



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Uso de isótopos estables de carbono y nitrógeno para estudios de ecología acuática

Use of stable isotope of carbon and nitrogen for aquatic ecology studies

Fecha recepción: 2009-06-18 / Fecha aceptación: 2009-10-28

Pedro Caraballo, caraballo7@yahoo.com

Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Sincelejo, Colombia.

Resumen

El flujo de carbono hasta los niveles superiores en las redes tróficas acuáticas, se presenta de dos formas básicas: una corta, basada en la producción fitoplanctónica, conocida como planctónica, y otra más larga, que incluye además las bacterias, protozoarios y el proceso denominado microbial loop (cíclico), llamada red trófica microbiana. Incluir esta otra cadena en los estudios de redes tróficas, complementa la visión general de las redes tróficas acuáticas, hoy limitada en ese aspecto. En ese sentido, el análisis de la abundancia natural de los isótopos estables de carbono y nitrógeno, es una técnica que permite definir el papel de los grupos tróficos que integran las redes tróficas acuáticas. La proporción de isótopos de carbono define la fuente autótrofa y la proporción de isótopos de nitrógeno permite inferir, basados en el proceso de fraccionamiento trófico, el nivel trófico de los organismos estudiados.

Palabras claves: Isótopos estables, ecología acuática, redes tróficas, microbial loop.

Abstract

Two distinct pathways of carbon flow are currently recognized in deep sea aquatic food webs: a short pathway based on phytoplankton production known as planktonic and a longer one, which also includes bacteria, protozoans, and the process known as the microbial loop, referred to collectively as the microbial food web. Considering the microbial loop complements the current vision of aquatic food webs, which today continues to be limited in this respect. In this sense, the analysis of natural abundance of the steady isotopes of carbon and nitrogen in aquatic organisms is a technique which permits the definition of the role of the trophic groups which are part of food web. The proportion of isotopes of carbon indicates the autotrophic energy source of an organism while the proportion of nitrogen isotopes, permits to infer, based on the process of trophic breaking, the level of the organisms studied.

Key words: Stable isotopes, aquatic ecology, food webs, microbial loop.

Introducción

En general la forma más elemental y efectiva de visualizar una comunidad es a través de las redes tróficas que la constituyen. Esta estrategia es positiva porque evidencia relaciones básicas como la herbivoría y la predación, pero también negativo porque trivializa (como consecuencia de agrupar organismos diferentes) relaciones complejas, que pueden asumirse como estáticas cuando en la realidad son profundamente dinámicas. Una alternativa entonces es definir claramente los límites de la representación, señalando posibles relaciones de reciclaje, canibalismo y omnivoría, así como el período para el cual se presenta como válida. De esta forma, la representación gráfica de las relaciones tróficas en una comunidad resulta ser una herramienta fundamental para el manejo y control de ecosistemas acuáticos.

Una vez asumida la tarea de estudiar las relaciones tróficas en una comunidad, es necesario establecer la estrategia básica de estudio, que puede ser el análisis del contenido estomacal o de las abundancias naturales de isótopos estables en los organismos estudiados. La primera de ellas permite definir qué ha ingerido el organismo, siempre y cuando pueda ser identificado, lo que no es tarea fácil. Una dificultad adicional viene del hecho que algunos ítems alimenticios son asimilados más rápidamente que otros, por lo que pueden ser subestimados en los análisis. La segunda forma de estudio, que representa el tema central de esta revisión, es el uso de la abundancia natural de los isótopos estables de carbono y nitrógeno, como trazadores del flujo de energía en una comunidad.

Básicamente el análisis de la abundancia del carbono 13 (^{13}C), nos permite definir cuál es la fuente original del carbono presente en cualquier organismo. De hecho, gracias a esa técnica sabemos hoy que gran parte de las poblaciones humanas usan como fuente primaria de energía, el carbono proveniente de las gramíneas (plantas tipo C4) y sólo algunas pequeñas poblaciones aisladas, tienen como fuente las plantas C3. Por otro lado, el análisis del nitrógeno 15, permite definir los diversos pasos (niveles tróficos) por los que va pasando la energía hasta llegar a la cima.

En el marco de la ecología acuática, la aplicación de la técnica de isótopos estables se ha consolidado como

un área específica, definida como ecología isotópica, que tiene una amplia diversidad de aplicaciones. Problemas de contaminación pueden ser detectados y lo que es más interesante, resueltos en la medida en que se puede actuar directamente sobre el grupo o nivel trófico que representa el problema principal.

Con base en lo anterior, se presenta esta breve revisión sobre una de las áreas de trabajo en ecología acuática de mayor crecimiento en las últimas dos décadas. Evitando el esquema tradicional de un abordaje por grupos tróficos, he optado por una presentación más funcional, señalando primero las características de las cadenas y redes tróficas, pasando luego a la parte teórica y metodológica de la ecología isotópica, para terminar con algunas explicaciones y análisis de casos para el análisis de datos.

Cadenas y redes tróficas

De la forma como sea considerada la comunidad planctónica en un ecosistema, van a depender el enfoque inicial y las técnicas de estudio requeridas. Incluir o no a las bacterias y protozoarios en un mismo grupo con el fitoplancton y zooplancton, define el estudio o no de una cadena trófica del detritus, que funciona simultáneamente con la cadena trófica herbívora (también llamada cadena trófica clásica) en el flujo de carbono, constituyendo una red trófica planctónica como propuesto por Porter [1]. Implica también que otras técnicas como microscopía de epifluorescencia, evaluación de lípidos en los organismos, análisis estequiométricos y de isótopos estables, tengan que ser empleadas adicionalmente a los conteos tradicionales usando microscopía ocular.

El largo de la red alimenticia, definido como el número de niveles tróficos existentes, es una característica ecológica importante de las comunidades. Influye sobre la estructura de la comunidad, las funciones ecosistémicas y las concentraciones de contaminantes en los predadores terciarios, que será mayor en la medida en que haya más bioacumulación en el flujo. En general se ha considerado que el tamaño de la red puede ser función de la productividad, del tamaño del ecosistema o una combinación de la productividad y el tamaño del ecosistema. Estudios recientes sin embargo, demuestran que el tamaño de la red alimenticia tiende a incrementarse con el tamaño del ecosistema [2].

Históricamente el plancton, constituido por fitoplancton y zooplancton, ocupó papel central en los estudios de ecología acuática. Ese principio básico de la ecología del plancton sufre su primer impacto, cuando al proceso de descomposición de la materia orgánica por parte de las bacterias, descrito por Lyndeman [3], se le confiere un papel central en el estudio del metabolismo de los ecosistemas acuáticos. Posteriormente, Pomeroy [4] presentó el proceso de reciclaje de la materia orgánica disuelta en la cadena trófica, que dio paso al término “microbial loop” introducido por Azam, *et al.* [5]. Se trata del procesamiento de la materia orgánica particulada no viva por parte de las bacterias, seguida del consumo de éstas por parte de los protozoarios, lo que permite una transferencia de energía hacia niveles tróficos superiores¹. Se hizo evidente entonces, que el microbial loop junto con la producción primaria, controlan la productividad natural de los ecosistemas acuáticos [6] y como parte del plancton fue asimilado el bacterioplancton. El consumo de las bacterias heterotróficas por parte de protozoarios (flagelados y ciliados) y el zooplancton [7,8] cambia la idea tradicional de una cadena trófica lineal (figura 1). El microbial loop transfiere una cantidad de energía equivalente de 10-50% (dependiendo principalmente de la concentración de nutrientes en el medio) del carbono de la fotosíntesis a través de la vía carbono orgánico disuelto – bacteria – protozoos (figura 2). Según Work *et al.* [9] el carbono de las bacterias representa cerca del 25% del total que pasa para el mesozooplancton, y casi la mitad del carbono que va para el microzooplancton y los protozoarios.

Hasta aquí era reconocido el papel heterotrófico de las bacterias dentro de las redes planctónicas, pero es con la inclusión de las algas cianofíceas en el dominio Bacteria [10] que se transforma totalmente la visión tradicional del plancton, si bien algunos investigadores continúan considerando las cianofíceas como algas, pero no entraré en esa polémica. La omnipresencia y abundancia de la cianofícea *Synechococcus* por ejemplo, evidencia la

importancia de este grupo como productor primario, permitiendo a Pomeroy *et al.* [11] hacer dos afirmaciones transcendentales para la ecología: a) la mitad del oxígeno que respiramos proviene de bacterias fotosintéticas asociadas con el microbial loop oceánico, y b) la biomasa total de bacterias en el océano, es mayor que la biomasa combinada de zooplancton y peces en ese medio. De cualquier forma, se puede inferir que por ser las cianofíceas uno de los principales productores fotosintéticos de materia orgánica, su papel como fuente de energía es fundamental en la dinámica trófica, para el flujo directo (herbívora) e indirecto (microbial loop) en los ecosistemas acuáticos.

Una de las consecuencias de incluir el microbial loop en los estudios de ecología del plancton, es que deben ser estudiados más niveles tróficos en las cadenas tróficas. Como consecuencia inmediata se tiene que, proporcionalmente, una fracción menor del carbono orgánico producido llegaría a los niveles tróficos superiores [12,13]. Este carbono, de acuerdo con Klug [14], puede ser dividido con base en el origen de las fuentes de energía en autóctona y alóctona, y con base en su biodisponibilidad en lábil y recalcitrante. El hecho de existir una diferencia entre el carbono autóctono y el alóctono, permite por ejemplo detectar fuentes de contaminación y el impacto de las cuencas sobre la calidad de las aguas. Por otro lado, los mecanismos que pueden convertir en disponible el COD (carbono orgánico disuelto) recalcitrante, incluyen reacciones fotoquímicas, la presencia de exoenzimas, difusión desde el litoral y el sedimento, o de fuentes alóctonas que facilitan la despolimerización de las macromoléculas recalcitrantes [12]. Hoy se sabe que existe un proceso de transferencia abiótica del COD, en el que esos compuestos, principalmente aquellos de carbono recalcitrante, son transformados en macropartículas que son consumidas por protozoarios, porque su forma y tamaño son parecidos con las bacterias [6] y porque forman flóculos llamados “nieve marina”, que son agregados orgánicos que pueden ser consumidos directamente por los peces [15].

¹No existe consenso en español sobre un término equivalente (ciclo microbiano, bucle microbiano y otros son usados), por lo que en este documento será usado el término original en inglés.

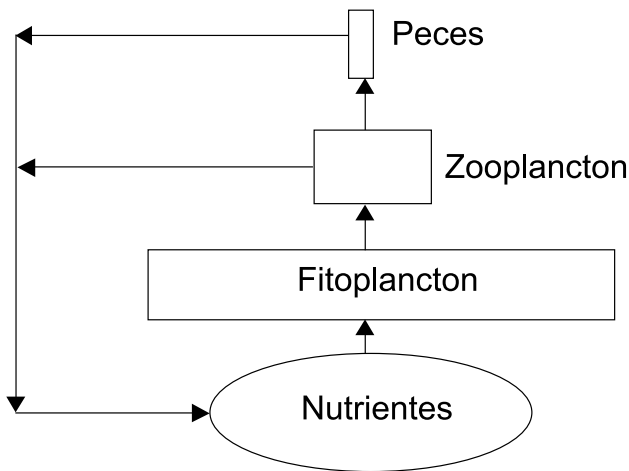


Figura 1. Cadena trófica tradicional, basada en la producción primaria fitoplanctónica.

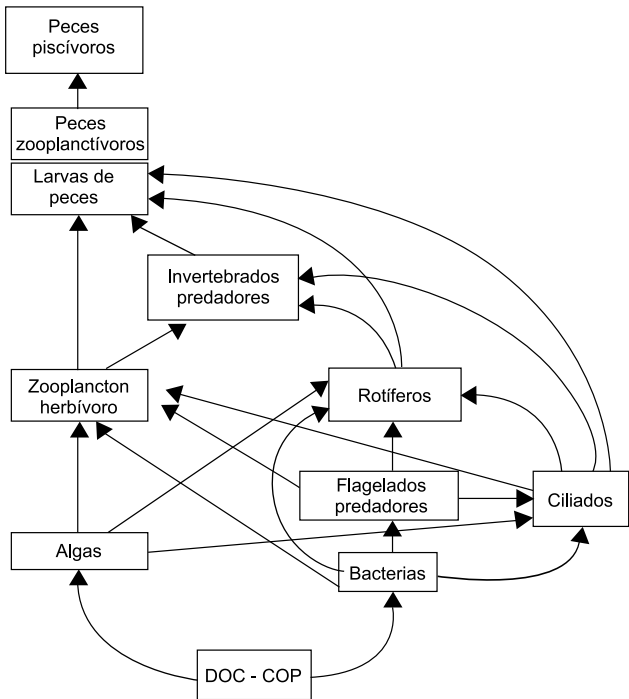


Figura 2. Cadena trófica basada en la producción fitoplanctónica y bacteriana (modificado de Porter [1]).

De acuerdo con la clasificación por tamaño hecha por Sieburth [16], los organismos planctónicos se dividen en: picoplancton (0.2 - 2 μm); nanoplancton (2 - 20 μm); microplancton (20 - 200 μm); mesoplancton (0.2 - 20 mm); macroplancton (2 - 20 cm) y megaplancton

(20 - 200 cm). De esta forma, el picoplancton está constituido principalmente por procariotas, que pueden representar valores de 10^5 cel/ml en aguas oligotróficas y hasta 5×10^6 cel/ml en aguas eutróficas [17]. Con base en lo anterior, los principales microorganismos que constituyen las redes tróficas en los ecosistemas acuáticos pueden ser divididos en dos clases, de acuerdo con su tamaño: a) El picoplancton que incluye organismos autótrofos (procariotas y eucariotas) y heterótrofos (bacterias y pequeños flagelados); b) Nanoplancton que incluye grandes flagelados y pequeños ciliados. Los flagelados y ciliados son los más importantes protozoarios picoplanctívoros en la mayoría de los ecosistemas acuáticos. Podemos decir, basados en los trabajos de Porter [1] y Winemiller [18], que una cadena trófica que incluye el microbial loop, tiene una participación, en proporciones variables, de carbono orgánico disuelto y particulado, de macro y micro algas, flagelados, ciliados, insectos, micro y mesozooplancton, así como de larvas y juveniles de peces (figura 3).

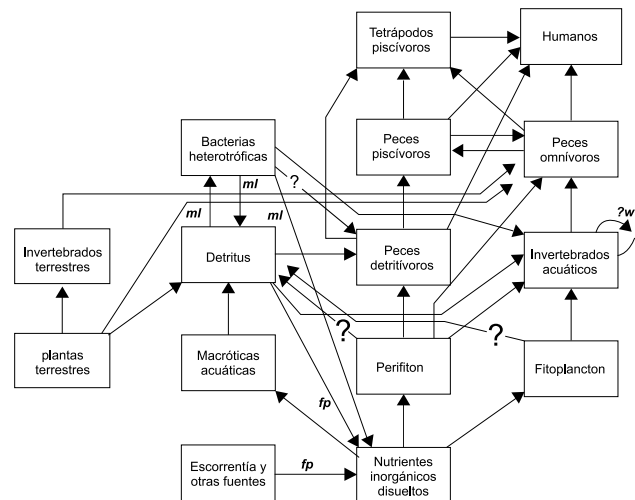


Figura 3. Red trófica de un lago de inundación, incluyendo la cadena trófica detritívora y la participación del microbial loop (ml) en el flujo de carbono hacia niveles tróficos superiores (modificado de Winemiller [18]).

Existen básicamente, dos formas como son estudiadas las cadenas tróficas en ecosistemas los lagos de inundación tropicales: una que presenta una red trófica corta, con poca o ninguna participación del microbial loop en el flujo de energía hacia los niveles

tróficos superiores [19,20,21] y otra que considera significativa la participación del microbial loop en el bacterioplancton en el proceso [22,23,24]. Existe adicionalmente una tercera posición, que se refiere a lagos de regiones templadas, según la cual, como consecuencia de la entrada de materia orgánica alóctona en un sistema acuático, las redes tróficas basadas en la producción primaria pueden cambiar y pasar a estar basadas en la producción heterotrófica [13]. En términos generales son muchos y no muy bien comprendidos, los factores físicos, químicos y biológicos que controlan las fuentes de carbono que son accesibles para la producción bacteriana [25].

Considerando la variabilidad ambiental de los lagos de inundación, descrita por Junk *et al.* [26], es de esperarse que la interrelación entre la estructura de la comunidad ecológica, su estabilidad y los procesos que ocurren dentro del ecosistema, que constituyen la red trófica [27], cambien también en los períodos limnológicos de sequía, inundación, llena y bajada, descritos por Raí y Hill [24]. Así, se puede decir que una red trófica cambia en su composición de especies y en los parámetros poblacionales, incluida la abundancia. Además, a nivel de individuos, en la red se presentan variaciones en el crecimiento, tamaño y comportamiento [28]. Esto ocurre en las poblaciones de bacterias, que presentan diferentes tasas de crecimiento poblacional, haciendo que puedan coexistir utilizando la misma fuente de energía [12]. En este contexto, los diferentes períodos asociados con el proceso de inundación y sequía de los lagos tropicales, son eventos de gran magnitud, en los cuales la contribución relativa de materia orgánica autóctona y alóctona puede cambiar profundamente. Períodos de sequía dependen básicamente de la producción autóctona, a diferencia de la inundación, en donde la participación de fuentes alóctonas es significativa.

Buscando establecer el origen de la materia orgánica para los ecosistemas acuáticos amazónicos, fueron definidos cuatro grandes grupos de productores primarios que son las macrófitas acuáticas, la floresta inundable (equivalente a los manglares en la zona costera), fitoplancton y perifiton [19,20,29] a partir de los cuales se genera todo el carbono que sustenta aproximadamente el 60% de la producción pesquera en el Amazonas, evaluada en 200000 ton/año [30]. Por otro lado, se sabe que las plantas (especialmente aquellas con metabolismo C4) pueden ser consumidas

directamente por micro herbívoros, o entrar indirectamente en la cadena trófica a través del microbial loop, como dice Waichman [22], que encontró bacterias heterotróficas que son mantenidas con el carbono que viene de las plantas C4 y sugiere que tienen la función de eslabones tróficos entre las plantas vasculares y los micro invertebrados.

Principios básicos de ecología isotópica

El análisis de isótopos estables, que fue inicialmente aplicado a estudios de geoquímica, encontró en la ecología, un amplio campo de actuación, fundamentado en la diferencia isotópica existente entre los diferentes compartimentos de un ecosistema. La utilización de los isótopos estables como trazadores se basa en la premisa según la cual la marca o proporción isotópica, que es la proporción entre el isótopo pesado y el isótopo liviano, varía de forma previsible en la medida en que el elemento ciela en la naturaleza [31]. De esta forma, la marca isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) refleja la fuente de carbono de su dieta [32] en la marca isotópica de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) puede ser usada para definir su posición trófica [21]. El análisis combinado de estos isótopos en las fuentes y en los consumidores, puede revelar la fuente original de carbono y su paso a través de la cadena trófica. La gran cantidad de publicaciones disponibles reflejan el poder de la técnica para resolver problemas de la trofodinámica que de otra forma serían insolubles. Los mismos documentos, sin embargo, también reflejan la incertidumbre que se genera cuando la técnica es aplicada en ecosistemas abiertos, en los cuales no son conocidas todas las fuentes autótrofas y menos aún, han sido cuantificadas.

Variaciones en el fraccionamiento isotópico entre productores primarios ocurren por diferencias en la vía metabólica empleada, el substrato inorgánico, las condiciones ambientales y fisiológicas. Las diferentes rutas fotosintéticas de las plantas generan modelos distintos de fraccionamiento isotópico, resultantes de la acción de enzimas que seleccionan ^{12}C y ^{13}C de forma diferente. Ellas fijan el carbono, utilizando dos ciclos fotosintéticos:

- Plantas C3 usan el **ciclo de Calvin** y reducen el CO_2 a fosfoglicerato, un compuesto con tres átomos de carbono, utilizando la bifosfato ribulosa carboxilasa (Rubisco), que discrimina el $^{13}\text{CO}_2$ resultando en un valor medio de $\delta^{13}\text{C}$ de -27 ‰. Son plantas tipo C3 la

uva, arroz, cebada, remolacha, café, *Eichhornia crassipes* y fitoplancton, hojas y frutos de árboles.

- Plantas C4 que usan el **ciclo de Hatch-Slack**, fijan el CO₂ utilizando la enzima fosfoenilpiruvato carboxilasa (PEPC), produciendo un compuesto de 4 carbonos (malato o aspartato), que es asimilado a través del ciclo de Calvin. Estas plantas, con alta eficiencia fotosintética, discriminan menos el ¹³CO₂ dando como resultado un δ¹³C medio de -13‰. Son ejemplos de estas plantas la caña de azúcar, maíz y las macrófitas acuáticas *Paspalum repens* y *Echinochloa polystacha*.

El fitoplancton, a pesar de ser de tipo C3, presenta regularmente una marca isotópica más empobrecida (más negativa), porque no usa el CO₂ atmosférico (-8 ‰) como sustrato, sino el carbono inorgánico disuelto en el agua (CID), que en lagos y ríos tiene marca isotópica cercana a -15 ‰ y en regiones costeras tiene valores entre -22 y -18‰.

Las transformaciones isotópicas que producen variaciones en la abundancia relativa de los isótopos pesados (¹³C) y livianos (¹²C), entre el sustrato (dieta) de la fuente y sus productos (consumidores), son llamadas **fraccionamientos isotópicos**. Estos fraccionamientos ocurren porque los isótopos menos pesados forman enlaces químicos que requieren menos energía para romperse, y por eso en las reacciones químicas, los isótopos más leves generalmente reaccionan más rápido y van quedando más concentrados en los productos o consumidores [33]. En general existen cuatro conceptos básicos en la ecología isotópica: razón o proporción isotópica (R), señal o marca isotópica, fraccionamiento trófico y la tasa de reemplazo (“turnover”) isotópico:

1. Razón o proporción isotópica (R‰), es la proporción natural entre el isótopo pesado y el leve.
R= isótopo pesado/isótopo común, 13C/12C, 15N/14N
2. Señal o marca isotópica (δ¹³C o δ¹⁵N‰), es la diferencia entre la razón isotópica y su estándar internacional. Es definido por la letra delta (δ) y cada vez más, con letra d. Es expresada en partes por mil así:
δX(‰) = [(R_{muestra}/R_{estandar}) - 1] x 1000

3. Fraccionamiento trófico o factor de discriminación (Δ‰), es la diferencia entre la marca isotópica del consumidor y de su presa o dieta.
4. La tasa de reemplazo isotópico es la tasa de cambio de un tejido, hasta asumir la marca isotópica de la nueva fuente de alimento.

Los componentes de la cadena alimentaria reflejan exactamente los δ¹³C de sus fuentes de energía, con pequeñas diferencias, aumentando 0.2 a 1% a cada nivel trófico (esto hace que la variabilidad propia de los valores medidos se confunda con el enriquecimiento, por lo que es difícil usar este isótopo para definir niveles tróficos). La determinación de la razón isotópica permite una comparación de los valores de δ¹³C y δ¹⁵N de las fuentes, con el valor del producto. De esta forma, cuando hay sólo dos fuentes es posible definir el porcentaje de participación de cada una, por el principio de la dilución isotópica [34] usando la siguiente fórmula:

$$\%C_3 = [(\delta^{13}C_{\text{muestra}} - \delta^{13}C_4) / (\delta^{13}C_3 - \delta^{13}C_4)]$$

Donde δ¹³C₃ y δ¹³C₄ son las marcas isotópicas de las plantas C3 y C4 respectivamente, a lo que se suma la marca de la muestra analizada. De esta forma, si existen dos fuentes A y B con marcas de -10‰ y -20‰ respectivamente, que dan origen a un producto con marca -17‰, se puede calcular una participación de 30% de la fuente A y 70% de la fuente B. Es muy improbable que esta situación ocurra en la naturaleza, donde suelen encontrarse más de dos fuentes, por lo que es necesario usar modelos que incluyan más de un isótopo. Es el caso de las plantas C₃ en la cuenca amazónica, porque ellas poseen valores medios de δ¹³C que estadísticamente no son diferentes entre sí [20]. En este tipo de situaciones el IsoSource, disponible en <http://www.epa.gov/wed/pages/models/stableIsotopes/isosource/isosource.htm>, es el procedimiento estadístico que calcula los intervalos de las contribuciones de las fuentes (mínimo y máximo posibles) que ha sido empleado con más éxito.

Usando dietas con marca isotópica conocidas, DeNiro y Epstein [37] alimentaron varias especies y hallaron que el carbono de los tejidos se iba enriqueciendo 1‰ con relación a la dieta (0.81 ± 1.1‰, rango = -0.6 a

2.7‰), mientras que el $\delta^{15}\text{N}$ aumentaba entre 3-5‰ ($3.0 \pm 2.6\%$, rango = -0.5 a 9.2‰). Estos valores, a pesar de ser variables en los diferentes ecosistemas, son ampliamente utilizados [38,32]. La expresión, “usted es lo que come”, muy común en los trabajos de ecología isotópica, no es tan correcta como parece. Jamori *et al.* [39], alimentaron larvas de *Piaractus mesopotamicus* ($\delta^{13}\text{C} = -21\%$) con nauplios de *Artemia* ($\delta^{13}\text{C} = -15\%$), y después de quince días las larvas estaban más enriquecidas ($\delta^{13}\text{C} = -12.5\%$) que la propia fuente de alimento (figura 4). Esta situación, que puede ser consecuencia de la absorción selectiva del vitelo de los nauplios de *Artemia*, demuestra que los organismos no son aquello que comen, que es el resultado usual de los análisis de contenido estomacal, y sí aquello que asimilan, que es el resultado del análisis de la abundancia natural de isótopos estables.

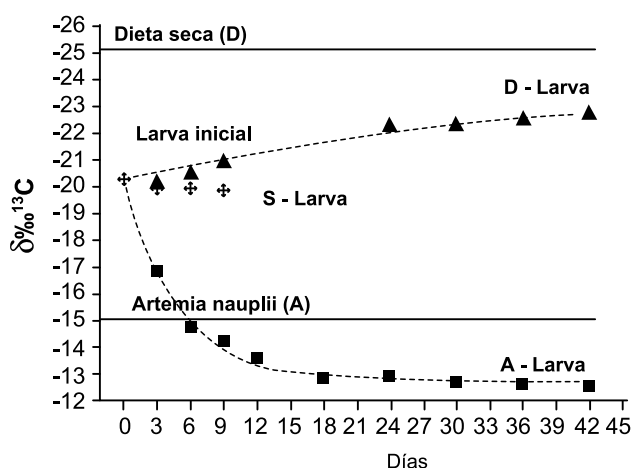


Figura 4. Variación del $\delta^{13}\text{C}$ de larvas de *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) alimentadas con nauplios de *Artemia sp.* En el eje de Y está la marca isotópica de carbono y en X el número de días de experimento (modificado de [39]).

En el caso del nitrógeno, es relevante el hecho que el N fijado biológicamente tiene un valor de $\delta^{15}\text{N}$ similar al N_2 atmosférico (0 ‰). Por eso las plantas leguminosas, que fijan N_2 a través de relaciones simbióticas con bacterias, presentan valores cercanos a 0‰, como ocurre con las muestras de fitoplancton dominadas por cianofíceas. Ya las plantas que no son fijadoras, presentan un $\delta^{15}\text{N}$ similar al de su fuente de N teniendo presente el enriquecimiento que se presenta en el consumidor, denominado fraccionamiento trófico.

Principios metodológicos

Para evaluar las proporciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ se utilizan muestras pulverizadas del material, que son convertidas por combustión en gas y luego son introducidas en el espectrómetro de masas, donde son ionizadas y sus moléculas separadas de acuerdo con su masa [39]. Vale anotar que el trabajo del investigador regularmente termina al preparar el polvo fino y enviarlo a un laboratorio para su análisis y comparación con los estándares internacionales. En el caso del carbono se trata del carbonato de calcio, conocido como PDB (el molusco fósil *Belemnitella americana* en la formación Pee Dee en USA) y para el nitrógeno se comparan el $\delta^{15}\text{N}$ de la muestra con el del aire. Otros estándares, conocidos como “working standards” son usados regularmente en todos los laboratorios del mundo por economía.

Dependiendo del tamaño del organismo estudiado, parte del cuerpo o el cuerpo entero es utilizado para el análisis. En el caso de los peces, generalmente se usa músculo de la región dorsal, porque hay diferencias significativas entre la tasa de asimilación de otros tejidos del cuerpo, lo que impediría establecer comparaciones con evaluaciones hechas en otros peces. Diversos estudios han demostrado la variabilidad de la marca isotópica en los diferentes tejidos de un organismo, conocida como variabilidad metabólica [21,31,40].

La cantidad de material usado en los análisis de isótopos estables, que es la primera duda al iniciar este tipo de trabajo, depende de la concentración de los isótopos en la muestra y la sensibilidad del espectrómetro de masa utilizado. Para tejidos con proporción de C:N entre 3-6 (músculo de peces y zooplancton p.ej.), son necesarios entre 0,2-0,4 mg de materia seca, mientras que para muestras con proporción C:N cercana a 15 (la mayoría de las plantas), son necesarios entre 2,0 y 4,0 mg de materia seca [41].

Una modificación de la técnica de análisis de isótopos estables es usada actualmente en algunos laboratorios, en los cuales se estudia el fraccionamiento isotópico de una sustancia en particular (los peptidoglucanos en las bacterias p.ej.), que es producida específicamente por los organismos que están siendo estudiados, por lo que son llamadas biomarcadores [42]. Según estos investigadores, un biomarcador es un compuesto que

tiene especificidad biológica, en la medida en que solamente es producido por un pequeño grupo de organismos, lo que permite evaluar su abundancia como equivalente de la abundancia de los organismos que la producen.

Evaluar la abundancia de ^{13}C y ^{15}N en muestras de bacterias, requiere naturalmente de una biomasa de bacterias, suficiente para ser analizada en el espectrómetro de masas. Una forma de hacerlo es capturar el CO_2 respirado por las bacterias heterotróficas como fue realizado por Waichman [22], que requiere una infraestructura de laboratorio compleja. Por otro lado, Coffin *et al.* [43], propusieron una metodología más viable pero altamente dispendiosa, con resultados altamente confiables, que es presentada aquí con algunas variaciones propuestas por el autor. En principio se trata de filtrar con filtro de $0,2\ \mu\text{m}$, un volumen de 990 ml de agua del sistema estudiado, como un medio de cultivo natural, en el cual se obtiene a partir de un inóculo, la biomasa de bacterias necesaria. Estas bacterias, por alimentarse del COD, reflejarán en su marca isotópica su estrategia alimenticia y por ende su papel en el medio. El problema es que para obtener 990 ml de agua filtrada con $0,2\ \mu\text{m}$, es necesario filtrar con redes de $30\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ y luego con filtros GF/C ($1.2\ \mu\text{m}$), GF/F ($0.7\ \mu\text{m}$), filtro nucleopore de $0.6\ \mu\text{m}$ y finalmente con filtro nucleopore blanco de $0.2\ \mu\text{m}$ para obtener el medio de cultivo que será guardado en frasco oscuro estéril. El inóculo consiste en 10 ml de agua filtrada con filtro GF/F. Los frascos oscuros son sellados con cinta plástica e incubados en la oscuridad por 48 horas a $30\ ^\circ\text{C}$, para posterior filtración con filtro GF/F prequemado a $450\ ^\circ\text{C}$ durante una hora. El filtro es secado en estufa a $55\ ^\circ\text{C}$ por 24 horas y guardado en desecador.

Una de las formas más eficientes de estudiar el carbono del fitoplancton, es a través del estudio de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. De hecho, el proceso de evaluación sería bien simple si no fuera por el problema metodológico que representa separar el fitoplancton del resto de partículas presentes en el seston. En este sentido Hamilton y Lewis [44] hicieron una propuesta de separación del material detrital a través de la centrifugación de la muestra en una solución de sílice, que fue empleada sin mucho éxito por Calheiros [45]. Esta técnica fue mejorada años después [46] y hoy es una referencia importante

en los estudios de isótopos estables del fitoplancton. A pesar de esto, el método más empleado para evaluar el fraccionamiento isotópico del carbono fitoplanctónico, continúa siendo considerar todo el carbono orgánico particulado menor de $50\text{-}60\ \mu\text{m}$, como representativo del fitoplancton presente en el medio [47]. Es claro que esto implica una fuente de error, porque en la evaluación se incluye carbono de otras fuentes, aunque en la práctica el procedimiento ha demostrado una fuerte asociación con organismos fitoplanctófagos (Caraballo, datos sin publicar). Es importante en este punto resaltar que las muestras deben ser filtradas con filtros de fibra de vidrio, en lo posible GF/F ya que tienen una capacidad de retención superior.

En el caso de animales pequeños, tales como las postlarvas de peces, el intestino debe ser retirado del animal para evitar la interferencia que ese material ingerido, pero no asimilado, pueda tener en los resultados [21]. En el caso del zooplancton igualmente, los organismos deberán ser mantenidos en un recipiente con agua limpia para que evacúen sus contenidos intestinales. Esto ocurre en un lapso no mayor de 3 horas, en una temperatura próxima a los $30\ ^\circ\text{C}$ (Caraballo, datos sin publicar).

Además de las dificultades relacionadas en este documento, existe un problema adicional en los estudios de cadenas tróficas planctónicas. En estos organismos se presentan variaciones en las proporciones isotópicas asociadas con las variaciones ambientales como fue observado en una investigación realizada en un lago en el Japón, en la que Yoshioka *et al.* [48] encontraron una fluctuación estacional en la proporción de isótopos estables del zooplancton, fuertemente relacionada con la del fitoplancton que también cambió. Las variaciones en los valores de delta ^{13}C fueron mayores en Copepoda y una especie de Cladocera predadora, disminuyendo de -15‰ en mayo hasta -23‰ en noviembre. Esta situación fue asociada con la variación estacional y por eso se espera que algo similar ocurra, asociado con el pulso anual del río.

Análisis de datos

En general son considerados como valores extremos de carbono aquellos correspondientes a las plantas C4 y C3. Esto significa una variación entre -10‰ y -35‰ respectivamente. Hay sin embargo fuentes más

negativas, que generan valores próximos a -50‰ y que son asociadas con una fuente de carbono metanogénica [49]. Organismos como los quironomídeos (*Chironomus spp*) asociados con fondos anóxicos, suelen presentar ese comportamiento, como fue demostrado por Calheiros [45], que encontró valores medios de carbono de -55‰ . Es común en los libros de ecología que la producción quimioautotrófica sea subestimada hasta el punto de no ser incluida como una fuente de producción primaria, pero si consideramos que los lagos de inundación tropicales tienen un hipolimnio definido la mayor parte del año [50], es posible intuir que esta otra fuente autotrófica, puede tener una importancia mayor de la que suele dársele.

Al igual que con el carbono, hay también algunos valores extremos en el caso del $\delta^{15}\text{N}$, asociados con el metabolismo anaeróbico de los cuerpos de agua. Asumiendo un fraccionamiento trófico de $3\text{-}4\text{‰}$ como propuesto por Post [32], un organismo con $\delta^{15}\text{N}$ de 16‰ estaría en el quinto nivel trófico y fue eso lo que encontraron Gray *et al.* [49] estudiando quironomídeos en lagos ingleses y alemanes. En ese mismo estudio fueron igualmente reportados valores de $\delta^{15}\text{N}$ extremadamente negativos (-8‰) que fueron asociados con bacterias que habitan en los tubos donde viven estos organismos en el fondo. Estudiando la red trófica en un lago amazónico (Caraballo, datos sin publicar) fueron encontrados valores de $\delta^{15}\text{N}$ de 16‰ en bacterias, lo que fue interpretado como resultado del consumo de grandes predadores en descomposición. El comportamiento regular del $\delta^{15}\text{N}$ en los cuerpos de agua está definido por valores mínimos entre -0.1 y -2.5‰ que son indicativos de alta fijación de N_2 , asociada con altas concentraciones de cianobacterias fijadoras de N_2 . Valores altos en sistemas lóticos están asociados con fuentes de contaminación antrópica, pero es necesario tomar cuidado de evaluar las concentraciones de amonio (NH_4^+) ya que su abundancia puede generar valores contrarios.

Lo que se desprende de toda esta variabilidad de datos, es que a través del estudio isotópico de carbono y nitrógeno, se puede visualizar el espacio trófico de una comunidad. En general esta representación se hace de dos formas básicas: a través de un histograma de frecuencias y a través de un diagrama cartesiano en el

cual los ejes representan la abundancia de los isótopos de carbono y de nitrógeno.

Uno de los paradigmas de la ecología acuática amazónica era que la principal fuente autotrófica de carbono para la enorme producción pesquera de esa cuenca eran las plantas C_4 , representadas principalmente por dos géneros de amplia cobertura y productividad: *Paspalum spp* y *Echinochloa spp*. Fue necesario que alguien dudara de esta verdad y así, Araujo-Lima *et al.* [19] publicaron un clásico de la ecología acuática tropical, demostrando que la principal fuente de carbono para la producción pesquera amazónica eran las plantas C_3 y especialmente el fitoplancton (figura 5) y que ninguna de las especies de peces estudiadas se alimentaba con plantas C_4 .

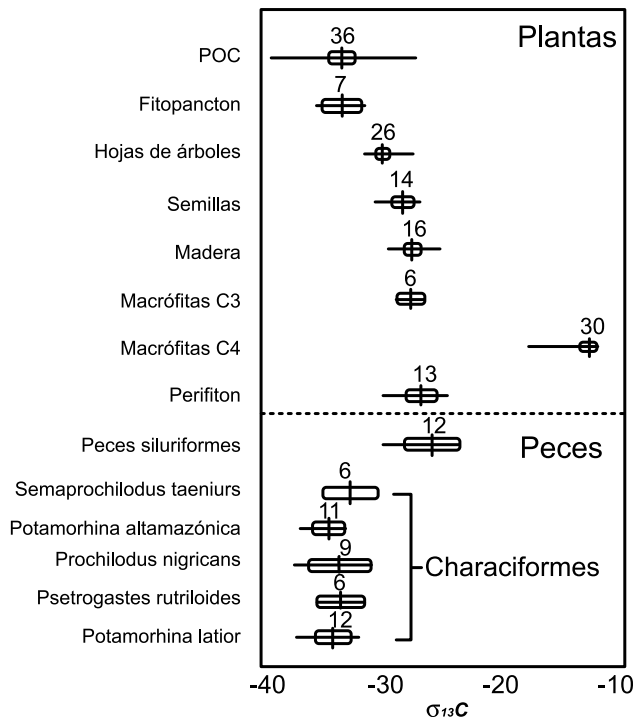


Figura 5. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de fuentes de carbono orgánico particulado (POC), siete fuentes autotróficas, cinco especies de peces detritívoros y cuatro especies de Siluriformes agrupadas (modificado de 19).

En la figura 6, Wantzen *et al.* [51] presentan en un diagrama, el comportamiento isotópico general de una comunidad de peces en un lago de inundación en el Pantanal (Brasil). Fueron analizados 11 ítems, de los

cuales cinco son grupos funcionales de peces, de una red con 4 niveles tróficos. Lo interesante del diagrama es que representa en dos dimensiones el nicho trófico (como descrito por Hutchinson), de los grupos de peces, siendo los ejes que definen el ambiente las abundancias isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

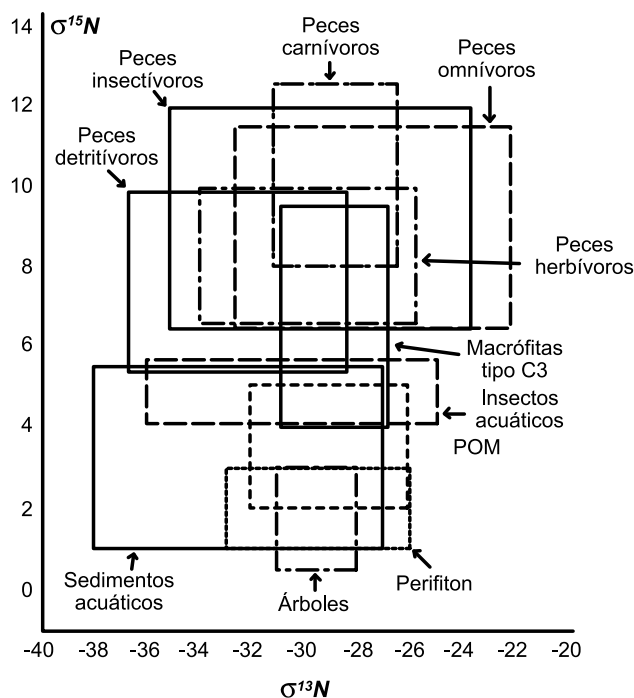


Figura 6. Diagrama del nicho isotópico de los diferentes grupos funcionales de peces en el lago Coqueiro (Pantanal, Brasil) definidos por la abundancia relativa de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (tomado de 51).

Una breve conclusión de esta revisión es que a pesar de todas las evidencias sobre la participación e importancia de bacterias y protozoarios en las redes tróficas acuáticas, actualmente se continúa estudiando las comunidades planctónicas sin incluirlas. Esta falta de investigación en el área de la ecología microbiana está asociada al hecho de tratarse de un campo de investigaciones reciente y al requerimiento de tecnologías más costosas para estudiar el bacterioplancton. De hecho si bien este tipo de estudios se iniciaron en la década de los 60's, fue sólo a fines del siglo pasado que se consiguió demostrar que los principios ecológicos generales son aplicables a los microorganismos y que estos principios pueden ser incluidos en los actuales paradigmas ecológicos [52].

De esta forma, a pesar que el esquema de las cadenas tróficas planctónicas aún sea válido, el hecho de las bacterias y protozoarios constituir casi la mitad de la biomasa en los cuerpos de agua, sugiere que esa descripción, de acuerdo con Pomeroy *et al.* [11], es incompleta.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonia por el apoyo logístico y cooperación a través del Curso de Ecología y la CPBA. A los proyectos CTPETRO y PIATAM IV, por el apoyo financiero de la investigación. A la Universidad de Sucre, Colombia, por la comisión de estudios concedida. A un revisor anónimo, cuyos comentarios fueron claves para la organización de este documento.

Referencias bibliográficas

- [1] Porter KG. 1996. Integrating the microbial loop and the classic food chain into a realistic planktonic food web. In: Food Webs: integrations of patterns and dynamics. Edited by G.A. Polis and K.O. Winemiller. Chapman & Hall. USA.
- [2] Post DM, Pace MI, Hairston jr. NJ. 2000. Ecosystem Size Determines Food-Chain Length in Lakes. *Nature*, Vol. 405.
- [3] Lyndeman RL. 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23:399-418.
- [4] Pomeroy LR. 1974. The ocean food web, a changing paradigm. *BioScience* 24: 499-504.
- [5] Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*. Oldendorf. Vol. 10, No. 3, pp. 257-263.
- [6] Kerner M, Hohenberg H, Ertl S, Reckermannk M, Spitzky A. 2003. Self-organization of dissolved organic matter to micelle-like microparticles in river water. *Nature*, Vol 422: 150-154.
- [7] Hobbie J.E. 1988. A comparison of the ecology of planktonic bacteria in fresh and salt water. *Limnol. Oceanogr.* 33: 750-764.
- [8] Ventela A, Wiackowski K, Moilanen M, Saarikari V, Vuorio K, Sarvala J. 2002. The effect of small zooplankton on the microbial loop and edible algae during a cyanobacterial bloom. *Freshwater Biology* 47, 1807-1819.
- [9] Work K, Havens K, Sharfstein B, East T. 2005. How important is bacterial carbon to planktonic grazers in a turbid, subtropical lake?. *Journal of Plankton Research* 27(4): 357-372.

- [10] Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the Prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74:5,088–5,098.
- [11] Pomeroy LR, Williams PJ, Azam F, Hobbie JE. 2007. Te Microbial Loop. *Oceanography*, 20(2): 29-33.
- [12] Tranvik L.J. 1992. Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiologia* 229: 107–114.
- [13] Jansson M, Bergström A, Blomqvist P, Drakare S. 2000. Allochthonous organic carbon and phytoplankton/bacterioplankton production relationships in lakes. *Ecology* 81(11): 3250-3255.
- [14] Klug J.L. 2005. Bacterial response to dissolved organic matter affects resource availability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 62, 2; ProQuest Biology Journals. p. 472-481.
- [15] Grossart H.P, Kiorboe T, Tang K, Ploug H. 2003. Bacterial Colonization of Particles: Growth and Interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.6, p. 3500-3509.
- [16] Sieburth JMCN, Smetacek V, Lenz J. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions *Limnology and Oceanography*, 23, 1256–1263.
- [17] Fenchel T. 1988. Marine plankton food chains. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 19-38.
- [18] Winemiller KO. 2004. Floodplain River Food Webs: Generalizations and Implications for Fisheries Management. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Regional Office for Asia and the Pacific; Mekong River Commission (MRC), Fisheries Programme (FP) Editor: Robin L. Welcomme; T. Petr. 285-310.
- [19] Araujo-Lima C.A.R.M, Forsberg B.R, Victoria R, Martinelli L.A. 1986. Energy sources for detritivorous fishes in the Amazon. *Science*. 234: 1256-1 258.
- [20] Forsberg B, Araujo-lima C.A.R.M, Martinelli L.A, Victoria R, Bonassi J.A. 1993. Autotrophic carbon sources for fish of the central Amazon. *Ecology*, 74(3), pp. 643-652.
- [21] Leite RG, Araujo-Lima CARM, Victoria RL, Martinelli LA. 2002. Stable isotope analysis of energy sources for larvae of eight fish species from the Amazon floodplain. *Ecology of Freshwater Fish*: 11: 56–63. Blackwell Munksgaard.
- [22] Waichman AV. 1996. Autotrophic carbon sources for heterotrophic bacterioplankton in a floodplain lake. *Hydrobiologia* 341: 27–36.
- [23] Fernandez J. 1993. Fontes autotróficas de energia em juvenis de jaraqui *Semaprochilodus insignis* (Schomburgk, 1841) e Curimatá, *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) (Pisces: Prochilodontidae) na Amazônia Central. MSc. Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 58 pp.
- [24] Rai H, Hill G. 1984. Primary production in the Amazonian aquatic ecosystem. In: H. Sioli (ed), *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht.
- [25] Pelz O, Cifuentes L, Hammer B, Kelley Ch, Coffin R. 1998. Tracing the assimilation of organic compounds using N13C analysis of unique amino acids in the bacterial peptidoglycan cell wall. *FEMS Microbiology Ecology* 25: 229-240.
- [26] Junk W.J, Bayley P.B, Sparks R.E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 106: 110-127.
- [27] De Ruiter P, Wolters V, Moore J, Winemiller K. 2005. Food Web Ecology: Playing Jenga and Beyond. *Science*, Vol 309: 68-70.
- [28] Caraballo P, Hardy E. 1995. Fluctuación diaria de las Poblaciones de *Daphnia gessneri* HERBST y *Ceriodaphnia cornuta* SARS (CRUSTACEA-CLADOCERA) en el Lago Calado (Amazonas, Brasil). *Boletín Científico INPA*, No. 3: 79-96. Colombia.
- [29] Melack JM, Forsberg BR. 2001. Biogeochemistry of Amazon floodplain lakes and associated wetlands. In: McClain, M.E.; Victoria, R.L. and J.E. Richey (eds.) *The biogeochemistry of the Amazon Basin*. Oxford University Press, Oxford 235-274 pp.
- [30] Bayley P, Petre M. Jr. 1989. Amazon Fisheries: assessment methods, current status and management options. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 106: 385-398.
- [31] Oliveira AC. 2003. Isótopos estáveis de C e N como indicadores qualitativo e quantitativo da dieta do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tese doutorado. Universidade de São Paulo. Brasil.
- [32] Post DM. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703–18.
- [33] Dawson TE, Brooks PD. 2001. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: Unkovich M, Pate J, McNeill A, Gibbs DJ (Eds.) *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*. Kluwer. Dordrecht, Holland. pp. 1-18.
- [34] Martinelli LA, Victoria RL, Matsui E, Forsberg BR, Mozeto AA. 1988. Utilização das variações naturais de $\delta^{13}C$ no estudo de cadeias alimentares em ambientes aquáticos: princípios e perspectivas. 1988. *Acta Limnol. Brasil*. Vol 11: 859–882.

- [35] Benstead J, March J, Fry B, Ewel K, Pringle C. 2005. Testing IsoSource: stable isotope analysis of a tropical fishery with diverse organic matter sources. *Ecology*: Vol. 87, No. 2, pp. 326–333.
- [36] Phillips D, Seth A, Newsome D, Gregg J. 2005. Combining sources in stable isotope mixing models: alternative methods. *Oecologia* 144: 520–527.
- [37] DeNiro MJ, Epstein S. 1981. Influence of Diet on the Distribution of Nitrogen Isotopes in Animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 45(3): 341-351.
- [38] Vander Zanden MJ, Rasmussen JB. 2001. Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: Implications for aquatic food webs studies. *Limnol. Oceanogr.*, 46(8): 2061–2066.
- [39] Jomori R.K, Ducatti C, Carneiro D.J, Portella M.C. 2008. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 370-381.
- [40] Caut S, Angulo E, Courchamp F. 2008. Discrimination Factors ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) in an omnivorous consumer: effect of diet isotopic ratio. *Functional Ecology*, 22:255-263.
- [41] Jardine T.D, McGeachy S.A, Paton C.M, Savoie M, Cunjak R.A. 2003. Stable isotopes in aquatic systems: Sample preparation, analysis, and interpretation. *Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 2656*: 39 p.
- [42] Boschker HTS, Middelburg JJ. 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology *FEMS Microbiology Ecology* 40: 85-95.
- [43] Coffin RB, Fry B, Peterson BJ, Wright RT. 1989. Carbon isotope composition of estuarine bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 34(7): 1305-1310.
- [44] Hamilton SK, Lewis WM, Sippel SJ. 1992 Energy-Sources for Aquatic Animals in the Orinoco River Floodplain - Evidence from Stable Isotopes. *Oecologia*, 89(3): 324-330.
- [45] Calheiros DF. 2003. Influência do pulso de inundação na composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) das fontes primárias de energia na planície de inundação do rio Paraguai (Pantanal – MS). Tese de Doutorado. USP - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 164p.
- [46] Hamilton SK, Sippel SJ, Bunn SE. 2005. Separation of algae from detritus for stable isotope or ecological stoichiometry studies using density fractionation in colloidal silica. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 3, 149–157.
- [47] Marty J, Planas D. 2008. Comparison of methods to determine algal $\delta^{13}\text{C}$ in freshwater. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 6, 51–63.
- [48] Yoshioka T, Wada E, Hayashi H. 1994. A stable isotope study on seasonal food web dynamic in an eutrophic lake. *Ecology* 75(3): 835-846.
- [49] Grey J, Kelly A, Jones R. 2004. High intraspecific variability in carbon and nitrogen stable isotope ratios of lake chironomid larvae. *Limnol. Oceanogr.*, 49(1), 2004, 239–244.
- [50] Wetzel, R.G. 2001. *Limnology, lake and river ecosystems*. Third Edition. Academic Press.
- [51] Wantzen KM, Machado FA, Voss M, Boriss H, Junk WJ. 2002. Flood pulse-induced isotopic changes in fish of the Pantanal wetland, Brazil. *Aquatic Sciences* 64: 239–251.
- [52] Guerrero R, Berlanga M. 2004. La Ecología Microbiana se hace mayor de edad. *Boletín informativo de la Sociedad Española de Microbiología*, No. 34.