

USO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO, NITROGÊNIO E ENXOFRE EM ESTUDOS DE ECOLOGIA COSTEIRA

Matheus Carvalho de Carvalho

Kitasato University, School of Marine Biosciences, Utou 160-4, Sanriku-cho, Ofunato shi, Iwate ken, 022-0101, Japan.

E-mail: matheus@samerica.com

RESUMO

Os isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre vêm sendo utilizados com sucesso para diversos fins em ecologia costeira. A maioria dos estudos tem se concentrado na elucidação de relações tróficas em teias alimentares, em que têm-se empregado comumente os isótopos de carbono e nitrogênio, e às vezes os de enxofre. De forma similar, a determinação da origem da matéria orgânica particulada na coluna d'água ou no sedimento de fundo tem sido bem sucedida com o uso de isótopos estáveis, notavelmente os de carbono e de enxofre. Por outro lado, a utilização dos isótopos estáveis de nitrogênio em macrófitas tem se mostrado útil para determinar a existência de poluição em ecossistemas. Além desses usos já razoavelmente bem estabelecidos, novas aplicações vêm sendo sugeridas, como por exemplo, a utilização dos isótopos estáveis de carbono como um índice de crescimento de macrófitas aquáticas. Estudos utilizando a técnica tem sido numerosos recentemente em vários países, e podem ser muito úteis para uma maior compreensão dos ecossistemas costeiros brasileiros.

Palavras-chaves: Detritos, índice de crescimento, poluição, teias alimentares.

ABSTRACT

USE OF THE STABLE ISOTOPES OF CARBON, NITROGEN AND SULFUR FOR STUDIES ON COASTAL ECOLOGY. Stable isotopes of carbon, nitrogen and sulfur have been successfully used for diverse applications in coastal ecology. Most studies dealt with the elucidation of food webs using carbon and nitrogen isotopes, and sometimes sulfur isotopes. Similarly, stable isotopes were successfully employed in determining the source of particulate organic matter in the water column or bottom sediments, especially carbon and sulfur isotopes. On the other hand, macrophyte nitrogen stable isotopes have been useful to indicate the existence of pollution in some ecosystems. Apart from those well-established utilizations, new applications of stable isotopes were suggested, as for example the use of carbon stable isotopes to determine the growth rate of aquatic macrophytes. Numerous studies employing this technique were recently conducted in many countries, and it can be useful to increase the understanding of Brazilian coastal ecosystems.

Keywords: Detritus, food webs, growth index, pollution.

INTRODUÇÃO

Os elementos químicos têm em geral mais de um isótopo. Se o isótopo emitir radiação ele é radioativo, se não, ele é estável. Em geral, para um determinado elemento químico, um dos isótopos estáveis é quantitativamente muito mais abundante que os outros. Por exemplo, no caso do carbono, o isótopo estável mais abundante é o ^{12}C , compondo 99% dos átomos de carbono presentes em uma substância. Em seguida vem o ^{13}C , que compõe cerca de 1% do total. O restante é composto principalmente de ^{14}C , um isótopo radioativo. No entanto, essas proporções são

aproximadas: quando medições são feitas com alto grau de precisão, diferenças interessantes são encontradas entre diversas substâncias. Essas diferenças são muito pequenas, e então uma notação numérica especial é utilizada para indicar a composição isotópica das substâncias naturais, a notação delta:

$$\delta^{XX}E = (R_{\text{substância}} : R_{\text{referência}} - 1) \times 1000 \text{‰} \quad (1)$$

Em que XX é a massa atômica do isótopo pesado do elemento químico E e R é a razão entre os isótopos pesados e leves (por exemplo, $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$) numa substância. Referência é um padrão internacional

para o elemento *E*. Por exemplo, para o carbono, nitrogênio e enxofre as substâncias de referência são respectivamente o beleminito de Pee Dee ($R = 0.0112372$), o ar ($R = 0.0036765$) e o troilito de Canion Diablo ($R = 0.045004$) (Peterson & Fry 1987). Usando-se a notação delta, as diferenças entre as composições isotópicas das diversas substâncias de várias origens ficam bem mais claras do que usando-se os valores absolutos para *R*. Por exemplo, plantas C_3 tem $\delta^{13}C$ entre -20‰ e -35‰, enquanto plantas C_4 tem entre -11‰ e -15‰ (Dawson *et al.* 2002), e o fitoplâncton em geral tem valores ao redor de -20‰ (Goericke *et al.* 1994); o ar tem $\delta^{15}N = 0‰$ por definição, enquanto o nitrogênio oriundo de estações de tratamento de esgoto comumente tem valores ao redor de 15‰ (Heaton 1986); o $\delta^{34}S$ do sulfato na água do mar é aproximadamente 21‰ (Nriagu *et al.* 1991), mas o do sulfito resultante da decomposição da matéria orgânica em ambiente anaeróbico é -25‰ (Thode 1991). A existência de diferenças na composição isotópica nos diversos materiais permite que essa composição seja usada como um traçador da origem de substâncias (Peterson & Fry 1987, Peterson 1999).

A zona costeira se caracteriza por ser a interface de dois ecossistemas bem distintos, o marinho e o terrestre. Dessa forma, pode ser classificada como um ecótono (Odum 1988). Ecótonos se caracterizam por terem uma diversidade e densidade populacional dos organismos maiores que os ecossistemas divididos por eles (Odum 1988). Quando comparada ao restante do oceano, a zona costeira se caracteriza por uma produtividade primária e secundária muito elevada. Essa diferença se deve a dois fatores principais (Mann 1982): 1) a zona costeira é comparativamente rasa, permitindo que periodicamente os nutrientes acumulados no fundo sejam ressuspensos e reutilizados pelos produtores primários na coluna d'água; 2) a zona costeira recebe material orgânico e inorgânico do ambiente terrestre, seja por via aérea, seja por meio dos rios.

Apesar de o exposto acima descrever a situação da zona costeira em linhas gerais, um estudo detalhado do ecossistema é necessário se se deseja compreender como o ambiente terrestre fornece material para a teia alimentar na zona costeira. No ambiente costeiro, a questão da origem do alimento para os animais e dos nutrientes para as plantas é aberta em muitos casos.

Ambos problemas são importantes, pois, por exemplo, se a fonte de alimento de uma determinada espécie explorada comercialmente for afetada, a espécie alvo da pesca também o será. Por outro lado, muitas vezes o impacto ambiental de fontes antropogênicas de nutrientes não é clara, e a eutrofização de ambientes costeiros ocorre sem que sua causa seja elucidada. O uso de isótopos estáveis pode ajudar a resolver algumas dessas questões, além de outras, como a determinação da produção primária bruta de macrófitas aquáticas (pesquisa do autor, não publicada), uma tarefa que não raro é de difícil execução (Lobban & Harrison 1994). Neste trabalho, a intenção é apresentar o uso da técnica dos isótopos estáveis em ecologia costeira. Inicialmente, o enfoque é dado em alguns aspectos técnicos e analíticos. Nas seções subsequentes, alguns usos presentes e potenciais dos isótopos estáveis para a resolução de alguns problemas em ecologia costeira são apresentados. Em cada seção, uma pequena base teórica do problema é apresentada, e alguns casos ilustrativos são comentados.

A TÉCNICA

A medição da composição isotópica de carbono, nitrogênio e enxofre em substâncias sólidas e líquidas é feita por meio de espectrômetros de massa. Uma revisão completa sobre o assunto é apresentada em Groot (2004). Neste texto, não serão apresentados detalhes relacionados ao maquinário necessário para essas análises, mas somente os procedimentos de amostragem mais comuns que devem ser seguidos antes da análise isotópica propriamente dita.

Em amostras sólidas, os procedimentos fundamentais antes da análise são a secagem e a moagem, e aproximadamente de 1 a 10mg de amostra seca são suficientes para a maioria dos casos. No entanto, algumas vezes se faz necessário um tratamento extra da amostra para que a informação obtida pela medição faça sentido no contexto da investigação.

Por exemplo, para amostras de materiais marinhos, a influência dos sais dissolvidos na água pode falsear alguns resultados. Portanto, a remoção de carbonatos e sulfatos pode ser necessária antes da análise dos isótopos de carbono e enxofre, respectivamente. Para o nitrogênio, normalmente não é necessário se preocupar com esse tipo de contaminação, já que a concentração de nitrogênio como sal na água é

normalmente muito baixa. A remoção do carbonato é feita mediante a adição de ácido, enquanto a remoção de sulfato tem sido feita por meio de adição de água destilada ou de algumas soluções, como cloreto de lítio em água (Fry 1988).

Em geral, a remoção da contaminação por sal é simples. Recomenda-se esse tipo de procedimento em filtros, matéria orgânica particulada, amostras de sedimento de fundo, animais com conchas ou ossos (quando esse material não for previamente retirado da massa para análise), entre outros. Com relação a amostras de sedimento de fundo, no entanto, a medição do isótopo de enxofre pode exigir tratamentos mais complexos, dependendo do objetivo do trabalho (Bruechert 1998).

Outro procedimento frequentemente utilizado em amostras animais é a remoção de lipídios. Isso é feito porque o $\delta^{13}\text{C}$ dos lipídios é em geral mais baixo (DeNiro & Epstein 1977) que o dos outros tecidos do corpo, e seu teor varia entre indivíduos (Post 2002). A remoção dos lipídios é feita após a secagem e a moagem, e um método muito utilizado é o de (Bligh & Dyer 1959), ou alguma variação.

Outro aspecto a ser considerado é a heterogeneidade da amostra que não está ligada à composição bioquímica de suas substâncias. Esta variação pode ser bem acentuada, principalmente em algas de grande porte (Stephenson *et al.* 1984). Nesses casos, pode ser importante o pesquisador usar uma amostra homogênea do organismo e evitar usar apenas uma pequena amostra de tecido. No entanto, essa decisão depende dos objetivos da pesquisa, e já há quem recomende a análise de tecidos específicos de cada organismo (Sotiropoulos *et al.* 2004). O importante é que o pesquisador esteja atento para esses artefatos de amostragem na hora de delinear o experimento e analisar os resultados.

Finalmente, tem-se tornado comum a análise isotópica de compostos bioquímicos específicos. Por exemplo, pode-se medir a composição isotópica de diferentes tipos de lipídios, carboidratos ou aminoácidos (Teece & Fogel 2004). No entanto, este tópico não será abordado aqui, ficando a bibliografia citada como sugestão aos leitores interessados.

Em amostras de água, tem sido possível a análise dos isótopos de carbono no carbono dissolvido e do nitrogênio em nitrito, nitrato e amônia. A análise dos isótopos de carbono no carbono inorgânico dissolvido exige que a amostra coletada não seja contaminada por ar e que seja esterelizada, para evitar o consumo

ou produção de CO_2 por microorganismos. Podem ser seguidas as metodologias descritas em DOE (1994), em Atekwana & Krishnamurty (2004) e Spötl (2005). Para o nitrogênio inorgânico, as seguintes referências podem ser úteis: Holmes *et al.* (1998, Sigman *et al.* (2001) e Teece & Fogel (2004). No caso do carbono orgânico, alguns métodos têm sido recentemente apresentados para a medição direta (Beaupré *et al.* 2007, Osburn & St-Jean 2007), ou então ele tem sido medido indiretamente: faz-se a medição isotópica do CO_2 respirado por bactérias se alimentando do carbono orgânico (Waichman 1996, McCallister *et al.* 2006).

TEIAS ALIMENTARES

A aplicação mais comum de isótopos estáveis em ecologia costeira vem sendo o estudo de teias alimentares (Peterson 1999). Os isótopos usados mais frequentemente para estudos de teias alimentares têm sido aqueles de carbono e nitrogênio. Os de enxofre também têm sido usados, mas com menor frequência (Connolly *et al.* 2004). Nesses estudos, parte-se do princípio 'você é o que você come'. Em outras palavras, supõe-se que a composição isotópica do alimento se reflete no consumidor. A principal vantagem do uso dos isótopos em relação a estudos de conteúdo estomacal, por exemplo, é que os isótopos fornecem uma medição integrada do que o animal vem comendo até o momento da captura, enquanto o conteúdo estomacal mostra apenas o que o animal ingeriu (e não necessariamente assimilou) nas últimas horas.

O reflexo da composição isotópica do alimento no consumidor pode não ser exato. De um nível trófico para o seguinte há muitas vezes uma mudança previsível no valor do isótopo (Minagawa & Wada 1984, McCutchan Jr *et al.* 2003). Essa mudança é denominada 'fracionamento trófico'. O fracionamento trófico depende muito do organismo estudado e do alimento em questão (McCutchan Jr *et al.* 2003). No entanto, algumas regras gerais podem ser aplicadas para estudos preliminares: o $\delta^{13}\text{C}$ aumenta pouco menos que 1‰ de um nível trófico para o seguinte; o $\delta^{15}\text{N}$ aumenta mais ou menos 3‰ de um nível trófico para o outro; o $\delta^{34}\text{S}$ não aumenta de um nível trófico para o seguinte. Nas Figuras 1, 2 e 3, possíveis situações hipotéticas são mostradas. Apesar de hipotéticas, elas se assemelham muito aos resultados obtidos em vários estudos, e dão uma noção geral

do que se obtém normalmente quando se investiga a composição isotópica de organismos ou da matéria orgânica morta (detritos) em ecossistemas costeiros.

As Figuras 1, 2 e 3 descrevem três situações distintas. Na Figura 1, tem-se um caso bem simples de uma teia alimentar baseada somente em fitoplâncton. Este poderia ser o caso de uma teia alimentar pelágica, em que o fitoplâncton é o único produtor de importância. Este caso é simples, e por isso mesmo não é um caso em que os isótopos estáveis têm muito valor para decifrar a cadeia alimentar, pois ela já é bem óbvia.

Na Figura 2, um caso mais complexo é mostrado. Há três grupos de produtores primários: fitoplâncton,

plantas terrestres e microalgas bentônicas. Usando as regras explicadas no parágrafo anterior e a Figura 1 como modelo, podemos decifrar as ligações tróficas presentes. Inicialmente, vejamos que na Figura 2a a ostra 2 tem $\delta^{13}\text{C} = -22\%$. Este valor é um pouco mais alto que o das plantas terrestres (-25%), e mais baixo que o do fitoplâncton (-20%) e que das microalgas bentônicas (-15%). Como de um nível trófico para o seguinte em geral o $\delta^{13}\text{C}$ aumenta 1% , conclui-se que a ostra 2 se alimenta em parte de plantas terrestres, e em parte de fitoplâncton. É possível fazer uma análise quantitativa das contribuições relativas de carbono advindas de cada um dos produtores para

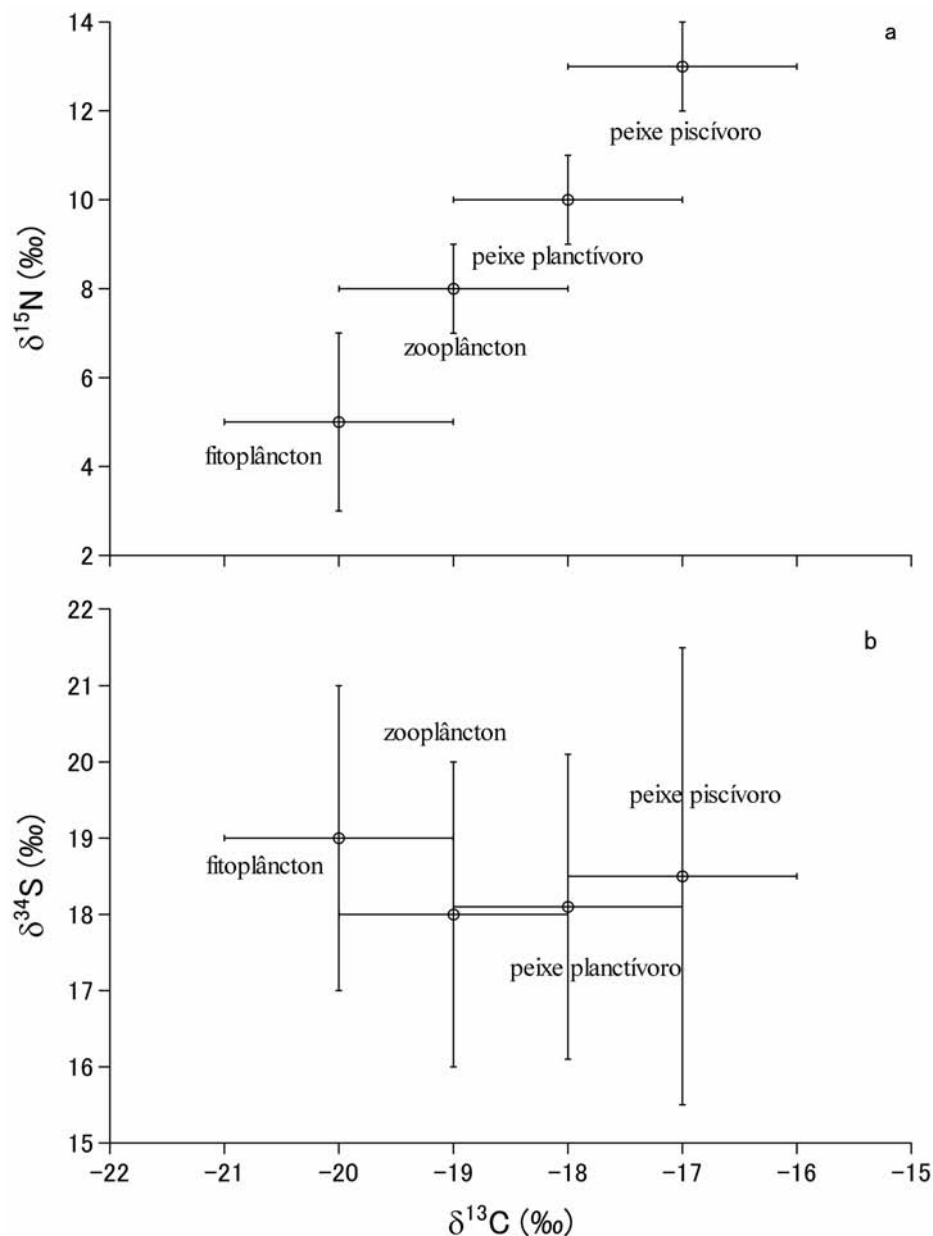


Figura 1. Exemplo hipotético da distribuição dos isótopos estáveis nos membros de uma teia alimentar pelágica.
Figure 1. Hypothetic example of the distribution of stable isotopes among the integrants of any pelagic food web.

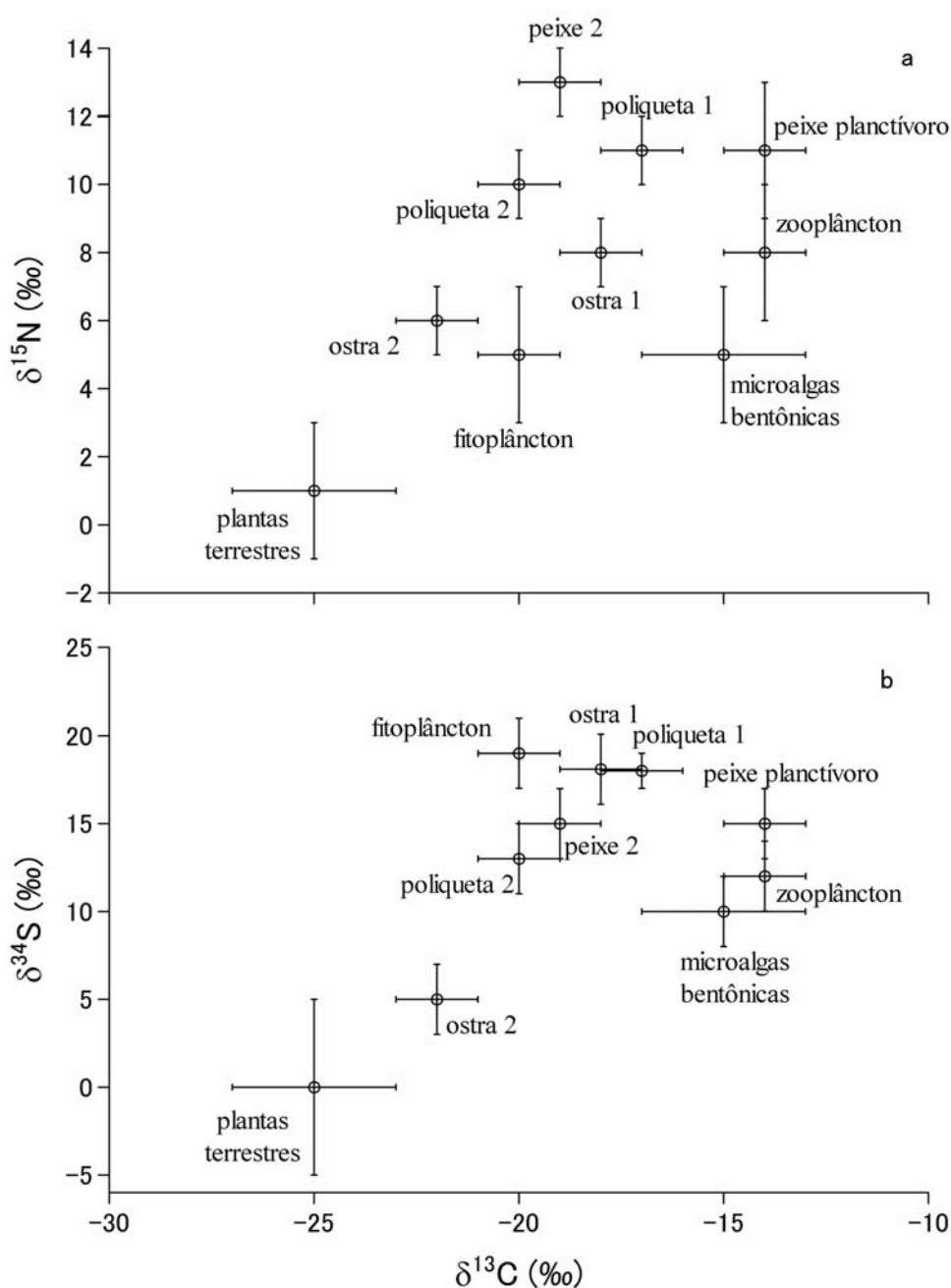


Figura 2. Exemplo hipotético da distribuição dos isótopos estáveis nos membros de uma teia alimentar costeira.
 Figure 2. Hypothetic example of the distribution of stable isotopes among the integrants of any coastal food web.

a ostra, como será mostrado adiante. Antes disso, porém, se seguirá com a análise qualitativa da Figura 2. Além das plantas terrestres e do fitoplâncton, a ostra 2, como herbívoro, poderia se alimentar também das microalgas bentônicas, pois é possível esses organismos serem carregados coluna d'água acima por ação dos movimentos da água (Demers & Therriault 1987). No entanto, está claro na figura que não é necessário se levar em conta a contribuição das microalgas de fundo, pois o $\delta^{13}\text{C}$ delas é muito mais alto que o da ostra 2.

Do mesmo modo que o $\delta^{13}\text{C}$, o $\delta^{15}\text{N}$ da ostra 2 contém informação sobre a dieta do animal. Aproveitando o fato que as microalgas bentônicas foram descartadas, nos prenderemos somente às plantas terrestres e ao fitoplâncton. Como o $\delta^{15}\text{N}$ do consumidor deve ser cerca de 3‰ mais alto que o de seu alimento, vê-se que faz sentido a conclusão obtida com o $\delta^{13}\text{C}$: tanto as plantas terrestres ($\delta^{15}\text{N} = 1‰$) como o fitoplâncton ($\delta^{15}\text{N} = 5‰$) parecem fazer parte da dieta da ostra 2 ($\delta^{15}\text{N} = 6‰$).

Finalmente, a análise do $\delta^{34}\text{S}$ (Fig. 2b) da ostra 2 e

de suas possíveis fontes de alimento (plantas terrestres e fitoplâncton) confirma o que foi previamente indicado pelos isótopos de carbono e nitrogênio, já que o valor do consumidor (5‰) fica entre os dos produtores (0 e 19‰), e não há aumento no $\delta^{34}\text{S}$ do consumidor em relação ao seu alimento.

O mesmo tipo de análise feito para a ostra 2 pode ser feito para os outros integrantes da teia alimentar. Por exemplo, vê-se que existe o seguinte caminho trófico: plantas terrestres + fitoplâncton → ostra 2 →

poliqueta 2 → peixe 2. Em outras palavras, parte da matéria orgânica terrestre entra na teia alimentar dessa região. Além disso, vê-se que a cada nível trófico que se sobe a participação dessa matéria orgânica diminui, uma vez que o $\delta^{34}\text{S}$ aumenta bastante (Fig. 2b).

Nos dois casos ilustrados até aqui, os isótopos dos três elementos foram igualmente úteis na resolução das ligações tróficas entre os organismos. No entanto, existem situações em que um dos isótopos não é útil e outro se torna necessário para a resolução do

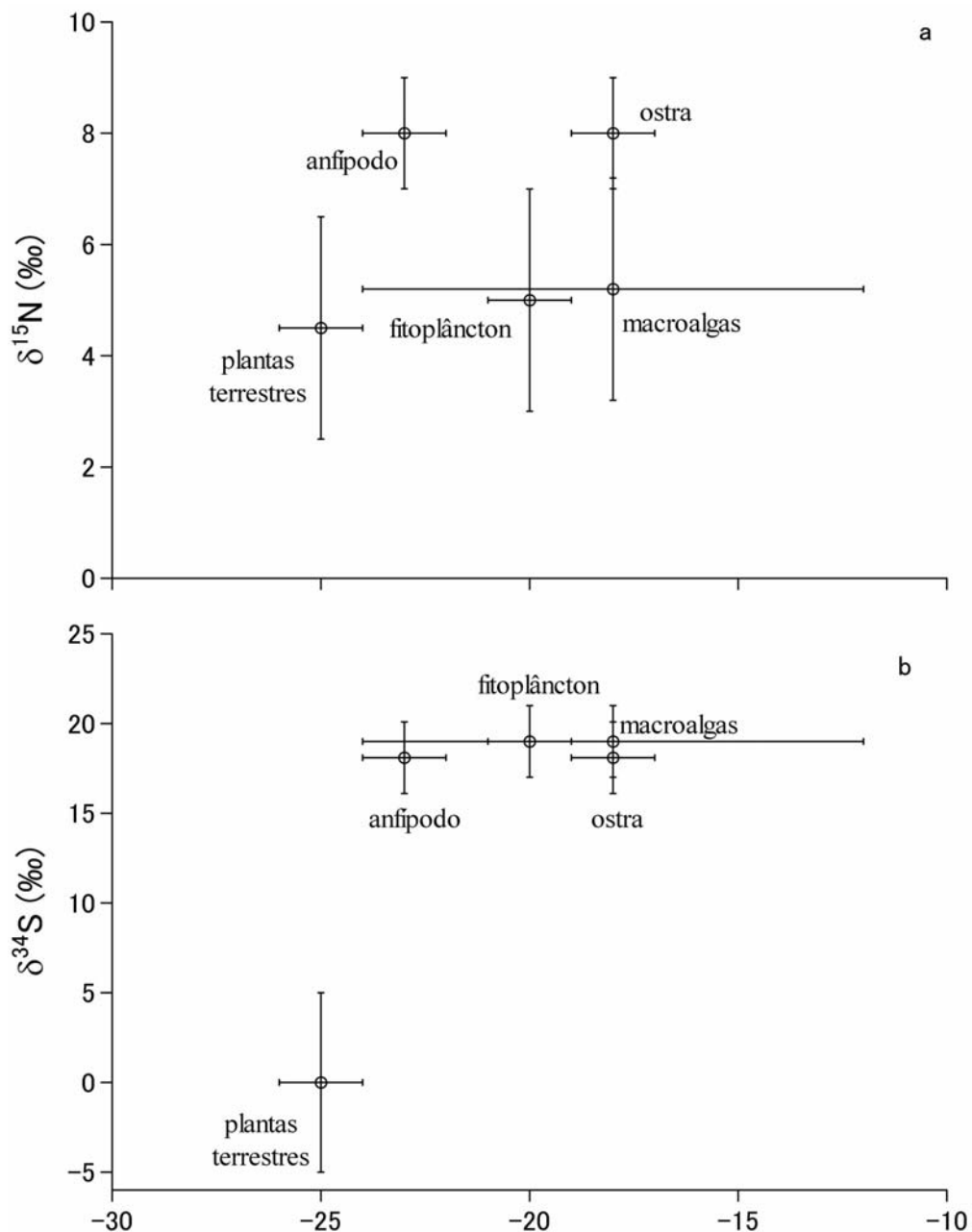


Figura 3. Exemplo hipotético da distribuição dos isótopos estáveis nos membros de uma teia alimentar costeira em que a influência das plantas terrestres é pequena.

Figure 3. Hypothetic example of the distribution of stable isotopes among the integrants of any coastal food web in which there is little influence by terrestrial plants.

problema. Na Figura 3a, os $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das possíveis fontes de matéria orgânica se sobrepõem e assim se torna impossível descobrir qual é a fonte de alimento para os consumidores. Por outro lado, na Figura 3b vê-se que o $\delta^{34}\text{S}$ das plantas terrestres é completamente diferente das outras fontes de alimento, e que os animais têm $\delta^{34}\text{S}$ similar aos das outras fontes. Portanto, as plantas terrestres podem ser consideradas fora das teias alimentares mostradas na Figura 3. Em muitos casos, os isótopos não vão mostrar mais do que isso: quais partes do ecossistema não estão sendo assimiladas nos níveis tróficos mais elevados, o que não deixa de ser uma informação importante.

Publicações com exemplos similares aos apresentados anteriormente: Stribling & Cornwell (1997), Weinstein *et al.* (2000), Fredriksen (2003) e Kasai & Nakata (2005).

ANÁLISE QUANTITATIVA – MODELOS DE MISTURA

Além de servirem para mostrar os caminhos tróficos das substâncias em teias alimentares, os isótopos estáveis também permitem uma análise quantitativa da contribuição de cada fonte de alimento para um determinado animal. Por exemplo, o caso da ostra 2, na Figura 2. É possível, como foi explicado anteriormente, simplificar a situação ignorando-se a participação das microalgas bentônicas. Dessa forma, duas fontes de alimento restaram para a ostra 2: fitoplâncton e plantas terrestres. Para calcular quanto cada uma das fontes contribui para a nutrição da ostra, utiliza-se a seguinte formulação:

$$\delta^{13}\text{C}_m - 1 = \delta^{13}\text{C}_1(p_1) + \delta^{13}\text{C}_2(1 - p_1) \quad (2)$$

Em que os sufixos m, 1 e 2 correspondem respectivamente a mistura, fonte 1 e fonte 2. Mistura no caso aqui é a ostra 2, e as fontes são as plantas terrestres (fonte 1) e o fitoplâncton (fonte 2). p é a proporção de cada fonte na mistura; portanto, $p_1 + p_2 = 1$. O objetivo aqui é achar p_1 . Para isso, substituem-se os valores médios da Figura 1c na equação 2, e descobre-se que $p_1 = 0.6$. Em outras palavras, 60% do carbono da ostra vem das plantas terrestres, e 40% do fitoplâncton.

O procedimento acima pode ser feito também para o nitrogênio e o enxofre, com algumas pequenas modificações: no caso do nitrogênio, o lado esquerdo

da fórmula seria $\delta^{15}\text{N} - 3$, e no enxofre simplesmente $\delta^{34}\text{S}$. Essas parcelas negativas (-1 ou -3) correspondem ao fracionamento trófico para cada elemento, apresentada previamente.

É certamente possível fazer análises muito mais sofisticadas que a apresentada aqui, mas o princípio geral é o mesmo. Por exemplo, se existem 3 fontes de alimento, podem-se utilizar 2 isótopos e determinar a participação de cada uma das fontes no consumidor. É possível também se levar em conta a variação na composição de cada fonte, e se calcular faixas de contribuição, em vez de valores pontuais, o que torna a análise mais realista. Abaixo vai uma lista com algumas referências-chave para análises detalhadas do assunto:

- Peterson *et al.* (1985): ilustra de forma simples o uso de 3 isótopos para a determinação das fontes de alimento para um mexilhão
- Phillips (2001): dá uma introdução completa aos modelos de mistura e critica trabalhos como o de Peterson *et al.* (1985), devido ao caráter semi-quantitativo dos mesmos
- Phillips & Gregg (2001): analisa o papel das faixas de valores na resolução de modelos de mistura usando isótopos
- Phillips & Koch (2002): analisa o problema do uso simultâneo de mais de um isótopo tendo em vista que as proporções elementares (taxas carbono/nitrogênio) em diferentes fontes de alimento podem ser muito diferentes, e isso leva a erros quando ignorado
- Phillips & Gregg (2003): propõe uma solução (assumidamente incompleta) para o problema de haver muitas fontes de alimento possíveis
- Yokoyama *et al.* (2008): ilustração de um caso em que a taxa de renovação dos tecidos no animal é levada em conta no cálculo da contribuição de diferentes fontes de alimentos.

Finalmente, apesar de todos os esforços que têm sido feitos na área, os modelos quantitativos para a elucidação da fonte de alimentos de animais não devem ser utilizados isoladamente: ajuda muito haver um conhecimento prévio sobre a ecologia do animal, bem como estudos de conteúdo estomacal e semelhantes. Muitas das complicações matemáticas que são abordadas nos trabalhos supracitados podem provavelmente ser evitadas quando essas informações complementares são disponíveis.

ORIGEM MARINHA OU TERRESTRE DOS DETRITOS

Da mesma maneira que modelos de mistura têm sido utilizados em estudos cujo objetivo é conhecer a fonte de alimento de animais, esses modelos são também aplicados para se determinar as fontes de matéria orgânica morta (detritos), como matéria orgânica particulada e sedimento de fundo (Wada *et al.* 1987, Rezende *et al.* 1990). Nessas ocasiões, o isótopo de carbono tem sido aplicado preferencialmente. No entanto, uma avaliação rigorosa de tais estudos tem demonstrado que o sucesso da abordagem é limitado. Por exemplo, alguns pesquisadores ao se defrontarem com uma composição isotópica fora da faixa esperada, classificam o fenômeno como contaminação (Kojima

& Ohta 1989), quando na verdade o que ocorre é que a variação da composição isotópica das fontes pode não ter sido considerada completamente. Da mesma forma, Hedges *et al.* (1988) não obtiveram sucesso ao comparar o isótopo de carbono e o teor de lignina na matéria orgânica, e, uma vez que a lignina pode ser atribuída a plantas terrestres sem ambigüidade, isso demonstra que o isótopo de carbono não foi tão eficiente para se diferenciar matéria orgânica terrestre e marinha no caso estudado. Finalmente, existe a complicação potencial decorrente da diferença entre plantas C₃ e C₄ no ecossistema terrestre, que pode ter levado a erros ao se estimar quantitativamente a entrada de matéria orgânica terrestre no mar (Chikaraishi *et al.* 2007).

Em busca de um método melhor para se lidar

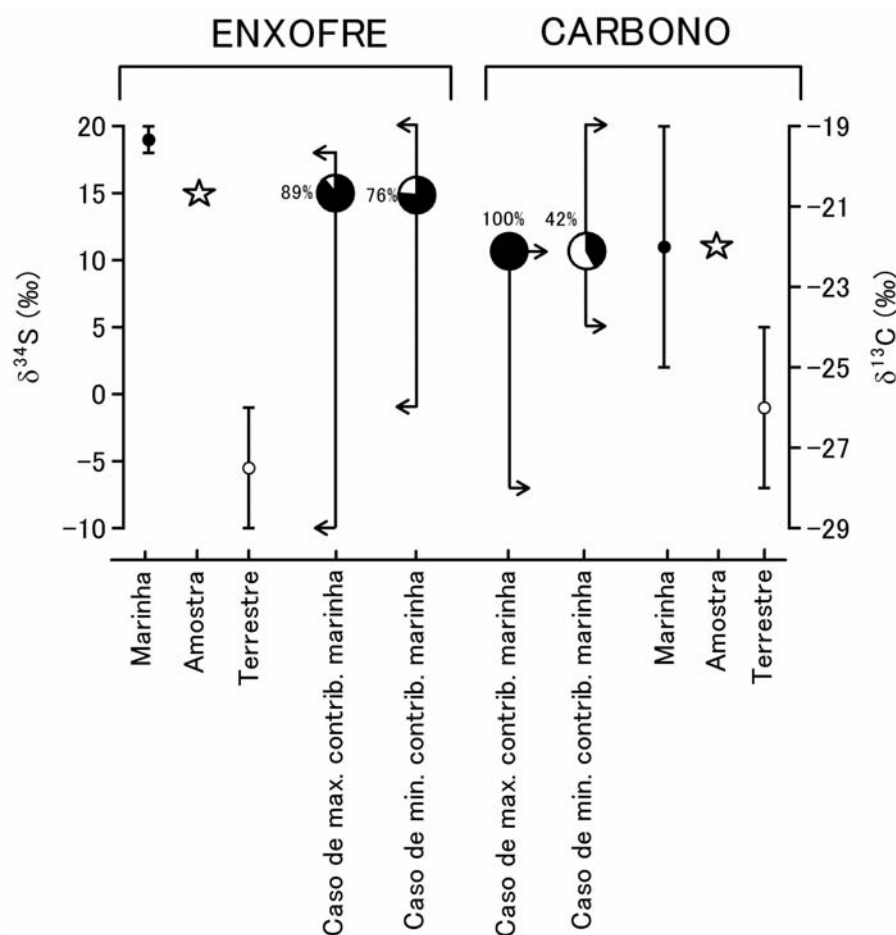


Figura 4. Comparação entre os isótopos estáveis de enxofre e de carbono para a determinação das proporções relativas de material marinho ou terrestre na matéria orgânica em um ecossistema costeiro (modificado de Carvalho *et al.* 2008). Estrelas: valores para a amostra de matéria orgânica; círculos negros: valores médios para o material marinho; círculos brancos: valores médios para o material terrestre; tortas: proporção de material marinho na amostra para os casos extremos de máxima e mínima contribuição do material marinho na amostra. Procedimentos de cálculo explicados no texto.

Figure 4. Comparison between sulfur and carbon stable isotopes for determining the relative proportion of marine / terrestrial materials present in the organic matter of a coastal ecosystem (modified from Carvalho *et al.* 2008). Stars: values for the organic matter sample; black circles: average values for marine material; white circles: average values for the terrestrial material; pies: proportion of marine material in the sample for the extreme cases of maximum and minimum marine contribution for the sample. Calculations are explained in the text.

com o problema da origem da matéria orgânica em ambientes costeiros, optou-se pela utilização do isótopo de enxofre para esse fim (Carvalho *et al.* 2008). A maior vantagem dos isótopos de enxofre sobre os de carbono está na diferença entre os valores encontrados no material terrestre e no material marinho, que pode ser bem maior para o enxofre do que para o carbono (Figura 4). Utilizando-se modelos de mistura que levam em conta a variação na composição isotópica de cada fonte de material (terrestre ou marinha), pôde-se calcular a faixa de contribuição de cada fonte na matéria orgânica coletada em coletores de matéria orgânica na coluna d'água. Usando-se o $\delta^{34}\text{S}$, a faixa de contribuição da matéria orgânica marinha ficou entre 75 e 89%, enquanto que usando-se o $\delta^{13}\text{C}$ essa faixa ficou entre 42 e 100%. Portanto, ficou evidente que nesse caso o $\delta^{34}\text{S}$ foi superior ao $\delta^{13}\text{C}$ para a elucidação das fontes da matéria orgânica.

Embora o isótopo de enxofre possa ser considerado superior ao de carbono em alguns casos, como o exemplificado aqui, há situações em que ele não pode ser empregado. Por exemplo, para sedimentos de fundo, o isótopo de enxofre é provavelmente de uso limitado, uma vez que a ação bacteriana em ambiente anaeróbico pode levar a uma mudança extrema no valor do enxofre associado a matéria orgânica (Nriagu *et al.* 1991, Bruechert 1998).

NITROGÊNIO: BIOINDICADOR DE POLUIÇÃO

O isótopo de nitrogênio é menos eficiente que os isótopos de carbono e enxofre para determinar a origem terrestre ou marinha de substâncias. No entanto, em algumas situações, esse isótopo pode ser usado para indicar a existência de poluição por nitrogênio em ecossistemas (Heaton 1986).

No processo de tratamento de esgotos, ocorre a etapa da desnitrificação, em que o nitrato é reduzido a nitrogênio gasoso. Essa transformação não tem 100% de eficiência, e algum nitrato pode permanecer na água a ser despejada no ambiente. Durante a desnitrificação, há um fracionamento isotópico, ou seja, a reação procede mais rapidamente com o isótopo leve de nitrogênio, que se torna N_2 . Ao final do processo, o nitrato que retorna ao ambiente tem um $\delta^{15}\text{N}$ com um valor maior (Heaton 1986), e que pode ser diferenciado do valor das fontes naturais desse elemento.

Muitos ambientes marinhos são pobres em nitrogênio. Portanto, pode-se esperar que as plantas lá presentes assimilarem o mais rapidamente possível todo nitrogênio disponível. Se isto ocorrer, o $\delta^{15}\text{N}$ das plantas será o mesmo do valor da fonte. Portanto, as plantas poderão ser usadas como bioindicadores da presença de poluição por nitrogênio na região. Este tipo de abordagem tem sido aplicado em várias situações (Costanzo *et al.* 2001). Embora possa-se considerar que a abordagem tem sido bem sucedida, alguns problemas podem existir em alguns casos, como por exemplo quando o nitrogênio é naturalmente abundante no ecossistema (Carvalho *et al.* 2007a).

CARBONO: ÍNDICE DE CRESCIMENTO PARA MACROALGAS

Além de servir (com restrições, como foi discutido) como um traçador da origem dos materiais, o isótopo de carbono pode ter outros usos. Desde há muito, tem-se observado que a taxa de crescimento do fitoplâncton pode ser correlacionada positivamente com o valor do isótopo de carbono (Degens *et al.* 1968, Burkhardt *et al.* 1999). Indícios de que a taxa de crescimento também influencia o $\delta^{13}\text{C}$ de plantas macroscópicas aquáticas têm sido também apresentados (Wefer & Killingley 1986, Carvalho *et al.* 2007b, Tanaka *et al.* 2008). Em particular, foi observado que o $\delta^{13}\text{C}$ da macroalga *Undaria pinnatifida* teve uma correlação muito forte com a taxa de crescimento relativo ($r = -0.97$), o que sugere que um uso potencial para o $\delta^{13}\text{C}$ seria a estimativa da taxa de crescimento dessa espécie no ambiente natural (pesquisa do autor, não publicada).

Incubações de curtas durações feitas em laboratório têm apresentado resultados (Carvalho *et al.* no prelo) que estão de acordo com aqueles obtidos em ambiente natural. A abordagem de incubações de curta duração pode ter potencial para expandir grandemente o conhecimento sobre os fatores que determinam o $\delta^{13}\text{C}$ de macrófitas aquáticas, com conseqüentes implicações para a ecologia e fisiologia desses organismos. Além disso, a correlação entre fotossíntese e a discriminação isotópica do carbono demonstra que isótopos estáveis podem fornecer informações não apenas sobre as origens de materiais nos ecossistemas, mas também sobre a taxa de ocorrência de transformações químicas (no caso, a

assimilação do carbono), uma função que até há bem pouco tempo era considerada restrita aos isótopos radioativos (Emerson & Hedges 2008).

SUMÁRIO

Os isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre têm sido utilizados com sucesso em diversos ramos da ecologia costeira, tais como:

1. Elucidação de caminhos tróficos em teias alimentares
2. Origem marinha ou terrestre dos detritos
3. Mapeamento da poluição por nitrogênio

Além desses usos já razoavelmente bem estabelecidos, potenciais novas aplicações vêm sendo propostas, como a utilização do isótopo de carbono como um índice de crescimento de macrófitas aquáticas.

REFERÊNCIAS

- ATEKWANA, E.A. & KRISHNAMURTY, R.V. 2004. Extraction of dissolved inorganic carbon (DIC) in natural waters for isotopic analyses. Pp. 203-228. In: P.A. Groot, (ed.) Handbook of stable isotope analytical techniques. Elsevier, Amsterdam. 1224p.
- BEAUPRÉ, S.R.; DRUFFEL, E.R.M. & GRIFFIN, S. 2007. A low-blank photochemical extraction system for concentration and isotopic analyses of marine dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5: 174-184.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- BRUECHERT, V. 1998. Early diagenesis of sulfur in estuarine sediments: The role of sedimentary humic and fulvic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 1567-1586.
- BURKHARDT, S.; RIEBESELL, U. & ZONDERVAN, I. 1999. Effects of growth rate, CO₂ concentration, and cell size on the stable isotope fractionation in marine phytoplankton. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63: 3729-3741.
- CARVALHO, M.C.; HAYASHIZAKI, K. & OGAWA, H. 2007a. Environment determines nitrogen content and stable isotope composition in the sporophyte of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Journal of Applied Phycology*, On line first: <http://www.springerlink.com/content/k28572422337g12t/?p=1d4d9f4670894322aef0401ffc0f9602&pi=0> (acesso em 01/09/2008).
- CARVALHO, M.C.; HAYASHIZAKI, K. & OGAWA, H. 2008. Sulfur stable isotopes indicate the source of sinking materials in a coastal bay: Otsuchi Bay, Sanriku, Japan. *Journal of Oceanography*, 64: 705-712.
- CARVALHO, M.C.; HAYASHIZAKI, K.; OGAWA, H. & KADO, R. 2007b. Preliminary evidence of growth influence on carbon stable isotope composition of *Undaria pinnatifida*. *Marine Research in Indonesia*, 32: 185-188.
- CARVALHO, M.C.; HAYASHIZAKI, K. & OGAWA, H. No prelo. Short-term measurement of carbon stable isotope discrimination in photosynthesis and respiration by aquatic macrophytes. *Journal of Phycology*.
- CHIKARAISHI, Y.; KASHIYAMA, Y.; OGAWA, N.O.; KITAZATO, H. & OHKOUCHI, N. 2007. Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Marine Ecology Progress Series*, 342: 85-90.
- CONNOLLY, R.M.; GUEST, M.A.; MELVILLE, A.J. & OAKES, J.M. 2004. Sulfur stable isotopes separate producers in marine food-web analysis. *Oecologia*, 138: 161-167.
- COSTANZO, S.D.; O'DONOHUE, M.J.; DENNISON, W.C.; LONERAGAN, N.R. & THOMAS, M. 2001. A New Approach for Detecting and Mapping Sewage Impacts. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 149-156.
- DAWSON, T.E.; MAMBELLI, S.; PLAMBOECK, A.H.; TEMPLER, P.H. & TU, K.P. 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33: 507-559.
- DEGENS, E.T.; GUILLARD, R.R.L.; SACKETT, W.M. & HELLEBUST, J.A. 1968. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton, part I: temperature and respiratory experiments. *Deep Sea Research*, 15: 1-9.
- DEMERS, S. & THERRIAULT, J.C. 1987. Resuspension in the shallow sublittoral zone of a macrotidal estuarine environment: Wind influence. *Limnology and Oceanography*, 32: 327-339.
- DENIRO, M.J. & EPSTEIN, S. 1977. A mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197: 261-263.
- DOE. 1994. *Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water, version 2*.
- EMERSON, S. & HEDGES, J. 2008. *Chemical oceanography and the marine carbon cycle*. Cambridge University Press, Cambridge. 475p.
- FREDRIKSEN, S. 2003. Food web studies in a Norwegian kelp forest based on stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 260: 71-81.

- FRY, B. 1988. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnology and Oceanography*, 33: 1182-1190.
- GOERICKE, R.; MONTOYA, J.P. & FRY, B. 1994. Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. Pp. 187-221. In: K. Lajtha & R.H. Michener, (eds.), *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 316p.
- GROOT, P.A. 2004. *Handbook of stable isotope analytical techniques*. Elsevier, Amsterdam. 1224p.
- HEATON, T.H.E. 1986. Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: a review. *Chemical Geology*, 59: 87-102.
- HEDGES, J.I.; CLARK, W.A. & COWIE, G.L. 1988. Organic matter sources to the water column and surficial sediments of a marine bay. *Limnology and Oceanography*, 33: 1116-1136.
- HOLMES, R.M.; MCCLELLAND, J.W.; SIGMAN, D.M.; FRY, B. & PETERSON, B.J. 1998. Measuring $^{15}\text{N-NH}_4^+$ in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations. *Marine Chemistry*, 60: 235-243.
- KASAI, A. & NAKATA, A. 2005. Utilization of terrestrial organic matter by the bivalve *Corbicula japonica* estimated from stable isotope analysis. *Fisheries Science*, 71: 151-158.
- KOJIMA, S. & OHTA, S. 1989. Particulate organic carbon supply to the sea bottom: stable carbon isotope ratio analysis of the sediment trap samples at the mouth of Otsuchi Bay, northeastern Japan *Journal of Oceanography*, 45: 361-368.
- LOBBAN, C.S. & HARRISON, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge university press, New York. 366p.
- MANN, K.H. 1982. *Ecology of Coastal Waters: A System Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 322p.
- MCCALLISTER, S.L.; GUILLEMETTE, F. & DEL GIORGIO, P.A. 2006. A system to quantitatively recover bacterioplankton respiratory CO_2 for isotopic analysis to trace sources and ages of organic matter consumed in freshwaters. *Limnology and Oceanography: Methods*, 4: 406-415.
- MCCUTCHAN JR, J.H.; LEWIS JR, W.M.; KENDALL, C. & MCGRATH, C.C. 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, 102: 378-390.
- MINAGAWA, M. & WADA, E. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48: 1135-1140.
- NRIAGU, J.O.; REES, C.E.; MEKHTIYEVA, V.L.; LEIN, A.Y.; FRITZ, P.; DRIMMIE, R.J.; PANKINA, R.G.; ROBINSON, B.W. & KROUSE, H.R. 1991. Hydrosphere. Pp. 177-266. In: H.R. Krouse & V.A. Grinenko, (eds.), *Stable isotopes: natural and anthropogenic sulphur in the environment*. John Wiley & Sons, Chichester. 466p.
- ODUM, E.P. 1988. *Ecologia*. Editora Guanabara, 434p.
- OSBURN, C.L. & ST-JEAN, G. 2007. The use of wet chemical oxidation with high-amplification isotope ratio mass spectrometry (WCO-IRMS) to measure stable isotope values of dissolved organic carbon in seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5: 296-308.
- PETERSON, B.J. 1999. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: a review. *Acta Oecologica*, 20: 479-487.
- PETERSON, B.J. & FRY, B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 293-320.
- PETERSON, B.J.; HOWARTH, R.W. & GARRITT, R.H. 1985. Multiple stable isotopes used to trace the flow of organic matter in estuarine food webs. *Science*, 227: 1361-1363.
- PHILLIPS, D.L. 2001. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia*, 127: 166-170.
- PHILLIPS, D.L. & GREGG, J.W. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, 127: 171-179.
- PHILLIPS, D.L. & GREGG, J.W. 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia*, 136: 261-269.
- PHILLIPS, D.L. & KOCH, P.L. 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia*, 130: 114-125.
- POST, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology*, 83: 703-718.
- REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D.; OVALLE, A.R.C.; SILVA, C.A.R. & MARTINELLI, L.A. 1990. Nature of POC transport in a mangrove ecosystem: a carbon stable isotopic study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 30: 641-645.
- SIGMAN, D.M.; CASCIOTTI, K.L.; ANDREANI, M.; BARFORD, C.; GALANTER, M. & BOHLKE, J.K. 2001. A Bacterial Method for the Nitrogen Isotopic Analysis of Nitrate in Seawater and Freshwater. *Analytical chemistry*, 73: 4145-4153.
- SOTIROPOULOS, M.A.; TONN, W.M. & WASSENAAR, L.I. 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecology of Freshwater Fish*, 13: 155-160.
- SPÖTL, C. 2005. A robust and fast method of sampling and

- analysis of $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved inorganic carbon in ground waters. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 41: 217-221.
- STEPHENSON, R.L.; TAN, F.C. & MANN, K.H. 1984. Stable carbon isotope variability in marine macrophytes and its implications for food web studies. *Marine Biology*, 81: 223-230.
- STRIBLING, J.M. & CORNWELL, J.C. 1997. Identification of important primary producers in a Chesapeake Bay tidal creek system using stable isotopes of carbon and sulfur. *Estuaries*, 20: 77-85.
- TANAKA, Y.; MIYAJIMA, T.; YAMADA, K.; HORI, M.; HASEGAWA, N.; UMEZAWA, Y. & KOIKE, I. 2008. Specific growth rate as a determinant of the carbon isotope composition of the temperate seagrass *Zostera marina*. *Aquatic Botany*, 89: 331-336.
- TEECE, M.A. & FOGEL, M.L. 2004. Preparation of ecological and biochemical samples for isotope analysis. Pp. 177-202. In: P.A. Groot, (ed.) Handbook of stable isotope analytical techniques. Elsevier, Amsterdam. 1224p.
- THODE, H.G. 1991. Sulphur Isotopes in Nature and the Environment: An Overview. Pp. 1-26. In: H.R. Krouse & V.A. Grinenko, (eds.), Stable isotopes: natural and anthropogenic sulphur in the environment. John Wiley & Sons, Chichester. 466.
- WADA, E.; MINAGAWA, M.; MIZUTANI, H.; TSUJI, T.; IMAIZUMI, R. & KARASAWA, K. 1987. Biogeochemical studies on the transport of organic matter along the Otsuchi River watershed, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 25: 321-336.
- WAICHMAN, A.V. 1996. Autotrophic carbon sources for heterotrophic bacterioplankton in a floodplain lake of central Amazon. *Hydrobiologia*, 341: 27-36.
- WEFER, G. & KILLINGLEY, J.S. 1986. Carbon isotopes in organic matter from a benthic alga *Halimeda incrassata* (Bermuda): effects of light intensity. *Chemical Geology*, 59: 321-326.
- WEINSTEIN, M.P.; LITVIN, S.; BOSLEY, K.L.; FULLER, C.M. & WAINRIGHT, S.C. 2000. The role of tidal salt marsh as an energy source for marine transient and resident finfishes: a stable isotope approach. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129: 797-810.
- YOKOYAMA, H.; ISHIHI, Y. & YAMAMOTO, S. 2008. Diet-tissue isotopic fractionation of the Pacific oyster *Crassostea gigas*. *Marine Ecology Progress Series*, 358: 173-179.

Submetido em 28/08/2008.

Aceito em 07/11/2008.