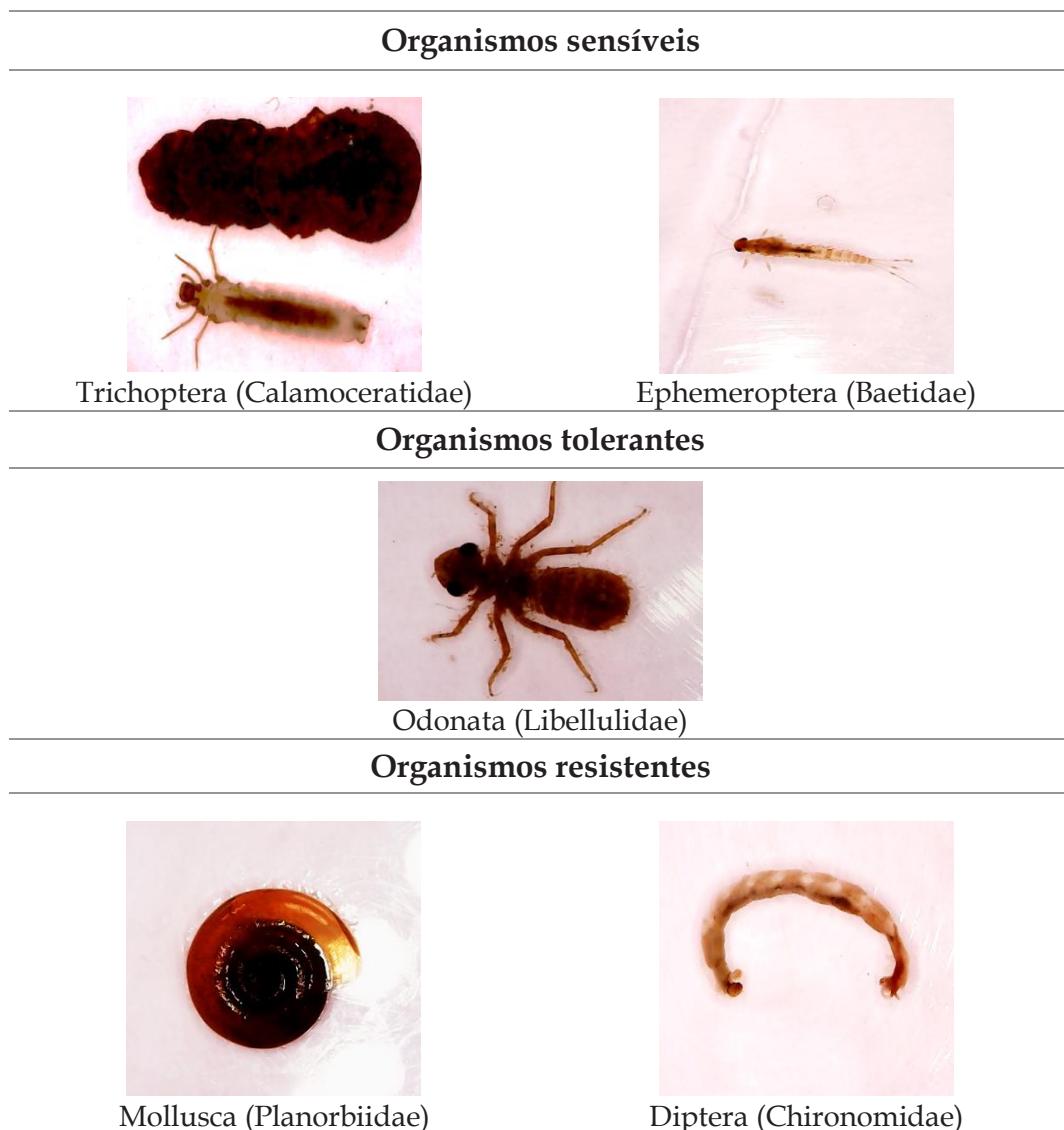
5.2 Comunidade de macroinvertebrados aquáticos

A comunidade de macroinvertebrados aquáticos constitui-se de organismos maiores que 0,25 mm, visíveis por observação direta (olho “nu”), sendo representada por um grupo diversificado de insetos, anelídeos, moluscos e crustáceos, que são encontrados em rios, córregos e lagos (ROSENBERG; RESH, 1993). Sua distribuição é influenciada pelas características do sedimento que se encontra em seu habitat, natureza química do substrato que compõe, disponibilidade de recursos alimentares, profundidade da coluna d’água, morfologia das margens do corpo d’água, vegetação ripária, competição e predação entre as diferentes espécies (QUEIROZ et al., 2000).

Em relação aos grupos funcionais de alimentação, os macroinvertebrados aquáticos podem ser classificados em coletores-filtradores, coletores-catadores, predadores, raspadores e fragmentadores (MERRITT; CUMMINS, 2008). Os coletores são organismos que ingerem pequenas partículas de matéria orgânica coletada nos sedimentos dos corpos de água ou suspensas na coluna d’água. Os predadores alimentam-se de outros organismos como pequenos peixes, girinos, anfíbios e moluscos, larvas e outros insetos aquáticos. Os raspadores se alimentam por meio da raspagem e mastigação do perifíton (biofilme que atua na camada entre o substrato e a água circulante) aderido às pedras, folhas, troncos e macrófitas aquáticas. E os fragmentadores são aqueles grupos que fragmentam grandes partículas de matéria orgânica, como folhas, galhos e sementes, para se alimentarem.

Os macroinvertebrados aquáticos diferem entre si, em relação a tolerância da poluição orgânica. Há grupos de organismos considerados sensíveis, que no geral, são de ambientes limpos ou de boa qualidade ambiental e não toleram altas cargas de poluição orgânica (p.e. Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera - Insecta). Por outro lado, existem organismos que toleram maior carga de poluição orgânica (p.e. alguns Coleoptera, Hemiptera, Odonata e alguns Diptera) e outros organismos considerados mais resistentes, como exemplo, alguns Chironomidae e Oligochaeta. A Figura 5.1 mostra alguns exemplos de macroinvertebrados aquáticos classificados em relação à tolerância da poluição orgânica. Mais exemplos de macroinvertebrados aquáticos podem ser consultados em Merritt e Cummins (2008), Esteves (2011) e Hamada et al. (2014).

Figura 5.1 - Classificação dos macroinvertebrados em relação à tolerância da poluição orgânica.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Locais que apresentam baixa riqueza de espécies e elevada abundância de alguns organismos como, por exemplo, do gênero *Chironomus* (Família Chironomidae) e espécies da família Tubificidae (Classe Oligochaeta), geralmente são classificados como poluídos.

Os ecossistemas são de grande importância para os organismos aquáticos, como é o caso dos macroinvertebrados, que dependem de tais ecossistemas para sua sobrevivência. Dessa forma, muitas ferramentas têm sido empregadas para a avaliação e monitoramento dos ambientes aquáticos (BUSS et al., 2008), como por exemplo, as ferramentas de monitoramento biológico utilizando-se macroinvertebrados aquáticos (CALLISTO et al., 2005). Resh e Jackson (1993) ressaltam a sensi-

bilidade dos macroinvertebrados não só à poluição, mas também às mudanças no habitat, sugerindo seu uso como indicadores de qualidade de água.

Metcalfe (1989), Rosenberg e Resh (1993) e Alba-Tercedor (1996), descreveram algumas características que tornam os macroinvertebrados aquáticos bioindicadores de qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos. Estas características podem ser observadas no quadro a seguir.

Características dos macroinvertebrados aquáticos como bioindicadores de qualidade ambiental

- Ampla distribuição, estando presentes em diversos ambientes aquáticos;
- Alta riqueza de espécies, o que oferece enorme gama de tolerância e amplo espectro de respostas frente aos diferentes níveis de contaminação;
- Ciclos de vida longos, favorecendo a detecção de alterações no ambiente em tempo hábil;
- Tamanho de corpo relativamente grande;
- Fácil de amostragem;
- Pequena capacidade de deslocamento, o que facilita as análises espaciais dos efeitos da poluição ambiental;
- Técnicas de amostragem padronizadas e de custo relativamente baixo.

A comunidade de macroinvertebrados aquáticos é essencial ao funcionamento dos ecossistemas de água doce por atuarem em processos ecológicos de ciclagem de nutrientes, de transformação da matéria orgânica e de transferência de energia no meio em que vivem (CALLISTO; ESTEVES, 1995). Por exemplo, em um sistema aquático, a quantidade de nutrientes a ser liberada pelo sedimento está relacionada com os processos de mineralização realizados por esses organismos (VALDOVINOS; FIGUEROA, 2000). O processo de biorrevolvimento da superfície do sedimento e a fragmentação da matéria orgânica proveniente da vegetação ripária são outros exemplos de processos ecológicos realizados pela comunidade dos macroin-

vertebrados aquáticos, que resultam na liberação de nutrientes para a água e na aeração dos sedimentos (CUMMINS et al., 1989; DEVÁI, 1990).

5.3 Cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e os impactos na comunidade de macroinvertebrados aquáticos

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com produção estimada de 665,1 milhões de toneladas para a safra 2020/2021, sendo a região sudeste a maior produtora (436,4 milhões de toneladas). O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional de cana-de-açúcar, atingindo 54% da área total cultivada, com produção de 180 milhões de toneladas e área de $2,5 \times 10^6$ hectares. Um dos fatores para a elevada produção de cana-de-açúcar pelo estado de São Paulo é que este possui condições consideradas excelentes para a produção de cana-de-açúcar, por apresentar regiões de clima tropical, quente e úmido, o que o torna responsável por 82% da produção da região Sudeste.

Os impactos ambientais decorrentes do cultivo da cana-de-açúcar, como uso intensivo de pesticidas, fertilizantes, o revolvimento do solo e a retirada das matas ciliares, têm sido objeto de discussão em diversos fóruns (AGEITEC, 2019). A remoção da mata ciliar causada pelas práticas agrícolas retira a proteção do córrego, resultando no aumento dos níveis de partículas de solo suspensas e na contaminação química, o que causa mudanças no habitat, provocando a perda da biodiversidade aquática (SURIANO; FONSECA-GESSNER, 2013). A aplicação de pesticidas e fertilizantes podem atingir tanto os organismos alvos nas plantações quanto os não alvos, como é o caso dos macroinvertebrados aquáticos (CORBI et al., 2006; SPADOTTO, 2006; MELLO et al., 2019).

O Brasil se destaca por utilizar grandes quantidades de pesticidas e, no ano 2017, comercializou aproximadamente 540 mil toneladas de pesticidas (em um contexto mais amplo), sendo o Glifosato o mais vendido, somando aproximadamente 173 mil toneladas (IBAMA, 2019). Sabe-se que os herbicidas são as substâncias mais preocupantes do ponto de vista ambiental, pois suas características de mobilidade no solo, levá-los a serem encontrados em águas subterrâneas com frequência (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). A utilização de pesticidas na agricultura é fundamental para a eficiência do campo, para o controle de pragas e para a produção de alimento, mas é necessário utilizá-los com cautela, de modo a evitar prejuízos à saúde humana e à biota aquática e terrestre.

Os pesticidas podem alcançar o meio aquático pelo processo de lixiviação do solo e se ligar aos materiais particulados em suspensão, se depositar no sedimento

ou ainda serem acumulados nos organismos (TOMITA; BEYRUTH, 2002). A biota pode ser afetada de acordo com as substâncias presentes no ambiente impactado, podendo apresentar mudanças fisiológicas e em alguns casos pode até ocorrer a letalidade total nas populações, afetando a estrutura da comunidade naquele local (CLEMENTS, 2000). A Tabela 5.1 apresenta alguns impactos que os pesticidas e metais podem causar nos macroinvertebrados aquáticos.

Tabela 5.1 – Exemplos de efeitos que as atividades agrícolas, os pesticidas e os metais podem causar nos invertebrados aquáticos.

Tabela 5.1: Efeitos que as atividades agrícolas, os pesticidas e os metais podem causar nos macroinvertebrados aquáticos.

	Efeitos	Referências
Metais (Cu, Zn, Pb, Cd, Al, Fe, Mn, Mg e Cr)	Bioacumulação	Corbi et al. (2010;2020)
Atividades agrícolas	<ul style="list-style-type: none"> -Alterações na estrutura da comunidade; -Aumento da porcentagem de Chironomidae; -Redução do número de famílias sensíveis (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera); -Redução na riqueza de táxons; -Perda de habitats; -Menor heterogeneidade de substratos 	CORBI, TRIVINHO-STRIXINO (2008; 2013); HEPP, SANTOS (2009); EGLER et al. (2012); SURIANO; FONSECA-GESSNER (2013); SONODA et al. (2018)

Atividades agrícolas	Alterações dos grupos funcionais de alimentação	FU et al. (2016); HEPP et al. (2016)
Inseticida Imidacloprida e herbicida terbutilazina	Redução do número de espécies e do tamanho corporal	BARMENTLO et al. (2018)
Metais em geral	Alterações nas partes bucais, comprimento larval, largura da cápsula cefálica, mortalidade e dano total	BEGHELLI et al. (2018)
Fungicida Pirimetanil	Alterações genéticas	COLOMBO-CORBI et al. (2017)
Herbicida 2, 4-D e inseticida Pipronil	-Alterações na taxa de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento -Deformidade bucal	PINTO et al. (2021)
Pesticidas em geral	Alteração da natação	OLIVEIRA et al. (2012); BOWNIK; SZABELAK (2021)

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Assim, os invertebrados aquáticos se tornaram uma ferramenta frequentemente utilizada no biomonitoramento da qualidade ambiental, permitindo acompanhar as mudanças nos ecossistemas aquáticos com o objetivo de detectar os impactos decorrentes dos diferentes usos e ocupação do solo (BAPTISTA et al., 2003).

5.4 Biomonitoramento utilizando a estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos e testes ecotoxicológicos, como recortes para análise ambiental

A utilização das análises biológicas tem sido integrada com as análises físicas e químicas de modo a aperfeiçoar o diagnóstico da qualidade ambiental do meio aquático, uma vez que somente o uso do monitoramento convencional não é suficiente para inferir sobre a "saúde" dos ecossistemas (BAPTISTA, 2008). Os métodos físicos e químicos são momentâneos, identificam e quantificam as substâncias tóxicas. Por outro lado, os métodos biológicos permitem a integração temporal e espacial, fornecendo medidas a longo prazo referentes à concentração de substâncias acumuladas na comunidade que habita o meio aquático (BUSS et al., 2003).

Por refletirem às mudanças no meio, a comunidade de macroinvertebrados aquáticos tem sido frequentemente utilizada como uma ferramenta para avaliar os efeitos dos impactos antrópicos sobre os ecossistemas de água doce (TRIVINHO-STRIXINO, 2006; HEPP et al., 2016; CHAGAS et al., 2017). Várias métricas podem ser utilizadas, individualmente ou combinadas, com a comunidade de macroinvertebrados aquáticos na avaliação da qualidade ambiental, levando em consideração a composição, a riqueza, a dominância, a tolerância e os grupos funcionais de alimentação (BARBOUR et al., 1996; SILVEIRA et al., 2005; BAPTISTA et al., 2007) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Exemplos de métricas de composição, riqueza, medidas tróficas e tolerância utilizadas com os macroinvertebrados aquáticos em estudos de avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos e suas respostas esperadas durante um impacto.

Categoria	Métricas	Respostas esperadas
Métricas de composição	% EPT	Diminui
	% Ephemeroptera	Diminui
	% Plecoptera	Diminui
	% Trichoptera	Diminui
	% Coleoptera	Diminui
	% Odonata	Aumenta
	% Diptera	Aumenta
	% Chironomidae	Aumenta
	% Oligochaeta	Aumenta
	% EPT/Chironomidae	Diminui
Métricas de Riqueza	nº de táxons total	Diminui
	nº de táxons de EPT	Diminui
	nº de táxons de Ephemeroptera	Diminui
	nº de táxons de Plecoptera	Diminui
	nº de táxons de Trichoptera	Diminui
	nº de táxons de Chironomidae	Diminui
	nº de táxons de Coleoptera	Diminui
	Diversidade de Shannon (H')	Diminui
	Equitabilidade (J)	Diminui
Métricas tróficas	% Fragmentadores	Diminui
	% Coletores-filtradores	Diminui
	% Coletores-catadores	Variável
	% Raspadores	Diminui
	% Predadores	Variável
Métricas de tolerância	EPT/Chironomidae	Diminui
	Baetidae/Ephemeroptera	Aumenta
	BMWP*	Diminui
	BMWP - ASPT**	Diminui
	BMWP - CETEC***	Diminui

*BMWP - Biological Monitoring Working Party (ARMITAGE et al., 1983);

**BMWP/ASPT - Average Score Per Taxon (PÍNDER et al., 1987);

***BMWP/CETEC - Centro Tecnológico de Minas Gerais - uma adaptação do BMWP para rios brasileiros (JUNQUEIRA; CAMPOS, 1998).

Fonte: Elaboração nossa (2021).

A amostragem e a triagem do sedimento para a identificação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos é realizada conforme descrito no Capítulo 1. Caso não seja possível triar o material coletado no mesmo dia, devido ao grande número de pontos de coleta, as amostras devem ser mantidas sob aeração constante. Sugermos que o processo de triagem seja realizado o mais rápido possível, para evitar a morte dos animais e consequente alteração na estrutura comunitária. Depois de triados, os organismos podem ser armazenados em frascos de vidro, plásticos ou eppendorfs e fixados em álcool 70% para posterior identificação (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Frascos de armazenamento de organismos.



Fonte: LEAA (2021).

A identificação dos organismos em análise ambientais, em geral, pode ocorrer em nível de família, gênero ou espécie (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006). Existem diferentes chaves de identificação disponíveis na literatura, entre elas destacam-se:

Brinkhurst & Marchese (1992);

Trivinho-Strixino e Strixino (1995);

Fernandes e Domingues (2001);

Costa et al. (2004);

Froehlich (2007);

Merritt e Cummins (2008);

Mugnai et al. (2010);

Hamada et al. (2014).

Além das métricas comunitárias, os testes ecotoxicológicos também têm sido utilizados como ferramenta de monitoramento e avaliação da qualidade ambiental. Eles permitem avaliar a contaminação de diferentes fontes de poluição, tais como efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos, microplásticos, poluentes emergentes e produtos químicos em geral (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). As vantagens dos testes ecotoxicológicos são: baixo custo, obtenção de respostas rápidas, simplicidade na maior parte dos métodos, fácil interpretação dos resultados e uma evidência direta das consequências da contaminação (CESAR et al., 2002).

No que se refere a realização dos testes de toxicidade, estes podem ser realizados em laboratórios ou em campo, com sedimento *in natura* ou formulados. O sedimento é um importante compartimento a ser estudado na avaliação dos ecossistemas aquáticos devido a sua capacidade de acumular compostos orgânicos e inorgânicos. Além disso, os macroinvertebrados aquáticos podem viver no sedimento e entrar em contato com os contaminantes presentes nele por meio da ingestão de partículas, contato com as paredes do corpo ou ainda pelas vias respiratórias (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A amostragem do sedimento para o uso em testes de toxicidade pode ser realizada com o auxílio de dragas ou amostradores do tipo *core* (Ver capítulo 1). As amostras podem ser armazenadas em potes plásticos e devem ser transportadas, sob refrigeração. Posteriormente, devem ser armazenadas à temperatura abaixo de 10°C, sem congelamento, por até 60 dias, até o uso nos testes ecotoxicológicos (ABNT, 2015).

A escolha do organismo-teste é baseada no conhecimento de sua fisiologia, biologia e comportamento, além de apresentarem sensibilidade aos compostos químicos, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, ciclos de vida curtos, abundância e disponibilidade nos ambientes aquáticos e, se possível, a espécie deve ser nativa para melhor representatividade dos ecossistemas (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Esses organismos podem ser utilizados individualmente ou em combinação com outros organismos na avaliação dos efeitos agudos, crônicos ou multigeracionais. Os testes são realizados conforme metodologia descrita no capí-

tulo 2, para a avaliação da mortalidade, desenvolvimento, emergência de adultos, fecundidade, tamanho da asa, deformidade do mento, etc.

Para a caracterização do meio aquático, pode ser realizar análises de pH, condutividade elétrica, temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez, transparência, nítrito, nitrato, nitrogênio, fósforo, metais, pesticidas, matéria orgânica, granulometria, entre outras.

Cabe ainda ressaltar sobre a importância do planejamento amostral para delinear as perguntas a serem respondidas e definir os pontos de coleta, a escolha dos pontos de referência para comparar com os pontos de contaminação e o período e frequência de amostragem. No próximo tópico, apresentaremos um estudo de caso comparativo dessas duas formas de “recorte” aplicado para áreas de cana-de-açúcar.

5.5 Estudo de caso: Avaliação do impacto de cana-de-açúcar em córregos, integrando a estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos e os ensaios ecotoxicológicos

Para compor este tópico, apresentaremos os resultados de estudos conduzidos em córregos da região Central do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando duas ferramentas: estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos e testes ecotoxicológicos utilizando o sedimento aquático dos córregos.

Os ambientes aquáticos escolhidos para a realização desse estudo foram agrupados em duas situações distintas, sendo três córregos localizados em áreas de mata preservada (Anhumas, Espraiado e São Vicente) e três córregos localizados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Água Sumida, Chibarro e São João). Os córregos selecionados pertencem a bacia hidrográfica do rio Tietê-Jacaré. As características gerais dos córregos analisados podem ser observadas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Localização, coordenadas geográficas e uso e ocupação do solo dos córregos localizados em área de mata e de cana-de-açúcar.

Córregos	Município	Coordenadas	Usos do solo
	Américo Brasiliense	21°43'34" S 48°01'7,6" W	Mata preservada aberta
Anhumas			
	São Carlos	21°58'52" S 47°52'25" W	Mata preservada fechada
Espraiado			
	Guarapiranga	21°59'45" S 48°15'31" W	Mata preservada fechada*
São Vicente			
	Araraquara	21°56'16" S 48°16'39" W	Cana-de-açúcar
Água Sumida			
	Araraquara e Ibaté	21°52'02" S 48°16'34" W	Cana-de-açúcar
Chibarro			
	Guarapiranga	21°57"50" S 48°15'52" W	Cana-de-açúcar
São João			

*Área com presença de cana-de-açúcar.

Fonte: Elaboração nossa (2021).

A comunidade de macroinvertebrados aquáticos foi coletada pelo método de varredura com auxílio de uma rede em D (malha de 0,25 mm de abertura), durante

1 minuto de esforço amostral (FONTOURA, 1985). As amostras foram acondicionadas em potes de plásticos e encaminhadas ao laboratório, lavadas em peneira de 0,25 mm de abertura de malha, triadas e fixadas em álcool 70%. A identificação taxonômica ocorreu em nível de família utilizando as chaves disponíveis de MUGNAI et al. (2010) e HAMADA et al. (2014).

O sedimento para a realização dos testes de toxicidade foi coletado com auxílio de uma draga de Eckman-Birge (área padrão de 255 cm²), acondicionado em potes de plásticos atóxicos e armazenado em temperatura inferior a 10°C na geladeira (ABNT, 2015). Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica utilizando larvas de *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981, conforme metodologia descrita no Capítulo 2, para a avaliação da mortalidade e do crescimento das larvas. Os resultados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

5.6 Resultados e discussão

A composição da comunidade de macroinvertebrados aquáticos foi diferente entre os dois usos do solo, sendo possível perceber a influência do cultivo de cana-de-açúcar na estrutura da comunidade (Tabela 5.4). As métricas comunitárias forneceram informações consistentes sobre a integridade dos seis córregos estudados (Tabela 5.5).

A maior riqueza da comunidade de macroinvertebrados aquáticos, juntamente com a maior porcentagem de EPT e maior porcentagem de organismos fragmentadores, mostraram melhores condições ecológicas nas áreas de mata ciliar preservadas. Nas áreas de cana-de-açúcar, a ausência de mata ciliar e a aplicação de pesticidas e fertilizantes durante os cultivos, provavelmente influenciaram na qualidade da água e na diminuição da porcentagem de EPT e de organismos fragmentadores, bem como no aumento da porcentagem de Chironomidae e de invertebrados coletores, mostrando que os cultivos agrícolas podem afetar a riqueza de espécies aquáticas.

Tabela 5.4 - Macroinvertebrados aquáticos nos córregos de mata (Anhumas, Espraiado e São Vicente) e de cana-de-açúcar (Água Sumida, Chibarro e São João).

Grupo taxonômico	Anhumas	Espraiado	São Vicente	Água Sumida	Chibarro	São João
Trichoptera						
Calamoceratidae	-	16	2	-	-	-
Hydroptilidae	99	-	-	45	-	-
Hydropsychidae	7	2	-	-	-	-
Leptoceridae	2	42	-	-	3	-
Polycentropodidae	8	-	-	-	13	-
Odontoceridae	-	2	-	-	-	-
Ephemeroptera						
Baetidae	5	25	-	-	23	-
Leptohyphidae	4	-	-	-	6	-
Leptophlebiidae	-	21	-	-	-	-
Plecoptera						
Gripopterygidae	-	14	-	-	-	-
Perlidae	-	3	-	-	-	-
Odonata						
Aeshnidae	-	2	-	-	-	-
Calopterygidae	2	-	-	-	4	-
Coenagrionidae	13	1	2	3	25	1
Gomphidae	-	-	12	-	-	-
Libellulidae	11	-	24	7	-	1
Protoneuridae	-	1	-	-	-	-
Coleoptera						
Scirtidae	-	-	-	-	-	1
Dytiscidae	3	1	1	7	1	5
Hydrophilidae	-	-	-	1	-	3
Dryopidae	-	-	1	3	-	-
Elmidae	-	4	-	-	-	-
Diptera						
Ceratopogonidae	13	3	13	8	6	4
Culicidae	-	-	-	-	-	3

Dixidae	-	10	-	-	-	-	-
Simuliidae	1	-	-	-	-	-	-
Syrphidae	-	-	-	-	-	-	1
Psychodidae	3	-	-	-	-	-	-
Tabanidae	-	1	-	-	-	-	-
Chironomidae	438	175	68	203	101	151	
Lepidoptera	1	1	-	3	1	-	
Hemiptera							
Belostomatidae	3	1	5	3	-	8	
Hebridae	-	3	-	-	-	1	
Naucoridae	-	2	-	-	-	-	
Pleidae	-	127	-	-	-	-	
Veliidae	-	1	-	-	-	-	
Oligochaeta	47	-	77	28	90	8	
Total	660	458	205	311	273	187	

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Tabela 5.5 - Métricas comunitárias aplicadas à comunidade de macroinvertebrados aquáticos dos córregos de mata (Anhumas, Espraiado e São Vicente) e de cana-de-açúcar (Água Sumida, Chibarro e São João).

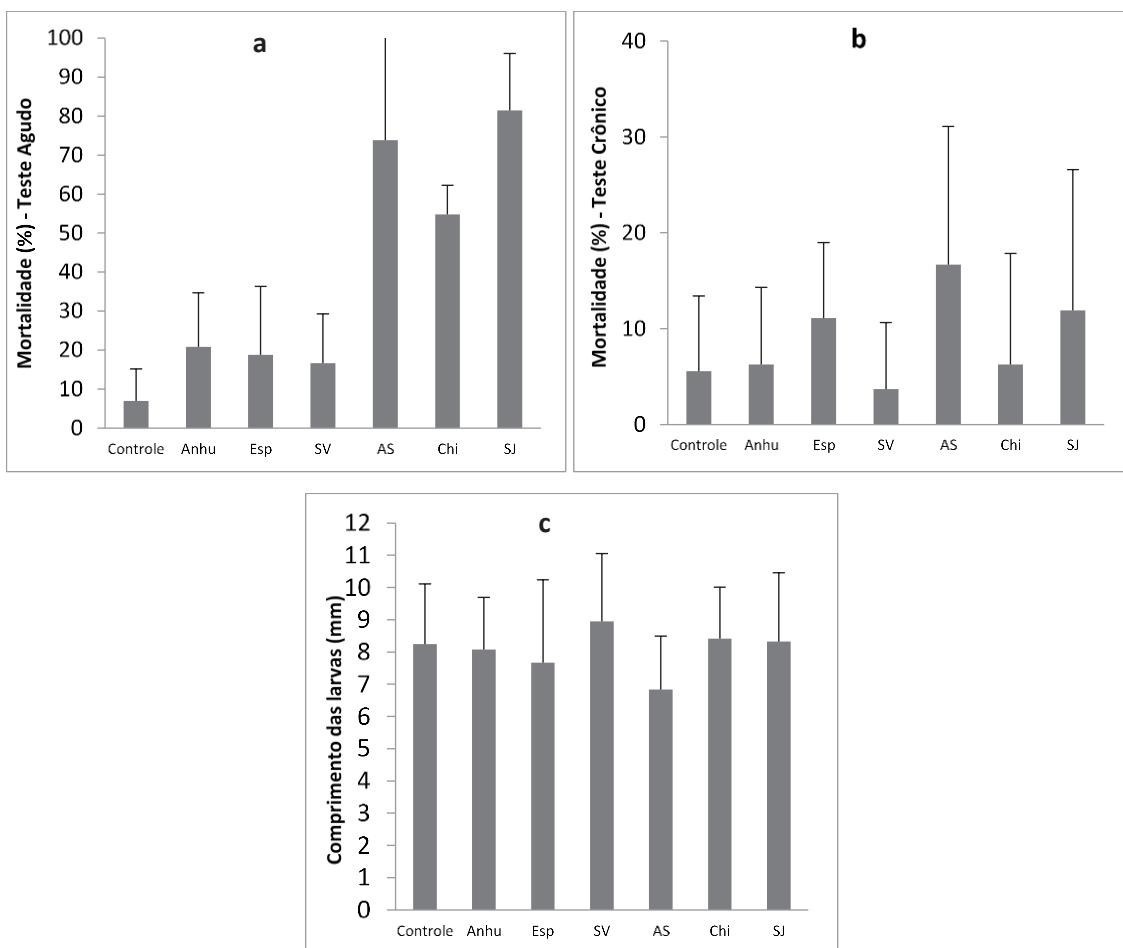
Métricas	Anhumas	Espraiado	São Vicente	Água Sumida	Chibarro	São João
Abundância	660	458	205	311	273	187
Número de táxons	17	23	10	11	11	12
Número de famílias	15	22	9	9	9	11
Dominância	0,46	0,23	0,27	0,45	0,26	0,65
% Ephemeroptera	1,36	10,04	0	0	10,62	0
% Plecoptera	0	3,71	0	0	0	0
% Trichoptera	17,58	13,54	0,98	14,47	5,86	0
% EPT	18,94	27,29	0,98	14,47	16,48	0
% Chironomidae	66,36	38,21	33,17	65,27	37,00	80,75
% Chironomidae/total	20,92	8,36	3,25	9,69	4,82	7,21
Diversidade de Shannon	1,27	1,88	1,56	1,24	1,63	0,89
Riqueza de Margalef	2,46	3,59	1,69	1,74	1,78	2,10
% Coletores	26,21	34,28	53,17	73,31	68,13	83,96

%Fragmentadores	0,45	15,94	1,46	1,93	1,47	0
BMWP	86	120	36	43	53	47
BMWP/Classificação	Excelente	Excelente	Ruim	Ruim	Regular	Regular

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Para o teste de toxicidade aguda (Figura 5.3a) foi observada diferença significativa ($p<0,05$) entre as áreas de cana-de-açúcar e o controle, mostrando que o sedimento dos córregos de cana-de-açúcar influenciou negativamente na taxa de sobrevivência de *C. sancticaroli*. Por outro lado, no geral, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre o controle e as áreas de cana-de-açúcar para os resultados de mortalidade (Figura 5.3 b) e comprimento das larvas retiradas do teste de toxicidade crônica (Figura 5.3 c).

Figura 5.3 - Valores médios e desvio padrão da mortalidade (%) de larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao teste de toxicidade aguda (a), ao teste de toxicidade crônica (b) e comprimento larval (c), dos 6 córregos estudados (Anhu=Anhumas; Esp=espriado; SV=São Vicente; AS= Água Sumida; Chi=Chibarro e SJ=São João).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

As métricas comunitárias e os testes ecotoxicológicos são duas importantes ferramentas que tem auxiliado no monitoramento dos ecossistemas aquáticos (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008; HEPP; SANTOS; 2009; DORNFELD et al., 2009; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2011; EGLER et al., 2012; REBECHI et al., 2014; CHAGAS et al., 2017; BEGHELLI et al., 2018; PINTO et al., 2021). São duas ferramentas que avaliam respostas diferentes em relação às modificações das condições ambientais causadas nas comunidades biológicas. Porém, com os resultados deste estudo foi possível perceber que as métricas comunitárias responderam melhor que os testes ecotoxicológicos aos impactos da cana-de-açúcar, sendo a ferramenta mais adequada para a análise desse tipo de impacto ambiental.

5.7 Experiências de campo e laboratório

Neste tópico apresentaremos algumas situações que podem ocorrer durante os experimentos em campo ou em laboratório, nas coletas, na etapa de identificação dos organismos ou na realização dos testes ecotoxicológicos. Este tópico visa compartilhar experiências que foram vivenciadas pelos autores e que possam auxiliar em trabalhos futuros.

A coleta é o primeiro passo para a realização dos experimentos, sejam eles com a comunidade aquática ou com os testes ecotoxicológicos, mas muitas vezes pode ser difícil acessar o ponto de interesse, devido a uma grande faixa de mata ciliar ou o ponto de coleta estar localizado dentro de propriedade particular ou de uma área pública. Nessa situação, é preciso fazer uma visita prévia ao local de estudo e verificar as condições de acessibilidade ao ponto de coleta. Também é possível verificar por meio da ferramenta Google Earth, conversando com colegas de trabalho que já fizeram coleta naquela área ou próximo dela ou ainda solicitar autorização para acesso. O córrego Água Sumida, por exemplo, está localizado em uma propriedade particular e o córrego São Vicente contém alguns trechos de cana-de-açúcar, plantação de eucalipto e mata ciliar para percorrer até a chegada ao córrego. Para o córrego Anhumas foi preciso autorização, pois sua nascente está localizada dentro de um clube aquático. Por outro lado, o acesso foi livre para o córrego Espraiado, por estar localizado em uma área pública (Parque Ecológico) e para os córregos Chibarro e São João, por estarem localizados próximos à rodovia, facilitando a coleta.

A paisagem muda constantemente e entre o período de uma coleta e outra, pode ocorrer de o ponto não estar mais acessível para coletar, pois a vegetação pode ter crescido rapidamente no local. Além disso, longos períodos chuvosos ou alagamentos no local de coleta podem dificultar ou impedir o acesso até o córrego. Dessa forma, é preciso coletar em locais próximos ao ponto original de coleta ou onde for

possível a acessibilidade. Por exemplo, o ponto de coleta do córrego Água Sumida, na segunda visita de campo, já não estava mais apropriado para fazer a amostragem do material, pois foi tomado pela vegetação e pelas algas. Assim, foi preciso coletar em um ponto mais acima. O córrego São Vicente estava alagado e foi preciso coletar em um ponto em que o acesso até o córrego não estava comprometido.

Além da mudança na paisagem, a toxicidade do ponto de coleta pode mudar ao longo do tempo. Em alguns córregos foi verificado que os dados da comunidade aquática não estavam correspondendo com os dados da coleta anterior, de modo que quase não havia organismos amostrados. Em outro momento, os testes de toxicidade causaram letalidade total, nenhum organismo sobrevivia, mesmo repetindo o teste mais de uma vez. Com isso, é preciso verificar a toxicidade do sedimento por meio de análises químicas de metais e pesticidas, por exemplo. Verificar se não há nenhum ponto de contaminação ou lançamento de poluentes próximo ao local de coleta ou ainda, observar as características da água, como cheiro, presença de espuma, velocidade do fluxo, e se for possível, substituir o ponto de coleta por outro.

Em relação a amostragem do sedimento para os testes ecotoxicológicos, foi preciso adaptar a ferramenta de coleta, pois a profundidade de alguns córregos era muito baixa. Para isso, substituímos o amostrador do tipo draga por espátulas de plásticos (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Amostrador de sedimento: Espátula de plástico.



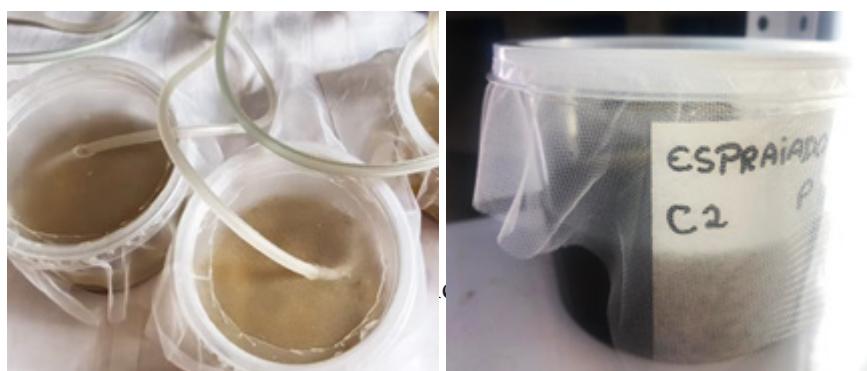
Fonte: LEAA (2021).

A lavagem do material amostrado para a identificação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos é importante para a remoção de partículas finas e melhor visualização dos organismos durante a triagem. Nessa etapa foi observado que, mesmo tomando os devidos cuidados na hora da lavagem, como baixa velocidade do fluxo da água da torneira, ainda assim foi verificado que alguns organismos foram fragmentados. Em alguns casos, os organismos perderam suas brânquias abdominais, parte dos filamentos caudais, das garras e das pernas, comprometendo

sua identificação. Por outro lado, observou-se experiências positivas, como o uso de bandejas transiluminadas, facilitando a triagem dos organismos.

Durante a realização dos testes de toxicidade foi verificado o acúmulo de gotículas de água na tampa do pote, devido a aeração. Para evitar que isso ocorresse e prejudicasse os resultados, uma parte da tampa foi cortada e um pedaço de tule foi colocado embaixo da tampa, permitindo assim maior circulação do ar e da água (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Adaptação dos potes com tule para serem utilizados nos testes de



Fonte: LEAA (2021).

Outra adaptação realizada foi em relação a contagem das larvas após os testes de toxicidade. Por conterem matéria orgânica, as amostras de sedimento ficavam escuras, dificultando a visualização das larvas. Para isso, foi adotado o procedimento de lavagem das amostras com peneira, antes da contagem das larvas. A utilização de bandejas transiluminadas também se fez necessário para melhor visualização das larvas.

5.8 Considerações Finais

As métricas comunitárias indicaram que o cultivo de cana-de-açúcar causou alterações na estrutura da comunidade de macroinvertebrados aquáticos. Por outro lado, a sobrevivência e o comprimento larval de *C. sancticaroli* não foram afetados quanto expostas ao sedimento dos córregos de cana-de-açúcar, indicando que as métricas comunitárias foram mais adequadas para a avaliação deste tipo de impacto ambiental. Os efeitos da cana-de-açúcar puderam ser observados em diferentes níveis de organização biológicas (população e comunidades) simultaneamente, permitindo pesquisas interdisciplinares e a escolha da melhor ferramenta a ser utilizada. Cabe ressaltar, que essas duas ferramentas também podem ser aplicadas para outros tipos de cultura, como milho, soja ou outros usos e ocupação do solo.

Este capítulo também compartilha experiências vividas em campo e laboratório que possam ser utilizadas em estudos futuros, em especial para estudantes em início de carreira. Às vezes, diante da limitação de cada laboratório e da disponibilidade de recursos e de materiais, precisamos adaptar os equipamentos disponíveis. Cabe ressaltar ainda sobre a dificuldade de trabalhar com amostras ambientais, devido às rápidas mudanças que os ambientes sofrem entre uma coleta e outra, em relação às paisagens naturais, a sazonalidade e a toxicidade.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo nº 168736/2018-7) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes – Processo nº 88887.339553/2019-00 e Processo nº 88887.499485/2020-00).

Referências

AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA (AGEITEC). Cana-de-açúcar. Acesso em: 4 de maio de 2021. Disponível em: https://www.agencia.cnpq.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_102_22122006154841.html.

ALBA-TERCEDOR, J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. **IV Simposio del Agua en Andaluzia (SIAGA)**, Almeria, v. 2, p. 203-13. ISBN: 84-784. 1996.

ARMITAGE, P. D.; MOSS, D.; WRIGHT, J. F.; FURSE, M. T. The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running water sites. **Water research**, v. 17, n. 3, p. 333-347, 1983.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR 15469: Ecotoxicología - Coleta, preservação e preparo de amostras**. ABNT, Rio de Janeiro, 22p., 2015.

AZEVEDO-PEREIRA, H. M. V. S.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M. Behaviour and Growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under Imidacloprid Pulse and Constant Exposure Scenarios. **Water Air Soil Pollut**, v. 219, p. 215-224, 2011.

BAPTISTA, D. F. Uso de macroinvertebrados em procedimentos de biomonitoramento em ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, n.3, p.425-441, 2008.

BAPTISTA, D. F.; BUSS, D. F.; EGLER, M. **Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 162, 2003.

BAPTISTA, D. F.; BUSS, D. F.; EGLER, M.; GIOVANELLI, A.; SILVEIRA, M. P.; NESSIMIAN, J. L. A multimetric index based on benthic macroinvertebrates for evaluation of Atlantic Forest streams at Rio de Janeiro State, Brazil. *Hydrobiologia*, v. 575, p. 83-94, 2007.

BARBOUR, M. T.; GERRITSEN, J.; GRIFFITH, G. E.; FRYDENBOURG, R.; McCA-RRON, E.; WHITE, J. S.; BASTIAN, M. L. A framework for biological criteria for Florida streams using benthic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*, v. 15, p. 185-211, 1996.

BARMENTLO, S. H., SCHRAMA, M., HUNTING, E. R., HEUTINK, R., VAN BODEGOM, P. M., DE SNOO, G. R., VIJVER, M. G. Assessing combined impacts of agrochemicals: Aquatic macroinvertebrate population responses in outdoor mesocosms. *Science of the Total Environment*, v. 631, p. 341-347, 2018.

BEGHELLI, F. G. S.; LOPEZ-DOVÁL, J. C., ROSA, A. H.; POMPÉO, M.; CARLOS, V. M. Lethal and sublethal effects of metal-polluted sediments on *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino, 1981. *Ecotoxicology*, v. 27, n. 3, p. 286-299, 2018.

BOWNIK, A.; SZABELAK, A. Short-term effects of pesticide fipronil on behavioral and physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-11, 2021.

BRINKHURST, R. O.; MARCHESE, M. R. **Guía para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de sud y centroamerica.** 2^a ed. Santo Tomé, Colección CLIMAX, n. 6, 207p., 1992.

BUSS, D. F; BAPTISTA, D. F; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, p. 465-473, 2003.

BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. F. Monitoramento Biológico de ecossistemas aquáticos continentais. *Oecologia Brasiliensis*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 12, p. 339-345, 2008.

CALLISTO, M.; ESTEVES, F. A. Distribuição da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em um lago amazônico impactado por rejeito de bauxita, Lago Bataia (Pará, Brasil). *Oecologia Brasiliensis*, v. 1, n. 1, p. 281-291, 1995.

CALLISTO, M.; GONÇALVES J. F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. *Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais*, v. 1, p. 1-12, 2005.

CESAR, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R.; MARÍN, A. Sensibilidad de anfípodos y erizos del Mar Mediterráneo a substancias tóxicas de referencia. *Ciencias Marinas*. v. 28, n. 4, p. 407-417, 2002.

CHAGAS, F. B.; RUTKOSKI, C. F.; BIENIEK, G. B.; VARGAS, G. D. L. P.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Utilização da estrutura de comunidades de macroinvertebrados bentônicos como indicador de qualidade da água em rios no Sul

do Brasil. **Ambiente; Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12, n. 3, p. 416-425, 2017.

CLEMENTS, W. H., Integrating effects of contaminants across levels of biological organization. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 7, n. 2, p. 113-116, 2000.

COLOMBO-CORBI, V., GORNI, G. R., SANZOVO-FALCOSKI, T., COSTA, P. I., CORBI, J. J. Genetic Diversity Loss in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) Exposed to Pyrimethanil Fungicide: Analysis Using RAPD Technique. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 228, n. 10, p. 399, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2020**. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 2020.

CORBI, J. J. Invertebrados aquáticos como ferramenta para a avaliação do impacto de metais em córregos adjacentes ao cultivo de cana-de-açúcar. In: **Ciências Ambientais: Recursos Hídricos**, p. 201, 2020.

CORBI, J. J.; COSTA, C. G.; GORNI, G. R.; COLOMBO, V.; RIOS, L. Environmental diagnosis of metals in streams near sugarcane cultivation areas: current and historical analysis in the central region of the State of São Paulo. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2711-2719, 2018.

CORBI, J. J., FROEHLICH, C. G., STRIXINO, S. T., SANTOS, A. D. Bioaccumulation of metals in aquatic insects of streams located in areas with sugar cane cultivation. **Química Nova**, v. 33, p. 644-648, 2010.

CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A. D.; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 61-65, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Influence of taxonomic resolution of stream macroinvertebrate communities on the evaluation of different land uses. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 18, n. 4, p. 469-475, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, 2008.

COSTA, J. M; SOUZA, L. O. I.; OLDRINI, B. B. **Chave para identificação das famílias e gêneros das larvas conhecidas de Odonata do Brasil: comentários e registros bibliográficos (Insecta, Odonata)**. Museu Nacional, 2004.

CUMMINS, K. W.; WILZBACH, M. A.; GATES, D. M.; PERRY, J. B.; TALIAFERRO, W. B. Shredders and riparian vegetation. **Bioscience**, v. 39, n. 1, p. 24-30, 1989.

DEVÁI G. Ecological background and importance of the change of chironomid fauna in shallow Lake Balaton. **Hidrobiologia**, v. 191, p. 189-198. 1990.

DORNFELD, C. B.; MOREIRA-SANTOS, M.; ESPINDOLA, E. L.; RIBEIRO, R. Do larvae and ovipositing *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) females avoid copper-contaminated environments? **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 15, n. 1, p. 63-75, 2009.

EGLER, M.; BUSS, D. F.; MOREIRA, J. C.; BAPTISTA, D. F. Influence of agricultural land-use and pesticides on benthic macroinvertebrate assemblages in an agricultural river basin in southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 437-443, 2012.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Interciênciac. 826p., 2011.

FERNANDES, H. R.; DOMINGUES, E. **Guia para determinación de los artrópodos bentónicos Sudamericanos**. Tucumán, Universidad Nacional de Tucumán, 282p. 2001.

FONTOURA, A. P. **Manual de vigilância da qualidade das águas superficiais. Avaliação biológica da qualidade da água**. Instituto de zoologia. Faculdade de Ciências - Universidade do Porto. Porto - Portugal. 38p., 1985.

FROEHLICH, C. G. (org.) Guia on-line: **Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo**. [São Paulo: s.n.], 2007.

FU, L., JIANG, Y., DING, J., LIU, Q., PENG, Q. Z., KANG, M. Y. Impacts of land use and environmental factors on macroinvertebrate functional feeding groups in the Dongjiang River basin, southeast China. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 31, n. 1, p. 21-35, 2016.

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Editora INPA, 724p, 2014.

HEPP, L. U.; SANTOS, S. Benthic communities of streams related to different land uses in a hydrographic basin in southern Brazil. **Environmental monitoring and Assessment**, v. 157, n. 1-4, p. 305-318, 2009.

HEPP, L. U.; URBIM, F. M.; TONELLO, G.; LOUREIRO, R. C.; SAUSEN, T. L.; FORNEL, R.; RESTELLO, R. M. Influence of land-use on structural and functional macroinvertebrate composition communities associated on detritus in Subtropical Atlantic Forest streams. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 28, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS (IBAMA). **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos**. 2019. Acesso em: 27 de abril de 2021. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos> >.

JUNQUEIRA, V. M.; CAMPOS, S. C. M. Adaptation of the "BMWP" method for water quality evaluation to Rio das Velhas watershed (Minas Gerais, Brazil). **Acta Limnol. Brasiliensis**, v. 10, n. 2, p. 125-135, 1998.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasilienses*, v. 12, n. 3, p. 355 - 381, 2008.

MELLO, J. L.; CARDOSO, B. N.; COLOMBO-CORBI, V.; CORBI, J. J. Effects of Agrochemicals on Freshwater Macroinvertebrates: Challenges and Perspectives from Southeastern Brazil. *Limnology and Oceanography Bulletin*, v. 28, n. 1, p. 1-4, 2019.

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

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environmental Pollution*, v. 60, p. 101-139, 1989.

MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos, 176 p, 2010.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA, J.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M.; GRAVATO, C. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquatic Toxicology*, v. 124, p. 209-216, 2012.

PINDER, L. C. V.; LADLE, M.; GLEDHILL, T.; BASS, J. A. B.; MATTHEWS, A. M. Biological surveillance of water quality. 1. A comparison of macroinvertebrate surveillance methods in relation to assessment of water quality, in a chalk stream. *Arch. Hydrobiol.* v. 109, n. 207-226, 1987.

PINTO, T. J.; MOREIRA, R. A.; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. Impact of 2, 4-D and fipronil on the tropical midge *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 209, p. 111778, 2021.

QUEIROZ, J. F.; TRIVINO-STRIXINO, S.; NASCIMENTO, V. M. C. **Organismos bentônicos bioindicadores da qualidade das águas da bacia do médio São Francisco.** Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 1-4. 2000.

REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; GUIOSKI, I. C.; ASSIS, H. C.; NAVARRO-SILVA, M. A. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 58, n. 3, p. 296-301, 2014.

RESH, V. H.; JACKSON, J. K. Rapid assessment approaches to biomonitoring using benthic macroinvertebrates. In: **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates.** Rosenberg, D. M., Resh, V. H. (Eds), p. 195-233. Chapman and Hall, New York, 1993.

ROSENBERG, D.; RESH, V. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates.** Chapman; Hall, New York, 488p., 1993.

CAPÍTULO 6

EXPERIÊNCIAS UTILIZANDO UM MÉTODO DE TAXA DE CRESCIMENTO INSTANTÂNEO DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS, EM RIACHOS TROPICAIS

*EXPERIENCES USING AN INSTANTANEOUS
GROWTH RATE METHOD OF
MACROINVERTEBRATES, IN TROPICAL STREAM*

Daniel Peroni Abrahão
José Leonardo Mell
Matt While
Juliano J. Corbi

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.6

Resumo

Os recursos hídricos vêm sendo cada vez mais comprometidos devido aos impactos antrópicos que modificam o ambiente aquático e interferem na estrutura das comunidades aquáticas. Nos últimos anos, um vasto número de estudos vem sendo desenvolvidos em ambientes aquáticos, em virtude da sua importância para a população humana e também para o estabelecimento de organismos que dependem desses ecossistemas e fazem parte das teias tróficas. Ferramentas biológicas têm tido destaque para o monitoramento e avaliação dos ambientes aquáticos, devido à relação direta dos organismos com o ambiente durante todo o seu ciclo de vida. A produção secundária em ambientes aquáticos é uma ferramenta muito importante, pois estuda o sucesso na sobrevivência do organismo consumidor, agrupando vários componentes populacionais como densidade, biomassa, crescimento, reprodução e sobrevivência, fornecendo uma inter-relação entre as populações e os ecossistemas. Neste capítulo apresentaremos um estudo de caso que avaliou a taxa de crescimento instantâneo por meio de câmaras *in situ* em córregos de Cerrado, pela análise da comunidade de Chironomidae e Ephemeroptera, com o objetivo de identificar os possíveis fatores que motivam os padrões do ciclo de vida e dimensão destas populações. Será possível conferir como os resultados demonstraram a importância desses táxons para o sistema e não devem ser descartados em estudos de produção secundária.

Palavras-chave: Macroinvertebrados aquáticos. Produção secundária. Taxa de crescimento instantâneo.

Abstract

Water resources are being increasingly compromised due to the anthropic impacts that modify the aquatic environment and alter the aquatic community's structure. Nowadays, many studies have been carried out in aquatic environments, due to their importance to the human population, and to the establishment of organisms that depend on these ecosystems and are part of the trophic webs. Biological tools have been highlighted for the monitoring and evaluation of aquatic environments, due to the direct relationship of organisms with the environment throughout their life cycle. Secondary production in aquatic environments is an important tool because it can study the success in the survival of the consumer organisms, bringing together several population components such as density, biomass, growth, reproduction and survival, providing an interrelationship between populations and ecosystems. In this chapter we will present a case study that evaluated the instantaneous growth rate by means of chambers *in situ* in Cerrado streams, by analyzing

the community of Chironomidae and Ephemeroptera in order to identify the possible factors that motivate the life cycle and dimension patterns of these populations. The results showed how important these taxa are to the system and should not be discarded in studies of secondary production.

Keywords: Aquatic Macroinvertebrates. Secondary production. Instantaneous growth rate.

6.1 Corpos d'água, uso do solo e macroinvertebrados aquáticos

Como apresentado no capítulo anterior, estudos envolvendo a análise da presença de macroinvertebrados podem indicar características dos ecossistemas aquáticos. Neste capítulo, veremos com mais detalhe como algumas espécies se comportam em seu habitat.

Córregos ou riachos são ambientes caracterizados por uma diversidade de processos que contribuem para o equilíbrio ambiental e para os serviços ecossistêmicos, consequentemente, para a manutenção da qualidade de vida humana. Entretanto, os cursos d'água são especialmente vulneráveis aos impactos ocasionados pelas atividades antrópicas, particularmente aqueles relacionados às alterações no uso e ocupação do solo e à intensificação das atividades agrícolas (GILLER et al., 2004; VÖROSMARTY et al., 2010). Estes ambientes estão conectados diretamente à vegetação ciliar, conhecida também como vegetação ripária, presente no seu entorno. Esta vegetação pode ser considerada uma interface entre os ecossistemas aquáticos e terrestres (NAIMAN et al., 2010), desempenhando importantes funções para a integridade ambiental dos cursos de água. A cobertura vegetal é responsável, por exemplo, pela filtração de nutrientes e poluentes provenientes de atividades agrícolas e mitigação de processos erosivos (SWEENEY et al., 2004; VERHOEVEN et al., 2006), estabilização das margens, aumento da heterogeneidade do leito fluvial, e consequente aumento da variedade de habitats para as comunidades biológicas (NAIMAN et al., 2010), em especial aos macroinvertebrados aquáticos (ver definição no capítulo 5). A cobertura vegetal, por meio do sombreamento, também contribui com a proteção dos cursos de água contra significativas flutuações de temperaturas (LIMA; ZAKIA, 2001).

As alterações no uso do solo no entorno dos riachos podem representar uma quebra na ligação entre os sistemas aquático e terrestre (SNYDER et al., 2003) e podem acarretar diversas consequências, não só para a biodiversidade aquática, como para importantes processos ecológicos, como a produção primária e secundária de energia, a respiração do ecossistema e a ciclagem de nutrientes (SWEENEY et al.,

2004; LEPORI et al., 2005). A proteção das áreas de vegetação ripária é considerada de extrema importância para a preservação da integridade funcional e biológica dos cursos de água (GREGORY et al., 1991).

A produção secundária pelos macroinvertebrados aquáticos está intimamente relacionada ao balanço entre a produção primária e a contribuição de matéria orgânica alóctone nos ambientes aquáticos. A produção secundária pode ser definida como o desenvolvimento de biomassa de organismos heterotróficos ao longo do tempo (BENKE, 1984). A mensuração da produção secundária possui papel essencial no entendimento da dinâmica dos ecossistemas aquáticos, uma vez que a produção é uma das principais vias do fluxo de energia nesses ambientes (WATERS, 1977; DOWNING, 1984). Em riachos, a produção secundária de macroinvertebrados pode ser controlada pelas diferentes fontes de carbono (STAGLIANO; WHILES, 2002) e pode sofrer influência de fatores como a heterogeneidade espacial, temperatura e características químicas da água (BRAND; MISERENDINO, 2012). Em regiões que apresentam regimes térmicos mais estáveis, as taxas de produção e biomassa tendem a ser mais elevadas, independentemente da estação do ano (BOTTOVÁ et al., 2013).

Logo o estudo de ambientes prístinos, aqueles que possuem o mínimo de impacto, proverão o conhecimento da interação entre as populações das espécies do bioma, ou local estudado, fornecendo dados para que possamos nos dedicar à conservação destes locais. Tais informações nos revelam dados do quanto cada espécie é importante para aquele ambiente e as interações entre elas, o conhecimento de aspectos das comunidades aquáticas e a distribuição de táxons podem ter reflexos diretos no entendimento de padrões eco regionais e no aprimoramento de técnicas de avaliação de impactos.

6.2 Produção secundária e crescimento instantâneo

Para entendermos melhor o conceito de produção secundária, precisamos do conceito de produção primária. Segundo Odum (1988) a produção primária é a taxa de energia solar convertida, pela atividade fotossintética e quimiossintética em organismos produtores, base dos níveis tróficos, em substâncias orgânicas (transformação do carbono inorgânico em orgânico). O mesmo autor afirma que a produção secundária é a assimilação do carbono, que foi transformado anteriormente de inorgânico para orgânico por organismos produtores (produção primária) através da fotossíntese.

Podemos dizer também que produção secundária são todos os processos envolvidos no consumo, a partir do segundo nível trófico, transformação e utilização da matéria orgânica por todos os consumidores, ou seja, toda a matéria orgânica armazenada pelos consumidores é quantificada pelo aumento da biomassa que se dá pela transformação do alimento em matéria assimilável por unidade de tempo (TUNDISI;MATSUMURA-TUNDISI, 2008). É o mecanismo pelo qual a população existe ou mantém sua existência, ou seja, é a ligação para o fluxo de massa e energia através dos níveis tróficos (SANTOS-WISNIEWSKI, 1998).

A produção secundária é uma medida da importância e sucesso do consumidor, incorporando vários componentes do desempenho ecológico, incluindo densidade, biomassa, crescimento, reprodução e sobrevivência (BENKE;HURYN, 2006). As estimativas de produção secundária fornecem uma ligação entre as populações e os ecossistemas, permitindo também uma melhor caracterização da estrutura comunitária. Estas estimativas são importantes para a compreensão da dinâmica do fluxo de energia em riachos (BENKE, 1993). Este tipo de estudo, produção secundária por meio de macroinvertebrados em ecossistemas aquáticos, é bastante difundido em regiões temperadas (BENKE 1993; HURYN;WALLACE, 2000). No entanto, há um déficit de estudos similares em ecossistemas aquáticos em regiões tropicais (RAMIREZ; PRINGLE 1998; DUDGEON, 1999). Pelo estudo da produção secundária é possível conhecer o funcionamento dos ecossistemas como o fluxo de energia através dos diferentes níveis tróficos e a dinâmica das populações, e estes aspectos podem ser utilizados para estudos de manejo e preservação dos ecossistemas aquáticos (COLON-GAUD et al., 2009).

Estudos utilizando macroinvertebrados de água doce têm progredido ao longo das últimas décadas a partir de descrições de histórias de vida, distribuição e diversidade de estudos com maior ênfase em processos ecológicos ou função ecológica, incluindo o fluxo de energia, dinâmica da matéria orgânica, primária e produção secundária, e de decomposição (BENKE, 1993). A grande maioria dos estudos tem produção secundária focada em invertebrados, em que uma estimativa exata e precisa da produção é uma exigência crucial para a análise do fluxo de energia. Produção através de macroinvertebrados aquáticos, ou a sua formação de biomassa ao longo do tempo, foi agora estimado para uma vasta gama de habitats de água doce, especialmente córregos e rios (HURYN; WALLACE, 2000; BENKE, 2010).

Em córregos de águas quentes, como os encontrados em regiões áridas e semi-áridas, as taxas de crescimento instantâneo e a falta de sincronia no desenvolvimento são características comuns de populações de insetos, especialmente entre

o Diptera e alguns Ephemeroptera (GRAY, 1981; FISHER; GRAY, 1983; JACKSON; FISHER, 1986; BENKE; PARSON, 1990). Diptera e Ephemeroptera muitas vezes são esquecidos ou ignorados nos estudos de produção devido a dificuldades em reconhecer coortes (tempo de vida de cada indivíduo nascido em um determinado período) ou estimar o intervalo de produção de coorte (BENKE, 1984).

Espécies de Chironomidae, em sua maioria, completam o seu desenvolvimento em temperaturas que variam de 0°C a 32°C. Com o aumento da temperatura tem-se uma aceleração não só nas reações químicas, mas também nos processos fisiológicos em geral, visivelmente no crescimento e desenvolvimento. Estudos com espécies de regiões tropicais têm mostrado que as mesmas, que encontram condições térmicas favoráveis, completam seu ciclo em torno de 15 dias, o que faz prever um elevado número de gerações por ano (STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1995).

Ephemeroptera constituem uma parte importante da biomassa e da produção de macroinvertebrados em habitats de água doce (BRITTAINE, 1982). As variações sazonais na densidade, biomassa e produção anual são fortemente influenciadas por parâmetros de ciclo de vida, indicando a importância do ciclo de vida de informações corretas em estudos de produção. Muitos estudos sobre produção secundária em ambientes lóticos através destes insetos possuem dados derivados de laboratório utilizados para fazer generalizações relativas a histórias de vida ou taxas de crescimento, mas, muito específico da espécie, poucos estudos têm sido realizados em campo utilizando dados de história de vida para examinar produção secundária (CHRISTMAN; VOSHELL, 1992).

Insetos aquáticos, tais como Ephemeroptera, desempenham um papel ecológico importante dentro de ambientes lóticos, onde constituem boa parte da biomassa e da produção macroinvertebrados (BRITTAINE, 1982). Em pequenos corpos d'água, a temperatura é o principal fator ecológico que afeta a sazonalidade, crescimento e desenvolvimento de padrões de insetos aquáticos, quando as espécies possuem condições ideais de habitats (LEARNER; POTTER, 1974; OERTLI, 1995), não sendo diferente para Ephemeroptera (VANNOTE; SWEENEY, 1980; WARD; STANFORD, 1982; SWEENEY et al., 1986; BRITTAINE, 1990; NEWBOLD et al., 1994). A temperatura também influencia nas densidades através do crescimento (CEREGHINO; LAVANDIER, 1998), no tamanho do adulto e na fecundidade (PRITCHARD; ZLOTY, 1994).

Infelizmente, os estudos de dinâmica populacional de Ephemeroptera são muito escassos e/ou limitados à descrição da fenologia ciclo de vida (estudo das relações entre processos ou ciclos biológicos e o clima) (GONZÁLEZ et al., 2001).

Para os diferentes estudos utilizando a produção secundária com macroinvertebrados para avaliação dos fatores ambientais e antrópicos que influenciam na dinâmica desse grupo é de extrema importância o planejamento adequado da metodologia que será utilizada. Quando falamos em metodologia logo buscamos um delineamento, que possui papel importante na pesquisa científica, no sentido de articular planos e estruturas a fim de obter respostas para os problemas estudados. Delineamento focaliza a maneira com que o problema de pesquisa é concebido e colocado em uma estrutura que se torna um guia para a experimentação, coleta de dados e análise, sendo assim, o delineamento é intrínseco à pesquisa científica, fazendo com que o pesquisador busque uma resposta para determinado problema (RAUPP, 2006).

Metodologia científica é uma ferramenta colocada à disposição do pesquisador que pretende penetrar no segredo de seu objeto de estudo, é a ordem que se deve impor aos diversos processos necessários para atingir um fim dado ou um resultado desejado. O método científico é uma série de processos ordenados que o pesquisador aplica para obter o conhecimento adequado do problema que se propõe definir (SANTOS, 2012). No item 6.3 traremos uma demonstração do delineamento metodológico aplicado a um estudo de caso.

6.3 Estudo de caso

Para entendermos melhor a aplicação da produção secundária como ferramenta de biomonitoramento vamos analisar um estudo de caso que avaliou o crescimento instantâneo de Chironomidae e Ephemeroptera em córregos de Cerrado. Nesse estudo foram utilizadas câmaras de crescimento *in situ* em três córregos e identificado os possíveis fatores que motivam os padrões do ciclo de vida e dimensão das populações dos organismos citados no Cerrado da região central do Estado de São Paulo.

6.3.1 Área de Estudo

Foram estudados três trechos de riachos com diferentes fisionomias presentes em áreas de Cerrado, situadas no município de São Carlos – São Paulo (Figura 6.1). A seleção de trechos de cursos de água com diferentes características na cobertura de vegetação ripária e no uso e ocupação do solo em seus entornos teve como objetivo delimitar um gradiente ambiental no bioma estudado. Além disso, os riachos escolhidos para esse estudo encontram-se em áreas relativamente preservadas, com baixos níveis de perturbação ou alteração em suas condições naturais. Dessa maneira, procurou-se evitar a interferência de fatores estressores sobre os processos

estudados, como a poluição por nutrientes, sedimentos ou compostos tóxicos. Os córregos estudados foram, o do Espraiado, o córrego do Broa e o da fazenda Canchim (Embrapa), cujas coordenadas seguem na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Estações de coleta no Cerrado (SP) e suas respectivas coordenadas geográficas.

Estação de coleta	Coordenadas geográficas
Córrego do Espraiado	21°58'46.75"S - 47°52'23.11"O
Córrego do BROA	22°11'40.93"S - 47°53'55.78"O
Córrego Canchim (EMBRAPA)	21°58'00.73"S - 47°50'33.73"O

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Figura 6.1 - Fisionomia geral dos córregos estudados, Espraiado (A), Canchim (Embrapa) (B) e Broa (C).



Fonte: LEAA (2021).

6.3.2 Crescimento instantâneo e produção secundária

O método de crescimento instantâneo (IGR) é utilizado para o cálculo da produção secundária descrito por Huryn e Wallace (1986). Este método é utilizado para macroinvertebrados aquáticos de ciclo de vida curto, não passando de um mês em sua maioria (HURYN; WALLACE, 1986). Para este estudo foi adaptada a metodologia de Colón-Gaud (2009) e foram considerados os grupos Chironomidae (não Tanypodinae), pois os Tanypodinae são considerados predadores e caso fossem co-

locados nas câmaras provavelmente iriam se alimentar dos outros organismos ali presentes, e Ephemeroptera (HURYN, 1996, 2002).

Este método consiste primeiramente em fornecer a taxa de crescimento instantâneo por meio da equação 6.1, de acordo com Huryn, (2002).

$$IGR = \ln(Mf/Mi)/T \quad (6.1)$$

Onde IGR = taxa, MF=massa final, Mi=massa inicial, T=tempo.

Para conseguirmos os pesos iniciais e finais dos organismos precisamos das medidas onde essas são convertidas para peso através da equação 6.2 (Benke, 1999).

$$M = a \cdot L^b \quad (6.2)$$

Onde M=massa, a=coeficiente descrito, L=comprimento, b=coeficiente descrito. Tais coeficientes são específicos para cada táxon (BENKE et al, 1999).

Então como precisamos dos comprimentos iniciais e finais dos organismos houve a necessidade de incubá-los *in situ*, e para isso foram desenvolvidas câmaras especiais para o monitoramento do crescimento dos insetos em campo. Esta câmara é feita com tubo de PVC, onde o mesmo não causa danos aos organismos, com medidas de 10 centímetros de diâmetro e 25 centímetros de comprimento (Figura 6.2). Nestas câmaras existem espaços preenchidos com malha de 0,01 micrômetros que servem para a passagem de água e para evitar a evasão dos organismos. A coleta dos organismos foi feita com uma rede em “D”, e a amostra foi triada no campo com o auxílio de bandejas translúcidas e uma caixa de iluminação (Figura 6.3) improvisada com lâmpadas que funcionam com baterias (lâmpadas de emergência).

Figura 6.2 - Câmaras de crescimento “*in situ*”, feitas com plástico reforçado e redes com abertura de malha de 0,25mm.



Fonte: LEAA (2021).

Figura 6.3 - Triagem em campo utilizando bandejas de plástico. Ao fundo, fotos das câmaras monitoradas para análise da produção secundária dos macroinvertebrados aquáticos.



Fonte: LEAA (2021).

Foram necessárias 3 câmaras para cada táxon analisado, totalizando 6 câmaras para cada córrego. Dentro de cada câmara foram alocados 6 organismos de cada táxon, sendo no total 18 Chironomidae (não Tanypodinae) e 18 Ephemeroptera.

Antes de alocar os indivíduos nas câmaras, todos os organismos depois de triados e identificados, foram medidos com auxílio de papel milimetrado, que foi colocado entre a tampa e a base de uma placa de petri (Figura 6.4), vedada com silicone. Depois de medidos, os macroinvertebrados foram colocados dentro das câmaras, com um pouco de substrato para o suporte de alimento.

Figura 6.4 - Medição do comprimento de Chironomidae e Ephemeroptera em campo com o auxílio de placas de petri e papel milimetrado.



Fonte: LEAA (2021).

As câmaras permaneceram *in situ* (Figura 6.5) durante um período de 14 dias durante a primavera e o verão, e 20 dias durante o outono e o inverno, pois em temperaturas mais amenas o metabolismo dos organismos diminui e consequentemente o ciclo de vida aumenta (HURYN, 1996). O experimento das câmaras foi realizado de 2 em 2 meses, somando 6 vezes durante 1 ano.

Figura 6.5 - Montagem e posicionamento das câmaras dentro dos riachos para a análise do crescimento instantâneo dos macroinvertebrados.



Fonte: LEAA (2021).

Durante esse tempo de incubação foram realizadas mais 2 medidas do comprimento dos insetos, uma na metade do período de incubação, 7 ou 10 dias, e outra quando as câmaras eram retiradas. Logo, obtivemos 3 medidas de cada organismo para cada câmara, uma no início da incubação, uma na metade e outra no final da incubação.

Depois de obtidas as medidas, transformamos o comprimento em massa por meio da equação (6.2) para a obtenção da massa dos macroinvertebrados monitorados. Logo após fizemos a média para cada período de medição, obtendo assim a massa média no início da incubação, a massa média no período do meio e a massa média no período final de incubação.

Obtidas as médias das massas conseguimos calcular o IGR, pois tivemos a média da massa inicial, a final e o período de incubação no período.

Para o cálculo da produção secundária precisamos da biomassa em cada mês para cada táxon e depois, assim como as câmaras, foram feitas médias para cada

dois meses, tendo assim a biomassa média por um período de 2 em 2 meses, durante um ano, em um total de 6 biomassas médias durante o período de 12 meses. Após o cálculo da biomassa média, multiplicamos esse valor pela taxa de crescimento instantâneo (IGR) e pelo período de dias de cada período que foi feita a média da biomassa. O cálculo da produção secundária por período segue a equação (6.3) (WALTHER et al., 2006).

$$Pp=B*IGR*Período \quad (6.3)$$

Onde Pp é produção por período, B é a biomassa média por período, IGR é a taxa de crescimento instantâneo e o Período é o número total de dias que foi utilizado para fazer a média da biomassa.

Calculado a produção por bimestre ou por período, soma-se a produção de cada período calculado obtendo a produção de um período de 1 ano ou 12 meses.

Para o cálculo da biomassa, todos os organismos dos dois táxons em questão, foram medidos, depois foram obtidos a biomassa de cada indivíduo através da equação (6.4), uma média de cada sub amostra foi feita e somada às 5 sub amostras obteve-se a biomassa média do período.

Todos os procedimentos e análises relativos a este estudo foram realizados nas dependências do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), sob a supervisão do Professor Juliano J. Corbi. Durante o período de planejamento amostral houve orientação do Professor Matt Whiles, da Universidade da Flórida (USA).

6.4 Resultados e discussões

Como observado na explicação da metodologia adotada, para o crescimento instantâneo foi utilizado somente grupos de ciclo de vida curtos, Chironomidae e Ephemeroptera, onde câmaras de crescimento foram instaladas nos riachos. Foi observado que esses dois grupos, nos três riachos, se somados chegam a números muito altos quando comparados com os outros grupos da macrofauna inventariada. Espraiado (55% do total da fauna), Broa (44% do total da fauna) e Embrapa (45% do total da fauna). Então, quando vamos trabalhar com produção secundária, não podemos descartar estes táxons, e um método para o cálculo desta produção é o crescimento instantâneo. A seguir (Tabela 6.2 a 6.4) podemos ver os resultados das taxas de crescimento dos três riachos estudados.

Tabela 6.2 - Taxa de crescimento Instantâneo (IGR) bimestral Espraiado - mg/dia.

Meses/ Organismos	Chironomidae	Ephemeroptera
OUT/NOV	0,031582307	0,055679106
DEZ/JAN	0,046270614	0,080273827
FEV/MAR	0,0407542	0,079731986
ABR/MAI	0,049650154	0,054015954
JUN/JUL	0,035659605	0,036015568
AGO/SET	0,051028423	0,022870448

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Tabela 6.3 - Taxa de crescimento Instantâneo (IGR) bimestral Broa - mg/dia.

Meses	Chironomidae	Ephemeroptera
OUT/NOV	0,034226876	0,04528481
DEZ/JAN	0,086757038	0,084077153
FEV/MAR	0,070894685	0,136907828
ABR/MAI	0,035971	0,088638963
JUN/JUL	0,078366991	0,030402446
AGO/SET	0,048794885	0,100291411

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Tabela 6.4 - Taxa de crescimento Instantâneo (IGR) bimestral Embrapa - mg/dia.

Meses/Organismos	Chironomidae	Ephemeroptera
OUT/NOV	0,01870359	0,048571335
DEZ/JAN	0,06026448	0,075672602
FEV/MAR	0,179517468	0,12805068
ABR/MAI	0,085868712	0,066505959
JUN/JUL	0,080514906	0,045806012
AGO/SET	0,131672899	0,055748591

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Além da importância na ciclagem de nutrientes, a comunidade de macroinvertebrados aquáticos também atua no fluxo de energia nestes sistemas. Esses organismos fazem o processo de decomposição da matéria orgânica, diminuindo o tamanho das partículas e são parte importante na cadeia alimentar (Esteves, 1988) e sendo um dos principais elos das estruturas tróficas do ecossistema (SILVEIRA; QUEIROZ, 2006, ABÍLIO et al., 2007).

Estudos sobre os macroinvertebrados de ambientes lóticos muitas vezes são escassos de informações sobre sua biomassa, mesmo sabendo que a partir dela e suas variações sazonais se constitui parâmetro importante para o entendimento da história de vida e interações biológicas, incluindo as relações tróficas entre os grupos funcionais (BENKE; HURYN, 2006).

Segundo Christman e Voshell (1992) o ciclo de vida e a utilização de informações corretas em estudo de produção secundária são de extrema importância, pois os parâmetros de ciclo de vida influenciam variações sazonais na densidade e biomassa e produção anual.

6.5 Considerações finais

Podemos citar o quanto trabalhos como estes são válidos, pois para podermos calcular a produção secundária desses táxons, Chironomidae e Ephemeroptera, faz-se necessário saber a taxa de crescimento instantâneo, sendo este importante para entendermos o comportamento de dispersão de energia dentro de corpos d'água, facilitando o entendimento de dispersão de energia e quais grupos são importantes. Através de estudos de base como este podemos entender melhor o funcionamento ecológico do meio e assim atribuir medidas de proteção. Logo o estudo do crescimento instantâneo é essencial para trabalhos de produção secundária, pois não podemos descartar táxons que ocupam quase metade da fauna amostrada. Trabalhos *in situ* geralmente trazem situações inusitadas que nos forçam a repetir o experimento como a queda de galhos em cima das câmaras e chuvas que podem mudar o posicionamento das mesmas e acabar tirando-as dos riachos. Para quem almeja trabalhar com produção secundária é necessário que saiba qual a fauna que existe no local a ser explorado, pois assim saberá quais os métodos que irão utilizar. A produção secundária é uma ferramenta muito importante para o biomonitoramento, pois ela fornece dados entre o ambiente aquático e o terrestre, promovendo um link entre os dois sistemas. Sendo mais uma forma de utilizar a comunidade de macroinvertebrados aquáticos em trabalhos de campo para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos, além das descritas no capítulo 5.

Referências

- ABÍLIO, Francisco José Pegado, DE MELO RUFO, T.L., DE SOUZA, A.H.F.F., DA SILVA FLORENTINO, H., DE OLIVEIRA JUNIOR, E.T., MEIRELES, B.N., SANTANA, A.C.D. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da Caatinga. *Oecologia Brasiliensis*, v.11, n.3, p. 397-409, 2007.
- BENKE Arthur C. Secondary production of aquatic insects. *The Ecology of Aquatic Insects*. Praeger Publishers, v. 10, p. 289-232, 1984.
- BENKE Arthur C. Concepts and patterns of invertebrate production in running waters. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, v. 25, n. 1, p. 15-38, 1993.
- BENKE, Arthur C. HURYN, A. D., SMOCK, L. A., Wallace, J. B. Length-mass relationships for freshwater macroinvertebrates in North America with particular reference to the southeastern United States. *Journal of the North American Benthological Society*, v. 18, n. 3, p. 308-343, 1999.
- BENKE Arthur C., HURYN Alexander D. 2006. Secondary production of macroinvertebrates. In: *Methods in stream ecology*. Second edition. Academic Press, p. 691-709, 2006
- BENKE Arthur C., PARSON Keith A. Modelling blackfly production dynamics in blackwater streams. *Freshwater Biology*, v. 24, n. 1, p. 167-180, 1990.
- BENKE Arthur C. Secondary production as part of bioenergetic theory – contributions from freshwater benthic science. *River Research and Applications*, v. 26, n. 1, p. 36-44, 2010.
- BOTTOVÁ, K., DERKA, T., BERACKO, P., FIGUEROA, J.M.T. Life cycle, feeding and secondary production of Plecoptera community in a constant temperature stream in Central Europe. *Limnologica*, v. 43, p. 27-33, 2013.
- BRAND, C., MISERENDINO, M.L. Life cycle phenology, secondary production, and trophic guilds of caddisfly species in a lake-outlet stream of Patagonia. *Limnologica*, v. 42, p. 108-117, 2012.
- BRITTAINE John E. Biology of mayflies. *Ann. Rev. Entomol*, v. 27, p. 119-147, 1982.
- BRITTAINE, John E. Life history strategies in Ephemeroptera and Plecoptera. In: *Mayflies and Stoneflies: Life histories and biology*. Springer, Dordrecht, p. 1-12, 1990.
- CÉRÉGHINO Régis, LAVANDIER P. Influence of hypolimnetic hydropeaking on the distribution and population dynamics of Ephemeroptera in a mountain stream. *Freshwater Biology*, v. 40, n. 2, p. 385-399, 1998.

CHRISTMAN Van D, VOSHELL JR. Life history, growth, and production of Ephemeroptera in experimental ponds. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 6, p. 705-712, 1992.

COLÓN-GAUD Checo, WHILES MR, KILHAM SS, LIPS KR, PRINGLE CM, CONNELLY S, PETERSON SD. Assessing ecological responses to catastrophic amphibian declines: patterns of macroinvertebrate production and food web structure in upland Panamanian streams. **Limnology and Oceanography**, v. 54, n. 1, p. 331-343, 2009.

DOWNING John A. Assessment of secondary production: the first step. **A manual on the assessment of secondary productivity in fresh waters**. Blackwell Scientific Publications, v. 17, p 1-18, 1984.

DUDGEON David. Patterns of variation in secondary production in a tropical stream. **Archiv für Hydrobiologie**, p. 271-281, 1999.

ESTEVES Francisco A. Fundamentos de Limnologia. **Interciência**. 1998.

FISHER Stuart, GRAY Lawrence J. Secondary production and organic matter processing by collector macroinvertebrates in a desert stream. **Ecology**, v. 64, n. 5, p. 1217-1224, 1983.

GONZÁLEZ Jorge M., BASAGUREN A., POZO J. Life history and production of *Caenis luctuosa* (Burmeister) (Ephemeroptera, Caenidae) in two nearby reaches along a small stream. **Hydrobiologia**, v. 452, n. 1, p. 209-215, 2001.

GRAY Lawrence J. Species composition and life histories of aquatic insects in a lowland Sonoran Desert stream. **American Midland Naturalist**, v. 106, p. 229-243, 1981.

GREGORY, SV, SWANSON, FJ, MCKEE, WA, CUMMINS, KW. An ecosystem perspective of riparian zones: focus on links between land and water. **Bioscience**, v. 41, n. 8, p. 540-555, 1991.

HURYN Alexander D. Temperature dependent growth and life cycle of *Deleatidium* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) in two high-country streams in New Zealand. **FreshWater Biology**, v. 36, n. 2, p. 351-361, 1996.

HURYN Alexander D. River-floodplain linkage determines production dynamics of detritivorous and predacious mayflies (Ephemeroptera) in a sedge-meadow wetland. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 155, p. 455-480, 2002.

HURYN Alexander D, WALLACE JB. A method for obtaining in situ growth rates of larval Chironomidae (Diptera) and its application to studies of secondary production. **Limnology and Oceanography**, v. 31, p. 216-222, 1986.

HURYN Alexander D, WALLACE JB. Life history and production of stream insects. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 83-110, 2000.

LEARNER MA, POTTER DWB. The seasonal periodicity of emergence of insects from two ponds in Hertforshire, England, with special reference to Chironomidae (Diptera: Nematocera). **Hydrobiologia**, v. 44, n. 4, p. 495–510, 1974.

LEPORI Fabio, PALM, D, MALMQVIST, B. Effects of stream restoration on ecosystem functioning: detritus retentiveness and decomposition. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, n. 2, p. 228-238, 2005.

LIMA, Paula w, ZAKIA, MJB. Hidrobiologia de matas ciliares. **Matas ciliares conservação e recuperação (RR Rodrigues & HF Leitão Filho, eds.)**. Edusp, 2001.

NAIMAN Robert J, DECAMPS Henri, MCCLAIN Michael E. **Riparia: ecology, conservation, and management of streamside communities**. Elsevier, 2010.

NEWBOLD J Denis, SWEENEY BW, VANNOTE RL. A model for seasonal synchrony in stream mayflies. **Journal of North America Benthological Society**, v. 13, n. 1, p. 3–18, 1994.

ODUM Eugene P. 1988. Ecologia. Tradução: Christopher J. Tribe. **Guanabara, Rio de Janeiro**. 1988.

OERTLI Beat. Spatial and temporal distribution of the zoobenthos community in a woodland pond (Switzerland). **Hydrobiologia**, v. 300, n. 1, p. 195–204, 1995.

PRITCHARD G, ZLOTY J. Life histories of two *Ameletus* mayflies (Ephemeroptera) in two mountain streams: the influence of temperature, body size, and parasitism. **Journal of North America Benthological Society** v. 13, n. 4, p. 557–568, 1994.

RAMIREZ Alonso, PRINGLE CM. Structure and production of a benthic insect assemblage in a neotropical stream. **Journal of North America Benthological Society** v. 17, n. 4, p. 443–463, 1998.

RAUPP, Fabiano M, BEUREN, IM. Metodologia da pesquisa aplicável às ciências. **Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade: teoria e prática**. São Paulo: Atlas, p. 76-97, 2006.

SANTOS, João A, PARRA FILHO, Domingos. Metodologia científica. 2012.

SANTOS-WISNIEWSKI MJ. **Distribuição espacial e produção secundária da comunidade zooplânctônica do Reservatório de Barra Bonita - SP**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de ecologia e biologia evolutiva. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.

SILVEIRA, M P; QUEIROZ, J F. Uso de coletores com substrato artificial para monitoramento biológico de qualidade de água. **Embrapa Meio Ambiente-Comunicado Técnico (INFOTEC-E)**, 2006.

SNYDER CD, YOUNG JÁ, VILLELLA R, LEMARIE DP. Influences of upland and riparian land use patterns on stream biotic integrity. **Landscape Ecology**, v. 18, n. 7, p. 647-664, 2003.

STAGLIANO David M, WHILES, MR. 2002 Macroinvertebrate production and trophic structure in a tallgrass prairie headwater stream. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 21, n. 1, p. 97-113, 2002.

STRIXINO G, TRIVINHO-STRIXINO S. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.3, n. 4, p. 177-180, 1995.

SWEENEY Bernard W, VANNOTE RL, DODDS PJ. Effects of temperature and food quality on growth and development of a mayfly, *Leptophlebia intermedia*. **Canadian Journal of Fishiers and Aquatic Sciencis**, v. 43, n. 1, p. 12-18, 1986.

SWEENEY Bernard W, BOTT, TL, JACKSON, JK, KAPLAN, LA, NEWBOLD, JD, STANDLEY, LJ, HESSION, WC, HORWITZ, RJ. Riparian deforestation, stream narrowing, and loss of stream ecosystem services. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p. 14132-14137, 2004.

TUNDISI José G, MATSUMURA-TUNDISI T. **Limnologia**, 2008.

VANNOTE Robin L, SWEENEY BW. Geographic analysis of thermal equilibria: a conceptual model for evaluating the effect of natural and modified thermal regimes on aquatic insect communities. **The American Naturalist**, v. 115, n. 5, p. 667-695. 1980.

VERHOEVEN Jos TA, ARHEIMER, B, YIN, CQ, HEFTING, MM. Regional and global concerns over wetlands and water quality. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 2, p. 96- 103, 2006

VÖRÖSMARTY Charles J, MCINTERY PB, GESSNER MO, DUDGEON D, PRUSICH A, GREEN P, GLIDDEN S, BUNN SE, SULLIVAN CA, LIERMANN CR, DAVIES PM. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature** v. 467, n. 7315, p. 555-561. 2010.

WALTHER Denise A, WHILES MR, FLINN MB, BUTLER DW. Assemblage-level estimation of nontanypodine chironomid growth and production in a southern Illinois stream. **Journal of the North American Benthological Society** v. 25, n. 2, p. 444-452, 2006.

WARD James V, STANFORD JA. Thermal responses in the evolutionary ecology of aquatic insects. **Annual Review of Entomology**, v. 27, p. 97-117, 1982.

WATERS Thomas F. Secondary production in inland waters. **Advances in Ecological Research**, v. 10, p. 91-64, 1977.

CAPÍTULO 7

BIOINDICADORES DE QUALIDADE AQUÁTICA: NOVAS POSSIBILIDADES DE ANÁLISES UTILIZANDO LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

WATER QUALITY BIOINDICATORS: NEW
POSSIBILITIES FOR ANALYSIS USING *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE) AND *Chironomus sancticaroli*
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) LARVAE

Lidia Moura¹
Barbara Lepretti de Nadai²
Maria Eduarda Yumi Oyamaguti³
Natália da Silveira⁴
Juliano J. Corbi⁵

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.7

¹ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-2828-5808>. lidiamoura@usp.br

² Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-9362-4001>. barbara_nadai@usp.br

³ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0002-0855-5700>. maria.oyamaguti@usp.br

⁴ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0702-6580>. nataliasilveira@usp.br

⁵ Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0249-9370>. julianocorbi@usp.br

Resumo

O*Aedes aegypti* é uma espécie que pode representar um grande risco para a saúde pública. Ao contrário do que já era amplamente divulgado, as larvas podem se desenvolver em águas com diferentes características, incluindo águas com elevada carga orgânica. Considerando a escassez de informação sobre o desenvolvimento de larvas em efluentes diversos e sobre *Ae. aegypti* como um bioindicador de poluição aquática, o presente capítulo tem como objetivo apresentar como o desenvolvimento larval de *Ae. aegypti* pode ocorrer em diluições de efluente industrial proveniente da produção de insumos para ração animal. Paralelamente, larvas do mosquito *Chironomus sancticaroli* foram expostas às mesmas concentrações previamente relatadas para comparar as respostas de sobrevivência das espécies ao final dos experimentos. Na concentração mais baixa, a mortalidade de *Ae. aegypti* foi significativamente menor do que larvas de *C. sancticaroli*. Larvas de *Ae. aegypti* desenvolveram-se mais rapidamente no efluente quando comparados a água da torneira. Os resultados indicam a necessidade de avaliar a tolerância do *Ae. aegypti* aos altos índices de poluição, tendo em vista que o Brasil ainda carece de garantia de saneamento básico em toda a sua extensão. Como essa situação pode ser estendida aos efluentes industriais, o desenvolvimento de *Ae. aegypti* em tais ambientes aumenta a ameaça ao cenário epidemiológico.

Palavras-Chave: Culicidae. Efluente industrial. *Aedes aegypti*.

Abstract

The mosquito *Aedes aegypti* is a species that represents a huge threat to public health. Unlike the common knowledge, the mosquito can breed in aquatic environments with different organic composition, including highly organic effluents. The survival in the effluent can be associated mostly to the respiratory siphon present at the posterior region of the larvae. Considering that information about larval development in effluents still are scarce, the present chapter has the goal to exemplify how immature development of *Ae. aegypti* can occur in different dilutions of industrial effluent. Thus, we tested first instar survival and development rate in three different dilutions of industrial effluent of animal food production. In parallel, we tested the same conditions with the mosquito larvae of the species *Chironomus sancticaroli*. In the lowest concentration, the mortality of *Ae. aegypti* was significantly lower than *C. sancticaroli* larvae. *Ae. aegypti* larvae developed faster in the effluent than in tap water. The outcomes indicate the need to assess the *Ae. aegypti* tolerance to highly polluted, considering that Brazil still lacks assuring basic sanitation attending throughout its extension. As this situation can be extended to industrial

effluent, *Ae. aegypti* development in such environments enhance the threat to the epidemiological scenario.

Keywords: Culicidae. Industrial effluents. *Aedes aegypti*.

7.1 Saúde ecológica e sua relação com a saúde humana

Agências governamentais, empresas privadas, tribos, cientistas, gestores, conservacionistas, agências reguladoras e a população em geral estão cada vez mais interessados na qualidade dos ecossistemas e em sua diversidade, considerando todos os níveis de organização biológica: desde organismo até comunidades. Em particular, há grande interesse em entender como e quanto a exploração de recursos naturais afetam plantas e animais, gerando consequências para a saúde humana e ecológica. Avaliar a saúde humana em decorrência da saúde ecológica envolve o estabelecimento de diversas metodologias para detecção dos efeitos deletérios dos compostos gerados por nós, humanos, em diversos contextos (abordados nos capítulos 3, 4, 5 e 6). E não se engane: a vida humana por si só gera subprodutos derivados de diversas atividades que se fizeram essenciais no desenvolvimento da sociedade. E embora possamos discutir a relevância dos impactos com relação ao consumismo, por ora esta não é a intenção deste capítulo.

Considerando que nós humanos impactamos substancialmente (negativa e positivamente) os ecossistemas, o biomonitoramento se torna essencial como uma das ferramentas da avaliação de impactos ambientais e, em última instância, ao desenvolvimento sustentável. Avaliar a integridade ecológica para espécies, populações, comunidades dentro dos ecossistemas e suas interfaces envolve analisar as condições encontradas e acompanhar suas mudanças ao longo do tempo. Há situações em que a avaliação e monitoramento no local não é possível de ser realizada por diversas dificuldades metodológicas e pela complexidade do ambiente que se deseja monitorar pois, ao considerar condições de campo, todas as variáveis ambientais (por exemplo: luminosidade, exposição solar, temperatura, umidade relativa do ar, relações ecológicas intra e interespecíficas) são potenciais interferentes no *status* do ambiente que precisam ser levadas em consideração nos efeitos observados. Nem sempre é possível mensurar e acompanhar as mudanças nessas variáveis e, sendo assim, o estudo em laboratório é uma forma adequada para avaliar o efeito de um único parâmetro e suas variações sobre um sistema biológico (que pode ser uma ou mais espécies).

É esperado que a resposta de uma espécie às mudanças ambientais seja diferente das respostas de espécies simpátricas e isso acontece por diversos motivos.

Estratégias diferentes de forrageamento e reprodução refletem em formas diversas de utilização dos recursos do ambiente; as diferenças nos tamanhos corporais das espécies refletem na diversidade em que se abrigam no ambiente, o que significa formas variadas de exploração da paisagem em escala espacial. Além disso, a variedade de histórias de vida dos organismos em um mesmo ambiente produz ciclos de vida em escalas temporais distintas; características funcionais e fisiológicas também respondem ao nível de sensibilidade às alterações no ambiente, o que significa que um consumidor primário pode ser mais sensível a uma alteração na densidade populacional do produtor em comparação a um consumidor secundário, por exemplo (CARO, 2006).

Sendo assim, a avaliação das respostas de um grupo de organismos pertencentes a uma única espécie (isto é, uma população) pode prover respostas cruciais para entender o efeito de um determinado contaminante e suas diluições que podem ser encontradas no ambiente. Ou ainda, uma determinada tolerância à poluição. No presente capítulo iremos discutir os efeitos distintos que um mesmo poluente (efluente de indústria de ração animal) nas respostas de sobrevivência de duas espécies de mosquito durante a fase larval: o *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, uma espécie invasora no Brasil e o *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981, uma espécie nativa brasileira.

7.2 *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981 como espécie bioindicadora em ecotoxicologia aquática

Os efeitos de subprodutos químicos nos organismos aquáticos dependem, substancialmente, da sua concentração, biodisponibilidade, solubilidade, duração da exposição e do nível de sensibilidade dos organismos submetidos ao composto (CONNON, GEIST, WERNER, 2012). Desta forma, bioensaios em laboratório, com exposição de indivíduos em mesmo estágio de desenvolvimento à diferentes concentrações do composto químico são ferramentas essenciais à obtenção de informação para posterior monitoramento, inferência e tomada de decisões sobre a recuperação de um ecossistema (DE VLAMING et al., 2010).

Para além da importância dos testes ecotoxicológicos, vale ressaltar a relevância de se analisar as respostas de uma dada espécie a diferentes contaminantes de forma a conhecer seus limites de sensibilidade e tolerâncias. Por ser uma espécie de mosquito nativa do sudeste brasileiro, *Chironomus sancticaroli* é comum em ambientes silvestres e periurbanos e de fácil coleta, e se mostra um organismo-teste muito valioso para o devido fim. Satisfazendo os critérios definidos e explanados no capítulo 2 para a seleção de organismo-teste, as formas imaturas de quironomídeos

são bons bioindicadores especialmente por apresentarem deformidades morfológicas em resposta à exposição a diversos contaminantes e sensibilidade à diversos contaminantes conhecida (REBECHI; NAVARRO-SILVA, 2012). Nas últimas décadas, inúmeros estudos utilizando essa espécie como bioindicadora foram realizados além da descrição detalhada de sua biologia, que pode também ser conferida no capítulo 2 deste mesmo livro. Respostas sobre alterações em seu ciclo de vida em ensaios crônicos e respostas de sobrevivência em ensaios agudos evidenciam sua representatividade na biota aquática em relação a seu nível trófico em ambientes de águas continentais.

Experiências prévias do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) confirmaram a estabilidade genética da referida espécie como bioindicadora, ao comparar as respostas entre uma população mantida em laboratório por mais de seis anos e uma população coletada em campo (CORBI et al., 2019). Tal similaridade é importante para validar os resultados de laboratório como representativos do que pode acontecer com organismos de campo, uma vez que as condições em laboratório podem ser muito diferentes daquelas encontradas pela espécie em ambiente natural.

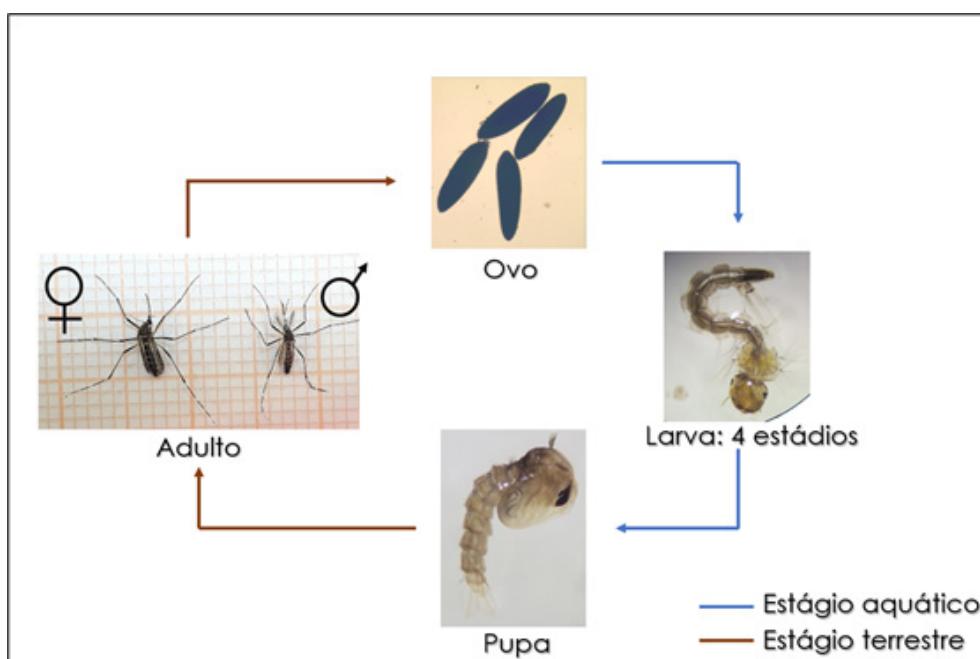
A simulação das condições ideais para a espécie em ambiente controlado (laboratório) não conta com flutuações naturais bem como interações com outras espécies, o que gera diferenças no processo evolutivo e pode, consequentemente, produzir efeitos distintos quando expostos a contaminantes. Logo, tão importante como ser uma espécie nativa é também a legitimidade dos resultados obtidos em laboratório com relação à projeção do que pode ocorrer em ambiente natural.

7.2.2 *Aedes aegypti* e suas características competitivamente vantajosas no ambiente urbano

Talvez você esteja se perguntando se o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) está fora do contexto do tema do presente capítulo. Afinal, o *Aedes aegypti* é conhecido por ser o vetor primário de dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela nas áreas urbanas e não por ser um bioindicador aquático nem tampouco terrestre. No entanto, essa é uma espécie que apresenta características morfológicas que a conferiram vantagem competitiva sobre outras espécies, o que permitiu que fosse uma invasora bem sucedida, ocupando uma diversidade de habitats e microhabitats. Com origem em um ancestral africano, o mosquito *Ae. aegypti* é um oportunista no ambiente urbano, sendo que tal proximidade com sociedades humanas representa fonte abundante de alimentação sanguínea para as fêmeas da espécie, garantindo sua reprodução (POWELL; TABACHINIK, 2014).

Esse mosquito apresenta ciclo de vida do tipo holometábolo (com metamorfose completa) sendo suas fases imaturas em ambiente aquático (ovo, larva e pupa) enquanto apenas a fase adulta é terrestre (CLEMENTS, 2012) (Figura 7.1).

Figura 7.1 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



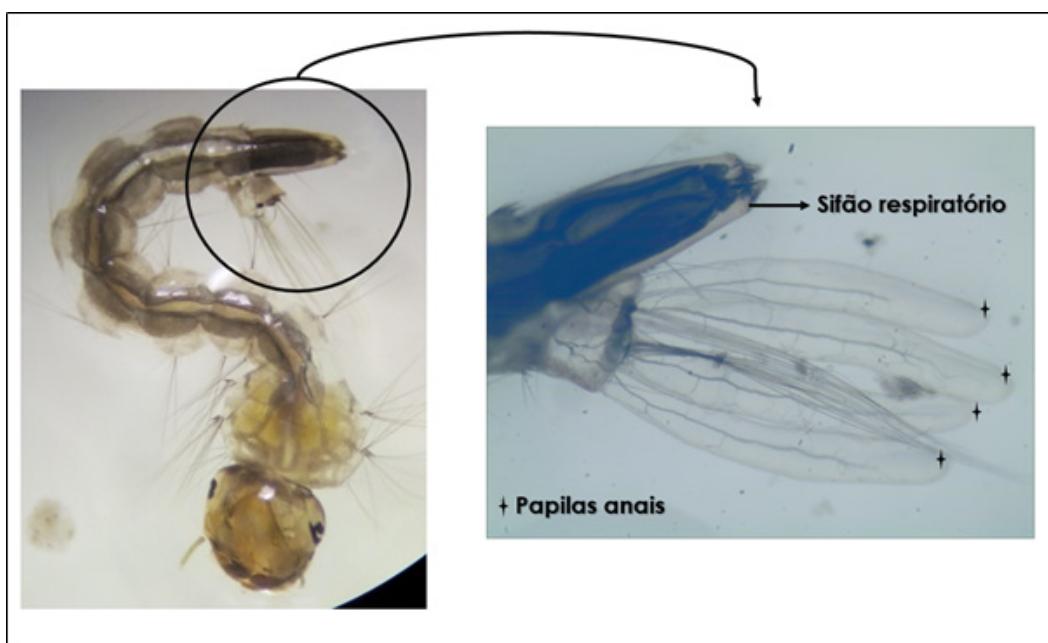
Fonte: LEAA (2021).

Durante seu ciclo de vida, as fêmeas depositam seus ovos em recipientes que permitem a retenção de água, que são geralmente provenientes de atividade antrópica (por exemplo, pneus descartados, garrafas plásticas, fontes d'água, canaletas, vasos de plantas). No entanto, se o recipiente estiver seco, os ovos permanecem em quiescência (indivíduos não eclodem e permanecem consumindo as reservas energéticas dentro do ovo) até que o ambiente seja preenchido por uma quantidade adequada de água, o que engatilha os processos fisiológicos responsáveis pela eclosão do ovo e nascimento da larva (REZENDE et al., 2008; DA SILVA et al., 2019). Esta característica é vantajosa, pois permite que os indivíduos persistam em um ambiente desfavorável, como no caso, um período prolongado de seca e baixas temperaturas médias.

A fase larval, que é subdividida em 4 estádios de crescimento, é característica pelo corpo alongado e flexível, com um abdome liso e vermiforme com oito segmentos. Estendido a partir do segmento terminal do abdome, as larvas possuem uma estrutura chamada sifão respiratório (CHRISTOPHERS, 1960). Embora as larvas dessa espécie sejam aquáticas, elas não respiram o oxigênio que está dissolvido no meio, e sim o oxigênio atmosférico com uso dessa estrutura, por meio da super-

fície d'água onde os espiráculos do sifão respiratório se abrem para a entrada de ar (Figura 7.2).

Figura 7.2 - Localização do sifão respiratório e papilas anais nas larvas de *Aedes aegypti*



Fonte: LEAA (2021) (aumento em 40x em microscópio óptico)

O sistema traqueal larvário é composto por dois troncos longitudinais, ligados entre si e ramificados por todo o corpo. Assim que a larva mergulha, os espiráculos se fecham para impedir a entrada de água no sistema. Considerando um efluente com alta poluição orgânica e, consequentemente, baixo oxigênio dissolvido como esgotos domésticos e alguns efluentes industriais, tal característica por si só oferece pouco risco de mortalidade das larvas por falta de oxigênio devido à tal morfologia.

Ainda no segmento terminal composto pelo sifão respiratório, a larva tem um lobo anal que termina em quatro papilas anais (Figura 7.2). Essas papilas anais são essenciais para a regulação osmo-íônica, controlando as trocas iônicas entre o meio e a hemolinfa, além das quantidades de água no interior da larva (BRADLEY, 1987). Em meios com alta carga nitrogenada ou com salinidade elevada, as larvas toleram tal condição excretando o excesso de amônia através das papilas anais o que previne a acidificação da hemolinfa (DURANT; DONINI, 2019).

As larvas de *Ae. aegypti* podem se alimentar de uma diversidade de microrganismos presentes nos criadouros, como por exemplo bactérias, fungos, rotíferos, protozoários e até detritos vegetais (ver WALKER et al., 1988; HO et al., 1992; MUNIARAJ et al., 2012). Elas produzem uma enzima (β - 1,3 - Glucanase) que é responsável pela quebra da parede celular destes detritos do ambiente aquático,

tornando possível a obtenção de micro e macronutrientes para seu desenvolvimento (SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2019).

Quanto ao seu comportamento de forrageio, elas podem ser detritívoras e/ou filtradoras, dependendo da disponibilidade de matéria orgânica do ambiente. Se o criadouro possui matéria orgânica sedimentada, as larvas podem forragearativamente e é considerada atividade detritívora; no entanto, elas também podem obter alimento por meio da filtragem das partículas menores e suspensas na coluna d'água, atividade classificada como filtradora, o que acontece quando o ambiente tem pouca matéria orgânica constituída de material particulado muito fino (SOUZA et al., 2016). Essa flexibilidade trófica ressalta a característica generalista e oportunista dessa espécie: generalista por estar apta a conseguir se alimentar de uma variedade de matéria orgânica, o que permite que a espécie se desenvolva praticamente em qualquer criadouro que contenha água e matéria orgânica; e oportunista por estar adaptada a duas estratégias de forrageamento distintas, de acordo com a forma que o recurso nutritivo está disposto no ambiente (CLEMENTS, 1992).

Agora considere, de maneira hipotética, que em um ambiente de clima quente (considerando os padrões de uma região tropical) haja uma lagoa superficial contendo efluente industrial, apresentando cargas nitrogenadas como subproduto da atividade e sujeita a diluição por águas de chuva devido à disposição do efluente a “céu aberto”. Este é um potencial criadouro para tal espécie devido seu conjunto de características que a permite persistir em um ambiente que pode ser hostil a muitas outras espécies (seja pela carga de poluentes, pela falta de oxigenação como consequência, pela ausência de vazão, pela exposição à luz solar que pode causar extremos de temperatura, entre outros).

7.2.3 Efluentes industriais: um carreamento de problemas ambientais.

No Brasil, aproximadamente 53% do esgoto gerado é coletado e destinado para tratamento adequado, o que significa que mais de 5000 piscinas olímpicas de esgoto não tratado são despejadas na natureza sem tratamento (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO, 2018).

Além do esgoto sanitário, outro problema é o despejo de efluentes industriais sem tratamento em locais inadequados, ou mesmo sua disposição em lagoas na planta industrial como ocorre muitas vezes. O efluente das indústrias de fabricação de insumos para ração animal é um poluente, devido à presença de sangue, gordura, pelos, penas, ossos, vísceras, carne, urina, excrementos e microrganismos preju-

diciais aos seres humanos, e seu lançamento produz efeito altamente contaminante nos corpos hídricos.

O tratamento dos efluentes gerados por este tipo de indústria visa à remoção dos compostos orgânicos e nitrogenados. Para tanto Li et al. (2017) e Zhu et al. (2017) recomendam o uso do pré-tratamento dessas águas residuárias, uma vez que os sistemas de tratamento secundários, em geral, são ineficientes na remoção de nutrientes. Após o pré-tratamento, os nutrientes remanescentes da digestão anaeróbia podem ser removidos no reator de Nitrificação Parcial/ Anammox, enquanto o resíduo de matéria orgânica pode ser consumido através da desnitrificação utilizando o nitrato como acceptor final de elétrons. No Brasil, os sistemas compostos por lagoas de estabilização, lodos ativados e reatores do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* - manta de lodo anaeróbio e fluxo ascendente) apresentam boa remoção da matéria orgânica. Porém, são ineficientes na remoção de nitrogênio e requerem o uso de tecnologias complementares para remoção desse nutriente.

Como exemplo, podemos citar que o abate e processamento de aves podem gerar impactos significativos ao meio ambiente, já que utiliza grande quantidade de água, além de produzir efluentes com carga orgânica alta na faixa de 2000-5000 mg.DQO.L⁻¹ e nitrogenada de 700-1500 mg N-NH₄⁺.L⁻¹. O lançamento deste tipo de água residuária em ambientes aquáticos, resulta em prejuízos ao meio ambiente e à vida humana, além de elevar os custos de tratamento para tais efluentes (RUIZ et al, 1997). Na Tabela 7.1, são apresentados valores dos parâmetros para este tipo de efluente comumente encontrados na literatura.

Tabela 7.1 - Parâmetros do efluente de abate e processamento de aves.

Parâmetros	Valores
DBO (mgO ₂ /L)	710 - 4633
DQO (mgO ₂ /L)	1400 - 11118
DQO _{suspensão} (mgO ₂ /L)	780 - 10900
Óleos e Graxas (mg/L)	50 - 897
NT (mg/L)	110 - 700
$N - NH_4^+$ (mg/L)	3 - 300
PT (mg/L)	13 - 120
Alcalinidade (mg/L)	350 - 800

OBS: DBO: demanda bioquímica de oxigênio; DQO: Demanda química de oxigênio; NT: Nitrogênio total; N - NH₄⁺: nitrogênio amoniacal; PT: Partículas totais.

Fonte: (Pinto et al., 2015).

Sendo assim, retomando o apresentado sobre duas espécies distintas quanto à biologia, o presente capítulo visa demonstrar como exemplo as respostas de desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* em efluente industrial da produção de insumos para fabricação de ração animal, após tratamento preliminar em reator anaeróbio tipo UASB, comparando com respostas da exposição de *Chironomus sancticaroli*, uma espécie bioindicadora já amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos. Para isso, destacamos que as mesmas condições de diluição foram testadas com os dois organismos.

7.3 Estudo de caso

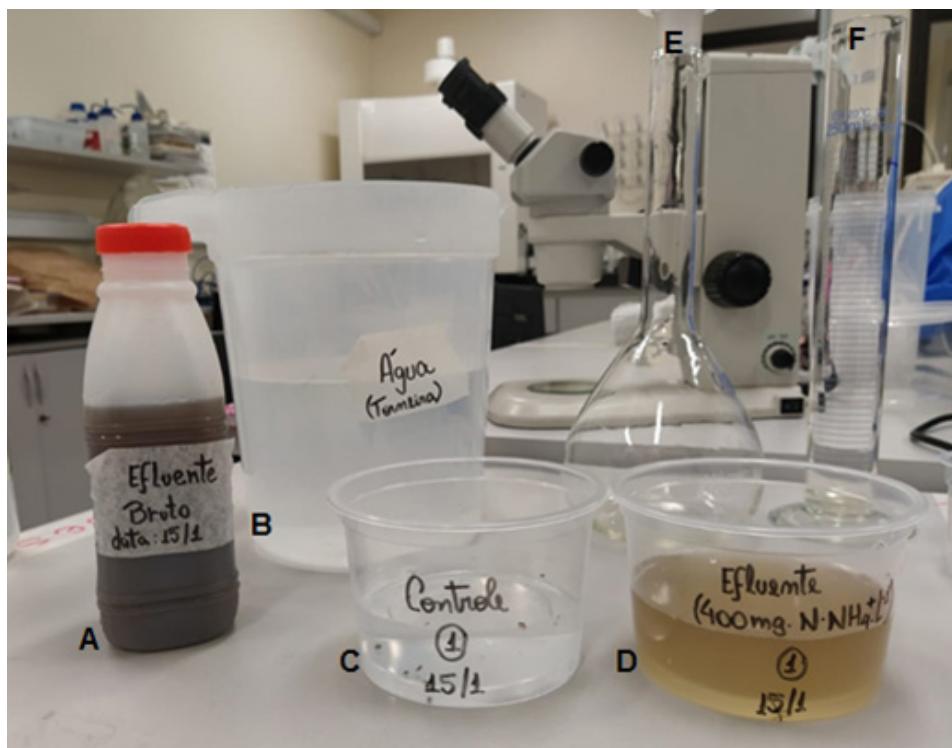
Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), na Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Para realizá-los, primeiro foi necessária à coleta do efluente, seu tratamento em laboratório e o cultivo dos organismos a serem expostos à essa água residuária. Vamos por etapas sobre como foi feito este exemplo prático.

7.3.1 Coleta do efluente e sua diluição

A água residuária foi originada do reator UASB proveniente da Estação de Tratamento da indústria INCOFAP, fabricante de insumos para ração animal, situada no município de Araraquara, SP. Esta água residuária, foi filtrada em papel de filtro comum (para retirar impurezas mais grossas) e diluída até que atingisse concentrações de média de 1200, 800 e 400 mg/L e utilizados para os testes com *Ae. aegypti* e *C. sancticaroli*. As diluições foram realizadas utilizando água de torneira

sem cloro e, para todos os experimentos de exposição dos organismos, as diluições foram realizadas em balão volumétrico com capacidade para 1 litro de solução e calculadas para obter o mesmo volume final de 250 ml para cada unidade experimental (Figura 7.3).

Figura 7.3 - Preparação da diluição do efluente.



OBS: (A) frasco de efluente devidamente rotulado com data de coleta; (B) Água a ser utilizada para diluição; (C) Unidade de experimento controle (composta por água da torneira e alimento); (D) Unidade de teste devidamente rotulada; (E) balão volumétrico; (F) Provetas.

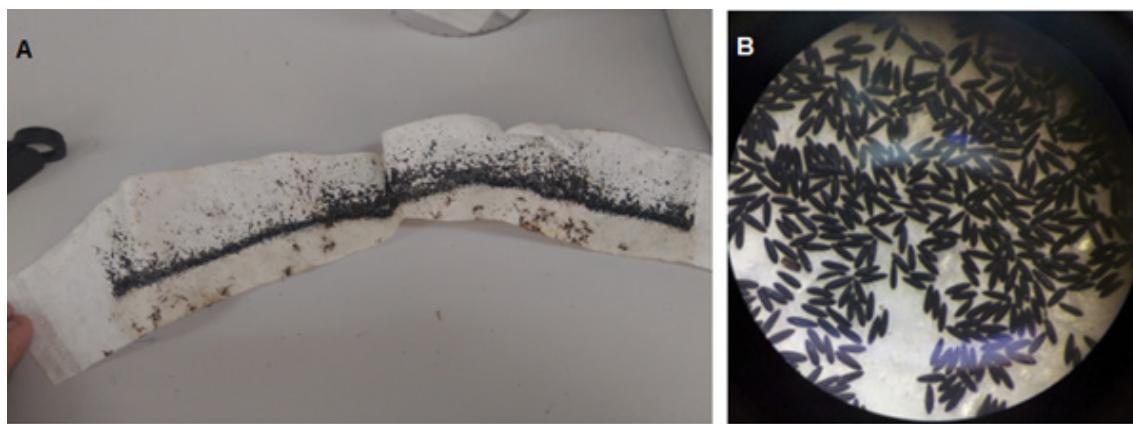
Fonte: LEAA (2021).

7.3.2 *Aedes aegypti*: origem e eclosão dos ovos

As populações selvagens de mosquitos estão submetidas a constantes pressões evolutivas do ambiente (exemplo: alterações na temperatura, diferenças na umidade do ar, chuvas e exposição a inseticidas). Para os experimentos relatados neste capítulo, utilizamos uma linhagem suscetível de *Aedes aegypti*. A linhagem *Rockefeller* (1966) é uma cepa isolada das variações ambientais que populações selvagens do mosquito experimentam normalmente, aclimatada em condições controladas em ambiente laboratorial. Os ovos foram estocados em pote plástico lacrado com tecido tule no topo e mantido em ambiente seco, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, fixos em papel poroso (Figura 7.4). Os ovos são mantidos desta forma para permitir a entrada de ar no pote e ainda evitar a entrada de possíveis animais invasores. Por exemplo, existe a possibilidade de invasão de psocídeos nos potes contendo papéis de desovas, e estes

insetos se alimentam tanto dos ovos quanto dos papéis, ameaçando toda a desova (YAMADA et al., 2019).

Figura 7.4 - Estoque de ovos de *Aedes aegypti*



OBS: (A) ovos de *Aedes aegypti* fixos em papel poroso; (B) ovos de *Aedes aegypti* com aumento de 40x observado em microscópio óptico.

Fonte: LEAA (2021).

7.3.3 Exposição de *Aedes aegypti* e *Chironomus sancticaroli* ao efluente

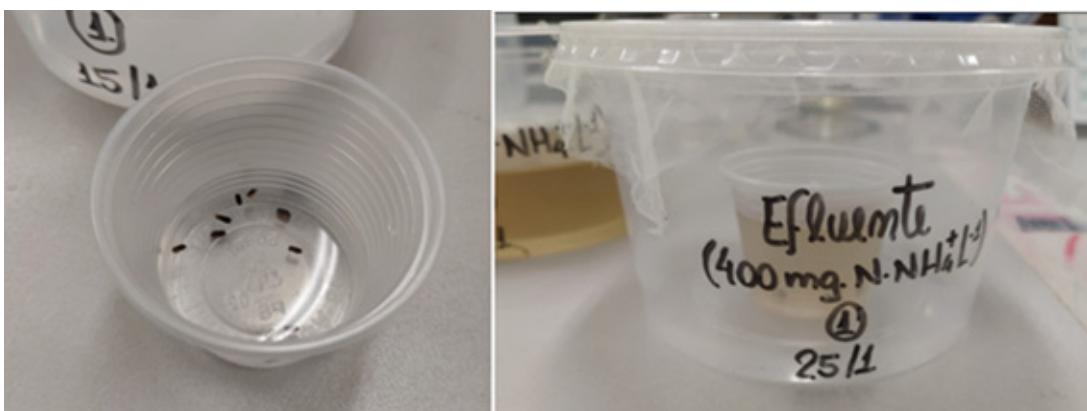
Após 24 horas da submersão dos ovos na solução, potes plásticos com capacidade para 500 ml foram rotulados com informações sobre a concentração do efluente (em mg/L) número de réplica e data de início do teste. Para as três concentrações escolhidas para cada experimento, foram realizadas 3 réplicas, sendo o mesmo número mantido para o experimento controle. Também chamado de experimento controle negativo, trata-se de réplicas paralelas ao experimento contendo um meio não contaminado (neste caso, água da torneira), porém com o mesmo volume e mesma quantidade de alimento para que seja possível comparar resultados e avaliar efeitos. Além disso, o experimento controle também tem como objetivo atestar que os organismos provenientes da mesma população testada estão saudáveis e não sofrerão influência por fatores externos como, por exemplo, alguma doença.

O volume de solução ou de água dos controles foi medido preenchendo 250 ml em proveta volumétrica, disposto em cada pote identificado e, logo em seguida, medimos o pH do meio pelo método potenciométrico. Em cada unidade experimental foram colocadas 10 larvas transferidas com uma pipeta plástica. As larvas foram alimentadas com 2,5 mg de ração para peixe (Tetramin®). A cada dois dias, novo alimento foi adicionado.

Os testes foram mantidos em sala aclimatada a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa mantida a $60 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas:12 horas (claro/escuro). Diariamente, as larvas mortas foram removidas dos testes, para evitar interferência na carga or-

gânica do ambiente e os exoesqueletos também foram retirados, para acompanhar a velocidade de desenvolvimento e crescimento dos indivíduos. As pupas, último estágio imaturo da fase aquática, foram transferidas para recipientes plásticos com capacidade para 50 ml que, por sua vez, foram inseridos em potes plásticos maiores, fechados com tecido tule, para evitar o escape de mosquitos adultos e oferecer maior espaço para os adultos se movimentarem com menos risco de afogamento (Figura 7.5).

Figura 7.5 - Etapa de separação de pupas dos experimentos.



OBS: À esquerda, visão de cima das pupas separadas em copos plásticos; à direita, visualização das pupas já separadas e mantidas em potes secos bloqueados com tecido tule. A nova data faz referência ao dia em que a pupa foi originada no teste em andamento.

Fonte: LEAA (2021).

O teste teve duração de 10 dias, até a metamorfose completa dos organismos presentes no experimento controle (emergência dos adultos).

Para testar o efeito do efluente no desenvolvimento larval de *C. sancticaroli*, todas as condições acima descritas foram reproduzidas, inclusive o mesmo número de larvas e o mesmo estádio de desenvolvimento. No entanto, o método de criação seguiu o descrito no capítulo 1 deste livro a partir da eclosão de ovos da massa ovígera em placa de Petri. A duração dos testes foi a mesma, embora iniciados em dias diferentes. No entanto, uma adaptação importante para o teste em *C. sancticaroli* foi a aeração de todos os meios de acordo com o protocolo detalhado no capítulo 2.

Todos os dados de mortalidade e de desenvolvimento larval foram registrados em planilha eletrônica no Microsoft Excel®, calculando-se indicadores básicos de estatística descritiva. Para testar se houve diferenças na mortalidade média e no tempo médio de desenvolvimento até a fase de pupa em cada condição testada, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em software PAST (para $\alpha=0,05$).

7.4. Resultados

Ao fim de 10 dias, todos os imaturos expostos à maior concentração de nitrogênio amoniacial (1200 mg/L) morreram antes de completarem todo o desenvolvimento larval, tanto *C. sancticaroli* quanto *Ae. aegypti* (Tabela 7.2). A diferença entre as taxas de sobrevivência passa a ser diferente na concentração de 800 mg/L em que, mesmo que não tenha sido uma diferença significativa estatisticamente, ainda representou a sobrevivência de 25% dos indivíduos de *Ae. aegypti* enquanto todas as larvas de *C. sancticaroli* morreram. No entanto, a taxa de mortalidade larval no tratamento com a menor concentração testada foi significativamente menor, com 10% de mortalidade para *Ae. aegypti* enquanto, nessa mesma condição, todos os indivíduos de *C. sancticaroli* morreram antes de se tornarem pupas ($p < 0.05$).

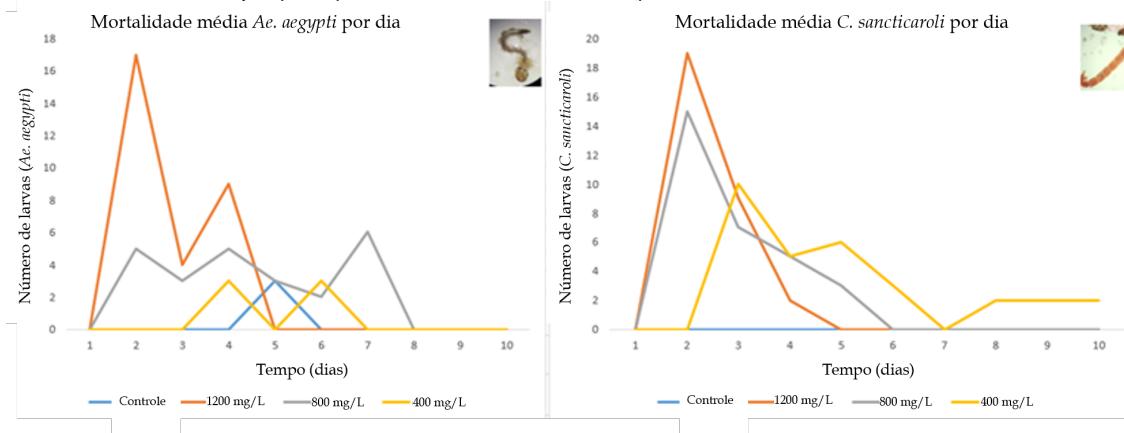
Tabela 7. 2 - Mortalidade e pH médio para cada condição testada em concentração de efluente, com base em nitrogênio amoniacial

	Controle	1200 mg.L ⁻¹	800 mg.L ⁻¹	400 mg.L ⁻¹	
Taxa de mortalidade (\bar{X})	3%	100%	75%	10%	 <i>Ae. aegypti</i>
pH (\bar{X})	7,304	8,338	8,358	8,256	 <i>C. sancticaroli</i>

Fonte: Elaboração nossa (2021).

Além da diferença de mortalidade para as duas espécies ao fim de 10 dias dos testes, observou-se também distinção na taxa de mortalidade ao longo dos dias. Note que, mesmo na concentração mais alta de nitrogênio amoniacial em que ambas as espécies tiveram todos os seus indivíduos mortos, as larvas de *Aedes aegypti*, considerando sua totalidade, persistiram por mais tempo (Figura 7.6)

Figura 7.6: Mortalidade média de larvas de *Aedes aegypti* e *Chironomus sancticaroli* em função do tempo (dias) em diferentes concentrações do efluente industrial

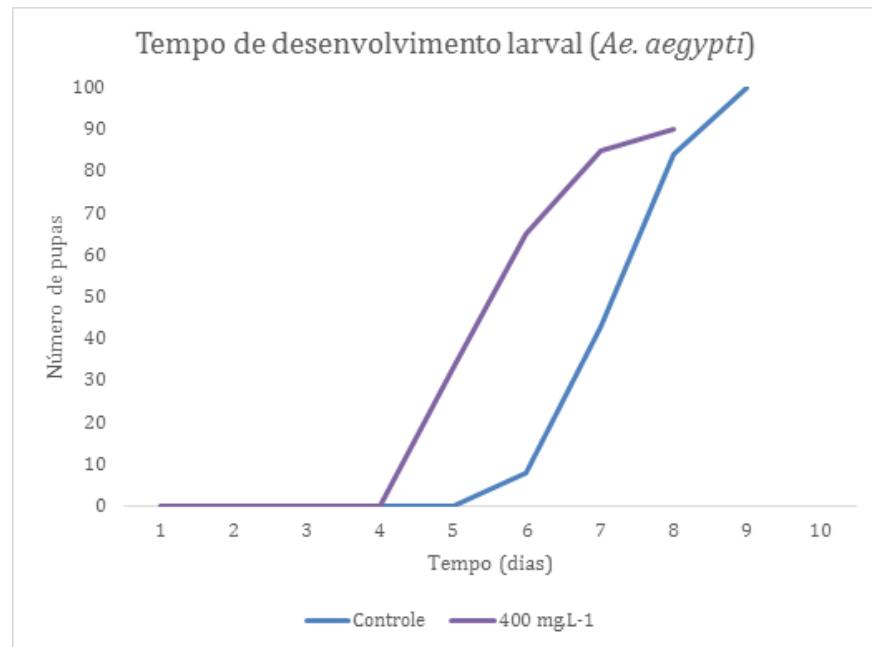


Fonte: Elaboração nossa (2021).

Apesar do pico de mortes ser evidente nos primeiros 3 dias para *C. sancticaroli*, há um padrão de redução do número de mortes ao longo dos dias conforme a concentração do efluente foi menor em nitrogênio amoniacal. O mesmo foi observado com *Ae. aegypti* apesar do número total de mortes ser menor para esta espécie.

Ao observar o desenvolvimento larval de *Ae aegypti* nos ambientes contaminados e no experimento controle, observou-se que na menor concentração de nitrogênio amoniacal testada as larvas atingiram a fase de pupa, em média, 2 dias antes que os indivíduos em ambiente descontaminado (Figura 7.7). Isso significa que não apenas a concentração menor matou menos como o próprio efluente do meio nutriu mais as larvas, de uma forma geral. Tal comparação não foi possível de ser realizada com *C. sancticaroli* pois todos os indivíduos dessa espécie morreram nos meios contaminados.

Figura 7.7 - Tempo (dias) para desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti* até o estágio de pupa (água de torneira e 400 mgN/L-1)



Fonte: Elaboração nossa (2021).

7.5. Discussão

Na natureza, as espécies estão submetidas a variações nos parâmetros ambientais e, devido às ações antrópicas, tais variações podem ser bruscas e atribuídas a adição de contaminantes e poluentes, o que influencia no processo evolutivo. A persistência das espécies a uma condição adversa, por exemplo, à exposição de uma carga de poluentes pode ser determinante para a reprodução na fase adulta e geração de prole viável. Nesse sentido, a sobrevivência de poucos organismos à menor carga de nitrogênio amoniacal para *Ae. aegypti* pode ser resolutivo para a persistência da espécie sobre a persistência de *C. sancticaroli*, a partir do exemplo apresentado em ambientes que contenham tal poluente.

Durant e Donini (2019) afirmaram que as larvas de *Ae. aegypti* apresentam notável capacidade em tolerar ambiente nitrogenado por meio de modulação da excreção de NH_4^+ na papila anal, tornando possível sua persistência e sobrevivência em ambiente inóspito a diversos outros organismos (aqui cabe destacar como exemplo o próprio *C. sancticaroli*). No entanto, é possível observar por meio dos resultados do presente capítulo que há naturalmente um limite de concentração em nitrogênio que as larvas conseguem tolerar. Portanto, se o efluente compreender lagoas superficiais em ambiente aberto, estará sujeito a ser diluído por eventos de

precipitação, tornando possível a redução da concentração de NH_4^+ e, como consequência, possibilitando a sobrevivência e desenvolvimento das larvas.

Há crescentes evidências provenientes de estudos em campo em diversas regiões tropicais que detectaram imaturos de *Ae. aegypti* em tanques sépticos contendo efluentes (ver BARRERA et al., 2008; BURKE et al., 2010; BANERJEE et al., 2015; CHITOLINA et al., 2016). Considerando que não houve diferenças na fonte e na quantidade de alimento fornecido, possivelmente a concentração reduzida de nitrogênio amoniacal atuou como adicional nutritivo às larvas. Quando a alimentação não é um recurso limitante na fase larval, o desenvolvimento até a fase adulta tende a ser mais rápido e os mosquitos resultantes tendem a ser maiores (STEINWASCHER, 2018; SOUZA et al., 2019). Em um estudo desenvolvido por Banerjee et al. (2015), *Ae. aegypti* provenientes de desenvolvimento larval em tanques sépticos apresentaram asas e reservas nutricionais maiores do que aqueles mosquitos cujo desenvolvimento larval se deu em águas livres de poluição orgânica.

Este exemplo evidencia como a sobrevivência e desenvolvimento das larvas em efluente nitrogenado pode prover mais um risco do descarte inadequado e não tratado de efluentes para saúde pública. Ademais, ressalta a tolerância do *Ae. aegypti* à poluentes orgânicos e, como uma espécie relativamente abundante no ambiente urbano, de fácil coleta, ciclo de vida rápido, emerge à discussão sobre bioindicadores. Ao passo que *C. sancticaroli* não sobreviveu à mesma exposição ao efluente, põe à prova tal tolerância à poluentes que o *Ae. aegypti* apresentou neste exemplo prático. Muito se deve às características bioecológicas de ambas as espécies, o que leva à questão essencial quando se quer avaliar o efeito de um dado contaminante nos organismos aquáticos.

7.6. Dificuldades e recomendações: próximos passos

A utilização de bioindicadores do ambiente aquático é uma ferramenta essencial que torna possível estabelecer comparação entre efeitos de diversos contaminantes devido o consenso entre cientistas e órgãos reguladores por meio de protocolos de testes. Dessa forma, garante-se que os métodos sejam os mesmos e assim a comparação de efeitos é possível. Nesse sentido, o uso do *Ae. aegypti* enquanto um bioindicador de poluição ainda não é padronizado e protocolado. Para isso, discussões sobre o tema devem continuar seguindo, incluindo investigações dos níveis de sensibilidade de diversas cepas laboratoriais de *Ae. aegypti* às soluções padrão de sensibilidade, como KCl e/ou ao $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Embora *Ae. aegypti* também satisfaça alguns critérios básicos para ser usado como um organismo teste, sua interpretação deve ser sempre cuidadosa ao considerarmos que esta espécie é um importante vetor de arboviroses. Sendo assim, considerando sua relevância epidemiológica e seu status como espécie invasora, cabe interpretar como bioindicador de poluição. No entanto, para testes em laboratório há uma grande dificuldade em fechar o ciclo do mosquito uma vez que as fêmeas precisam realizar o repasto sanguíneo para ovipositar. Nem todo laboratório que realiza testes ecotoxicológicos e possui estrutura básica para cultivo dos organismos é dotado de biotério autorizado ao manejo de cobaias para o devido fim. Isso limita alguns resultados, mas não inviabiliza a possibilidade de fechar o ciclo do mosquito, se for necessário, por meio de alimentadores artificiais que têm se provado excelentes para substituir cobaias vertebradas (ver COSTA-DA-SILVA et al., 2013).

Por fim, encorajamos a escolha de espécies diferentes para serem testadas como candidatas a novos organismos teste, pois toda nova forma de investigar os efeitos que os contaminantes têm nos ecossistemas aquáticos continentais são importantes para futura recuperação da saúde dos sistemas aquáticos e das comunidades biológicas. No entanto, reforçamos que é essencial conhecer detalhadamente a biologia da espécie escolhida e o seu papel funcional no ambiente. Dessa forma, os resultados obtidos podem ter relevância para se inferir no ambiente e este é o maior objetivo da utilização de bioindicadores.

Agradecimentos: Gostaríamos de agradecer à todos os pesquisadores e parceiros do LEAA que de alguma forma contribuíram para a realização da produção deste trabalho, sendo pelo compartilhamento de experiências e aperfeiçoamento da escrita do capítulo. Além disso, somos gratos às agências de fomento CAPES (#88887.352964/2019-00; #88881.190251/2018-1 e #681912), CNPq (#140578/2017-0 e #140534/2017-2) e FAPESP (#2015/06246-7; #2016/04986-6; #2016/24622-9 e #2019/14431-0) pelas bolsas concedidas para realização de nossas pesquisas e que tornou possível a elaboração do presente capítulo.

Referências

BANERJEE, S. et al. Pupal productivity; nutrient reserves of *Aedes* mosquitoes breeding in sewage drains; other habitats of Kolkata, India: implications for habitat expansion; vector management. *Indian Journal of Medical Research*, v. 142, p. 87 – 94, 2015.

BARRERA, R. et al. Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. *Journal of Medical Entomology*, v. 22, p. 62 – 69, 2008.

BESERRA, E.B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia Série Zoologia*, v. 99, n. 3, p. 281-285, 2009.

BRADLEY, T.J. Physiology of osmoregulation in mosquitoes. *Annual Reviews of Entomology*, v. 32, p. 439 - 462, 1987.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL. SECRETARIA NACIONAL DE Saneamento - SNS. *Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: 24º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos - 2018*. Brasília: SNS/MDR, 2019. 180 p.

BURKE, R. et al. Septic tanks as larval habitats for the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Playa-Playita, Puerto Rico. *Veterinary Entomology*, v. 24, p. 117 - 123, 2010.

CARO, Tim. **Conservation by proxy**: Indicator, umbrella, keystone, flagship, and other surrogate species. Washington: Island Press, 2010.

CHITOLINA, R.F. et al. Raw sewage as breeding site to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, culicidae). *Acta Tropica*, v. 164, p. 290 - 296, 2016.

CHRISTOPHERS, S.R. *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure. Cambridge: University Press, 1960.

CLEMENTS, A.N. **The biology of mosquitoes, volume 1: Development, nutrition and reproduction**. Wallingford, CABI Publishing, 1992.

CLEMENTS, A.N. **The biology of mosquitoes, volume 3: Transmission of viruses and interactions with bacteria**. Cambridge: University Press, 2012.

COSTA-DA-SILVA et al. Glytube: A conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*, 2013.

CORBI, J.J. et al. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a sensitive test species: Can we rely on its use after repeated generations, under laboratory conditions? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, p. 1 - 5, 2019.

CONNON, R.E.; GEIST, J.; WERNER, I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors*, v. 12, p. 12741 - 12771, 2012.

DA SILVA, R.M. et al. Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 227, p. 56 - 63, 2019.

DE VLAMING, V. et al. Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. *Environment Toxicology and Chemistry*, v. 19, p. 42 - 62, 2000.

DURANT, A.C.; DONINI, A. Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito larvae in high ammonia sewage in septic tanks causes alterations in ammonia excretion, ammonia transporter expression, and osmoregulation. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1 – 17, 2019.

HO, B.C. et al. Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 29, p. 960–964, 1992.

LI, X. et al. Mainstream upflow nitritation-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: Long-term performance and microbial community dynamics. **Water Research**, v. 125, p. 298–308, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico. Disponível em <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/11/BE-arbovirose-22.pdf>>.

MUNIARAJ, M. et al. Bdelloid rotifer, Philodina species in the breeding containers of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Tropical Biomedicine**, v.29, p. 646 – 649, 2012.

PINTO, L.A. Aspectos ambientais do abate de aves: uma revisão. **Revista Uningá**, v. 22, p. 44 – 50, 2015.

POWELL, J.R.; TABACHNICK, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11 – 17, 2014.

REBECHI, D.; NAVARRO-SILVA, M.A. Setting the reference for the use of *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) as bioindicator: Ontogenetic pattern of larval head structures. **Zoologia**, v. 29, p. 167 – 171, 2012.

REZENDE, G.L. et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology**. v. 13, 1–14, 2008.

RUIZ, I. et al. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 251–258, 1997.

SOUZA, R.S. et al. Digestion of yeasts and Beta-1, 3-Glucanases in mosquito larvae: physiological and biochemical considerations. **PLoS ONE**, 2016. 11:e0151403.

SOUZA, R. S. et al. Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 152, 2019.

STEINWASCHER, K. Competition among *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 2018.

CAPÍTULO 8

TECNOLOGIA NO MONITORAMENTO AMBIENTAL DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE DOENÇAS: QUAIS SÃO OS DESAFIOS? UMA BREVE REVISÃO

TECHNOLOGY IN THE ENVIRONMENTAL MONITORING OF DISEASE-TRANSMITTING MOSQUITOES: WHAT ARE THE CHALLENGES? A BRIEF REVIEW

Barbara Lepretti de Nadai¹

Lídia Moura²

André Gustavo Maletzke³

Gustavo E. A. P. A. Batista⁴

Juliano J. Corbi⁵

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.8

¹ Universidade de São Paulo [barbara_nadai@usp.br/ ORCID ID 0000-0002-9362-4001]

² Universidade de São Paulo [lidiamoura@usp.br/ ORCID ID 0000-0002-2828-5808]

³ Universidade Estadual do Oeste do Paraná [andre.maletzke@unioeste.br/ ORCID ID 0000-0003-3598-0670]

⁴ University of New South Wales [g.batista@unsw.edu.au / ORCID ID 0000-0002-3482-8442]

⁵ Universidade de São Paulo [julianocorbi@usp.br/ ORCID ID 0000-0003-0249-9370]

Resumo

Algumas tecnologias podem auxiliar no monitoramento de espécies de mosquitos adultos transmissores de doenças. Uma abordagem que vem sendo estudada nos últimos anos é a identificação de espécies de mosquito por meio da frequência de batida de asas utilizando dispositivos constituídos por sensores ópticos ou microfones. Este capítulo tem como objetivo fornecer informações sobre cada uma destas abordagens, bem como suas vantagens e desvantagens. Também são apresentados os principais desafios na utilização destas tecnologias.

Palavras-chave: Frequência de batida de asas. Sensores ópticos. Microfones. Condições ambientais.

Abstract

Some technologies can assist in monitoring adult mosquito species. In recent years an approach that has been studied is the identification of species through the wingbeat frequency using devices consisting of optical sensors or microphones. This chapter aims to provide basic information about each of these approaches, as well as their advantages and disadvantages. The main challenges in the employment of these technologies are also presented.

Keywords: Wingbeat frequency. Optical sensors. Microphones. Environmental conditions.

8.1. *Aedes aegypti*: um vetor histórico

O *Aedes aegypti* teve origem no Egito e foi descrito pela primeira vez em 1762, por Linnaeus, e acredita-se que o mosquito tenha chegado ao continente Americano no período colonial, entre os séculos XVI e XIX, por meio de embarcações utilizadas para o tráfico de escravos (ZARA et al., 2016). Como abordado no capítulo anterior, esta espécie é conhecida por ser o vetor de doenças como Zika, dengue, chikungunya e febre amarela, consideradas de grande importância para a saúde pública (CARVALHO et al., 2014). A recente propagação do *Aedes aegypti* e das doenças transmitidas por este mosquito está associada a fatores como globalização, comércio, viagens, urbanização, bem como sistemas de abastecimento de água inadequados (EBI e NEALON, 2016). Outras variáveis estão intrinsecamente relacionadas à propagação do *Ae. aegypti* e, consequentemente, às doenças causadas pelo mosquito, como temperaturas locais adequadas associadas com altos níveis de precipitação e umidade, a proximidade dos centros urbanos e comunidades de baixa renda. Essas interações entre fatores climáticos, socioeconômicos e outros fatores é complexa

e varia espacial e temporalmente (BHATT et al., 2013). É importante ressaltar que o controle desta espécie é um grande desafio para os órgãos de saúde pública devido à alta capacidade de adaptação do *Ae. aegypti* aos centros urbanos. A adaptação se deve a fatores como a permanência viável dos ovos em ambientes secos por até um ano, a oviposição espalhada em diversos locais e o ciclo de vida relativamente rápido (6 a 10 dias na fase aquática, dependendo das condições ambientais).

No Brasil, a partir do século XX, a febre amarela urbana resultou em milhares de mortes e os esforços para o controle deste mosquito foram intensificados. Entre os anos de 1958 e 1973 o *Ae. aegypti* chegou a ser erradicado do Brasil por duas vezes. No entanto, em 1976, devido ao rápido crescimento populacional e às falhas na vigilância epidemiológica, ocorreram os primeiros registros da reintrodução do vetor no Brasil (ZARA et al., 2016).

As estratégias de controle vetorial convencionais mais utilizadas no Brasil com a finalidade da redução da população dos mosquitos são compostas basicamente pelo controle mecânico (eliminação dos criadouros das larvas), controle biológico (utilização de predadores ou patógenos) e controle químico (utilização de produtos químicos), juntamente com a promoção de ações educativas (ZARA et al., 2016). No entanto, de acordo com Doug et al. (2015), estas estratégias são desafiadoras em muitas partes do mundo devido à falta de recursos, falta de vontade política e/ou implementação ineficaz dos recursos. O desenvolvimento de novas tecnologias pode atualizar as estratégias e alavancar os esforços no controle de vetores. Assim, diversas tecnologias de controle vetorial têm sido estudadas, com diferentes mecanismos de ação, como os compostos naturais (utilizados como uma alternativa dos compostos químicos), a *Wolbachia* (bactéria utilizada no controle biológico), mosquitos dispersores de inseticidas, dispositivos com inseticidas, mosquitos transgênicos, mosquitos esterilizados por irradiação, roupas impregnadas com inseticidas, bem como a combinação entre as técnicas, como por exemplo roupas e telas impregnadas de inseticidas (ZARA et al., 2016).

No entanto, o controle efetivo de vetores requer sistemas de monitoramento eficazes para avaliar os resultados e identificar as áreas de maior risco de transmissão de patógenos (MOURA et al., 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012) o monitoramento é fundamental em qualquer programa de prevenção e controle da dengue, pois fornece informações necessárias para a avaliação de risco e orientação do programa, incluindo respostas à epidemia e avaliação do programa. Essas informações podem estar associadas à abundância, variação tem-

poral e distribuição espacial de espécies de mosquitos vetores (MUKUNDARAJAN et al., 2017).

Em meados do século passado, pesquisadores relacionaram os sons emitidos pelos mosquitos com as espécies destes insetos (KHAN et al., 1945). Desde então o estudo do som gerado pelos mosquitos tornou-se a base para diversas pesquisas com foco no monitoramento de mosquitos transmissores de doenças (SOTAVALTA, 1952; WISHART e RIORDAN 1959; BELTON e COSTELLO, 1979; OGAWA e KANDA, 1986; BATISTA et al., 2011; ARTHUR et al., 2014; GENOUD et al., 2020). Com o avanço da tecnologia, diferentes métodos para detectar os sons foram aperfeiçoados e abriram-se novos horizontes, com possibilidades de empregar diversas tecnologias, desde as mais simples, passando pelas mais aprimoradas e até uma combinação entre as técnicas.

Nos últimos anos, dispositivos tecnológicos têm sido desenvolvidos com o intuito de monitorar os insetos de forma automática, o que resulta em economia de tempo e dinheiro. A maioria destes dispositivos é baseada em estratégias de captura que utilizam armadilhas compostas por atratores específicos, com o objetivo de atrair e capturar as fêmeas que estão à procura de hospedeiros ou de locais para ovopositar. Existem diversos tipos de armadilhas, com desenhos, materiais e atratores distintos cujo custo pode variar relativamente (BATISTA et al., 2011). Assim como existem diferentes métodos e dispositivos para identificar automaticamente as espécies de mosquitos. Alguns dispositivos utilizam informações do mosquito que são coletadas durante o voo, como por exemplo a frequência de batida de asa (FBA), também conhecida como frequência fundamental. Esta revisão apresenta as principais tecnologias estudadas no monitoramento de mosquitos que utilizam a frequência de batimento de asas para a identificação automática de espécies e seus desafios.

8.2 Materiais e Métodos

A revisão da literatura sobre os dispositivos tecnológicos utilizados no monitoramento de mosquitos foi baseada em duas abordagens: sensores acústicos e ópticos utilizados na detecção de mosquitos por meio da FBA. Foram adotadas como base de dados artigos publicados em revistas científicas e conferências internacionais no idioma inglês. No total, 33 artigos foram revisados, datando de 1945 a 2020.

8.3 Resultados e discussão

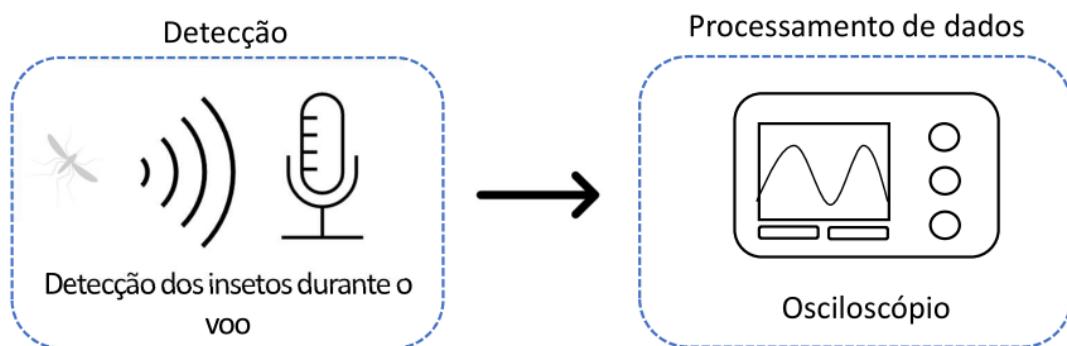
Os sons produzidos pelos mosquitos variam de acordo com a espécie e, portanto, podem ser utilizados como uma informação para identificar espécies (SILVA

et al. 2015; GEBRU et al., 2018; POTAMITIS et al., 2018). Motivado por resultados relatados em meados do século 20 (KAHN et al., 1945; WISHART e RIORDAN, 1959), na última década houve um aumento no número de estudos que visam o desenvolvimento de um mecanismo automático com o intuito de identificar diferentes espécies de mosquitos usando o som emitido por eles. Diversos dispositivos têm sido empregados para capturar a frequência de batimento de asa de insetos, desde os mais antigos como o estroboscópio e o oscilógrafo (SOTAVALTA, 1952), microfones (BELTON e COSTELLO, 1979; VILLARREAL et al., 2017) e os mais recentes, como os sensores (BATISTA et al., 2011; GENOUD et al., 2020). A seguir são descritos os sensores acústicos e ópticos que podem ser utilizados no monitoramento de mosquitos por meio da frequência de batida de asas desses insetos.

8.3.1 Sensores acústicos

O som dos mosquitos pode ser capturado por dispositivos acústicos-eletrônicos como microfones que, juntamente com osciloscópios, permitem a análise da frequência dos sinais gerados por estes insetos. O princípio deste dispositivo é basicamente a detecção do som emitido pelos mosquitos por meio do microfone durante o voo e o posterior processamento de dados pelo osciloscópio (Figura 8.1) (SANTOS et al., 2019). Apesar de ser utilizado em diversos estudos (OGAWA e KANDA, 1986; ARTHUR et al., 2014; SALIM et al., 2017; VILLARREAL et al., 2017), o microfone apresenta algumas desvantagens em relação a outros dispositivos, tais como: a necessidade de filtros para eliminar os ruídos externos (como carros, outros animais ou o ruído ambiente), o que pode ser uma tarefa complexa e pode limitar o seu uso em campo, além de requerer mais poder de processamento do sistema; maior consumo de energia, uma vez que permanece o tempo todo de coleta dos dados fazendo gravações; a distância entre o inseto e o microfone deve ser curta; as gravações geralmente são de curta duração (POTAMITIS e RIGAKIS, 2016; SANTOS et al., 2019); em laboratório, ocasionalmente há a necessidade de estimular o voo dos mosquitos artificialmente; em alguns casos, os insetos foram amarrados para confiná-los dentro do alcance do microfone (VILLARREAL et al., 2017). De acordo com Potamitis e Rigakis (2016), o uso de microfones é impraticável para analisar a frequência de batimento das asas de insetos que não estejam amarrados, especialmente no estudo com grande número de insetos.

Figura 8.1 - Princípios de dispositivos acústicos-eletrônicos.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2019).

Apesar das desvantagens citadas, o desenvolvimento e o estudo dos sensores acústicos com o objetivo de capturar os sons emitidos pelos mosquitos foi essencial para o estabelecimento de métricas no monitoramento de mosquitos (SANTOS et al., 2019). Já a vantagem deste dispositivo é o fácil acesso, estando comercialmente disponível em diversos locais.

Mais recentemente, surgiu uma nova abordagem com a utilização de telefones celulares para gravar os sons emitidos pelos mosquitos, por meio de softwares de gravação de áudio disponíveis gratuitamente nos telefones celulares (PARK et al., 2020). Estudos demonstraram que até os modelos de celulares mais simples são capazes de gravar sinais de áudio com qualidade suficiente para a posterior análise da FBA e identificação da espécie. Os dados de áudio dos telefones celulares são compilados e transferidos para um servidor para posterior processamento (SANTOS et al., 2019). As vantagens da utilização deste método são o conhecimento da data e da localização geográfica onde o sinal foi coletado, além das informações sobre os sons dos mosquitos poderem ser adicionadas por diversos usuários de telefones celulares em diversos lugares, gerando o mapeamento da distribuição das espécies. No entanto, o mapeamento das espécies por meio de dados coletados por diferentes usuários só será possível se o som das batidas de asas de um mosquito coletado por telefone celular puder ser analisado usando as mesmas métricas e algoritmos de identificação das espécies. Ou seja, os diferentes modelos de telefones devem registrar dados acústicos quantitativamente equivalentes com perfis espectrais idênticos (MUKUNDARAJAN et al., 2017).

No entanto, o uso de celulares para a coleta dos sons dos mosquitos também possui algumas desvantagens: para a utilização em campo, o usuário deve seguir os mosquitos em voo livre ou confinar os mosquitos em copos, garrafas ou sacos infla-

dos para a coleta do som. E, assim como os microfones normais, o ruído ambiental torna o som do mosquito imperceptível. Outra desvantagem é que a orientação do telefone celular (microfone) deve estar sempre em direção ao mosquito, acompanhando seu voo, uma vez que a sensibilidade acústica do telefone é direcional e localizada ao redor do microfone principal. Assim, o sucesso do uso de telefones celulares para capturar os sons dos mosquitos depende do envolvimento ativo do usuário, para manter a distância e a orientação adequadas do telefone em relação ao mosquito e evitar ruídos que podem ser provenientes de colisões e arranhões do microfone (MUKUNDARAJAN et al., 2017).

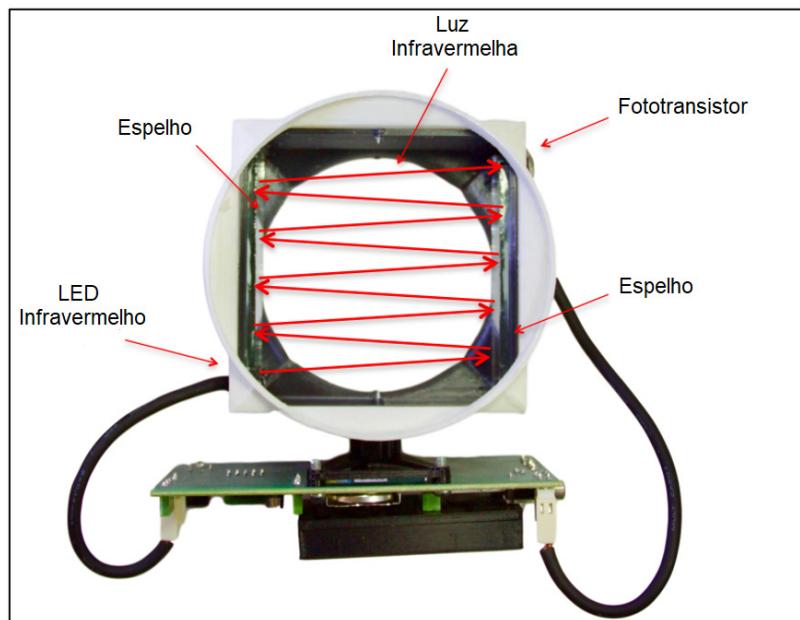
8.3.2 Sensores ópticos

Na década de 80 já havia um estudo voltado para o desenvolvimento de sistemas automáticos para a detecção de insetos durante o voo com base no sensoriamento optoeletrônico e sua análise de sinal de espectro de frequência utilizando tacômetro óptico (MOORE et al., 1986). A saída do sensor foi direcionada para um computador equipado com um conversor analógico-digital para monitoramento do sistema em tempo real e um gravador de áudio inserido em um analisador de frequência para monitoramento posterior. As mudanças na intensidade da luz percebidas por este sensor foram usadas como um gatilho para o início da gravação (SANTOS et al., 2019).

Estudos mais recentes consideram que um par de emissor e receptor de luz cujas variações na luz, causadas por um inseto voador ao cruzar o feixe de luz, é a base para sensores robustos, rápidos e que não são influenciados por ruídos externos (SANTOS et al., 2019). Desde então, diferentes tipos de sistemas utilizando sensores ópticos foram estudados, desde os mais simples até os que empregam uma combinação sofisticada de sensores e detectores.

Em 2011, Batista e colaboradores desenvolveram um sensor capaz de monitorar em tempo real diferentes espécies de mosquitos durante o voo. Além de identificar as espécies, o sensor é capaz de distinguir o sexo e realizar a contagem dos insetos. O sensor é composto por um LED infravermelho, dois espelhos paralelos e um fototransistor (Figura 8.2).

Figura 8.2 - Sensor óptico utilizado para capturar informações dos mosquitos durante o voo.



Fonte: Adaptado de Souza et al. (2020).

Assim, quando um inseto cruza o feixe de luz laser, ocorre uma interrupção parcial da luz, gerando variações que são capturadas pelos fototransistores, e que são registradas como sinal digital, uma espécie de assinatura do mosquito. Essa assinatura refere-se especificamente à frequência de batida de asas, que varia de espécie para espécie. Segundo os autores, a proposta do sensor é de que este seja utilizado em conjunto com uma armadilha, permitindo que somente os insetos de interesse sejam capturados (Figura 8.3).

Figura 8.3 - Armadilha equipada com sensor óptico utilizada para contar e identificar espécies de mosquitos em tempo real.



Fonte: Souza et al. (2020).

Esta é uma das vantagens da proposta, uma vez que a maior parte dos insetos possuem um papel relevante para o equilíbrio ecológico. Outras vantagens são: o sensor não detecta os ruídos externos, somente a FBA dos insetos, o que é muito importante, principalmente para a utilização em campo; o baixo custo do sensor desenvolvido pelos pesquisadores; a facilidade para coletar os dados de um número grande de mosquitos, o que permitiu a construção de modelos de classificação com grande número de dados, que juntamente com a utilização de um algoritmo simples aumentou a acurácia de identificação das espécies. De acordo com Silva et al. (2015), esta tecnologia apresentou resultados superiores a 95% de acurácia. Este dispositivo também possui um conjunto de outros sensores que possibilitam a medição da temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e altitude de cada dado coletado, além da data e horário. Com isso, dados suficientes são gerados, o que permite estudar a dinâmica espacial e temporal do comportamento dos mosquitos.

Em 2014, Potamitis avaliou o emprego de um sensor óptico baseado em uma fonte de luz laser acoplada a um fototransistor (receptor) na identificação de espécies utilizando somente a FBA. Para isso utilizou um modelo probabilístico de uma mistura de gaussianas complexas e que se mostrou eficaz em capturar as características do som das asas dos insetos. Segundo o autor, os dados gravados são semelhantes a uma gravação realizada por microfone. O autor destaca também que as vantagens do sensor óptico em relação ao microfone é que o sensor não detecta a interferência de ruídos externos. Além disso, estes dispositivos são muito mais baratos do que microfones externos e mais robustos quando utilizados em campo, pois esses sensores não são vulneráveis à umidade ou grandes variações de temperatura, ao contrário dos microfones. Em 2015, o autor, juntamente com Rigakis, desenvolveram um sensor óptico com outra fonte de luz, a LED (*Light Emitting Diodes*), além da luz laser. Foram realizados experimentos com o intuito de comparar o sensor óptico (e os dois tipos de luz) e o microfone na identificação de espécies por meio da FBA. De acordo com os autores, tanto o sensor constituído pelo laser quanto LED apresentaram performance semelhante ou até melhor que o microfone. Segundo os autores os dispositivos optoacústicos podem substituir os microfones na captura dos sons produzidos por insetos. Além disso, os autores afirmam que, uma vez incorporados em armadilhas para insetos, os sensores ópticos mudarão a maneira como o monitoramento de insetos é realizado atualmente (POTAMITIS e RIGAKIS, 2015).

Em 2015 Ouyang et al., empregaram três emissores de luz infravermelha nos sensores para detectar a FBA de mosquitos automaticamente e identificar as espécies e o sexo de cada inseto em tempo real utilizando Aprendizado de Máquina

(*Machine Learning*). Já Mullen et al. (2016) utilizaram uma combinação de fontes ópticas, detectores e *softwares* sofisticados para detectar e identificar insetos voadores em tempo real. Além disso, o sistema pode eliminar os insetos por meio de um pulso de laser letal. Gebru et al. (2018) utilizaram sensor óptico juntamente com uma configuração complexa de espectroscopia de modulação multibanda e laser infravermelho para distinguir espécies de mosquitos transmissores de doenças durante o voo. Este dispositivo permitiu capturar outras características dos mosquitos, além da FBA, como a refletância, a razão espectral e o brilho dos mosquitos. No entanto, estes equipamentos mais complexos somente podem ser utilizados em ambientes controlados, como em laboratórios, não podendo ser utilizados em campo (GENOUD et al, 2019).

Embora tenham ocorrido importantes avanços no desenvolvimento dos sensores ópticos, a maioria das abordagens ópticas estudadas foram implementadas apenas como protótipos de laboratório. A utilização destes dispositivos em campo resulta em novos desafios na calibração, avaliação de desempenho e estabelecimento de novas métricas (SANTOS et al, 2019). Também são necessários mais estudos no que diz respeito ao aperfeiçoamento do processamento, armazenamento e transmissão dos dados.

Apesar das vantagens e facilidades oferecidas pelos sensores ópticos e microfones na identificação de espécies de mosquitos, é importante ressaltar que algumas características referentes aos mosquitos e também ao meio podem ser desafiadoras quando utilizamos a FBA para tal tarefa. Alguns destes desafios encontram-se descritos a seguir.

8.3.3 Outros desafios na utilização da FBA para a identificação de espécies

Alguns fatores devem ser observados e levados em consideração quando se utiliza a FBA para a identificação de espécies de mosquitos utilizando microfones ou sensores ópticos. Segundo Ouyang et al. (2015), algumas espécies de mosquitos possuem FBA semelhantes, o que implica na sobreposição da FBA das espécies e, consequentemente, na impossibilidade de diferenciar tais espécies. Neste caso, características distintas e adicionais de batimento de asas devem ser consideradas para melhorar a precisão na identificação. Para Genoud et al. (2018), a precisão pode ser aperfeiçoada ao adicionar outras variáveis preditivas, como por exemplo o ritmo circadiano. Desse modo, ao registrar a hora e o local onde as medições de campo são realizadas, os dados sobre o ritmo circadiano da atividade de voo, juntamente com a distribuição espacial das espécies de mosquitos, podem aperfeiçoar a preci-

são na identificação das espécies. Isso ocorre, pois, diferentes espécies de mosquitos têm diferentes horários de atividade biológica. No entanto, estas variáveis devem ser tratadas com cautela, uma vez que poderão induzir a um viés nos resultados.

Outro fator importante são as condições ambientais que podem alterar a FBA dos mosquitos, e poucos estudos levaram em consideração tais condições (SANTOS et al., 2019). É comum, na natureza, encontrar mosquitos da mesma espécie, porém com tamanhos diferentes. Este fato ocorre devido a fatores que podem alterar o tamanho do mosquito ainda na fase de larva, como disponibilidade de alimento, densidade larval e temperatura da água durante o desenvolvimento das larvas (VILLARREAL, 2017). Estudos também sugerem que outros fatores como a temperatura (VILLARREAL, 2017), umidade do ar (STAUTON et al., 2019) e a idade (OGAWA e KANDA, 1986) podem alterar a FBA dos mosquitos (SALIM et al., 2017; VILLARREAL et al., 2017), o que torna a identificação das espécies ainda mais desafiadora. O conhecimento destes fatores pode auxiliar no aperfeiçoamento e na acurácia dos dispositivos que utilizam a FBA para a identificação de espécies. Desse modo, ressalta-se a importância de estudos sobre as diversas condições ambientais que podem impactar a frequência de batida de asas de diferentes espécies de mosquitos transmissores de doenças.

8.4 Considerações finais

Esta breve revisão forneceu informações essenciais sobre o emprego de sensores acústicos e ópticos na identificação de espécies de mosquitos transmissores de doenças utilizando a frequência de batimento de asas, bem como suas vantagens e desvantagens. Também reforçou a necessidade do estudo das condições ambientais que influenciam a FBA dos mosquitos. Os estudos realizados até o momento levaram a avanços significativos no aperfeiçoamento de cada tecnologia testada. No entanto, ainda são necessários esforços no que diz respeito ao monitoramento em tempo real, com baixo custo e reduzido consumo de energia e exigência de processamento. Desse modo, o monitoramento de mosquitos transmissores de doenças poderá alcançar grandes regiões, como bairros e até cidades inteiras, bem como locais afastados, onde a presença de especialistas para tal tarefa torna-se inviável.

Agradecimentos

Agradecemos às agências financeiras FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 2016/24622-9), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico - Processo 140534/2017-2) e Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior: Progra-

ma Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE – Processo 88881.190251/2018-1).

Referências

- ARTHUR, B. J.; EMR, K. S.; WYTTENBACH, R. A.; HOY, R. R. Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. *Journal of the Acoustical Society of America*, 135, 933-941, 2014.
- BATISTA, G. E.; KEOGH, E. J.; MAFRA-NETO, A.; ROWTON, E. Sigkdd demo: sensors and software to allow computational entomology, an emerging application of data mining, pp. 761-764. In Proceedings, 17th ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, 21- 24 August 2011, ACM, San Diego, CA, 2011.
- BELTON, P.; COSTELLO, R. A. Flight sounds of the females of some mosquitoes of western Canada. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 26, 105-114, 1979.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496 (7446), 504-507, 2013.
- CARVALHO, D. O.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; LEES, R. S.; CAPURRO, M. L. Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. *Acta Trop.*, 132, 1-8, 2014.
- CHEN, Y.; WHY, A.; BATISTA, G.; MAFRA-NETO, A.; KEOGH, E. Flying insect detection and classification with inexpensive sensors. *J. Insect. Behav.*, 27: 657-677, 2014.
- DUONG, V.; LAMBRECHTS, L.; PAUL, R. E.; LY, S.; LAY, R. S.; LONG, K. C.; HUY, R.; TARANTOLA, A.; SCOTT, T. W.; SAKUNTABHAI, A.; BUCHY, P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *PNAS*, v. 112, n° 47, November 24, 2015.
- EBI, K. L.; NEALON, J. Dengue in a changing climate. *Environmental Research*, 151; 115-123, 2016.
- GEBRU, A.; JANSSON, S.; IGNELL, R.; KIRKEBY, C.; PRANGSMA, J. C.; BRYDEGAARD, M. Multiband modulation spectroscopy for the determination of sex and species of mosquitoes in flight. *Journal of biophotonics*, 11 (8), e201800014, 2018.
- GENOUD, A. P.; BASISTYY, R.; WILLIAMS, G. M.; THOMAS, B. P. Optical remote sensing for monitoring flying mosquitoes, gender identification and discussion on species identification. *Journal of Applied Physics B*, 124, 46, 2018.

- GENOUD, A. P.; GAO, Y.; WILLIAMS, G.M.; THOMAS, B.P. A comparison of supervised machine learning algorithms for mosquito identification from backscattered optical signals. **Ecological Informatics**, 58, 101090, 2020.
- KAHN, M. C.; CELESTIN, W.; OFFENHAUSER, W. Recording of sounds produced by certain disease-carrying mosquitoes. **Science (Washington)**, pp.335-6, 1945.
- MOORE, A.; MILLER, J. R.; TABASHNIK, B. E.; GAGE, S. H. Automated identification of flying insects by analysis of wingbeat frequencies. **Journal of Economic Entomology**, 79, 1703-1706, 1986.
- MOURA, L.; NADAI, B. L.; CORBI, J. J. What does not kill it does not always make it stronger: High temperatures in pyriproxyfen treatments produce *Aedes aegypti* adults with reduced longevity and smaller females. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 23, 529-535, 2020.
- MUKUNDARAJAN, H.; HOL, F. J. H.; CASTILLO, E. A.; NEWBY, C.; PRAKASH, M. Using mobile phones as acoustic sensors for high-throughput mosquito surveillance. **eLife**, 6: e27854, 2017.
- MULLEN, E. R.; RUTSCHMAN, P.; PEGRAM, N.; PATT, J. N.; ADAMCZYK JR., J. J.; JOHANSON, E. Laser system for identification, tracking, and control of flying insects. **Optics Express**, 24, 11, 2016.
- OGAWA, K.-I.; KANDA, T. Wingbeat frequencies of some anopheline mosquitoes of East Asia (Diptera: Culicidae). **Applied Entomology and Zoology**, 21, 430-435, 1986.
- OUYANG, T.-H.; YANG E.-C.; JIANG, J.-A.; LIN, T.-T. Mosquito vector monitoring system based on optical wingbeat classification. **Computers and Electronics in Agriculture**, 118, 47-55, 2015.
- PARK, D.; BOWLES, J.; MCKENZIE, B.; NARAYANAN, H. V.; PRAKASH, M.; BLAGBURN, B.; STARKEY, L.; ZOHDY, S. An investigation of *Dirofilaria immitis* infection and its effects on mosquito wingbeat frequencies. **Veterinary Parasitology**, 283, 109112, 2020.
- POTAMITIS, I. Classifying insects on the fly. **Ecological Informatics**, 21, 40-49, 2014.
- POTAMITIS, I.; RIGAKIS, I. Novel Noise-Robust Optoacoustic Sensors to Identify Insects Through Wingbeats. **IEEE Sensors Journal**, vol. 15, n. 8, 2015.
- POTAMITIS, I.; RIGAKIS, I. Measuring the fundamental frequency and the harmonic properties of the wingbeat of a large number of mosquitoes in flight using 2D optoacoustic sensors. **Applied Acoustics**, 109, 54-60, 2016.
- POTAMITIS, I.; RIGAKIS, I.; VIDAKIS, N.; PETOUSIS, M.; WEBER, M. Affordable bimodal optical sensors to spread the use of automated insect monitoring. **Journal of Sensors**, 2018.

SALIM, Z. T.; HASHIM, U.; ARSHAD, M. M.; FAKHRI, M. A.; SALIM, E. T. Frequency-based detection of female *Aedes* mosquito using surface acoustic wave technology: Early prevention of dengue fever. **Microelectronic Engineering**, 179, 83-90, 2017.

SANTOS, D. A.; RODRIGUES, J. J.; FURTADO, V.; SALEEM, K.; KOROTAEV, V. Automated electronic approaches for detecting disease vectors mosquitoes through disease vectors mosquitoes through the wingbeat frequency. **Journal of Cleaner Production**, 217, 767-775, 2019.

SILVA, D. F.; SOUZA, V. M.; ELLIS, D. P.; KEOGH, E. J.; BATISTA, G. E. Exploring low cost laser sensors to identify flying insect species. **Journal of Intelligent and Robotic Systems**, 80, (1), 313-330, 2015.

SOTAVALTA, O. The essential factor regulating the wing-stroke frequency of insects in wing mutilation and loading experiments and in experiments at subatmospheric pressure. In: **Annales Zoologici Societatis Zoologicae Botanicae Fenniae Vanamo**, 15, 1-67, 1952.

SOUZA, V. M. A.; DOS REIS, D. M.; MALETZKE, A. G.; BATISTA, G. E. A. P. A. Challenges in benchmarking stream learning algorithms with real-world data. **Data mining and knowledge discovery**, v. 34, p.1-54, 2020.

STAUTON, K. M.; USHER, L.; PRACHAR, T.; RITCHIE, S. A.; SNOAD, N.; JOHNSON, B. J. A novel methodology for recording wingbeat frequencies of untethered male and female *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 35(3), 169-177, 2019.

VILLARREAL, S. M.; WINOKUR, O.; HARRINGTON, L. The impact of temperature and body size on fundamental flight tone variation in the mosquito vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Implications for acoustic lures. **Journal of Medical Entomology**, 54, 1116-1121, 2017.

CAPÍTULO 9

RESPOSTA DA COMUNIDADE OLIGOCHAETA (ANNELIDA: CLITELLATA) EM AMBIENTES AQUÁTICOS SOB DIFERENTES USO DO SOLO

RESPONSE OF THE OLIGOCHAETA COMMUNITY (ANNELIDA: CLITELLATA) IN AQUATIC ENVIRONMENTS UNDER DIFFERENT LAND USE

Guilherme Rossi Gorni¹
Mariana Futenma de Lima²
Douglas Aparecido Girolli³
Juliano J. Corbi⁴

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.9

¹ Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente da Universidade de Araraquara – PPGDTMA UNIARA. <https://orcid.org/0000-0002-9156-6864>. grgorni@gmail.com

² Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente da Universidade de Araraquara – PPGDTMA UNIARA. <https://orcid.org/0000-0002-5574-3106>. futenma19@gmail.com

³ Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente da Universidade de Araraquara – PPGDTMA UNIARA. <https://orcid.org/0000-0003-2063-0053>. douglasgirolli@gmail.com

⁴ Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, ESSC USP. Universidade de São Paulo. <https://orcid.org/0000-0003-0249-9370>. julianocorbi@usp.br

Resumo

Índices bióticos elaborados com base em informações de espécies indicadoras têm sido utilizados por Programas de monitoramento ambiental. O presente capítulo tem como objetivo avaliar a resposta do índice biótico, baseados na comunidade Oligochaeta, em ambientes aquáticos localizados no Estado de São Paulo sob diferentes padrões de uso do solo, bem como determinar espécies nativas com potencial indicador em relação ao gradiente ambiental encontrado.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Bioindicadores. Ecologia Aquática

Abstract

Biotic indices developed based on indicator species information have been used by Environmental Monitoring Programs. This chapter aims to evaluate the response of the biotic index, based on the Oligochaeta community, in aquatic environments located in the State of São Paulo under different land use, as well as to determine native species with a potential indicator in relation to the environmental gradient found.

Keywords: Biomonitoring. Bioindicators. Aquatic Ecology

9. Introdução

A água e os serviços ecossistêmicos associados a rios e lagos desempenham papel chave na saúde humana, refletindo diretamente no desenvolvimento social e econômico (CHENG et al., 2018). Sabemos que devido à extensão das intervenções humanas, principalmente no território associado a bacias hidrográficas, a qualidade dos recursos hídricos tem sido severamente comprometida. Isto se deve, principalmente, à crescente remoção de florestas nativas, visando à implementação de áreas de cultivo e pastagem, bem como, a ampliação de polos urbanos, contribuindo de forma decisiva para a redução da qualidade e disponibilidade dos recursos hídricos (JAYAWARDANA et al., 2017).

Nesse cenário, torna-se urgente a necessidade de acessar o “status” ecológico dos ecossistemas aquáticos continentais, bem como determinar como estes são afetados pelas diversas ações antrópicas. Partindo desse princípio, o diagnóstico sobre estado de conservação dos mananciais hídricos, subsidiam estratégias adotadas por órgãos gestores, visando à manutenção da disponibilidade e qualidade deste recurso. Como parte essencial do processo de gestão dos recursos hídricos, pode-se destacar a abordagem baseada no emprego de índices bióticos, elaborados com

base em informações de espécies indicadoras (HERMOSO et al., 2010; BIRK et al., 2012). Esses processos visam avaliar de forma comparativa alterações em atributos das comunidades biológicas, avaliando não só parâmetros de diversidade e abundância, quanto a dominância de espécies resistentes e a perda de espécies sensíveis (BARBOUR et al., 1999).

Frente à importância e urgência em diagnosticar e conservar os ecossistemas aquáticos continentais, e por consequência garantir a integridade e disponibilidade da água como um recurso, essas ferramentas, baseadas em índices bióticos, vêm sendo incorporadas à programas de monitoramento de vários países do globo, com destaque para Inglaterra, Alemanha, França e Espanha, além da Austrália e Estados Unidos (Agência Nacional de Águas - ANA, 2013). Comparado aos países citados anteriormente, no Brasil, o uso de índices bióticos em programas de diagnóstico da qualidade de ecossistemas aquáticos continentais ainda é incipiente.

Dentre os grupos faunísticos usados em programas de avaliação e monitoramento da qualidade dos ecossistemas aquáticos, espécies de Oligochaeta foram reconhecidas como valiosos bioindicadores (PRYGIEL et al., 2000), visto que esses animais são especialmente sensíveis à poluição química e orgânica.

9.1 Comunidades de Oligochaeta na avaliação e monitoramento da qualidade de ecossistemas aquáticos continentais

A Classe Oligochaeta (Annelida: Clitellata) é um dos grupos mais abundantes da fauna continental aquática, com aproximadamente 5.000 espécies descritas (MARTIN et al., 2008). Com ampla distribuição nesses ecossistemas, vermes oligoquetos desempenham importante papel em processos de decomposição e ciclagem da matéria orgânica (RÎŞNOVEANU, 2008).

Espécies Oligochaeta são reconhecidas por sua mobilidade limitada, portanto, influenciadas pela composição do habitat no qual se encontram (BEHREND et al., 2012). Dessa forma, fatores ambientais como: tipo e condição do substrato (LAFFONT et al., 2010; MORETTO et al., 2013), disponibilidade de oxigênio dissolvido na água (DORNFELD et al., 2006), bem como condições de condutividade elétrica e concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo) (CORTELEZZI et al., 2017), atuam de forma determinante na estruturação das comunidades Oligochaeta. Ainda, como exemplo de bons bioindicadores, cabe destacar espécies subfamília Tubificinae, comumente registradas em ambientes organicamente enriquecidos, contendo sedimentos lodosos e pouco oxigenados. Ademais, a ocorrência destes organismos

em grandes porcentagens pode descrever locais sob influência de micropoluentes (ex.: metais e Bifenilos Policlorados – PCBs) (PRYGIEL et al., 2000).

Nesse contexto, tomando como base atributos estruturais das comunidades Oligochaeta, a comunidade científica desenvolveu e normalizou alguns índices voltados para o diagnóstico da qualidade do sedimento/água de ecossistemas aquáticos continentais. Uma das métricas de maior destaque é o Índice de Oligochaeta Bioindicador da Qualidade do Sedimento (IOBS) (ROSSO et al., 1993). Este índice é descrito segundo a fórmula abaixo:

$$IOBS = 10 \times S \times T^{-1} \quad (01)$$

onde S é o número total de espécies por amostra, e T é a porcentagem do grupo Tubificidae dominante (com ou sem cerdas capilares) em relação ao número total de oligoquetos. O índice varia de 0 (degradação máxima) a 3 ou mais (elevada qualidade biológica do local).

Na comunidade europeia e na América do Norte, o emprego dessa abordagem na avaliação da qualidade ambiental já está consolidado, tanto pela comunidade acadêmica (VERDONSCHOT, 2006; LAFONT et al., 2010, 2012; TIXIER et al., 2011; VIVIEN et al., 2014), quanto por agências e comissões gestoras (AFNOR, 2002; AQEM consortium, 2002), por exemplo.

Nesse contexto, o presente capítulo tem como objetivo avaliar a resposta do índice biótico, baseados na comunidade Oligochaeta, (IOBS) em rios sob influência de diferentes padrões de uso e ocupação do solo de seu entorno (gradiente de qualidade ambiental). Além deste objetivo, também buscamos determinar espécies nativas com potencial indicador em relação ao gradiente ambiental citado. Nossas hipóteses foram organizadas da seguinte forma:

O IOBS responde de forma satisfatória ao gradiente de qualidade ambiental, variando positivamente de acordo com o aumento da conservação dos ambientes aquáticos.

Espécies da família Tubificidae tendem a ser indicadoras dos padrões de uso do solo considerados responsáveis pelo maior grau de degradação ambiental.

9.2 Metodologia

Para testar nossas hipóteses, amostragens das comunidades Oligochaeta foram realizadas em 14 (quatorze) trechos selecionados de rios localizados no Estado de São Paulo. Esses trechos foram divididos em grupos representando diferentes

impactos antrópicos, relacionados aos padrões de uso e ocupação do solo de seu entorno. Para maiores detalhes vide quadro 1.

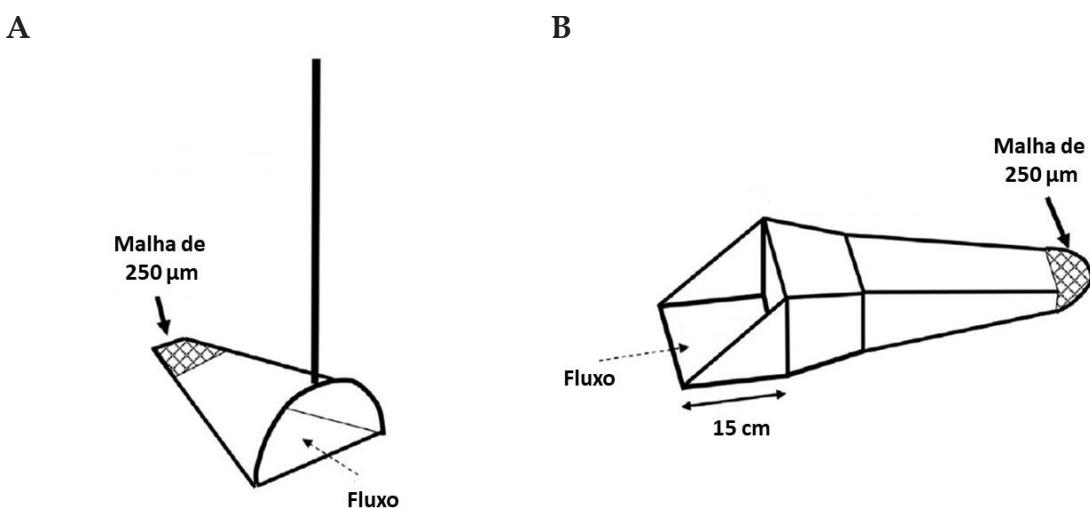
Quadro 01 – Descrição dos grupos analisados segundo padrão de uso e ocupação do solo do entorno.

Grupo (código)	Descrição
Urbano (URB)	Trechos amostrados em rios localizados em ambientes urbano, caracterizados pela ausência de vegetação ciliar, e com acentuado processo de erosão nas margens e assoreamento. Também são registrados despejo de efluentes provenientes de esgoto doméstico. Este grupo representa o estágio de maior degradação ambiental.
Cana (CAN)	Trechos amostrados em rios localizados em ambientes sob influência agrícola, caracterizados pela ausência parcial da vegetação ciliar, e pela presença de cana-de-açúcar em todo seu entorno. Este grupo é classificado em o estágio intermediário de degradação ambiental.
Referência (REF)	Trechos amostrados em afluentes de baixa ordem (1º a 3º) do rio Sapucaí-Guaçú localizados no interior do Parque estadual de Campos do Jordão (PECJ). Estes ambientes são caracterizados pela presença da vegetação ciliar intacta, e seu leito pedregoso, contendo corredeiras de águas límpidas e oxigenadas. Este grupo representa ambientes preservados com influência antrópica praticamente nula.

9.3 Coleta e identificação da fauna

Amostras de sedimento dos trechos selecionados foram coletadas com auxílio de amostradores limnológicos do tipo rede em “D” e Surber (Figura 1 A e B), ambos com malha de 0,25 mm de abertura. O material coletado foi acondicionado em recipientes plásticos de 500 ml, e imediatamente fixado em solução de formol 10%. Encaminhadas ao laboratório, as amostras passaram por um minucioso processo de triagem feito sob microscópio estereoscópico, onde os espécimes Oligochaeta foram separados do sedimento.

Figura 1 – Ilustrações dos amostradores limnológicos utilizados. A: Rede em “D”; B: Surber



Fonte: adaptado de HAUER; RESH, 2017

Os organismos separados foram diafanizados em lâminas semipermeáveis contendo lactofenol, e posteriormente identificados, até o nível de espécie. Este procedimento foi realizado segundo critérios taxonômicos adotados por BRINKHURST; JAMIESON (1971), RIGHI (1984), BRINKHURST; MARCHESE (1989) e TIMM (2009).

Os dados de abundância absoluta foram convertidos em informações de presença/ausência, excluindo dessa forma, eventuais desvios relacionados à utilização de amostradores limnológicos distintos.

9.4 Análises estatísticas

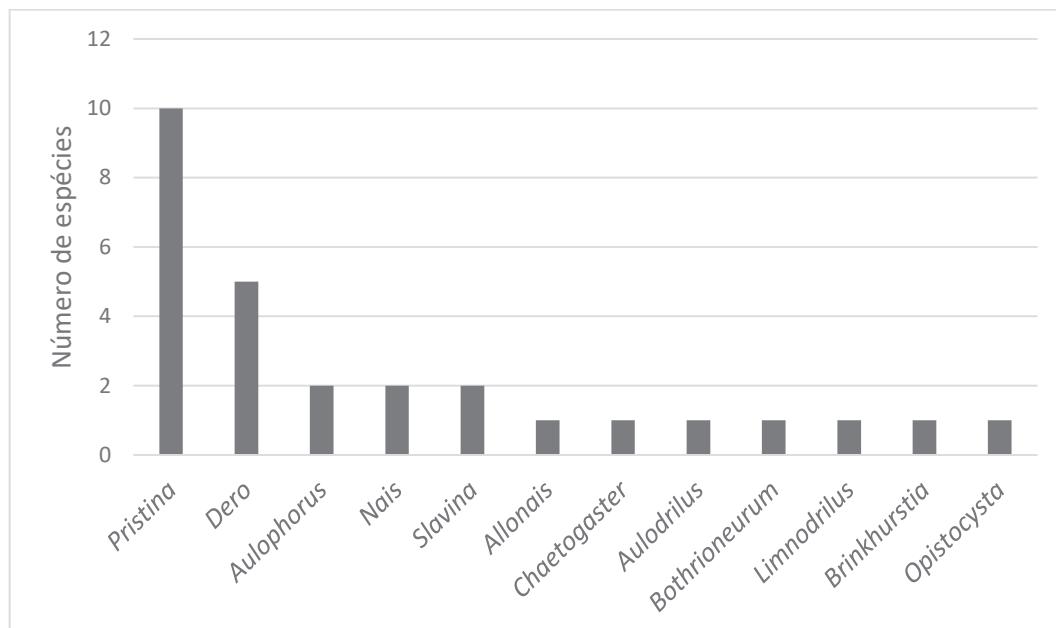
Visando verificar a significância da resposta IOBS em relação aos trechos agrupados segundo padrão de uso e ocupação do solo foi utilizada ANOVA ($\alpha = 0,05$). Para determinação das espécies indicadoras de cada grupo foi utilizada a Análise de Espécies Indicadoras (IndVal) (DUFRÊNE; LEGENDRE, 1997), associada ao teste de significância de Monte Carlo com 1000 permutações. A IndVal apresenta-se como uma análise muito versátil, possibilitando a identificação espécies características ou indicadoras em áreas de monitoramento e conservação, auxiliando o mapeamento da paisagem e em projetos de constituição reservas naturais (DE CACERES; LEGENDRE, 2009).

O cálculo do IOBS, bem como as análises estatísticas foram realizadas no software R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2020), com auxílio do pacote *indicspecies* (DE CACERES; LEGENDRE, op. cit.).

9.5 Resultados

Após análise das 78 amostras dos trechos selecionados foram identificadas 29 espécies, divididas em 6 famílias (Pristinidae, Naididae, Tubificidae, Alluroididae, Opistocistidae e Enchytraeidae). Os gêneros Oligochaeta com maior diversificação de espécies foram: *Pristina* (10 espécies), e *Dero* (05 espécies) (figura 2). Aproximadamente 58% dos gêneros apresentaram apenas uma espécie identificada nos trechos analisados.

Figura 2 – Número de espécies identificadas separadas por gênero no presente estudo.

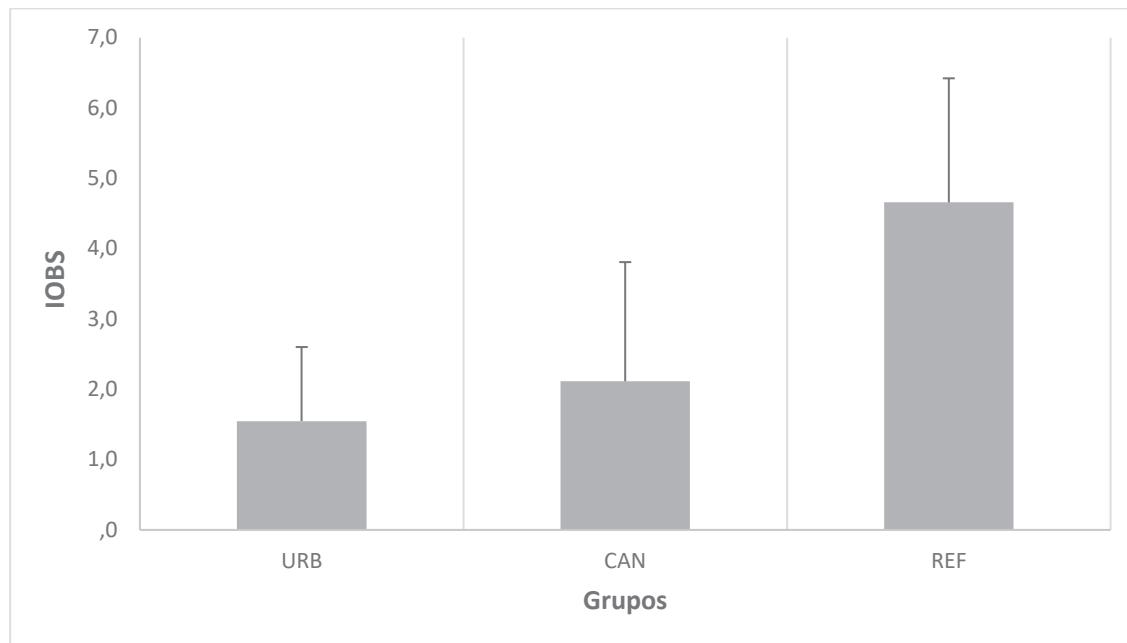


Fonte: Elaboração nossa (2021)

A Família Tubificidae esteve representada por 3 táxons (*Limnodrilus*, *Aulodrilus limnobioides* e *Bothrioneurum* sp.), totalizando aproximadamente 10% da riqueza de espécies registrada.

O IOBS apresentou comportamento de resposta claro de acordo com o gradiente de qualidade ambiental apresentado pelos grupos estudados. Os maiores valores foram registrados no grupo REF (média = 4,7; DP = 1,8), seguido de CAN (média = 2,1; DP = 1,7) e URB (média = 1,5; DP = 1,1) (Figura 3). A análise de variância evidenciou o mesmo padrão, detectando diferenças significativas ($p = 0,000$) dos valores médios do IOBS em relação aos tratamentos (grupos) analisados, corroborando, desta forma, a hipótese *i*. Assim, podemos afirmar que o IOBS responde satisfatoriamente ao gradiente de qualidade ambiental analisado, apresentando relação positiva ao aumento do grau de conservação dos ambientes aquáticos ($URB \leq CAN < REF$).

Figura 3 – Média e Desvio padrão dos valores de IOBS calculados para cada tratamento (grupo) analisado. As letras a e b designam resultados obtidos através da análise pareada *a posteriori* (Tukey, $\alpha = 0,05$), realizada entre os tratamentos (grupos).



Fonte: Elaboração nossa (2021)

A análise de espécies indicadoras (IndVal) permite a caracterização das preferências ambientais qualitativas das espécies-alvo e identifica táxons indicadores de grupos específicos de pontos amostrados. Assim, de acordo com os resultados dessa análise, dentre as 29 espécies registradas no presente estudo, apenas 14 foram consideradas indicadoras dos grupos analisados (tratamentos URB, CAN, REF) (Tabela 2).

Tabela 1 – Resultados da análise de espécies indicadoras (IndVal) segundo os grupos de pontos analisados (URB, CAN e REF). Comp. A: componente A; Comp B: componente B; p : significância estatística ($\alpha = 0,05$).

Espécie	Comp. A	Comp. B	INDVAL	p
URB				
<i>Pristina synclites</i>	1,00	0,43	0,65	0,0005
CAN				
<i>Slavina evelinae</i>	0,96	0,57	0,74	0,0002
<i>Aulophorus costatus</i>	1,00	0,29	0,54	0,0093
<i>Dero digitata</i>	1,00	0,29	0,54	0,0103
<i>Allonais inaequalis</i>	0,63	0,43	0,52	0,0057
<i>Nais variabilis</i>	0,79	0,29	0,48	0,0146
REF				
<i>Enchytraeidae</i>	1,00	1,00	1,00	0,0001
<i>Pristina osborni</i>	1,00	0,83	0,91	0,0001
<i>Pristina rosea</i>	0,70	1,00	0,84	0,0001

<i>Chaetogaster diastrophus</i>	1,00	0,58	0,76	0,0001
<i>Nais communis</i>	0,89	0,42	0,61	0,0012
<i>Pristina proboscidea</i>	1,00	0,33	0,58	0,002
<i>Pristina sima</i>	1,00	0,33	0,58	0,0032
<i>Aulodrilus limnobioides</i>	1,00	0,33	0,58	0,0036

Para os ambientes urbanos (URB), apenas *Pristina synclites* foi selecionada como espécie indicadora, com destaque a elevada especificidade dessa à elevado grau de degradação (componente A = 1,00). Ainda sobre os ambientes com maior nível de degradação, foram selecionadas como indicadoras dos pontos influenciados pela cultura de cana-de-açúcar (CAN), as espécies *Slavina evelinae*, *Aulophorus costatus*, *Dero digitata*, *Allonais inaequalis* e *Nais variabilis*. Os elevados valores registrados do componente A ($\geq 0,63$) para essas espécies, também sugerem especificidade significativa aos ambientes desse grupo CAN.

A análise dos ambientes considerados de referência (REF), revelou a seleção de oito táxons indicadores, Enchytraeidae, *Pristina osborni*, *Pristina rosea*, *Chaetogaster diastrophus*, *Nais communis*, *Pristina proboscidea*, *Pristina sima*, e *Aulodrilus limnobioides*. Segundo valores do componente B da IndVal, que traduz o nível de fidelidade dos táxons ao grupo de pontos selecionados, destacamos Enchytraeidae e *Pristina rosea*, ambos com resultados de fidelidade máxima a esses ambientes (Comp B = 1,00). Essa informação é extremamente útil, pensando na identificação de locais conservados e no estabelecimento destas áreas como prioritárias na conservação dos mananciais hídricos.

Outro ponto de destaque, é a ausência de espécies pertencentes à família Tubificidae selecionadas como táxon indicador dos ambientes que representam padrões de uso do solo considerados responsáveis pelo maior grau de degradação ambiental (URB e CAN), ao contrário do preconizado na hipótese *ii*. Essa informação reforça a necessidade de discussão e revisão das generalizações que consideram, de forma genérica, as espécies da família Tubificidae como sendo indicadoras de ambientes degradados, fato este, não observado em nossa análise.

Finalizando, o uso das informações provenientes das comunidades Oligochaeta em Programas de biomonitoramento demonstram-se eficientes na separação/determinação de ambientes segundo grau de degradação, auxiliando no estabelecimento de áreas prioritárias visando à conservação e gestão do território, bem como o uso de seus recursos. Ainda, cabe ressaltar que essa abordagem demanda ser usada com cautela, pois há necessidade do aprofundamento do estudo da Taxonomia/Sistemática da Classe Oligochaeta, e consequente ampliação no conhecimento da

biologia das espécies. Somente desta forma, as análises poderão ser refinadas e livre de erros conceituais.

Referências

- AFNOR. **Détermination de l'indice oligochètes de bioindication des sédiments (IOBS) NF T 90-390.** 11p., 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2013.** Brasília. 432p., 2013.
- AQEM consortium. **Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive.** Version 1.0, 2002.
- BARBOUR, M.T.; J. GERRITSEN, B.D.; SNYDER, J.B. STRIBLING. **Rapid Bioassessment Protocols for use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish.** 2 Ed. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) Office of Water; Washington, D.C. 339 p., 1999.
- BEHREND, R.D.L., TAKEDA, A.M., GOMES, L.C., FERNANDES, S.E.P. Using Oligochaeta assemblages as an indicator of environmental changes. **Brazilian Jornal of Biology**, v. 72, n. 4, p. 873-884, 2012.
- BIRK, S.; BONNE, W.; BORJA, A.; BRUCET, S.; COURRAT, A.; POIKANE, S. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. **Ecol. Indic.**, v.18, p. 31-41, 2012.
- BRINKHURST, R.O., JAMIESON, B.G.M. **Aquatic Oligochaeta of the world.** University of Toronto Press. 860p., 1971.
- BRINKHURST, R.O.; MARCHESE, M.R. 1989. **Guia para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de Sud y Centroamerica.** Santa Fé: Asociación de ciencias naturales del litoral. 207p., 1989.
- CHENG, X.; CHEN, L.; SUN, R.; KONG, P. Land use changes and socio-economic development strongly deteriorate river ecosystem health in one of the largest basins in China. **Science of the Total Environment**, v. 616-617, p. 376-385, 2018.
- CORTELEZZI, A.; ARMENDÁRIZ, L.; SIMOY, M.V.; MARINELLI, C.B.; CEPEDA, R.E.; RODRIGUES CAPÍTULO, A.; BERKUNSKY, I. **Site-occupancy modelling: a new approach to assess sensitivity of indicator species.** Ecological Indicators, v. 79, p. 191-195, 2017.
- DE CACERES, M.; LEGENDRE, P. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology**, 2009.
- DORNFELD, C.B., ALVES, R.G., LEITE, M.A., ESPÍNDOLA, E.L.G. Oligochaeta in eutrophic reservoir: the case of Salto Grande reservoir and their main affluent (Americana, São Paulo, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.18, n.2, p.189-197, 2006.

DUFRÊNE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, v.67, n. 3, p. 345-366, 1997.

HAUER, F. R.; RESH, R. Chapter 15: Macroinvertebrates. In: HAUER, F. R.; LAMBERTI, G. **Methods in Stream Ecology**. Second Edition, Academic Press. 506p., 2017.

HERMOSO, V.; CLAVERO; M., BLANCO-GARRIDO, F.; PRENDA, J. Assessing the ecological status in species-poor systems: a fish-based index for Mediterranean Rivers (Guadiana River, SW Spain). *Ecological Indicators*, v. 10, p. 1152-1161, 2010.

JAYAWARDANA, J.; GUNAWARDANA, W.; UDAYAKUMARA, E.; WESTBROOKE, M. Land use impacts on river health of Uma Oya, Sri Lanka: implications of spatial scales. *Environ. Monit. Assess.*, v. 189, p. 189-192, 2017.

LAFONT, M.; JÉZÉQUEL, C.; VIVIER, A.; BREIL, P.; SCHMITT, L.; BERNoud, S. Refinement of biomonitoring of urban water courses by combining descriptive and ecohydrological approaches. *Ecohydrol. Hydrobiol.*, v. 10, p. 3-11, 2010.

LAFONT, M.; TIXIER, G.; MARSALEK, J.; JÉZÉQUEL, C.; BREIL, P.; SCHMITT, L. From research to operational biomonitoring of freshwaters: a suggested conceptual framework and practical solutions. *Ecohydrol. Hydrobiol.*, v. 12, p. 9-20, 2012.

MARTIN, P.; MARTÍNEZ-ANSEMIL, E.; PINDER, A.; TIMM, T.; WETZEL, M.J. Global diversity of oligochaetous clitellates (Oligochaeta: Clitellata) in freshwater. In: BALIAN, E.V.; LÉVÈQUE, C.; SEGERS, H.; MARTENS K. Freshwater animal diversity assessment. *Hydrobiologia*, v. 595, n. 1, p. 117-127, 2008.

MORETTO, Y.; SIMÕES, N.R.; BENEDITO, E.; HIGUTI, J. Effect of trophic status and sediment particle size on diversity and abundance of aquatic Oligochaeta (Annelida) in neotropical reservoirs. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, v.49, n.1, p.65-78, 2013.

PRYGIEL, J.; ROSSO-DARMET, A.; LAFONT, M.; LESNIAK, C.; OUDDANE, B. Use of oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediment of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). *Hydrobiologia*, v. 410, p. 25-37, 2000.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

RIGHI, G. **Manual de identificação de invertebrados límnicos do Brasil**. CNPQ/ Coordenação Editorial. 49p., 1984.

RÎŞNOVEANU, G. Oligochaeta assambleges as service providing units in the Danube Delta shallow lakes. *Limnological reports*, v. 37, p. 127-131, 2008.

ROSSO, A. LAFONT, M. EXINGER A. Effets des métaux lourds sur les peuplements d'oligochètes de l'Ill et de ses affluents (Haut-Rhin, France). *Annls. Limnol.*, v. 29, n. 3-4, p. 295-305, 1993.

TIMM T. A. Guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. **Lauterbornia**, v. 66, p. 1-235, 2009.

TIXIER, G.; LAFONT, M.; GRAPENTINE, L.; ROCHFORT, Q.; MARSALEK, J. Ecological risk assessment of urban stormwater ponds: literature review and proposal of a new conceptual approach providing ecological quality goals and the associated bioassessment tools. **Ecological Indicators**, v. 11, p. 1497-1506, 2011.

VERDONSCHOT, P.F.M. Beyond masses and blooms: the indicative value of oligochaetes. **Hydrobiologia**, v. 564, p. 127-142, 2006.

VIVIEN, R.; TIXIER, G.; LAFONT, M. Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area (Switzerland) and Artois-Picardie basin (France): proposition of heavy meta.

CAPÍTULO 10

GUIA PRÁTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNEROS OLIGOCHAETA (ANNELIDA: CLITELLATA) EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

*PRACTICAL GUIDE FOR THE IDENTIFICATION
OF OLIGOCHAETA GENERA (ANNELIDA:
CLITELLATA) IN AQUATIC ECOSYSTEMS*

Guilherme Rossi Gorni¹
Douglas Aparecido Girolli²
Mariana Futenma de Lima³

DOI: 10.46898/rfb.9786558891321.10

¹ Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente da Universidade de Araraquara – PPGDTMA UNIARA. * grgorni@uniara.edu.br

² Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente da Universidade de Araraquara – PPGDTMA UNIARA. <https://orcid.org/0000-0003-2063-0053>. douglasgirolli@gmail.com

³ Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente da Universidade de Araraquara – PPGDTMA UNIARA. <https://orcid.org/0000-0002-5574-3106>. futenma19@gmail.com

Resumo

Guias de identificação são de extrema importância para atrair novos pesquisadores e consequentemente, aumentar o conhecimento da distribuição geográfica e das comunidades de organismos indicadores. Este guia descreve e ilustra os métodos e caracteres necessários para identificar os principais gêneros de oligoquetos aquáticos de ambientes antropizados. Cerca de 40% dos gêneros registrados no Brasil, são apresentados neste capítulo.

Abstract

Identification guides are extremely important to attract new researchers and, consequently, increase the knowledge of the geographical distribution and the communities of indicator organisms. This guide describes and illustrates the methods and characters necessary to identify the main genera of aquatic Oligochaeta from anthropogenic environments. About 40% of the genera registered in Brazil, are presented.

10. Introdução

Esta contribuição tem como objetivo fornecer uma lista dos gêneros de oligoquetas de água doce mais ocorrentes em ecossistemas aquáticos antropizados do Brasil. Devido à funcionalidade deste capítulo, a numeração das páginas do livro foi reiniciada.

Embora o conhecimento de oligoquetos no Brasil tenha crescido muito desde os primeiros trabalhos de Ernesto Marcus na década de 40, a última chave publicada, em português, foi a de Gilberto Righi, em 1984. A elaboração de chaves de identificação é de extrema importância para atrair novos pesquisadores e consequentemente, aumentar o conhecimento da distribuição geográfica e das relações ecológicas destes organismos.

Consideramos que este guia prático pode ser valioso para pesquisadores que desejam aprofundar a identificação taxonômica em trabalhos com macroinvertebrados aquáticos, mesmo que estes não sejam especialistas em anelídeos. Buscamos combinar fotografias de caracteres taxonômicos usados para distinguir grupos em uma sequência de decisões que, poderão reduzir o tempo e facilitar o aprendizado na identificação dos principais gêneros aquáticos de Oligochaeta que ocorrem no Brasil.

A caracterização de cerdas e órgãos reprodutivos internos são cruciais para a sistemática de oligoquetos, mas não são absolutamente necessários para a identificação rotineira. A presente chave de identificação indica os principais caracteres de diagnóstico taxonômico, que embora esteja simplificada, esta abordagem utiliza principalmente estruturas externas mais necessárias para a identificação em nível de gênero, visíveis sob um microscópio óptico.

10.1 Subclasse Oligochaeta

O táxon Oligochaeta (Annelida: Clitellata) está inserida no Filo Annelida. A principal característica do filo é o metamerismo, isto é, o corpo anelídeo consiste em uma série de segmentos similares a anéis, dispostos ao longo do eixo anteroposterior, frequentemente visíveis externamente (TIMM, 2009; MUGNAI et al., 2010; RODRIGUEZ; REYNOLDSON, 2011).

Classificar este táxon ainda hoje é uma problemática para os pesquisadores, especialmente para os organismos aquáticos. Há muito se suspeita do grupo Oligochaeta ser parafilético (ERSÉUS, 1987), e isto, se confirmou no início dos anos dois mil por meio de pesquisas moleculares (MARTIN, 2001; SIDDALL et al., 2001).

Desta maneira, Clitellata se tornou sinônimo de Oligochaeta, logo, a “subclasse” Oligochaeta inclui, portanto, dentre os clitelados, os Oligochaeta sensu stricto, os Branchiobdellida, os Acanthobdellida e os Hirudinea; ainda dentro do mesmo filo, Annelida, estão os táxons não-clitelados, Aphanoneura e Polychaeta (SKET; TRONTELJ, 2007; TIMM; MARTIN, 2015; VERDONSCHOT, 2015; MARCHESE; ALVES, 2020). Para mais detalhes ver Verdonschot (2015).

Cerca de 5.000 espécies são validamente reconhecidas (ERSÉUS, 2005) entre cerca de 30 famílias (TIMM; MARTIN, 2015), embora predominantemente terrestres (megadrile) os oligoquetos também ocorrem em ambientes marinhos, estuarinos e dulcícolas (microdrile) (BALIAN et al., 2007; MARTIN et al., 2008). Aproximadamente 1.700 espécies são aquáticas, sendo 600 marinhas (ERSÉUS, 2005) e cerca de 100 são encontradas em águas subterrâneas (DES CHÂTELLIERS et al., 2009). Em ambientes límnicos, a Subclasse Oligochaeta possui relativa representatividade na fauna de macroinvertebrados aquáticos, sendo um dos táxons mais dominantes em sedimentos de água doce (VIVEN et al., 2014).

No Brasil, o número de espécies registradas é de 101 (SILVA, 2017), onde 77 delas foram encontradas no estado de São Paulo (GORNI et al., 2015; GIROLI et al., 2018; GIROLI et al., 2020). Estes organismos podem ser encontrados em diversos

tipos de substratos, como, arenosos e argilosos (DORNFELD et al., 2006; ALVES et al., 2008; PETSCH et al., 2013; 2015), contendo folhiços (GORNI; ALVES, 2012) e em ambientes enriquecidos por matéria orgânica (BEHREND et al., 2012). Estes vermes também são encontrados aderidos a outros organismos, como briófitas e macrófitas aquáticas (CORREIA; TRIVINHO-STRIXINO, 1998; TRIVINHO-STRIXINO et al., 2000; ALVES; GORNI, 2007; GORNI; ALVES, 2007; SANCHES et al., 2016a), esponjas (GORNI; ALVES, 2008), moluscos gastrópodes (GORNI; ALVES, 2006), larvas de insetos (CORBI et al., 2004), e anfíbios (ODA et al., 2015) que por estes, podem ser transportados para tanques de bromélias (LOPEZ et al., 1999; 2005).

10.2 Coleta, preservação e montagem de lâminas

O método de coleta varia de acordo com o ambiente a ser amostrado e os objetivos do trabalho. Basicamente, existem três tipos de amostradores (redes, delimitadores e pegadores) para coleta de oligoquetos.

As Redes com de malha de 0,25 mm de abertura (por exemplo Rede em “D”) são muito utilizadas em bancos de macrófitas ou em riachos rasos. Podem ser empregadas na amostragem de dados qualitativos ou semiquantitativos, para isto, o esforço amostral deve ser padronizado temporal ou espacialmente. Delimitadores, são redes (com 0,25 mm de abertura) associadas a delimitador de área (por exemplo “Surber”). Estes são empregados na amostragem de dados quantitativos, usados em riachos rasos com fundo pedregoso ou de cascalho. Pegadores de sedimento são utilizados em ambientes profundos. O pegador Ekman-Birge melhor se adequa à coleta de amostras de ambientes lênticos, já os pegadores van Veen e Ponar à ambientes lóticos.

O processo de triagem deve ser feito com cuidado, pois frequentemente este processo causa danos e perda de estruturas nos organismos, inviabilizando a identificação de vários naidídeos, por exemplo. O sedimento ou substrato é lavado sobre peneira com malha de 0,25 mm, sendo posteriormente, depositado em bandeja branca sobre fonte de luz, permitindo a visualização dos organismos.

Para a fixação de invertebrados sem exoesqueleto, como os oligoquetos, Vivien et al. (2018) recomendam o uso de formaldeído tamponado neutro no máximo por quatro semanas, e etanol absoluto para preservação a longo prazo. Este processo garante a preservação significativa dos tecidos e DNA. No entanto, como o formaldeído é levemente tóxico para o pesquisador, pode-se fixar e preservar em etanol 70% (TIMM, 2009).

A montagem das lâminas pode seguir dois caminhos, permanente ou temporário. Apresentaremos a seguir o processo de montagem de lâminas temporárias.

Duas soluções podem ser usadas neste processo, lactofenol Ammans recomendado por Brinkhurst e Marchese (1989) ou glicerina (TIMM, 2009). O lactofenol exibe estruturas as cerdas com muita eficiência, mas pode destruir os tecidos moles rapidamente. Ao contrário, com a glicerina pode-se seguramente reinserir os animais em etanol para preservação ou estudos futuros. No caso da glicerina é razoável deixá-los de molho por várias horas ou dias antes de montá-los sob uma lamínula.

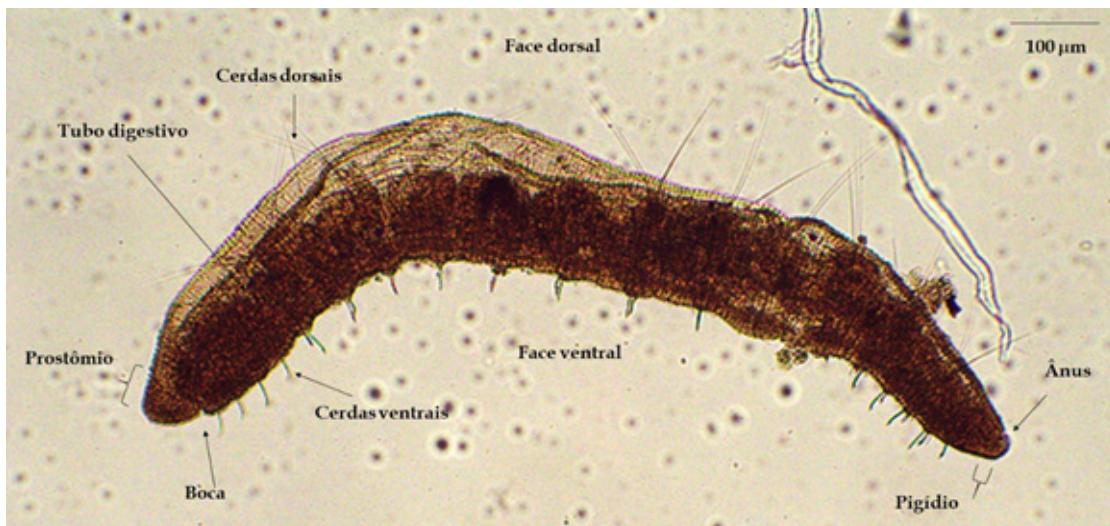
Após a escolha da solução a ser utilizada, basta colocar uma ou duas gotas sob a lâmina. Coloque o oligoqueto por alguns segundos sobre um papel-toalha para remover o excesso da solução em que estava preservado. Insira os animais sobre as gotas da lâmina e os cubra com a lamínula.

10.3 Identificação

A identificação dos oligoquetos em sua forma mais prática deve seguir alguns passos essenciais:

Primeiro, identifique as extremidades anterior e posterior, e as faces dorsal e ventral. A extremidade anterior é geralmente mais espessa, enquanto a porção da cauda é mais alongada e uniforme. O primeiro segmento recebe o nome de prostômio, este, é sempre desprovido de cerda, e em sua face ventral está posicionada a abertura oral. Em alguns oligoquetos, o prostômio pode conter uma projeção, que recebe o nome de probóscide. A contagem de segmentos (feita em algarismos romanos) segue os feixes cerdais iniciando em II, até o último segmento chamado de pigídio. Todos estes caracteres taxonômicos podem ser analisados na figura 1.

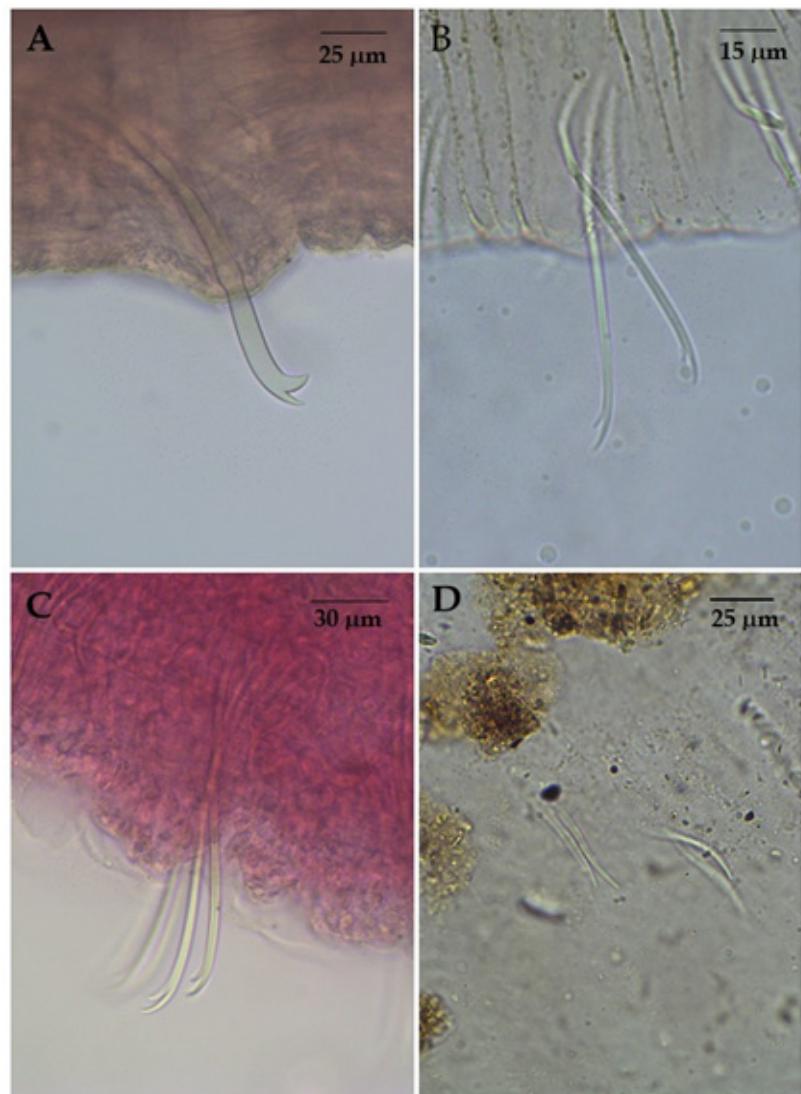
Figura 1. Visão externa das estruturas corporais de Oligochaeta.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

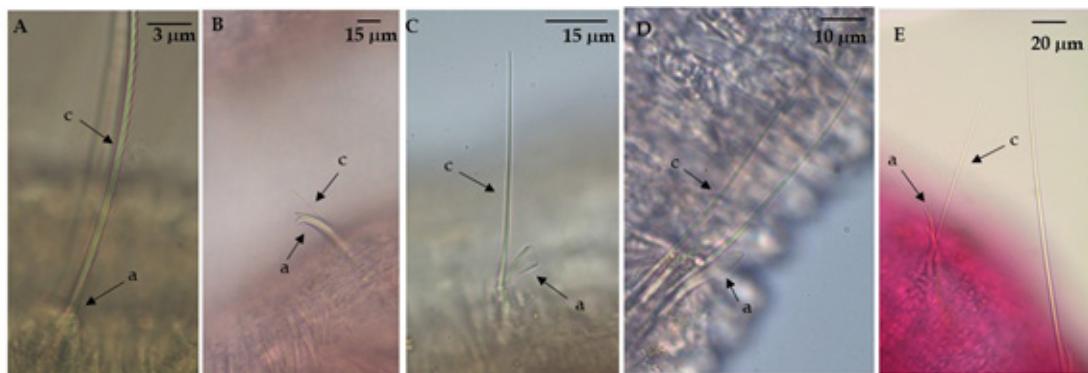
O segundo passo de identificação é a classificação das cerdas ventrais e dorsais. As cerdas ventrais são geralmente bífidas, algumas espécies maduras podem apresentar cerdas genitais geralmente entre os segmentos X-XIII (Figura 2). As cerdas dorsais são divididas em dois grupos: acicular e capilar. As cerdas aciculares são variadas, no entanto, são cruciais para a sistemática de oligoquetos. Estas cerdas se apresentam nos formatos, unicúspide, bífida, pectinada, palmada, plumosas ou serrilhadas. Já as capilares, são cerdas longas e finas como o próprio nome sugere (Figura 3).

Figura 2. Cerdas anteriores ventrais (A, B e C) e cerdas genitais (D) de oligoquetos aquáticos.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

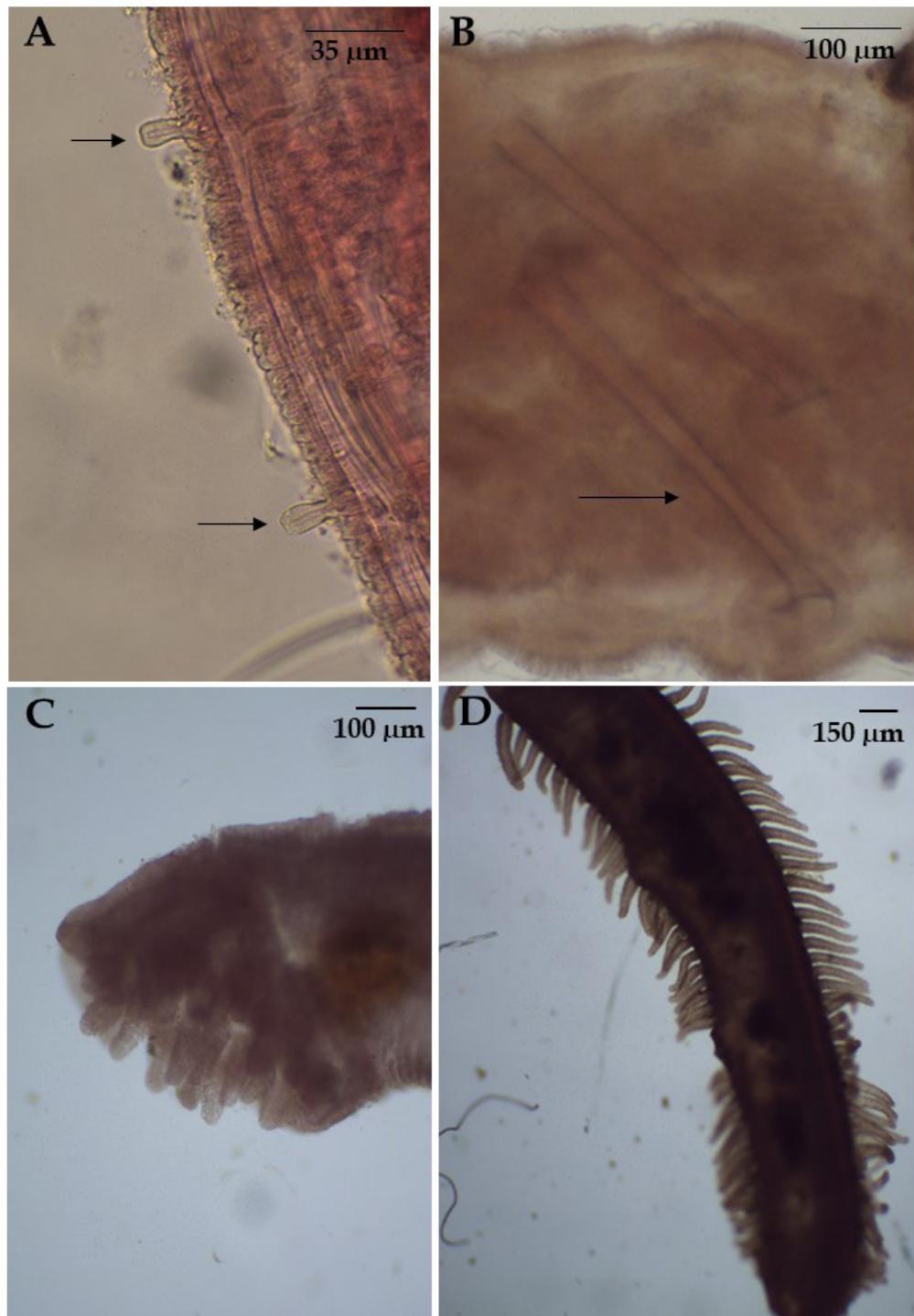
Figura 3. Cerdas dorsais de oligoquetos aquáticos. A - capilar serrilhada (c) e acicular unicúspide (a); B - capilar unicúspide (c) e acicular bífida com dentes curtos (a); C - capilar unicúspide (c) e acicular palmada (a); D - capilar unicúspide (c) e acicular com forma de remo (a); E - acicular bífida com dentes longos (a) e capilar unicúspide (c).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Outros caracteres externos essenciais para a identificação além das cerdas, são a presença de papilas na superfície corporal; bainha peniana, bem distingível em espécimes maduros de Tubificídeos; e na região posterior, apêndices caudais e brânquias. As brânquias podem circundar o pigídio, ou estar presentes em vários segmentos da região posterior (Figura 4).

Figura 4. Caracteres taxonômicos externos de oligoquetos aquáticos. Papilas (A), Bainha peniana (B) e brânquias (C e D).



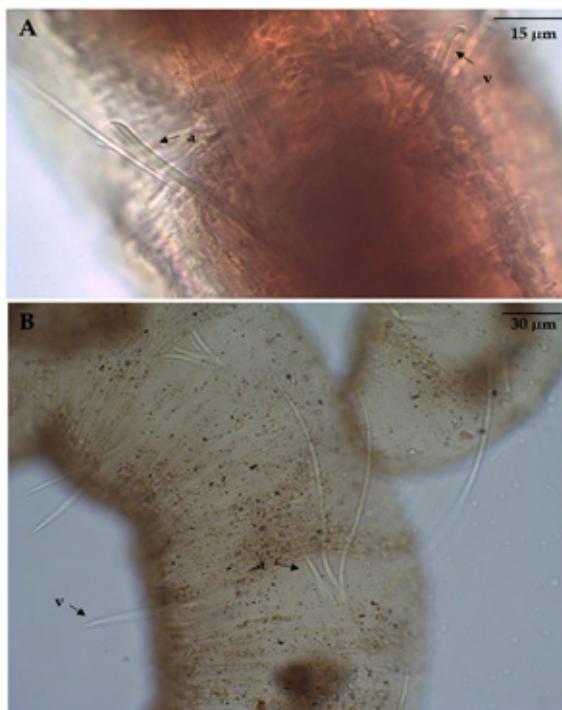
Fonte: Elaboração nossa (2021).

10.3.1 Famílias

Naididae

Os naidídeos apresentam como características morfológicas gerais: presença de olhos ou não; prostômio geralmente bem desenvolvido; cerdas ventrais começam em II (mais de duas por feixe), bífidas, raramente unicúspides; cerdas dorsais presentes ou ausentes que podem começar a partir do segmento IV. As cerdas capilares quando presentes são acompanhadas por cerdas aciculares visivelmente diferentes das ventrais (Figura 5) que podem ser bífidas, unicúspides, espatuladas ou pectinadas. Espécimes maduros sexualmente apresentam clitello em V e VIII; cerda genital presente ou ausente; pode apresentar brânquias ciliadas ao redor do ânus (pigídio) (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).....(Página 222)

Figura 5. Diferenciação entre as cerdas ventrais (v) e acicular (a) de um Naididae (Oligochaeta).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

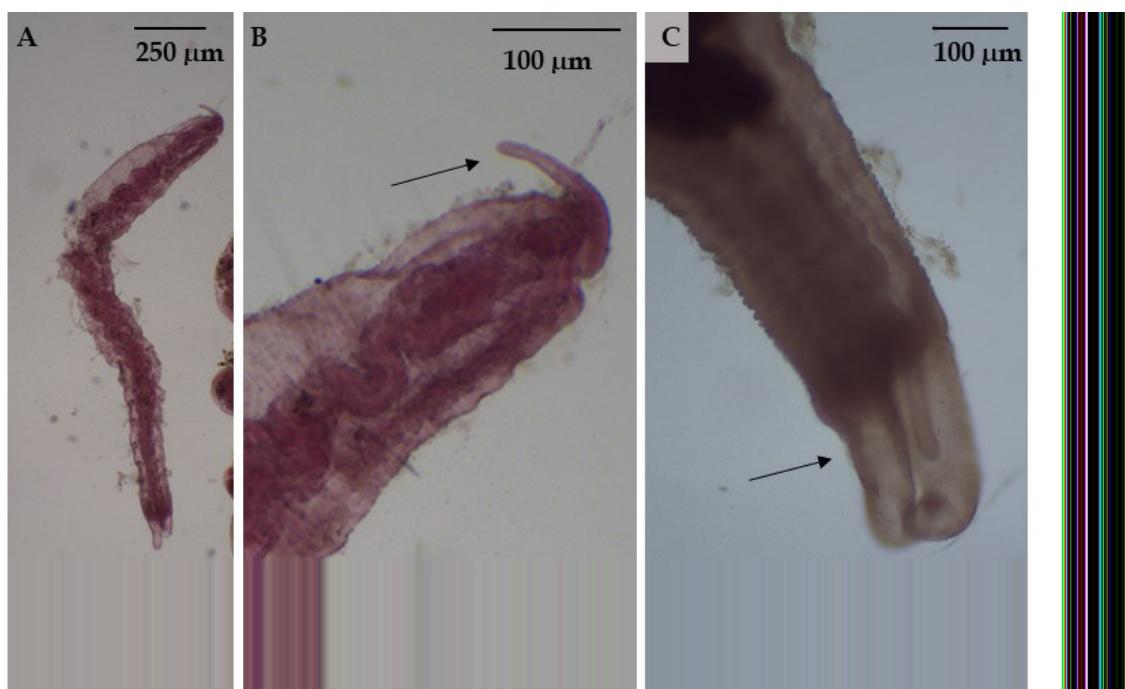
Pristinidae

Prostômio pode apresentar probóscide ou não; olhos geralmente ausentes; cerdas dorsais geralmente começam em II; cerdas capilares e aciculares unicúspides ou bífidas, com dentes curtos ou longos (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Esta família apresenta apenas um gênero, *Pristina*. Abaixo, apresentamos imagem de indivíduo deste gênero com probóscide presente no prostômio (mas pode estar ausente) e onde as cerdas dorsais iniciam (Figura 6).

Observação: espécimes com probóscide, aciculares unicúspides, que apresentam três projeções no extremo posterior do corpo são opistocistídeos (BRINKHURST; MARCHESE, 1989)(Abaixo)

Figura 6. *Pristina* sp. (Pristinidae: Oligochaeta) com probóscide e início das cerdas dorsais no segmento II.

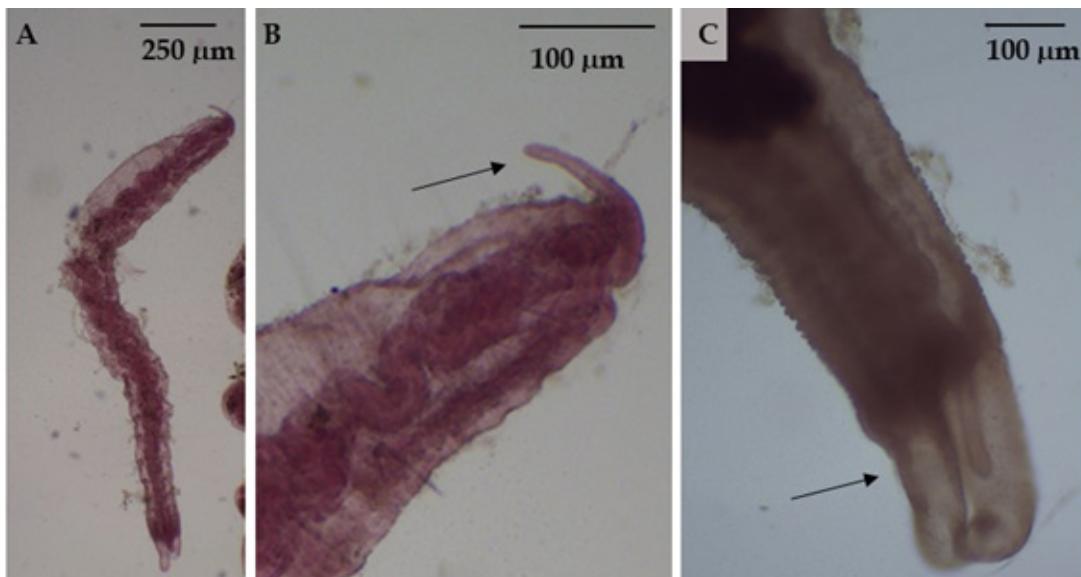


Fonte: Elaboração nossa (2021).

Opistocystidae

A família Opistocystidae possui apenas o gênero *Opistocysta*. A característica mais marcante é a presença de apêndices caudais. As cerdas capilares podem ser unicúspide ou serrilhadas, como mostra a figura 7 (MARCHESE; ALVES, 2020)(Abaixo)

Figura 7. Estruturas externas de *Opistocysta* sp. (Opistocystidae: Oligochaeta). A - visão geral; B - probóscide; C - apêndices caudais.

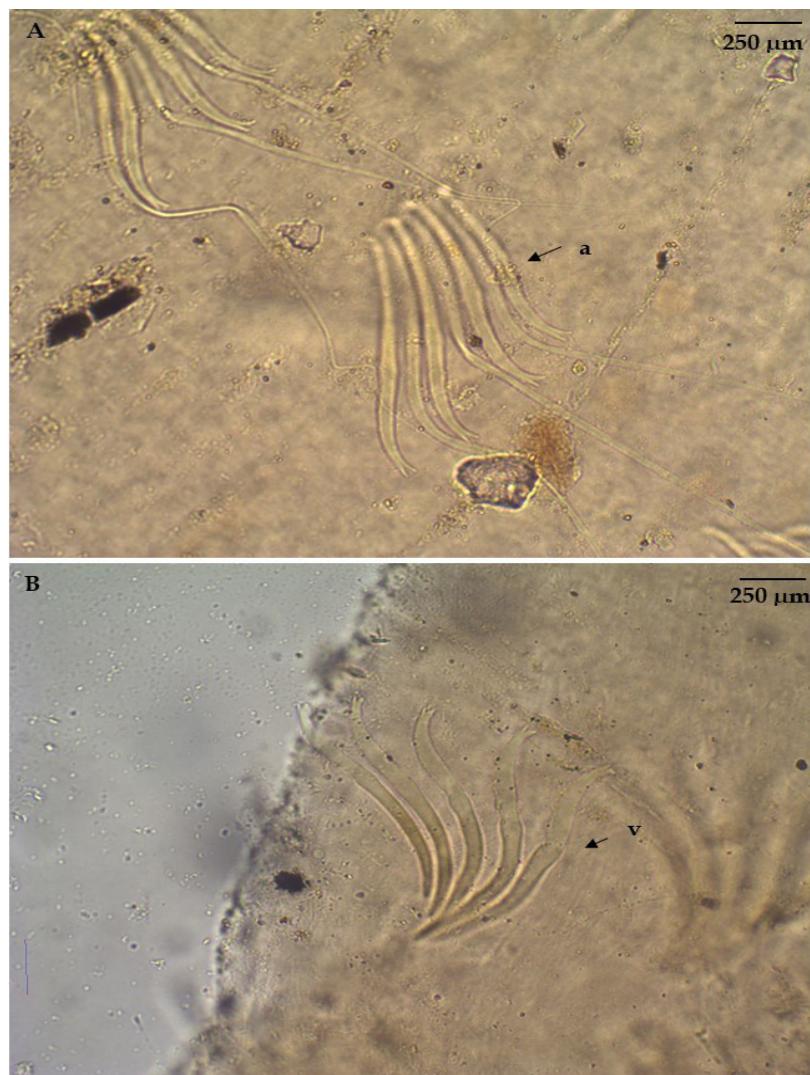


Fonte: Elaboração nossa (2021).

Tubificidae

Os tubificídeos apresentam como características morfológicas gerais: prostômio sem probóscide; cerdas ventrais e aciculares sem nenhuma diferenciação, começando em II (Figura 8). Cerdas bífidas, raramente unicúspides; cerdas capilares unicúspides presentes ou não. Bainha peniana presente ou ausente; brânquias ausentes ou presentes nos segmentos posteriores como projeções filiformes (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020)(Página 228)

Figura 8. Semelhança entre as cerdas aciculares (A) e ventrais (B) de um Tubificidae (Oligochaeta).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Naididae

Cerdas dorsais ausentes(Abaixo)

Cerdas dorsais iniciando a partir de IV(Página 223)

Chaetogaster

Prostômio geralmente bem desenvolvido; cerdas dorsais ausentes, supostamente associado à grande modificação da faringe; cerdas ventrais bífidas, raramente unicúspides, conforme figura 9 (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Figura 9. Visão geral de um *Chaetogaster* sp. (Naididae: Oligochaeta).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Presença de papilas na parede corporal *Slavina* (Abaixo)

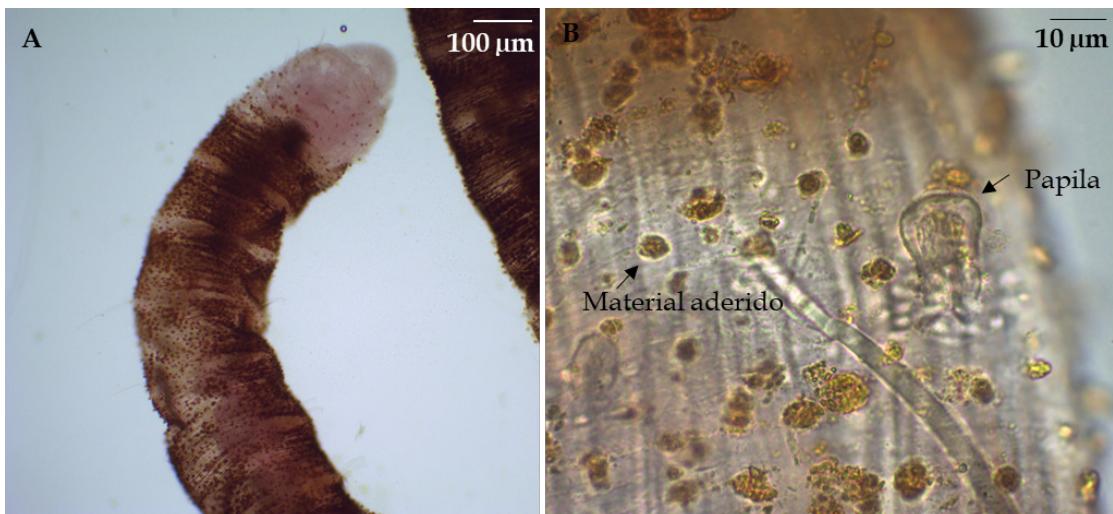
Presença de brânquias na extremidade posterior (Página 224)

Parede corporal sem papilas e, brânquias ausentes (Página 226)

Slavina

Olhos presentes ou não; cerdas dorsais começam entre IV e VII, cerdas capilares lisas, mais longas em V ou VI em algumas espécies; cerdas aciculares finas, unicúspides, com ponta aumentada ou ligeiramente bifidas; cerda peniana presente. Parede corporal coberta por papilas sensoriais, com secreção de substância que incorpora bactérias e outras partículas estranhas, que podem dificultar a visualização das cerdas (Figura 10) (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Figura 10. Visão geral de *Slavina* sp. (Naididae: Oligochaeta) (A), com detalhe para papilas e materiais aderidos ao corpo (B).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

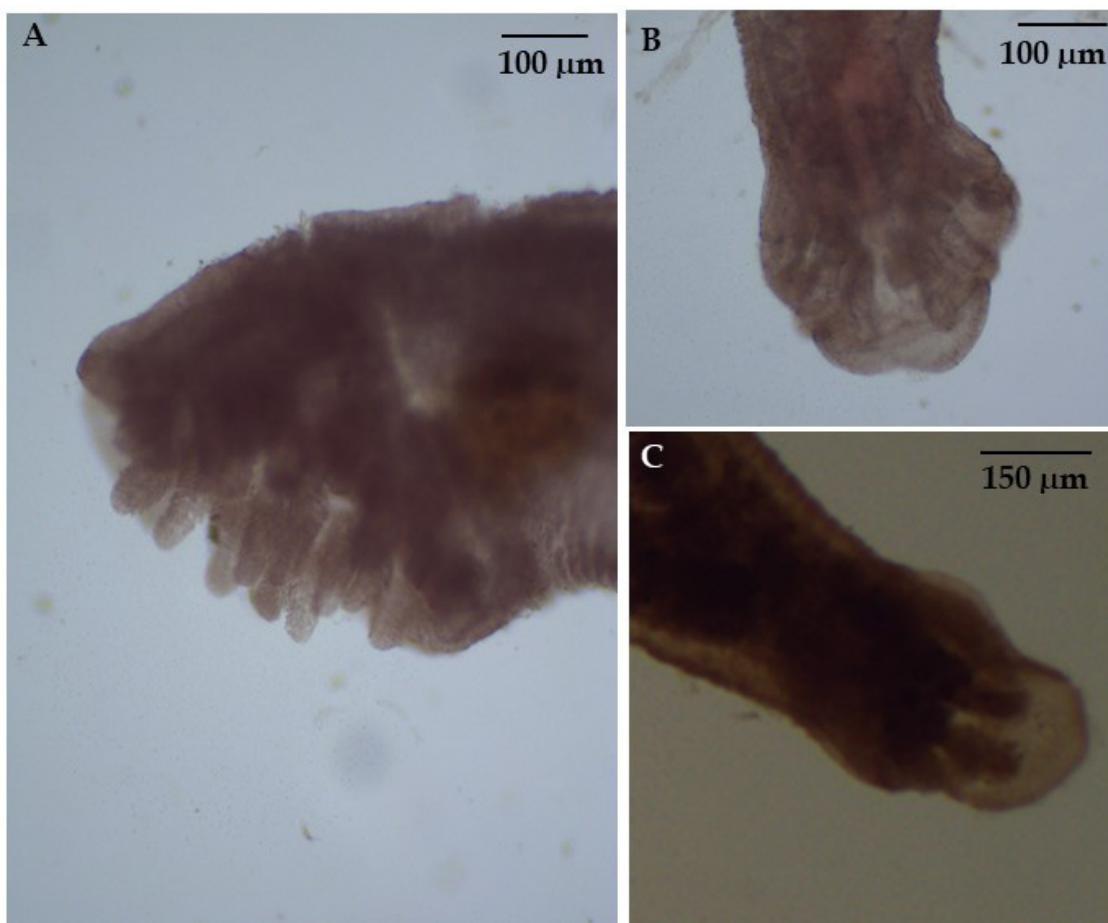
Brânquia sem palpos *Dero* (Abaixo)

Brânquia com palpos *Aulophorus* (Página 225)

Dero

Apresentam como uma de suas características morfológicas principais a presença de fossa branquial na parte posterior do corpo (Figura 11). Cerdas dorsais começam em IV - VI; capilares e aciculares bífidas, pectinadas ou palmadas; cerdas ventrais de II - V geralmente de tamanho e/ou forma diferente das restantes; cerdas penianas presentes ou não (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Figura 11. Fossa branquial de *Dero* sp. (Naididae: Oligochaeta).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Aulophorus

Sua principal característica morfológica que o diferencia é, além das brânquias, a presença de projeções na parte inferior da fossa branquial denominadas palpos (Figura 12); cerdas dorsais começam em IV, V, VI; cerdas ventrais de II - V com formato e/ou tamanho igual ou diferentes das seguintes; cerdas penianas geralmente ausentes (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Figura 12. Fossa branquial de *Aulophorus* sp. (Naididae: Oligochaeta) (A), com detalhe para os palpos (B e C).



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Cerdas aciculares apresentam o mesmo padrão *Nais* (Abaixo)

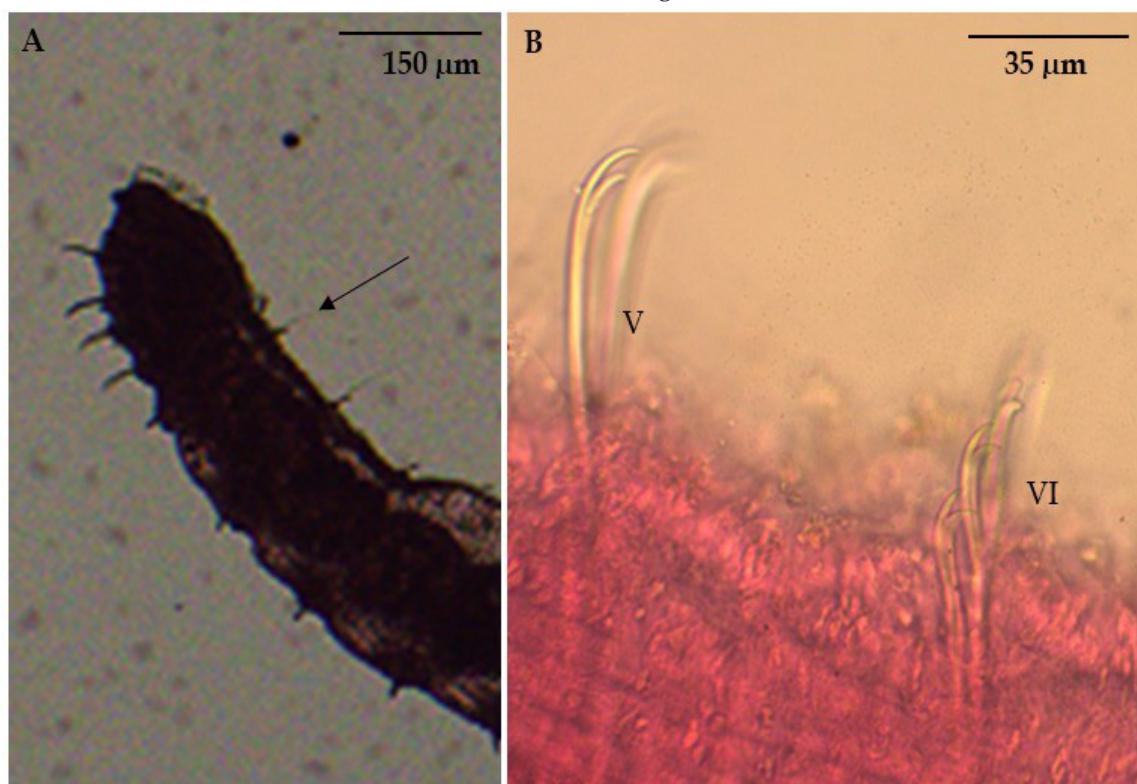
Cerdas aciculares com variação entre os segmentos *Allonais* (Página 227)

Nais

Olhos geralmente presentes; cerdas dorsais começam entre V e VI; cerdas capilares e aciculares unicúspides ou bífidas, ou espatuladas; cerdas ventrais mudam de forma entre V e VI, diferença evidente na maioria das espécies, incluindo comprimento e largura (Figura 13) (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Observação: alguns espécimes de *Dero* com o extremo posterior ausente podem ser classificados como *Nais*. Para evitar esse tipo de erro classifique-os como um espécime de Naididae.

Figura 13. *Nais* sp. (Naididae: Oligochaeta). A - Cerdas dorsais iniciando em VI; B - modificação das cerdas ventrais entre os segmentos V e VI.

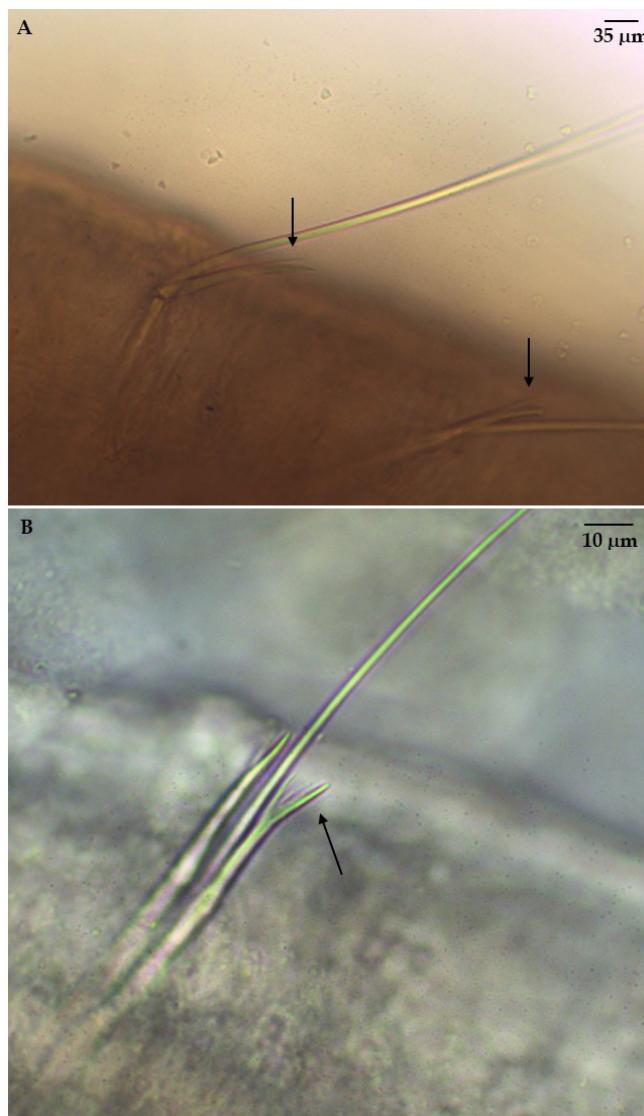


Fonte: Elaboração nossa (2021).

Allonais

Cerdas ventrais de II - V ligeiramente diferentes dos segmentos seguinte, mudam de forma entre V e VI. Cerdas dorsais começam em V - VII, bífidas com dentes de comprimento desigual, raramente unicúspides, dente superior mais longo ou mais curto, pectinadas, ou ainda completamente ausentes; cerdas penianas presentes ou não (Figura 14) (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Figura 14. Cerdas aciculares de *Allonais* sp. (Naididae: Oligochaeta). A - cerdas bífidas com dente (superior e inferior) desiguais; B - cerda pectinada.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Tubificidae

Presença de cerda capilar(Abaixo)

Cerdas capilares ausentes(Página 230)

Modificação das cerdas aciculares a partir de VII*Aulodrilus* (Abaixo)

Sem modificação de cerdas capilares, brânquias filiformes presentes ou ausentes*Branchiura* (Abaixo)

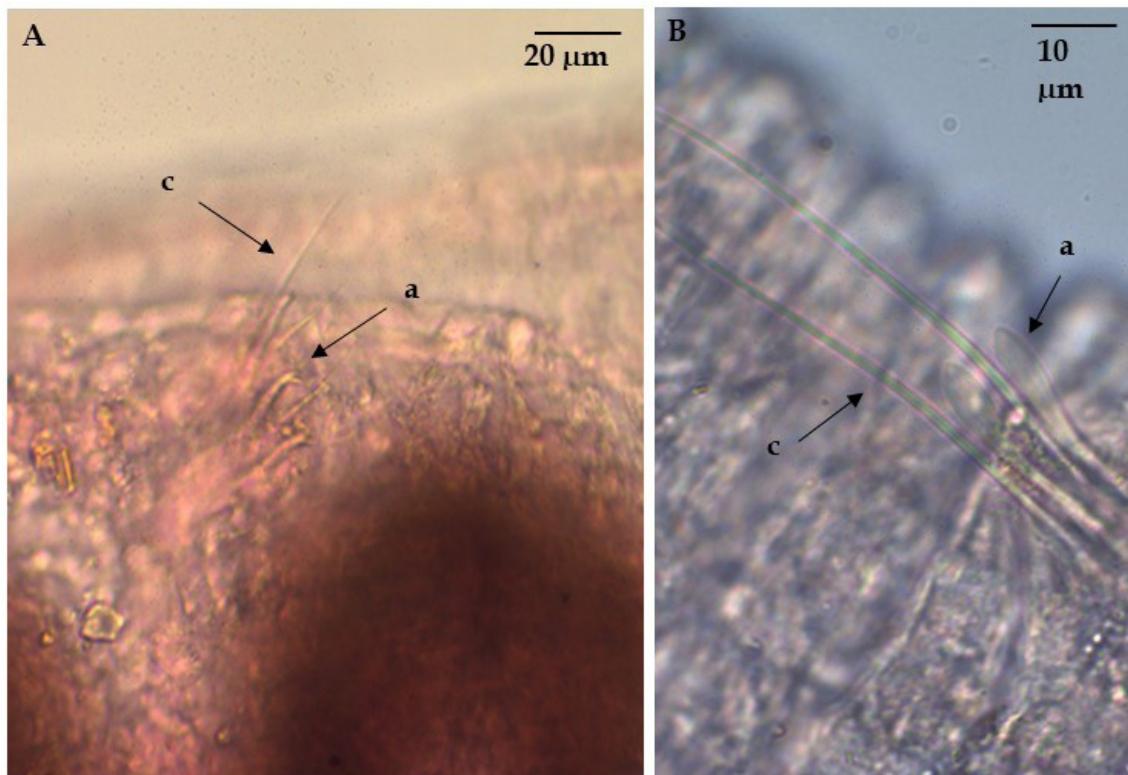
Aulodrilus

Pequenos indivíduos sem brânquias; cerda dorsal bífida com dente superior mais curto e mais fino que o inferior, a partir do segmento VII a cerdas bífidas se modificam em forma de remo (Figura 15). Cerdas penianas, quando presentes, apresentam formato de colher (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Branchiura

Indivíduos grandes que possuem como característica marcante a presença de filamentos branquiais dorsais e ventrais nos segmentos posteriores em indivíduos maduros (Figura 4, D) (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020). Em organismos jovens, que não apresentam brânquias, a identificação pelas cerdas pode ser realizada. Para visualizar as cerdas dorsais e ventrais ver figura 8.

Figura 15. Modificação das cerdas aciculares de *Aulodrilus* sp. (Tubificidae: Oligochaeta). A- (a) acicular bífida antes de modificar, (c) capilar unicúspide; B - (a) acicular em forma de remo após modificação, (c) capilar unicúspide.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

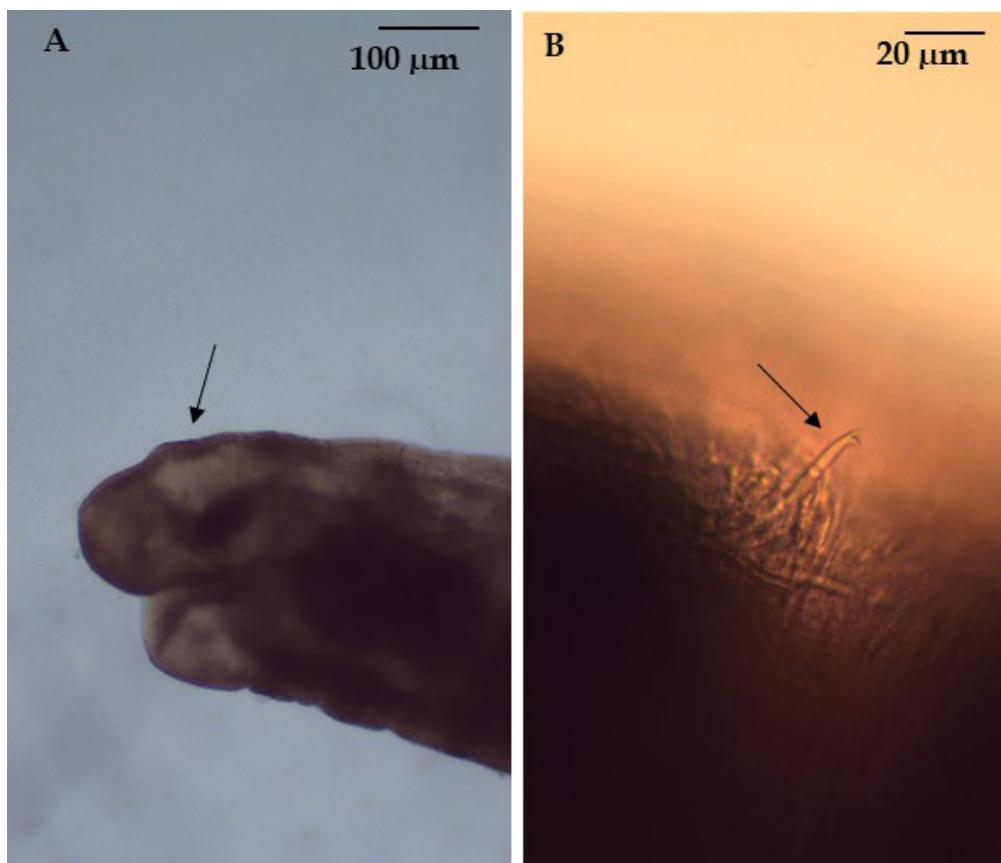
Presença de fossa prostomial *Bothrioneurum* (Abaixo)

Ausência de fossa prostomial, bainha peniana presente em organismos maduros sexualmente *Limnodrilus* (Página 231)

Bothrioneurum

Este gênero apresenta como característica peculiar a presença de fossa prostomial; cerdas penianas modificadas presentes ou ausentes; sem bainha peniana em XI (Figura 16) (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Figura 16: *Bothrioneurum* sp. (Tubificidae: Oligochaeta). A - fossa prostomial; B - cerda ventral bífida.



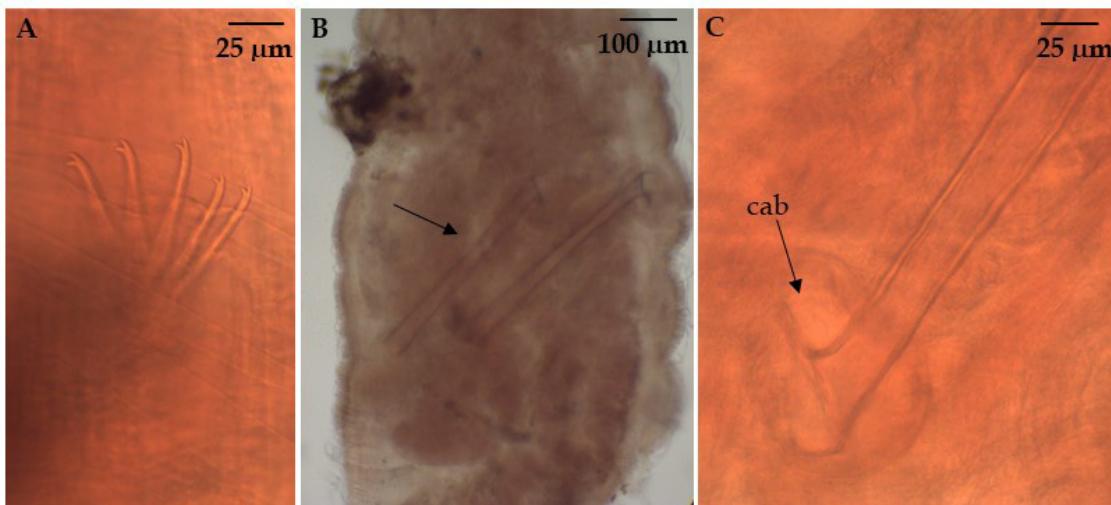
Fonte: Elaboração nossa (2021).

Limnodrilus

A principal característica deste gênero é a presença de bainha peniana em pares no segmento XI; não apresentam cerdas capilares (RIGHI, 1984; BRINKHURST; MARCHESE, 1989; MARCHESE; ALVES, 2020).

Observação: quando a bainha peniana não está totalmente desenvolvida, caso em que pode ser mais curta do que o normal, o formato da cabeça e as paredes adjacentes são usados como diagnóstico (Figura 17) (BRINKHURST; MARCHESE, 1989).

Figura 17. *Limnodrilus* sp. (Tubificidae; Oligochaeta). A - cerda ventral bífida; B - bainha peniana; C - (cab) cabeça da bainha peniana.



Fonte: Elaboração nossa (2021).

Referências

- ALVES, R. G.; GORNI, G. R. Naididae species (Oligochaeta) associated with submersed aquatic macrophytes in two reservoirs (São Paulo, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.19, n. 4, p. 407-413, 2007.
- ALVES, R. G.; MARCHESE, M. R.; MARTINS, R. T. Oligochaeta (Annelida, Clite-llata) of lotic environments at Parque Estadual Intervales (São Paulo, Brasil). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 69-72, 2008.
- BALIAN, E.; SEGERS H.; LÉVÈQUE C.; MARTENS K. An introduction to the Freshwater Animal Diversity Assessment (FADA) project. **Hydrobiologia**, 2007.
- BEHREND, R. D. L.; TAKEDA, A. M.; GOMES, L. C.; FERNANDES, S. E. P. Using Oligochaeta assemblages as an indicator of environmental changes. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 4, p. 873-884, 2012.
- BRINKHURST, R.O.; MARCHESE, M.R. Guia para la identificación de oligoquetos acuáticos continentales de Sud y Centroamerica. **Asociación de ciencias naturales del litoral**, Santa Fé, p. 207, 1989.
- CORBI, J. J.; JANCSO, M. A.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; FRAGOSO, E. N. Occurrence of Oligochaeta living on larvae of Odonata from Ipeúna (São Paulo state, Brazil). **Biota neotropica**, v.4, n2, p. 1-3, 2004.
- CORREIA, L.C.S.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Macroinvertebrados da Rizosfera de *Scirpus cubensis* na lagoa do Infernão (Estação Ecológica de Jataí - SP): Estrutura e função. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.10, n.1, p. 37-47, 1998.
- DES CHATELLIERS, M. C.; JUGET, J.; LAFONT, M.; MARTIN, P. Subterranean aquatic Oligochaeta. **Freshwater Biology**, 54(4), p. 678-690, 2009.
- DORNFELD, C. B.; ALVES, R. G.; LEITE, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Oligochaeta in eutroic reservoir: the case of Salto Grande reservoir and their main affluent (Americana, São Paulo, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensis**, Rio Claro, v. 18, n. 2, p. 189-197, 2006.
- ERSÉUS, C. Phylogenetic analysis of the aquatic Oligochaeta under the principle of parsimony. **Hydrobiologia** 155, p. 75-89, 1987.
- ERSÉUS, C. Phylogeny of oligochaetous Clitellata. **Hydrobiologia**, 2005.
- GIROLI, D. A; GORNI, G. R.; COLOMBO-CORBI, V.; CORBI, J. J. First record of *Nais schubarti* Marcus, 1944 (Oligochaeta: Naidinae) in the State of São Paulo. **Braz. J. Biol.**, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.189084>.
- GIROLI, D. A; GORNI, G. R.; COLOMBO-CORBI, V.; CORBI, J. J. First record of *Stephensoniana trivandrana* Aiyer, 1926 (Oligochaeta: Naididae), in southeastern Brazil. **Braz. J. Biol.**, 2020.

- GORNI, G. R.; ALVES, R. G. Naididae (Annelida, Oligochaeta) associated with bryophytes in Brotas, State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 518-519, 2007.
- GORNI, G. R.; ALVES, R. G. Naididae (Annelida, Oligochaeta) associated with *Pomacea bridgesii* (Reeve) (Gastropoda, Ampullariidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 1059-1061, 2006.
- GORNI, G. R.; ALVES, R. G. Naididae species (Annelida: Oligochaeta) associated with the sponge *Metania spinata* (Carter, 1881) (Porifera: Metaniidae) from a southeastern reservoir. *Acta Limnologica Brasiliensis*, Rio Claro, v. 20, n. 3, p. 261-263, 2008.
- GORNI, G. R.; ALVES, R. G. Oligochaetes (Annelida, Clitellata) in a neotropical stream: a mesohabitat approach. *Iheringia. Série Zoologia*, v. 102, n. 1, p. 106-110, 2012.
- GORNI, G. R.; PEIRÓ, D. F.; SANCHES, N. A. O. Aquatic Oligochaeta (Annelida: Clitellata) from State of São Paulo, Brazil: Diversity and Occurrence review. *Biota Neotropica*, v. 15, n. 1, 2015.
- LOPEZ, L. C. S.; FILIZOLA, B.; DEISS, I.; RIOS, R. I. Phoretic behaviour of bromeliad annelids (*Dero*) and ostracods (*Elpidium*) using frogs and lizards as dispersal vectors. *Hydrobiologia*, 549: p. 15-22, 2005.
- LOPEZ, L. C. S.; RODRIGUES, P. P.; RIOS, R. I. Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (Limnocytheridae: Elpidium) and Annelids (Naididae: Dero). *Biotropica*, 31(4): p. 705-708, 1999.
- MARCHESE, M. R.; ALVES, R. G. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Chapter 12 - Phylum Annelida. Class Clitellata: Subclass Oligochaeta. Volume 5: Keys to Neotropical and Antarctic Fauna, **Fourth Edition**, p. 435-458. 2020.
- MARTIN, P. On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta. *Proceedings of the Royal Society of London*, Series B 268, p. 1089-1098, 2001.
- MARTIN, P.; MARTINEZ-ANSEMIL, E.; PINDER, A.; TIMM, T.; WETZEL, M. J. Global diversity of oligochaetous clitellates ("Oligochaeta"; Clitellata) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, p. 117-127, 2008.
- MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J.; BAPTISTA, D. Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro. *Technical Books Editora*, 176 p., 2010.
- ODA, F. H.; PETSCH, D. K.; RAGONHA, F. H.; BATISTA, V. G.; TAKEDA, A. M.; TAKEMOTO, R. M. *Dero (Allodero) lutzi* Michaelsen, 1926 (Oligochaeta: Naididae) associated with *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) (Anura: Hylidae) from Semi-deciduous Atlantic Rain Forest, southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 75, p. 86-90, 2015.

PETSCH, D. K.; PINHA, G. D.; RAGONHA, F. H.; TAKEDA, A. M. Influência dos fatores ambientais sobre a distribuição da comunidade de invertebrados bentônicos em canais de uma planície de inundação neotropical. **Biomas**, Florianópolis, v. 26, p. 127- 138, 2013.

PETSCH, D. K.; RAGONHA, F. H.; GIMENEZ, B. C. G.; BARBOZA, L. G. A.; TAKEDA, A. M. Beta diversity partitioning of aquatic Oligochaeta in different environments of a neotropical loodplain. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 37, p. 41-49, 2015.

RIGHI, G. Manual de identificação de invertebrados límnicos do Brasil. **CNPq/ Coordenação Editorial**, Brasília, p. 48, 1984.

RODRIGUEZ, P.; REYNOLDSON, T. B. The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes. **Ed. Springer Science**, 2011.

SANCHES, N. A. O.; ALCORINTE, M. G.; SAHM, L. H.; GORNI, G. R.; RIBEIRO, M. L. Oligochaeta (Annelida: Clitellata) associados a macrófitas aquáticas no Brasil. **Biomas**, 29(3), p. 1-10, 2016.

SIDDALL, M. E.; APAKUPAKUL, K.; BURRESON, E. M.; COATES, K. A.; ERSÉUS, C.; GELDER, S. R.; KÄLLERJÖ, M.; TRAPIDO-ROSENTHAL, H. Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans and Acanthobdella peledina form a monophyletic group of oligochaetes. **Mol. Phylogenet. Evol.** 21, p. 346-351, 2001.

SILVA, C. C. Revisão de espécies de Oligochaeta (ANNELIDA: CLITELLATA) como bioindicadores: uma compilação dos dados para ecossistemas aquáticos brasileiros. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade de Araraquara**, p. 103, 2017.

SKET, B.; TRONTELJ, P. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. In: Freshwater Animal Diversity Assessment. **Springer**, Dordrecht, p. 129-137, 2007.

TIMM, T. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. **Lauterbornia** 66: p. 1-235, 2009.

TIMM, T.; MARTIN, P. J. Clitellata: oligochaeta. In Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, **Academic Press**, p. 529-549, 2015. doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00021-8

TRIVINHO-STRIXINO, S.; CORREIA, L. C. S.; SONODA, K. Phytophilous Chironomidae (Diptera) and other macroinvertebrates in the ox-bow Infernão lake (Jataí Ecological Station, Luiz Antônio, SP, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 60, n. 3, p. 527-535, 2000.

VERDONSCHOT, P. F. M. Introduction to Annelida and the Class Polychaeta. In Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, **Academic Press**, p. 509-528, 2015. doi:10.1016/b978-0-12-385026-3.00020-6

VIVIEN, R.; TIXIER, G.; LAFONT, M. Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area (Switzerland) and Ar-

Índice Remissivo

A

- Água 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 45, 46, 49, 53, 59, 66, 67, 71, 73, 75, 76, 77, 80, 82, 83, 84, 94, 96, 97, 99, 100, 107, 117, 118, 120, 121, 123, 129, 134, 135, 137, 139, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 156, 159, 162, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 176, 182, 191, 196, 197, 198, 208, 209
- Ambientais 9, 20, 36, 37, 41, 71, 83, 94, 95, 96, 97, 117, 121, 125, 133, 136, 149, 163, 164, 168, 171, 176, 180, 182, 183, 191, 197, 202, 227
- Ambiental 9, 13, 21, 25, 36, 50, 58, 64, 65, 66, 71, 89, 94, 96, 97, 116, 117, 118, 120, 121, 123, 126, 133, 135, 138, 141, 145, 149, 157, 187, 196, 198, 201, 203
- Ambiental 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193
- Ambiente 23, 29, 37, 38, 54, 65, 79, 90, 95, 96, 105, 111, 117, 122, 141, 144, 146, 156, 163, 164, 165, 166, 168, 169, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 185, 210
- Ambientes 9, 12, 14, 15, 19, 20, 27, 32, 38, 39, 64, 75, 109, 116, 118, 119, 124, 126, 127, 136, 144, 145, 146, 148, 156, 162, 164, 165, 169, 175, 176, 183, 190, 196, 197, 198, 202, 203, 208, 209, 210
- Ambientes 3, 195, 197, 199, 201, 203, 205
- Análises 3, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179
- Aplicação 9, 12, 16, 37, 57, 66, 75, 76, 83, 86, 94, 98, 105, 107, 117, 121, 129, 137, 149
- Aquático 16, 27, 36, 38, 42, 71, 75, 78, 86, 95, 98, 110, 111, 117, 120, 122, 123, 127, 133, 141, 144, 145, 156, 165, 166, 168, 177
- Aquáticos 9, 12, 13, 18, 19, 20, 21, 27, 32, 36, 37, 38, 45, 60, 64, 88, 94, 98, 101, 105, 106, 107, 109, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 144, 145, 146, 147, 148, 150, 152, 156, 157, 164, 169, 177, 178, 196, 197, 198, 202, 208, 209, 212, 213, 227
- Aquáticos 3, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227
- Avaliação 13, 22, 25, 36, 39, 50, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 71, 73, 74, 77, 79, 89, 90, 97, 109, 117, 119, 123, 124, 126, 129, 135, 137, 138, 141,

144, 146, 149, 163, 164, 183, 190, 197, 198

B

- Bioensaio 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 53
- Bioindicadores 12, 21, 41, 66, 117, 120, 136, 137, 140, 157, 165, 177, 178, 197, 227

Biológicos 3

C

- Coleta 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 32, 44, 49, 68, 73, 74, 77, 78, 125, 127, 133, 134, 136, 149, 150, 151, 165, 170, 171, 177, 185, 186, 187, 210

- Comunidade 37, 64, 74, 116, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 125, 127, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 137, 141, 144, 156, 159, 196, 198, 227

- Concentração 22, 27, 44, 54, 70, 72, 75, 80, 81, 82, 83, 85, 102, 110, 123, 162, 164, 172, 174, 175, 176, 177

- Contaminação 19, 36, 41, 42, 46, 48, 64, 65, 94, 96, 97, 117, 121, 126, 127, 134

Continentais 3

- Crescimento 42, 43, 54, 97, 102, 129, 144, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 155, 156, 166, 172, 183

D

- Desenvolvimento 7, 9, 10, 25, 28, 29, 37, 39, 42, 43, 44, 54, 58, 102, 126, 146, 147, 148, 160, 162, 163, 164, 168, 170, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 183, 185, 186, 187, 190, 191, 196

- Diferentes 16, 18, 19, 27, 37, 38, 41, 44, 48, 49, 57, 64, 66, 74, 75, 77, 78, 80, 82, 94, 97, 98, 100, 102, 104, 106, 107, 118, 123, 125, 126, 133, 135, 141, 146, 147, 149, 162, 164, 165, 173, 175, 178, 179, 183, 184, 185, 186, 187, 191, 196, 198, 214, 219, 221

E

- Ecotoxicológicos 9, 20, 21, 22, 25, 32, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 58, 75, 78, 79, 87, 88, 89, 96, 99, 116, 117, 123, 126, 127, 133, 134, 164, 170, 178

- Efluente 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 86, 89, 94, 95, 97, 105, 106, 107, 162, 164, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177

- Elaboração 9, 13, 47, 178, 208

- Emergência 28, 30, 42, 43, 44, 45, 53, 56, 106, 126, 151, 173

- Espécie 12, 18, 19, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 50, 51, 53, 58, 75, 78,

- 79, 98, 99, 105, 107, 116, 125, 126, 146, 148, 162, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 175, 176, 177, 178, 182, 183, 184, 186, 188, 191, 200, 201, 203
- Espécies 9, 12, 13, 18, 19, 20, 21, 22, 27, 32, 36, 37, 38, 39, 40, 49, 50, 53, 54, 58, 72, 75, 76, 77, 80, 81, 94, 105, 106, 118, 119, 129, 145, 146, 148, 162, 163, 164, 165, 168, 170, 174, 176, 177, 178, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 196, 197, 198, 200, 201, 202, 203, 204, 209, 212, 217, 220, 227
- Exemplo 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 27, 38, 39, 44, 47, 53, 54, 55, 57, 69, 75, 80, 98, 107, 117, 118, 119, 120, 133, 134, 145, 163, 164, 166, 167, 169, 170, 171, 172, 176, 177, 183, 184, 190, 197, 198, 210
- Exposição 43, 44, 48, 60, 75, 79, 88, 94, 97, 99, 102, 163, 164, 165, 168, 170, 171, 176, 177
- F
- Figura 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 43, 44, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 67, 69, 72, 74, 76, 77, 82, 83, 84, 103, 104, 118, 119, 125, 132, 134, 135, 149, 150, 151, 152, 153, 166, 167, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 185, 186, 187, 188, 199, 200, 201, 202, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225
- Fins 2
- Foram 9, 23, 25, 29, 31, 32, 36, 38, 40, 44, 46, 53, 57, 65, 70, 73, 80, 81, 82, 84, 86, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 106, 116, 117, 127, 129, 133, 134, 135, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 162, 165, 170, 171, 172, 173, 183, 184, 185, 187, 190, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 209
- G
- Germinação 94, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107
- I
- Identificação 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227
- Indicadores 3
- Informações 16, 32, 38, 39, 69, 70, 74, 79, 80, 82, 129, 146, 148, 156, 172, 182, 183, 184, 186, 188, 191, 196, 197, 200, 203
- Invertebrados 9, 12, 13, 18, 19, 21, 22, 32, 33, 36, 37, 38, 45, 57, 58, 60, 88, 94, 101, 106, 116, 117, 122, 123, 129, 147, 205, 210, 227
- L
- Laboratório 9, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 30, 31, 32, 36, 37, 38, 40, 41, 67, 68, 72, 73, 77, 87, 117, 126, 129, 133, 136, 148, 163, 164, 165, 170, 178, 185, 190, 199
- Larvas 14, 19, 27, 28, 29, 43, 44, 45, 50, 53, 59, 62, 118, 129, 132, 135, 138, 139, 162, 166, 167, 168, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 183, 191, 210
- M
- Macroinvertebrados 32, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 134, 135, 136, 137, 141, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 156, 208, 209, 227
- Manutenção 9, 12, 13, 20, 21, 22, 30, 36, 37, 40, 41, 98, 99, 126, 145, 196
- Métricas 3
- O
- Organismos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 32, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 53, 66, 67, 69, 72, 74, 75, 77, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 94, 97, 98, 99, 100, 101, 105, 106, 107, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 125, 126, 129, 133, 134, 135, 144, 146, 149, 151, 152, 153, 154, 156, 164, 165, 170, 172, 173, 176, 177, 178, 197, 200, 208, 209, 210, 223
- P
- Parâmetros 21, 26, 31, 40, 42, 44, 47, 54, 56, 66, 68, 71, 78, 86, 100, 148, 156, 169, 176, 197
- Plástico 16, 23, 24, 29, 42, 45, 46, 48, 74, 134, 151, 152, 171
- Plásticos 16, 18, 19, 23, 31, 40, 42, 46, 47, 125, 126, 129, 134, 172, 173, 199
- Presença 44, 50, 51, 96, 97, 128, 134, 145, 169, 191, 200, 213, 214, 215, 218, 219, 223, 224
- Produção 37, 95, 98, 106, 107, 121, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 156, 159, 162, 170, 178
- Q
- Qualidade 4
- Qualidade 3, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179
- R
- Recortes 3
- Remoção 39, 65, 66, 71, 79, 80, 82, 83, 121, 134, 169, 196
- Resultados 32, 40, 49, 54, 56, 57, 58, 67, 70, 74, 77, 78, 81, 82, 83, 84, 86, 94, 97, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 116, 126, 127, 129, 132, 133, 135, 144, 154, 162, 165, 172, 176, 178, 183, 185, 189, 191, 202, 203
- S

Sensibilidade 22, 25, 32, 45, 54, 69, 70, 75, 80, 97, 98, 99, 105, 119, 126, 164, 165, 177, 187

Substâncias 22, 37, 39, 40, 46, 48, 65, 66, 68, 70, 75, 87, 96, 97, 104, 121, 122, 123, 146

T

Toxicidade 9, 22, 32, 33, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 57, 58, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107, 109, 116, 126, 129, 132, 134, 135, 136

Tratamento 39, 43, 45, 54, 55, 64, 65, 66, 71, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 85, 87, 94, 96, 101, 102, 107, 110, 168, 169, 170, 174, 202

U

Universidade 7, 11, 13, 19, 22, 25, 33, 34, 35, 40, 58, 60, 63, 64, 66, 87, 88, 89, 90, 99, 110, 111, 115, 137, 139, 154, 159, 161, 170, 181, 195, 207, 227

Utilização 9, 12, 20, 21, 22, 24, 26, 27, 32, 36, 39, 40, 43, 46, 47, 54, 57, 58, 74, 75, 76, 77, 94, 95, 98, 107, 116, 117, 121, 123, 135, 147, 156, 164, 177, 178, 182, 183, 186, 189, 190, 200

V

Vinhaça 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 110, 111, 112

INDICADORES BIOLÓGICOS DE QUALIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

Métricas e recortes para análises



INDICADORES BIOLÓGICOS DE QUALIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

Métricas e recortes para análises

