

## Uso de isótopos estables en investigaciones en ecología

Natalia Felipe Medina<sup>1</sup>, Verónica Miguel Herranz<sup>2</sup>

Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumnas de 5<sup>o</sup> curso de Licenciatura en Biotecnología (curso 2012-2013)

1.- nfelimoo@estudiantes.unileon.es; 2.- vmiguhoo@estudiantes.unileon.es

La amplia distribución diferencial de los isótopos estables en la naturaleza permite su uso como trazadores naturales de procesos fisicoquímicos en los ecosistemas. Así, la concentración relativa de los isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre, ha permitido realizar estudios sobre el patrón de movimiento de los animales, ya que las proporciones isotópicas geográficas se conservan en los tejidos de los individuos tras la migración. También sobre cadenas tróficas, teniendo en cuenta que entre niveles tróficos sucesivos, se produce un ligero enriquecimiento en los isótopos pesados de C y N respecto de su dieta debido al propio metabolismo. Por otra parte, el <sup>15</sup>N puede utilizarse como indicador de una eutrofización incipiente causada por el aumento de los aportes de nitrógeno antropogénico, ya que los vertidos residuales de origen humano suelen estar enriquecidos en este isótopo respecto al ambiente. Además su aplicación en ecofisiología vegetal permite determinar el tipo de fotosíntesis que utilizan las plantas (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM) en base a la relación entre <sup>13</sup>C y <sup>12</sup>C; y en ecología microbiana, para identificar funciones metabólicas de microorganismos crecidos sobre sustratos marcados con <sup>13</sup>C, identificando cuáles lo han incorporado en su DNA, RNA o fosfolípidos.

**Palabras clave:** trazador isotópico, migración, cadenas tróficas, eutrofización, ecofisiología vegetal, ecología microbiana.

### Introducción

En la naturaleza existen átomos de un mismo elemento químico con distinto número de neutrones: los isótopos. Aunque algunos son inestables y tienden a desintegrarse (radioisótopos); otros son estables y no se descomponen con el tiempo. Entre ellos se incluyen los isótopos de hidrógeno (<sup>1</sup>H y <sup>2</sup>H), carbono (<sup>13</sup>C y <sup>12</sup>C), nitrógeno (<sup>14</sup>N y <sup>15</sup>N), oxígeno y azufre (<sup>34</sup>S y <sup>32</sup>S), denominados en conjunto HCNOS (Bigeleisen, 1965).

Estos últimos, ampliamente distribuidos en forma de diferentes moléculas, constituyen excelentes trazadores naturales de los procesos fisicoquímicos que ocurren en la naturaleza. De los isótopos estables de un elemento, los más ligeros son los más abundantes en la materia, encontrándose

los pesados en mucha menor proporción. Su concentración relativa puede usarse para estudiar el flujo de energía y materia en los ecosistemas, su estructura y los procesos que tienen lugar en ellos, debido a que diferentes partes de los mismos a menudo contienen distintas concentraciones de estos isótopos (Fry, 2006).

La diferente distribución de los isótopos, viene determinada por los fenómenos de mezcla y fraccionamiento. La mezcla es la combinación de dos o más fuentes con composiciones isotópicas diferentes y distintivas, cuyo resultado es un producto cuya identidad viene determinada por la composición y masa de las fuentes, mientras que el fraccionamiento es la diferencia de concentración del isótopo más pesado, entre el producto que se forma y la fuente material de la que procede. Este está muy condicionado al comportamiento diferencial que muestran los isótopos en las reacciones químicas (Bigeleisen, 1965).

La medida isotópica se lleva a cabo aprovechando las diferencias de masa atómica entre los isótopos, en base a su relación carga/masa (Brand, 1996).

### **Aplicaciones de los isótopos estables como trazadores en ecología**

En los últimos años se ha extendido enormemente el uso de los isótopos estables no solo en ecología, sino también en otras áreas. Algunas de sus aplicaciones son:

#### Patrones de movimiento de animales

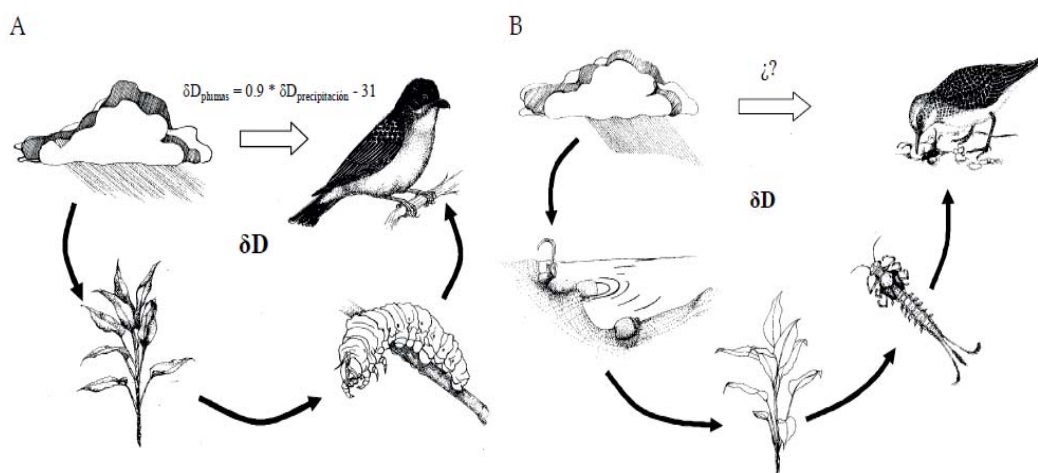
La determinación de los patrones de movimiento de los animales salvajes es crucial para comprender su historia vital y comportamiento, además de ser un requisito previo para su conservación efectiva (Torres et al., 2006).

La conectividad en aves migratorias (vínculos entre áreas reproductivas y no reproductivas) ha sido estudiada tradicionalmente usando marcadores extrínsecos -anillas, collares, etc. - que presentan el inconveniente de la captura inicial y posterior recaptura o reavistamiento del individuo. Otras técnicas extrínsecas más avanzadas son la radiotelemetría o tecnología satélite, que además de tener alto coste económico, pueden afectar el comportamiento de los animales (Rubenstein y Hobson, 2004).

Como alternativa se presentan los isótopos estables. Se encuentran naturalmente en el ambiente y su abundancia varía geográficamente. Al ingerir alimentos, un individuo está asimilando las proporciones isotópicas del ambiente donde se está alimentando (firma isotópica del ambiente), y esto se refleja en sus tejidos, cuyo análisis en un individuo capturado en una

determinada región geográfica, permitirá distinguir si este reside en esta zona o proviene de otra. Debido a que todas las aves de un lugar comparten la misma firma isotópica, no es necesario recapturar al mismo individuo para poder inferir su lugar de origen. Sin embargo, el conocimiento de la firma isotópica limita esta técnica.

Existen dos aproximaciones para determinar la firma isotópica: Una es determinando la firma isotópica de la localidad de interés, pero raramente se puede hacer un muestreo de toda el área, haciéndose necesario la intrapolación en los sitios no muestreados, lo que resulta poco preciso. La otra es inferir la firma isotópica a partir de mapas de variación espacial de isótopos estables, por ejemplo, a partir de una relación constante entre los valores de concentración isotópica de deuterio en las precipitaciones y en las plumas de las aves migratorias (**Fig. 1**), por ser estas metabólicamente inactivas y ser un método de muestreo no destructivo, aunque los niveles sanguíneos son comúnmente utilizados para desplazamientos de corta distancia debido a su mayor tasa de recambio (Torres et al., 2006).



**Figura 1.** Camino de los isótopos estables desde procesos productores de variación espacial hasta las plumas de las aves, para el deuterio (Hobson y Wassenaar, 1997).

El hidrógeno es un buen trazador por su claro fraccionamiento isotópico. Durante el ciclo del agua, la fase vapor se enriquece en los isótopos más ligeros, mientras que la fase líquida lo hace en el más pesado. Este efecto se magnifica en los polos, observándose valores muy negativos para la composición isotópica en deuterio (δD).

Las aves migratorias forman sus nuevas plumas al final del verano y conservan esa composición isotópica hasta la próxima muda. Así, los valores de

$\delta D$  mostrarán dónde el ave cambió su plumaje. Aves de altas latitudes tienen bajos valores de  $\delta D$ , mientras que los que están cerca del ecuador tienen altos valores, reflejando sus plumas la  $\delta D$  del agua local. Por otra parte, las aves que pasan largos periodos en altas montañas, pueden presentar bajos valores de  $\delta D$  debido a los valores del agua de la montaña, y no por la migración a altas latitudes (Kelly et al., 2002).

### Estudio de cadenas tróficas

Los isótopos estables de carbono ( $^{13}C$ ) y nitrógeno ( $^{15}N$ ) permiten estudiar los flujos de energía en las cadenas alimenticias, desde las plantas y el material detrítico, hasta los herbívoros y consumidores secundarios (Guerrero y Berlanga, 2000).

La composición isotópica de los tejidos de un animal no es exactamente la de las fuentes de materia orgánica que utiliza, pero sí depende directamente de su dieta. Debido a que en muchos ecosistemas distintas fuentes de materia orgánica tienen diferentes relaciones isotópicas  $^{13}C:^{12}C$  y  $^{14}N:^{15}N$ , las dietas de los animales se podrían inferir a partir de la señal isotópica de sus tejidos. Además, el uso de isótopos estables permite determinar el nivel trófico, ya que entre niveles sucesivos, ocurre un cambio en las proporciones isotópicas debido al propio metabolismo de los compuestos de C y N. En general, existe un ligero enriquecimiento en los componentes isotópicos ( $^{13}C$  y  $^{15}N$ ) en el animal respecto a su dieta (Muñoz et al., 2009). Los tejidos animales se enriquecen levemente en  $^{13}C$  respecto a su comida (1,1‰ por nivel trófico), debido a:

1. Pérdida preferencial de  $^{12}CO_2$  en la respiración.
2. Captación selectiva de compuestos  $^{13}C$  durante la digestión.
3. Fraccionamiento metabólico durante la formación de distintos tipos de tejidos.

Sin embargo, debido a que el enriquecimiento es mayor en  $^{15}N$ , éste es el que se utiliza como indicador del nivel trófico. Este aumento puede deberse a la excreción preferente de  $^{14}N$  y se estima que es un 3‰ por nivel trófico (Muñoz et al., 2009).

### Estudios de contaminación (eutrofización)

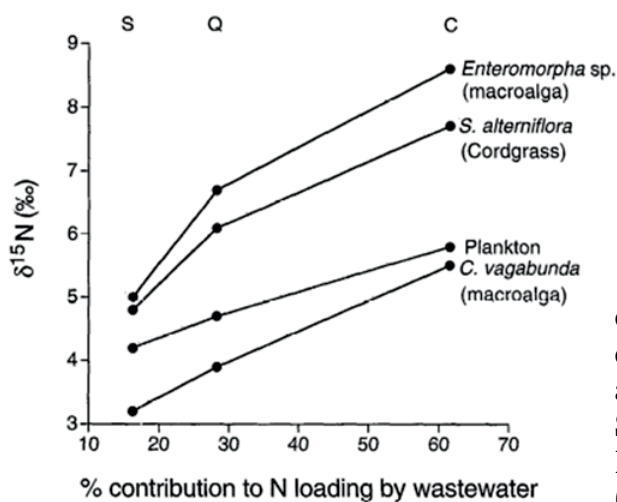
El enriquecimiento en nutrientes en un ecosistema causado por el aumento de los aportes de nitrógeno antropogénico es uno de los mecanismos más importantes de alteración de hábitats acuáticos. Concretamente en los estuarios puede producir proliferaciones masivas de algas fitoplanctónicas y

microalgas que compiten con las praderas de fanerógamas sumergidas, lo que conlleva a una pérdida de hábitats e implica importantes pérdidas económicas. De ahí el interés en buscar indicadores de la eutrofización, útiles y tempranos, para poder tomar a tiempo medidas de gestión adecuadas (Alcorlo, 2008).

La mayoría de los índices utilizados para cuantificar el grado de eutrofización por N se basan en cambios taxonómicos y de abundancia en productores y consumidores, derivados de la eutrofización, que ya se han producido (evaluación *a posteriori*). Dado que la restauración de los hábitats ya alterados es difícil, sería muy útil encontrar métodos que detecten el incremento y las fuentes de esos aportes de nutrientes mientras éstos aún son bajos. Para ello se ha utilizado la medida de los ratios de isótopos estables de N en las redes alimentarias de los estuarios (McClelland et al., 1997).

Varios estudios han probado la eficacia de las medidas de  $\delta^{15}\text{N}$  de distintos organismos como indicadores de contaminación, utilizando este fraccionamiento para rastrear el origen de los aportes de N. Esto es posible debido a que los vertidos residuales de origen humano suelen estar más enriquecidos en  $^{15}\text{N}$  respecto al ambiente, que el N procedente de deposición atmosférica natural o de fertilizantes. Esto es debido a la alta posición trófica de los humanos y la desnitrificación y volatilización del amonio en las depuradoras (Alcorlo, 2008).

Los organismos acuáticos que están expuestos a este tipo de efluentes de aguas residuales, suelen mostrar estos cambios en la composición isotópica en  $^{15}\text{N}$  (**Fig. 2**), de manera que el análisis isotópico del N en la biota proporcionaría señales de alerta de una eutrofización incipiente (Alcorlo, 2008).



**Figura 2.** Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  en diferentes productores frente a la contribución al N de carga de las aguas residuales en 3 hábitats: Sage Lot Pong(S), Quashnet River(Q) y Childs River(C) (McClelland et al., 1997).



### Estudios de ecofisiología vegetal

La relación entre los isótopos de carbono se puede utilizar para determinar el tipo de fotosíntesis de las plantas: C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM; en base al fraccionamiento del carbono durante este proceso.

Las plantas C<sub>3</sub> fijan el CO<sub>2</sub> mediante la enzima RUBISCO. En las plantas C<sub>4</sub> y CAM la enzima PEP-carboxilasa toma el CO<sub>2</sub> atmosférico y lo incorpora formando un ácido orgánico de 4 carbonos, que es descarboxilado y el CO<sub>2</sub> resultante es utilizado por la RUBISCO en el ciclo de Calvin. Las plantas CAM suelen vivir en hábitats áridos, abren sus estomas durante la noche y fijan CO<sub>2</sub> mediante la PEP-carboxilasa. Durante el día cierran los estomas, se produce la descarboxilación y el ciclo de Calvin, de manera que en plantas CAM, la separación entre las dos carboxilaciones es temporal (noche-día) y, en las C<sub>4</sub>, la separación es espacial (enzimas en dos tipos de células distintas) (Gannes et al., 1998).

Las propiedades químicas del <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> son idénticas a las del <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, pero debido a la pequeña diferencia en masa, la mayoría de las plantas asimilan menos <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> que <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, debido principalmente al fraccionamiento del CO<sub>2</sub> cuando éste difunde de la atmósfera al sitio de carboxilación en la hoja, al ser el <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> menos pesado que el <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, difunde más rápido al sitio de carboxilación; y a la mayor afinidad de las carboxilasas (RUBISCO en plantas C<sub>3</sub> y PEP-carboxilasa en C<sub>4</sub> y CAM) por el <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> que por el <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, incorporándolo preferentemente (Guerrero y Berlanga, 2000). Sin embargo, la relación entre <sup>13</sup>C y <sup>12</sup>C es función del tipo de fotosíntesis, debido al diferente grado de discriminación del <sup>13</sup>C por las enzimas carboxilasas. La RUBISCO tiene un efecto de discriminación mucho mayor que la PEP-carboxilasa (Santiago et al., 2005). La fotosíntesis C<sub>3</sub> ocurre en un sistema relativamente abierto, de manera que el CO<sub>2</sub> enriquecido en <sup>13</sup>C que queda dentro de las hojas (al usar la RUBISCO preferencialmente <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>) puede difundir hacia la atmósfera. Sin embargo, en la fotosíntesis C<sub>4</sub> el paso catalizado por la RUBISCO, se lleva a cabo en un sistema relativamente cerrado. Por ello el CO<sub>2</sub> enriquecido en <sup>13</sup>C (por el uso preferencial de <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> por parte de la PEP-carboxilasa) no es liberado a la atmósfera y acaba siendo utilizado por la RUBISCO (Gannes et al., 1998).

Debido a esto, las plantas con una fotosíntesis C<sub>3</sub> presentan una composición isotópica en <sup>13</sup>C menor que las plantas C<sub>4</sub> y CAM obligadas. Por otra parte, existen plantas CAM facultativas que presentan valores intermedios de δ<sup>13</sup>C, al usar uno u otro tipo de fotosíntesis en función de las condiciones ambientales. En condiciones de sequía, cierran sus estomas durante el día y fijan

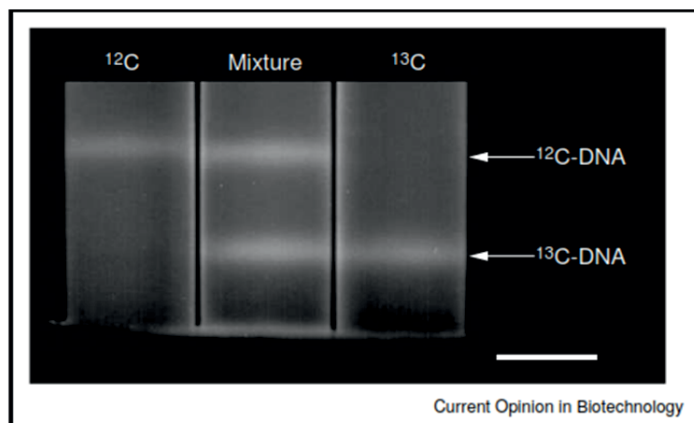
el CO<sub>2</sub> por la noche mediante la PEP-carboxilasa y su δ<sup>13</sup>C se parece más al de las plantas C<sub>4</sub>, pero si tienen disponibilidad de agua utilizan una fotosíntesis C<sub>3</sub> y su δ<sup>13</sup>C se acerca más al de plantas C<sub>3</sub>; lo que permite determinar qué mecanismo fotosintético están utilizando preferentemente (Gannes et al., 1998).

Las variaciones de δ<sup>13</sup>C en plantas también han sido utilizadas para estudiar la evolución de las rutas fotosintéticas (Santiago et al., 2005), distinguir el azúcar de caña (C<sub>4</sub>) del de remolacha (C<sub>3</sub>) con fines económicos (Guerrero y Berlanga, 2000); o comparar la eficiencia en el uso de agua en distintas especies, parámetro relacionado con la respuesta de las plantas ante un estrés hídrico (Aguilera et al., 2010).

### Ecología microbiana

La ecología microbiana estudia la identidad y las funciones de los microorganismos en su ambiente natural. Hasta ahora, los estudios funcionales basados en las nuevas técnicas de biología molecular requerían el aislamiento de las cepas microbianas. Sin embargo, muchos microorganismos no pueden ser crecidos en laboratorio. El uso de isótopos estables es una alternativa para identificar las funciones metabólicas de los microorganismos en muestras complejas (Boschker y Middelburg, 2002).

La técnica SIP (stable-isotope probing) relaciona el crecimiento de microorganismos sobre sustratos marcados con <sup>13</sup>C con funciones metabólicas, identificando cuáles de ellos tienen su DNA, RNA o fosfolípidos marcados con <sup>13</sup>C. Se realiza una centrifugación en gradiente de densidad (CsCl) con el DNA aislado de microorganismos de muestras de suelo o cultivos enriquecidos, crecidos sobre sustratos marcados (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH, <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>), de manera que las moléculas marcadas con <sup>13</sup>C son más densas y migran más que las enriquecidas en <sup>12</sup>C (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Centrifugación en gradiente de densidad de DNA marcado isotópicamente (Radajewski et al., 2003).

La fracción de DNA  $^{13}\text{C}$  contiene los genomas de la población microbiana que ha sido capaz de usar el sustrato marcado e incorporar el átomo pesado a su DNA. Utilizando cebadores para regiones conservadas del RNAr de la subunidad pequeña (de bacterias, arqueas o eucariotas) se puede amplificar ese gen para identificar los microorganismos implicados en el proceso de interés. Además, es posible usar cebadores para genes que codifican enzimas clave conocidas de las vías metabólicas de utilización de ese sustrato.

Esta técnica ha sido utilizada para identificar microorganismos implicados en procesos de oxidación aeróbica autótrofa de amonio y de metilotrofia, sugiriéndose que podría ser una función de ciertos miembros de la división *Acidobacterium*, grupo muy diverso y ampliamente distribuido con pocos representantes cultivados entre los que nunca se encontró ninguno que pudiera crecer en metanol. Además, puede utilizarse en la búsqueda de microorganismos capaces de degradar compuestos xenobióticos o contaminantes (Radajewski et al., 2003).

### **Conclusión**

El uso de isótopos estables como trazadores naturales representa una poderosa herramienta para estimar procesos, conexiones y flujos de energía. Sus aplicaciones, aunque limitadas por el grado en el que se cumplen las asunciones teóricas, son muy diversas; encontrándose cada vez más utilidades para los mismos, tanto en el campo de la ecología como en otras muchas ciencias aplicadas.

### **Agradecimientos**

A Gustavo González Fernández, profesor de la asignatura Bases Ecológicas en Biotecnología, por la revisión del texto y sus ánimos para sacar adelante esta publicación.

### **Bibliografía**

- Alcorlo, P. 2008. Distintas aplicaciones de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en el estudio de ecosistemas acuáticos continentales. *Técnicas y aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales* 1:347-374.
- Aguilera, M., Voltas, J., Ferrio, J.P. y Serrano, L. 2010. Evolución estacional de  $\delta^{13}\text{C}$  en hojas y madera de dos quercíneas mediterráneas concurrentes (*Quercus ilex* subps. *ballota* L. y *Quercus faginea* Lam.): dinámica de la eficiencia en uso del agua. *Ecosistemas* 19:6-13.



- Bigeleisen, J. 1965. Chemistry of isotopes. *Science* 147:463–471.
- Boschker, H.T.S. y Middelburg, J.J. 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 40:85–95.
- Brand, W.A. 1996. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 31:225–235.
- Fry, B. 2006. Isotope notation and measurement. *Stable Isotope Ecology*. pp 23–31. Springer, USA.
- Gannes, L.Z., del Rio, C.M. y Koch, P. 1998. Natural Abundance Variations in Stable Isotopes and their Potential Uses in Animal Physiological Ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 119:725–737.
- Guerrero, R. y Berlanga, B. 2000. Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones. Actualidad Sociedad Española de Microbiología. (29).
- Hobson, K.A. y Wassenaar, L. 1997. Linking breeding and wintering ground of neotropical migrant song-birds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. *Oecologia* 109:142–148.
- Kelly, J.F., Atudorei, V., Sharp, Z.D. y Finch, M.D. 2002. Insights into Wilson's Warbler migration from analyses of hydrogen stable-isotope ratios. *Oecologia* 130:216–221.
- McClelland, J.W., Valiela, I. y Michener, R.H. 1997. Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food webs: a record of increasing urbanization in coastal watersheds. *Limnology and Oceanography* 42:930–937.
- Muñoz I., Romani A., Rodrigues-Capítulo A., González J. y García-Berthou E. 2009. Relaciones tróficas en el ecosistema fluvial. Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Fundación BBVA. España.
- Torres, J., Farmer, A. y Bucher, E.H. 2006. Uso de isótopos estables para determinar conectividad migratoria en aves: alcances y limitaciones. *Hornero*. 21:73–84.
- Radajewski, S., McDonald, I. R. y Murrell, J.C. 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 14:296–302.
- Rubenstein, D.R. y Hobson, K.A. 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology & Evolution* 19:256–263.
- Santiago, L.S., Silvera, K., Andrade, J.L. y Dawson T.E. 2005. El uso de isótopos estables en biología tropical. *Interciencia* 30:536–542.