

# Variabilidade isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ ) em produtores primários de ambientes terrestres e de água doce

Célia de Almeida Lopes\* e Evanilde Benedito-Cecilio

Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia/PEA), Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência.  
e-mail: celiaalmeidalopes@hotmail.com

**RESUMO.** Em Ciências Ambientais o uso de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  como traçadores biológicos é dependente do entendimento dos processos físicos, químicos e biológicos que determinam a proporção entre isótopos leves e pesados de uma amostra em estudo. A presente síntese procura discutir os fracionamentos isotópicos associados com as diferentes vias fotossintéticas, e relacionar as características intrínsecas dos ecossistemas terrestres e aquáticos que influenciam na amplitude das variações isotópicas dos produtores primários na natureza. A dinâmica dos efeitos isotópicos nos ambientes aquáticos é altamente complexa, resultando em uma variabilidade isotópica mais ampla do que aquela observada nos ambientes terrestres. Nesses ambientes, a integração de técnicas isotópicas permite melhor dimensionar as fontes autotróficas de energia que sustentam a base de teias alimentares e estabelecer as conexões entre os organismos produtores e consumidores.

**Palavras-chave:** isótopos estáveis, produtores primários, ecossistemas terrestres, ecossistemas de água doce.

**ABSTRACT. Isotopes variability  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in primary producers from terrestrial and freshwater environments.** In environmental science the use of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  as biological tracers is dependent on the understanding of the physical, chemical and biological processes that determine the proportion among slight and heavier isotopes in a study sample. The present synthesis searches to elucidate isotopic fractionations associated with different photosynthetic pathways and relate intrinsic characteristics of the aquatic and terrestrial ecosystems that influence the amplitude of isotopes variation on primary producers in nature. The dynamic of the effects of isotopes in aquatic environments is highly complex, resulting in a more sample variation than those observed in terrestrial environments. In aquatic environments, the integration the isotopic techniques permit better measures of autotrophic energy sources that support the base of food webs and better establish connection among producers and consumers.

**Key words:** stable isotopes, primary producers, terrestrial ecosystems, fresh waters ecosystems.

## Introdução

Em Ecologia, as primeiras investigações isotópicas foram realizadas por Nier e Gulbransen (1939) com o objetivo de investigar possíveis diferenças entre o  $\text{CO}_2$  atmosférico (fonte) e as plantas terrestres e marinhas (produtos). Posteriormente, Wickman (1952) e Craig (1953) constataram que as plantas eram empobrecidas em  $^{13}\text{C}$ , quando comparadas à fonte de carbono. Na década de 70, as plantas foram separadas em categorias isotópicas devido à presença de diferentes fracionamentos entre as vias fotossintéticas (Smith e Epstein, 1971).

Atualmente, a crescente utilização de isótopos estáveis em tecidos animais e vegetais tem auxiliado no estabelecimento de uma rigorosa base empírica e teórica em estudos ecológicos (Hobson e Wassenaar, 1999). Como consequência, tem sido possível esclarecer e delinear mais adequadamente o fluxo de matéria e energia em teias alimentares complexas (Fogel e Tuross, 1999).

O uso de isótopos estáveis como traçadores biológicos baseia-se na premissa de que as razões isotópicas são conservativas e que a combinação de distintas fontes determinam o fluxo de nutrientes entre os organismos produtores, consumidores e decompositores (Forsberg *et al.*, 1993).

O isótopo estável mais amplamente utilizado em estudos ecológicos é o de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (Cifuentes *et al.*, 1988), possivelmente devido às facilidades metodológicas e de interpretação. O  $\delta^{13}\text{C}$  caracteriza-se por distinguir as contribuições das fontes autotróficas de energia em ecossistemas terrestres (Fry *et al.*, 1978), marinhos (Stephenson *et al.*, 1986) e de água doce (Araujo-Lima *et al.*, 1986). O  $\delta^{15}\text{N}$ , por sua vez, é fracionado consistentemente ao longo da teia trófica, possibilitando inferências sobre as relações tróficas dos consumidores com a sua dieta (Vander-Zanden *et al.*, 1997), além de indicar a origem e o destino do nitrogênio durante a sua ciclagem (Nadelhoffer e Fry, 1994).

Considerando a estrutura trófica do ecossistema, constituída por extratos autotróficos e heterotróficos, é conveniente reconhecer que os primeiros são os que manufaturam o alimento a partir de substâncias inorgânicas simples, disponibilizando os nutrientes para os demais níveis da teia alimentar. O entendimento do fluxo de energia no ecossistema inicia-se pela investigação dos processos que ocorrem a partir dos produtores primários e de como a variabilidade a este nível pode influenciar nos níveis subseqüentes da teia alimentar.

Nesse sentido, o presente trabalho, analisando a composição isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) em produtores primários de ecossistemas terrestres e de água doce, visa discutir os seguintes aspectos: i) a composição e variabilidade isotópica de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  dos produtores primários; ii) os processos e condições que determinam essa variabilidade; e iii) os procedimentos necessários ao uso de tal técnica e interpretação dos resultados obtidos.

Inicialmente, portanto, é importante considerar especificidades quanto às vias fotossintéticas dos produtores primários, as quais são caracterizadas em via Calvin, de Hatch Slack e dos Ácidos Crassuláceos.

### **Influência do metabolismo fotossintético na composição isotópica dos produtores primários**

#### **Via fotossintética Calvin ( $\text{C}_3$ )**

Nas plantas de via fotossintética Calvin ( $\text{C}_3$ ), a difusão do  $\text{CO}_2$  atmosférico ao longo da camada limite da folha têm um fracionamento de aproximadamente 4‰. Considerando-se a atmosfera como única barreira para a absorção de  $\text{CO}_2$ , a subtração de 4‰ do valor de  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CO}_2$  atmosférico (-8‰) resultaria em um valor isotópico para a planta  $\text{C}_3$  de -12‰. A enzima de carboxilação, ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RuBP-carboxilase), utilizada para a redução do  $\text{CO}_2$  a fosfoglicerato, apresenta um fracionamento de cerca

de 29‰ (de 27 a 30‰). Se de qualquer modo, a absorção fosse limitada apenas enzimaticamente, então o fracionamento da RuBP-carboxilase promoveria um valor isotópico de -37‰. O  $\delta^{13}\text{C}$  médio das plantas  $\text{C}_3$  localiza-se entre os dois extremos, em aproximadamente -27‰, demonstrando que a variabilidade isotópica de  $^{13}\text{C}$  dentre as plantas  $\text{C}_3$  depende do balanço entre a difusão e a demanda enzimática efetuada pelo  $\text{CO}_2$ . Desse modo, tornou-se senso comum aceitar que a composição isotópica das plantas  $\text{C}_3$  encontre-se entre -20 e -35‰ (Rounick e Winterbourn, 1986).

Musgos e líquens apresentam sua composição isotópica estendendo-se de -21,3 a -37‰ (fracionamento de 13,6 a 30,4‰) (Farquhar *et al.*, 1989). Como os musgos não apresentam anatomia especializada com cutícula de impermeabilidade, não são esperados fracionamentos relacionados com o aumento de permeabilidade de gases. É possível, entretanto, que o conteúdo de água e a intensidade luminosa interfiram na razão fotossintética e, conseqüentemente, nos fracionamentos. A dinâmica de fracionamentos isotópicos dos líquens é altamente dependente da associação simbiótica dos fungos (micobionte) com a parte algal (fotobionte) (Lange *et al.*, 1988). Ao contrário das cianobactérias, as algas verdes mantêm a razão fotossintética positiva (Lange *et al.*, 1986). Essas diferenças sugerem que a razão de difusão de  $\text{CO}_2$  pode ser limitada quando a cianobactéria constitui a parte algal dos líquens, correspondendo aos menores fracionamentos (de 2 a 4‰).

#### **Via fotossintética de Hatch Slack ( $\text{C}_4$ )**

Na via fotossintética de Hatch Slack ( $\text{C}_4$ ), a enzima de carboxilação fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-carboxilase) reduz o  $\text{CO}_2$  a ácido aspártico ou málico, discriminando menos contra o  $^{13}\text{C}$  (fracionamentos de -3,6 a 5,7‰), resultando em valor isotópico de -2‰ para as plantas. Os valores isotópicos das plantas  $\text{C}_4$  demonstram que o seu  $\delta^{13}\text{C}$  permanece aproximadamente em -14‰ (de -7 a -16‰), um valor ligeiramente mais leve do que numa situação limitada apenas pela difusão do  $\text{CO}_2$  (fracionamento de 4‰ e valor isotópico de -12‰). Isso ocorre devido à alta eficiência no uso do  $\text{CO}_2$ , uma vez que as folhas das plantas  $\text{C}_4$  apresentam as células do mesófilo arranjadas em torno da bainha vascular (anatomia Kranz), permitindo que o  $\text{CO}_2$  fixado pela via  $\text{C}_4$  seja bombeado essencialmente do mesófilo para a bainha vascular, mantendo alta concentração de  $\text{CO}_2$  no sítio de ação da RuBP-carboxilase. Embora a PEP-carboxilase discrimine menos contra o  $\delta^{13}\text{C}$ , a presença constante de difusão

do CO<sub>2</sub> na folha acaba por promover fracionamentos relevantes, fazendo com que a variabilidade isotópica da planta encontre-se mais dependente desse processo.

#### Via metabólica dos ácidos crassuláceos (MAC)

As enzimas de carboxilação presentes na via metabólica dos ácidos crassuláceos (MAC) são as mesmas utilizadas na via C<sub>4</sub> (PEP e RuBP-carboxilase), porém a atividade enzimática é dependente da luminosidade.

As espécies MAC-obrigatórias fixam o CO<sub>2</sub> durante a noite, usando a PEP-carboxilase com fracionamento comumente encontrado em plantas C<sub>4</sub>, associado ao de C<sub>3</sub>, por causa da transferência dos ácidos de via C<sub>4</sub> para a via C<sub>3</sub> durante o dia (Farquhar, 1983). As plantas MAC-facultativas têm se demonstrado isotopicamente intermediárias entre as MAC-obrigatórias e as C<sub>3</sub>, sendo que a sua variabilidade encontra-se, geralmente, entre -10 a -28‰.

#### Influência do ambiente na variabilidade isotópica dos produtores primários

Considerando os ecossistemas continentais, é possível distinguir os autótrofos de ambientes terrestres daqueles aquáticos, com base na estratégia de absorção do CO<sub>2</sub>.

##### a) Ambientes terrestres

Em ambientes terrestres, os valores de δ<sup>13</sup>C do CO<sub>2</sub> atmosférico decrescem em resposta às entradas de CO<sub>2</sub>, empobrecido em <sup>13</sup>C (biogênico), decorrentes da respiração e decomposição da matéria orgânica e queima de combustíveis fósseis (Peng e Freyer, 1986).

Esses decréscimos têm sido evidenciados desde a década de 50, através do trabalho pioneiro de Keeling, realizado nas montanhas Ynyo e na costa oeste dos Estados Unidos (Keeling, 1958). Posteriormente, Keeling *et al.* (1979) sumarizaram valores da concentração e composição isotópica do CO<sub>2</sub> atmosférico, através de amostras de ar obtidas em locais com diferentes latitudes (La Jolla, Ilhas Fanning e Polo Sul), com intuito de compará-los com aqueles da década de 50. Foi identificada uma tendência temporal marcante, com δ<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> mais leve para os últimos anos, sendo determinada uma redução de cerca de 0,6‰ na razão <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, durante os 22 anos de estudo. No Hemisfério Norte, o CO<sub>2</sub> atmosférico apresentou valores isotópicos mais negativos do que no Sul, constituindo uma diferença inter-hemisférica de aproximadamente 0,2‰, que

por sua vez, reflete a ampla atividade humana e biogênica nessas latitudes.

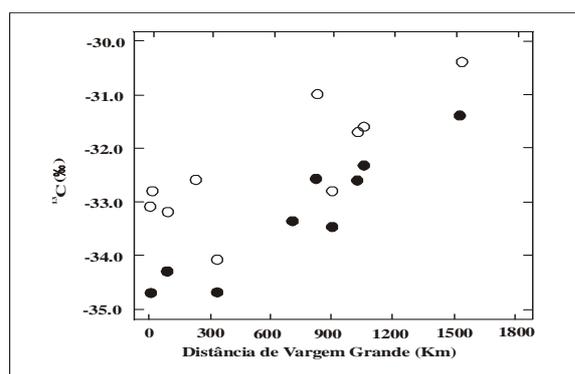
Em florestas densas (alta biomassa), os extratos inferiores podem assimilar CO<sub>2</sub> biogênico, antes deste se misturar com as camadas de ar superiores, refletindo valores baixos de δ<sup>13</sup>C (Vogel, 1978). Como resultado de baixos valores de δ<sup>13</sup>C do líter em decomposição, da oxidação de açúcares pelas células das raízes no solo e da respiração da fauna e flora, o CO<sub>2</sub> disponível nesse extrato da floresta é empobrecido em <sup>13</sup>C, sendo este denominado de *efeito da canopia*.

Tais evidências foram constatadas por Medina e Minchin (1980) ao pesquisarem o δ<sup>13</sup>C (foliar) de duas florestas da bacia amazônica (San Carlos do Rio Negro, Venezuela) com características distintas: de terra firme (solo de laterite) e de solo arenoso (solo podzólico). Em ambas, o extrato superior (canopia) apresentou valores mais elevados de δ<sup>13</sup>C, quando comparado ao extrato inferior. Na floresta de solo arenoso, o líter apresentou valores similares aos da canopia das árvores e isto foi interpretado como proveniente do transporte de açúcares da canopia para as raízes, com reduzido fracionamento através da decomposição.

Áreas abertas e florestadas distinguem-se isotopicamente. Nas primeiras, a predominância das vias fotossintéticas de plantas recai sobre a via C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub> e nas segundas, predominam as plantas C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>. Esse fato deve-se à tendência das plantas de apresentar valores mais empobrecidos de <sup>13</sup>C em áreas florestadas, devido à menor circulação de ar e trocas gasosas entre o CO<sub>2</sub> atmosférico e o CO<sub>2</sub> biogênico (Ribeiro *et al.*, 1988).

A vegetação ripária pode apresentar acentuadas diferenças entre os extratos superiores e inferiores das árvores quanto ao δ<sup>13</sup>C. Nesses ambientes, a vegetação conta ainda com os processos respiratórios da fauna e flora aquáticas, as quais tendem a ser mais proeminentes no sentido da nascente à foz dos rios, constituindo o *efeito biogênico do rio*.

Além de constatarem valores isotópicos mais baixos nos extratos inferiores da floresta de planície de inundação ao longo do rio Amazonas (Vargem Grande a Óbidos), Martinelli *et al.* (1991) observaram, ainda, tendências isotópicas ascendentes desses valores e da canopia, no sentido rio abaixo, diferente daquelas esperadas (procedente do *efeito biogênico do rio*). Esse fato foi atribuído ao aprisionamento noturno do CO<sub>2</sub> biogênico, através da formação de uma camada delimitadora de trocas gasosas com o CO<sub>2</sub> atmosférico sobre o rio Amazonas, mais desenvolvida em suas porções superiores (Figura 1).



**Figura 1.** Variação da composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de plantas  $\text{C}_3$  (círculo sem preenchimento = folhas do extrato superior da floresta (canopia); e círculo com preenchimento = folhas do extrato inferior da floresta (Adaptado de Martinelli *et al.*, 1991)

A composição isotópica de nitrogênio para a vegetação terrestre, bem como suas variações são altamente dependentes dos “pools” de nitrogênio, que são determinados pelas entradas e saídas desse elemento no ambiente e pelos fracionamentos isotópicos que possam ocorrer durante a sua ciclagem.

As entradas de amônio (resultante da mineralização) e nitrato (resultante da nitrificação) para a vegetação terrestre, são empobrecidas em  $^{15}\text{N}$ , com valores estendendo-se de -10 a 5‰, com o amônio mais empobrecido que o nitrato, devido a sua menor mobilidade (Shearer e Kohl, 1988). As saídas de nitrogênio da vegetação terrestre são representadas por formas dissolvidas (principalmente,  $\text{NO}_3$ ) e gasosas ( $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ ), as quais são, em sua maioria, empobrecidas em  $^{15}\text{N}$  em relação aos solos. Entradas de nitrogênio, que são empobrecidas em  $^{15}\text{N}$  e a ocorrência de fracionamentos durante a mineralização nos solos, são as principais razões dos baixos valores isotópicos de  $^{15}\text{N}$  de certos vegetais e do lúter.

Nos ecossistemas terrestres, os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  dos tecidos das plantas e do solo estão compreendidos entre -10 a 15‰, sendo que a variação isotópica das plantas situa-se entre -9 e 10‰, demonstrando leve depleção em  $^{15}\text{N}$  em relação aos solos (Peterson e Fry, 1987). A variabilidade isotópica do nitrogênio é considerada pequena, quando comparada àquela do carbono, uma vez que o suprimento de nitrogênio pode limitar reações, como o crescimento das plantas e a mineralização bacteriana.

A determinação de  $\delta^{15}\text{N}$  de plantas fixadoras e não fixadoras de  $\text{N}_2$  atmosférico pode resultar em sobreposição dos valores isotópicos, o que dificulta avaliar a contribuição da fixação biológica para a

economia de nitrogênio total da planta. Em locais com distinção desses valores, entretanto, a utilização da abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  pode ser feita com bons resultados.

Assim, as plantas fixadoras desse elemento podem apresentar valores isotópicos (de -3 a 4‰) mais próximos aos do  $\text{N}_2$  atmosférico (0‰). Para as plantas que não fixam biologicamente o  $\text{N}_2$  atmosférico, os valores isotópicos, usualmente, correlacionam-se àqueles do nitrogênio dos solos, variando amplamente de -9 a 10‰, dependendo da localização.

A abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  de plantas da floresta amazônica permite observar que no período, de águas altas do rio Madeira e na ascensão das águas do rio Amazonas, as plantas leguminosas tiveram valores isotópicos de  $^{15}\text{N}$  menores do que aqueles das não leguminosas, sendo próximos ao valor isotópico do  $\text{N}_2$  atmosférico, evidenciando que as leguminosas foram fixadoras ativas (Martinelli *et al.*, 1992). Por outro lado, durante o período de águas altas do rio Amazonas não houve diferenças isotópicas entre as plantas, indicando pouca, se não nenhuma, fixação de nitrogênio (Tabela 1). Na explicação de tais resultados, foram levantadas duas hipóteses: i) influência do período de inundação do rio Amazonas no grau de fixação e abundância de nitrogênio no solo; e/ou ii) influência de diferenças regionais, devido ao fato de os rios drenarem áreas distintas (rio Amazonas superior: Andes peruano; e rio Madeira: Andes boliviano), resultando em diferentes fontes de nitrogênio para as plantas.

**Tabela 1.** Número de amostras coletadas (N), valores médios de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) e desvio padrão de plantas coletadas na planície de inundação dos rios Amazonas e Madeira (Adaptado de Martinelli *et al.*, 1992)

Período/Local	Espécie	N	Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Desvio Padrão
Ascensão das águas	Leguminosas	14	0,7	0,8
- rio Amazonas	Não leguminosas	21	3,8	1,9
Águas altas - rio	Leguminosas	23	4,1	3,0
Amazonas	Não leguminosas	8	3,1	2,0
Águas altas - rio	Leguminosas	31	0,1	1,9
Madeira	Não leguminosas	8	1,8	1,4

### b) Ambientes de água doce

Em ambientes de água doce, a exata relação entre a variabilidade isotópica dos produtores primários e os processos físicos, químicos e/ou biológicos do ambiente encontra-se em fase de maiores investigações. A dinâmica da variabilidade isotópica desses organismos, portanto não é tão bem compreendida como em ambientes terrestres e marinhos, onde as pesquisas isotópicas estão amplamente disseminadas.

**Plantas vasculares: macrófitas aquáticas**

As plantas aquáticas apresentam maior variabilidade nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do que as plantas terrestres. Farquhar *et al.* (1982) propuseram que, em ambientes aquáticos, essa ampla variação nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  é determinada por três fatores: a discriminação isotópica enzimática durante a fixação de carbono, a taxa de difusão do  $\text{CO}_2$  e a composição isotópica do “pool” de carbono inorgânico dissolvido (CID).

As macrófitas aquáticas distribuem-se entre as vias fotossintéticas,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  e MAC. Desse modo, a extensão isotópica dessas plantas pode ser interpretada como valores abaixo de -16 ‰ para  $\text{C}_3$  e MAC, e valores de -10 a -16‰ para  $\text{C}_4$ .

A grande complexidade do comportamento fotossintético das macrófitas tem dificultado a distinção das vias fotossintéticas em ambientes aquáticos. Keeley e Sandquist (1992) evidenciam essa complexidade ao relatarem que algumas espécies do gênero *Isoetes*, enraizadas e pertencentes à via MAC, ao absorverem  $\text{CO}_2$  do sedimento (empobrecido em  $^{13}\text{C}$ ), passam a apresentar valores isotópicos mais negativos e próximos da extensão  $\text{C}_3$ ; por sua vez, *Eleocharis acicularis* pode agir tanto como  $\text{C}_3$  quanto  $\text{C}_4$ , dependendo das condições ambientais. Por outro lado, espécies como a Poaceae *Orcuttia californica*, podem apresentar folhas submersas com atividade fotossintética MAC, enquanto que as folhas flutuantes fixam  $\text{CO}_2$  através da via  $\text{C}_4$ .

Embora processos difusionais promovam fracionamentos, sua principal consequência, nesse ambiente, relaciona-se com a resistência à difusão, criada pela formação de uma camada limite (barreira) ao redor da folha, promovendo efeitos contrários na atividade bioquímica discriminatória da RuBP-carboxilase (mais predominante).

Decréscimos no fracionamento entre a planta e a fonte de carbono ocorrem quando esta se torna finita. A presença de uma camada limite ao redor da folha, aliada à fixação enzimática, conduz ao acúmulo de  $^{13}\text{C}$  empobrecido. Quando toda a forma de carbono utilizada pelo vegetal torna-se fixada, os fracionamentos diminuem, pois a razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  dos produtos sintetizados permanece muito próxima à da fonte (Keeley e Sandquist, 1992). Ecólogos têm se apoiado, principalmente, nesse efeito para explicar coerentemente o fato de as plantas aquáticas apresentarem valores isotópicos mais positivos do que as plantas terrestres.

O grau de turbulência da água também pode promover influências nos processos de discriminação enzimática, através da extensão de mistura das soluções do meio. Em geral, as águas

lênticas exibem menor discriminação enzimática do  $^{13}\text{C}$  do que as águas lólicas. A resistência difusional, em águas de fluxo mais rápido, é essencialmente menor, facilitando a ação da enzima RuBP-carboxilase, e conseqüentemente, um maior fracionamento.

O carbono presente na água pode ter várias origens (atmosfera, chuvas, águas subterrâneas, decomposição e respiração dos organismos aquáticos). No entanto, o “pool” de carbono inorgânico autóctone, derivado da respiração e decomposição da fauna e flora aquáticas, ou aloctone, resultante da decomposição do lóter depositado no sedimento ou passado através dos heterótrofos, pode diminuir acentuadamente os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do “pool” de carbono inorgânico dissolvido, o qual pode variar de -21 a 1‰, em ambientes dulcícolas (Peterson e Fry, 1987).

A observação de valores isotópicos essencialmente negativos em vegetais aquáticos é certamente devido ao  $\text{CO}_2$  biogênico, que apresenta uma assinatura isotópica  $\leq 27$ ‰ para as plantas  $\text{C}_3$ . Da mesma forma que a vegetação ripária de maior porte, as macrófitas também sofrem forte influência do efeito biogênico do rio. Corpos de água com alta biomassa vegetal circundante e elevadas temperaturas ( $>30^\circ\text{C}$ ) apresentam grande demanda por  $\text{CO}_2$ , excedendo o seu suprimento. Conseqüentemente, o uso excessivo de  $\text{CO}_2$  durante o dia torna-se restituído pelo  $\text{CO}_2$  respirado durante a noite, rendendo para as plantas aquáticas valores negativos de  $\delta^{13}\text{C}$ . Os estudos desenvolvidos ao longo da várzea amazônica, Martinelli *et al.* (1991) também encontraram variações espaciais para a macrófita  $\text{C}_4$ , *Echinochloa polystachya*, que apresentou tendência contrária àquela observada para as plantas terrestres  $\text{C}_3$ , ou seja, os valores isotópicos das macrófitas diminuíram rio abaixo, uma vez que essas plantas encontravam-se abaixo da camada limite de trocas gasosas. Os decréscimos nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  foram resultantes da diluição do carbonato, proveniente dos Andes, por  $\text{CO}_2$  biogênico, produzido pela respiração do rio.

Comportamento oposto foi verificado no tributário Henry's Fork do rio Snake (USA) (Angradi, 1993). As macrófitas, bem como os demais produtores primários da cabeceira do rio, foram mais empobrecidas em  $^{13}\text{C}$ . Para esse resultado, o autor sugeriu que as espécies dos trechos inferiores do rio, provavelmente absorviam  $\text{HCO}_3^-$ , ao mesmo tempo em que a velocidade da corrente de água era constante ao longo do rio.

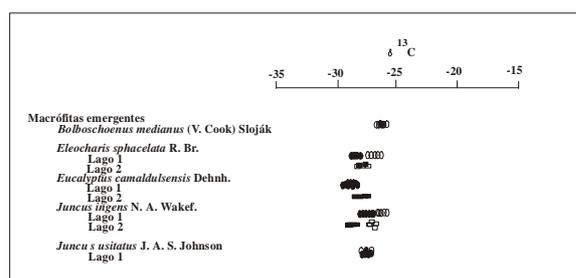
Dessa forma, o tipo de carbono inorgânico absorvido pelos vegetais aquáticos pode variar de

espécie para espécie. O  $\text{CO}_2$  dissolvido é descrito como a forma preferencial de carbono assimilado pelos vegetais, entretanto muitas espécies são passíveis de assimilar o  $\text{HCO}_3^-$ , como algumas submersas, ou então, no caso das emergentes, o  $\text{CO}_2$  atmosférico (Keeley e Sandquist, 1992).

Dependendo da temperatura, os  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{HCO}_3^-$  podem ser de 7 a 11‰ menos negativos do que o  $\text{CO}_2$ , o que é muito útil no entendimento dos valores obtidos em uma dada pesquisa. Mas para muitas espécies a avaliação do efeito isotópico da absorção de  $\text{CO}_2$  versus absorção de  $\text{HCO}_3^-$  é muito complicada, visto que a razão de  $\text{CO}_2$  para  $\text{HCO}_3^-$  pode variar ao longo do dia e, sazonalmente, em função do pH (Keeley e Sandquist, 1992).

Tão importante quanto o conhecimento da influência das fontes de variabilidade (mencionadas anteriormente) na interpretação da variabilidade isotópica das plantas é a tomada de medidas acuradas durante a sua coleta. A obtenção das amostras deve ser feita em períodos pré-determinados e semelhantes entre os diferentes locais investigados, principalmente quando o objetivo é a comparação da variabilidade isotópica em escalas espaciais e temporais.

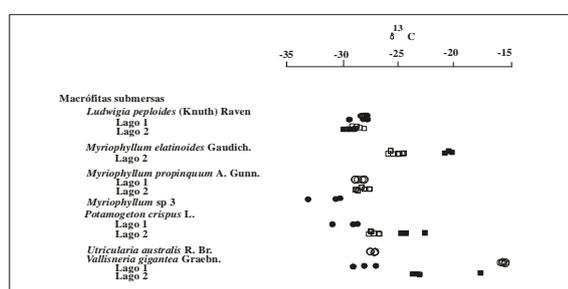
Um exemplo da ocorrência dessas variabilidades foi averiguado por Boon e Bunn (1994), que encontraram diferenças espaciais e sazonais significativas nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  em plantas aquáticas de pequenos corpos de águas lânticas, localizados na planície de inundação do rio Murray (Austrália). As macrófitas emergentes tenderam a ser mais enriquecidas em  $^{13}\text{C}$  durante o verão do que na primavera, como foi o caso de *Eleocharis sphacelata* e *Juncus ingens* (Figura 2).



**Figura 2.** Composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de macrófitas emergentes dos lagos 1 (círculo) e 2 (quadrado) da planície de inundação do rio Murray (Austrália) (as amostras coletadas no verão são representadas pelos símbolos sem preenchimento e as amostras coletadas na primavera pelos símbolos preenchidos, sendo os valores isotópicos expressos em unidades por mil (‰)) (Adaptado de Boon e Bunn, 1994)

As macrófitas submersas, com exceção de *Ludwigia peploides* demonstraram considerável

variação na assinatura isotópica não só temporalmente mas também espacialmente. No lago 1, por exemplo, exemplares de *Vallisneria gigantea* tiveram valores de  $\delta^{13}\text{C}$  estendendo-se de  $-27,6 \pm 0,7$  na primavera para  $-17,1 \pm 0,05$ ‰ no verão, sendo os valores isotópicos obtidos na primavera mais negativos do que aqueles observados para a mesma estação do ano no lago 2. Diferenças espaciais e temporais menores, porém substanciais, foram registradas para o gênero *Myriophyllum* e para *Potamogeton crispus*, (Figura 3). Através desses resultados, percebe-se que a extrapolação de dados de uma região e de um período pode conduzir a equívocos, como destacado por France (1995).

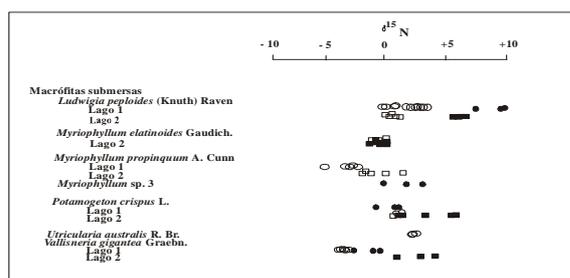


**Figura 3.** Composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de macrófitas submersas na planície de inundação do rio Murray (Austrália) (os símbolos são indicados na Figura 2 e os valores isotópicos expressos em unidades por mil (‰)) (Adaptado de Boon e Bunn, 1994)

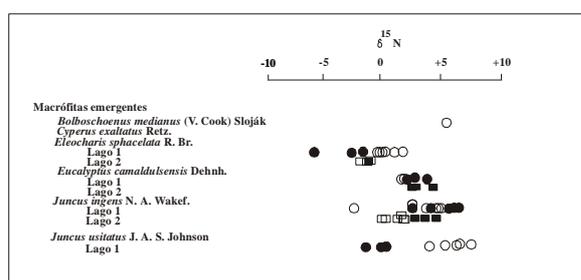
A razão isotópica de  $^{15}\text{N}$  dos produtores primários aquáticos é dependente da abundância de formas nitrogenadas de nutrientes inorgânicos, bem como a ocorrência de fracionamentos no meio.

As poucas investigações envolvendo processos fracionantes de  $\delta^{15}\text{N}$  concentram-se em ambientes terrestres e marinhos, de modo que a interpretação dos valores isotópicos desse elemento em organismos autotróficos de água doce é proveniente do entendimento do funcionamento do próprio ecossistema.

Para a planície de inundação do rio Murray, Boon e Bunn (1994) também encontraram variabilidades espaciais e temporais nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (de  $-6,2$  a  $10,6$ ‰). No geral, as macrófitas submersas foram consideravelmente mais enriquecidas em  $^{15}\text{N}$  na primavera do que no verão. Os valores isotópicos variaram em torno de  $10$ ‰ (de  $0,4$  a  $10,6$ ‰) para *Ludwigia peploides*, e  $9$ ‰ para o gênero *Myriophyllum* (de  $-5,8$  a  $4,8$ ‰) (Figura 4). Tendências contrárias foram observadas para algumas macrófitas emergentes como *Eleocharis sphacelata* e *Juncus usitatus*, que apresentaram valores isotópicos de  $^{15}\text{N}$  empobrecidos na primavera (Figura 5).



**Figura 4.** Composição isotópica de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de macrófitas submersas na planície de inundação do rio Murray (Austrália) (os símbolos são indicados na Figura 2 e os valores isotópicos expressos em unidades por mil (‰)) (Adaptado de Boon e Bunn, 1994)



**Figura 5.** Composição isotópica de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de macrófitas emergentes na planície de inundação do rio Murray (Austrália) (os símbolos são indicados na Figura 2 e os valores isotópicos expressos em unidades por mil (‰)) (Adaptado de Boon e Bunn, 1994)

No estudo realizado por Martinelli *et al.* (1992), as macrófitas  $\text{C}_4$  leguminosas e não leguminosas seguiram o mesmo padrão das plantas terrestres, isto é, durante o período de águas altas do rio Madeira, a leguminosa *Paspalum repens* (2,1‰) foi fixadora ativa de  $\text{N}_2$  atmosférico. Nesse mesmo período hidrológico, no rio Amazonas, não foi possível identificar diferenças entre as leguminosas *Paspalum fasciculatum* (3,4‰) e *P. repens* (5,7‰) e não-leguminosas *Echinochloa polystachya* (6,8‰). Esse fato, possivelmente, corresponde ao destacado para as plantas terrestres em que a época de coleta no período de inundação do rio Amazonas e as diferenças regionais entre os rios Amazonas e Madeira tenham influenciado no grau de fixação e na abundância de nitrogênio no ambiente.

É importante destacar que os tecidos das plantas podem variar consideravelmente em suas razões de carbono e nitrogênio. Pectinas, hemiceluloses, amido e açúcares são tipicamente mais enriquecidos em  $^{13}\text{C}$  do que ligninas, celulosas e lipídios (Deines, 1980). Compostos nitrogenados também diferem na razão  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  (Shearer e Kohl, 1988). Conseqüentemente, comparações isotópicas sempre devem ser feitas usando as mesmas partes das

plantas. Estudos de ecologia isotópica têm utilizado, principalmente, as folhas dos vegetais.

### Algas: fitoplanctônicas e perifíticas

Poucos mensuramentos isotópicos têm sido feitos a partir de amostras diretas de fitoplâncton. Em sua maioria, essas amostras apresentam determinação isotópica feita através de estimativas de valores, tendo como referência os valores isotópicos do COP ou do zooplâncton. O COP (carbono orgânico particulado) é grandemente representado por uma mistura variável de fitoplâncton vivo e morto, o que valida seu uso como indicador dos valores isotópicos deste último (Fry e Sherr, 1984).

O zooplâncton, empregado na estimativa isotópica do fitoplâncton, deve ser exclusivamente filtrador (copepódos calanóides e cladóceros, com ressalvas dos cladóceros predadores Polyphemidae e Leptoridae). Pesquisas têm revelado que a utilização de ambos os indicadores têm sido de grande confiabilidade (Benedito-Cecílio *et al.*, 2000).

Através das determinações isotópicas de vários grupos biológicos, coletados na planície de inundação do rio Orinoco (Venezuela), Hamilton e Lewis Jr (1992) observaram que a comunidade fitoplanctônica (amostras puras) possuía os valores mais empobrecidos em  $^{13}\text{C}$  (de -34 a -37,2‰). A presença de valores leves para o fitoplâncton em habitats de água doce é relatada ainda por Wada *et al.* (1997) para lagos do Médio Vale do rio Doce, e por Araujo-Lima *et al.* (1986) e Martinelli *et al.* (1994) ao longo do rio Amazonas. Esses valores mais empobrecidos em  $^{13}\text{C}$  relacionam-se com a influência de detritos terrestres da vegetação riparia  $\text{C}_3$  (-26‰),  $\text{CO}_2$  biogênico e fracionamentos entre a fonte de carbono e o fitoplâncton. Os principais fatores que determinam o valor isotópico do fitoplâncton, portanto, são a composição isotópica, a concentração e a origem da forma inorgânica de carbono fixado, a temperatura e a espécie em estudo (Martinelli *et al.*, 1988; Hamilton e Lewis Jr, 1992).

Os  $\delta^{13}\text{C}$  do fitoplâncton são influenciados pelas mudanças sazonais introduzidas pelas condições ambientais (temperatura, por exemplo) e fisiológicas. No lago Kizaqui no Japão (Ilha Honshu), durante 1984 e 1985, Yoshioka *et al.* (1988) verificaram tendência isotópica descendente nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do fitoplâncton na seguinte ordem: junho (de -15,0 e -18,8‰), setembro (-23,4‰) e abril (-35,3‰).

O perifíton corresponde a uma comunidade complexa aderida a qualquer tipo de substrato, dividindo-se em porção vegetal e animal. Assim, valores isotópicos desse material refletem variações de ambos organismos, sendo dependente de suas

proporções. Nesse caso, é imprescindível um conhecimento prévio acerca dos componentes do perifíton amostrado. Além disso, a exposição à baixa turbulência de água em áreas litorâneas de lagos e rios promove, na comunidade perifítica, a ocorrência de valores isotópicos mais positivos do que os do fitoplâncton (France, 1995).

O perifíton, ao longo do rio Amazonas, apresenta a maior variabilidade isotópica de  $^{13}\text{C}$  dentre os “pools” de carbono investigados. Os valores mais negativos são de  $-36,7\text{‰}$  e os mais positivos são de  $-21\text{‰}$  (Martinelli *et al.*, 1994). Essa variação é explicada como resultado da grande diversidade de espécies que podem compor o perifíton (como mencionado anteriormente) ou ainda devido ao uso de  $\text{CO}_2$  biogênico, derivado do substrato sobre o qual o perifíton está freqüentemente aderido. Esse efeito pode ser também correlacionado com as variações sazonais entre os períodos de águas altas e baixas, ao longo do rio (Benedito-Cecílio *et al.*, 2000).

O efeito da turbulência da água na resistência difusional do fitoplâncton, aliado a outros efeitos, como o do  $\text{CO}_2$  biogênico, pode reduzir os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  desses organismos a extensões coincidentes àquelas das plantas terrestres. Essas características, aliadas ao progressivo enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  dos produtores primários no sentido de ambientes terrestres aos de água doce, incentivam o uso combinado de  $\delta^{13}\text{C}$  com o  $\delta^{15}\text{N}$  (France, 1997) no discernimento entre fontes autótroficas terrestres e aquáticas nas teias alimentares aquáticas.

São poucos, entretanto, os estudos realizados com o mensuramento de  $\delta^{15}\text{N}$  no fitoplâncton e perifíton de água doce. Wada *et al.* (1997) verificaram valores médios de  $2,0\text{‰}$  para o fitoplâncton nos lagos do Vale do Médio rio Doce. Na planície de inundação do rio Orinoco (Venezuela) foram constatados valores para o fitoplâncton de  $2,7$  a  $4,4\text{‰}$  (Hamilton e Lewis Jr, 1992), e no lago Kizaki (Japão), valores de  $4,7$  a  $0,9\text{‰}$  (Yoshioka *et al.*, 1988). Assim como para os  $\delta^{13}\text{C}$ , os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do perifíton apresentam grande variabilidade, refletindo a elevada diversidade de seus componentes.

### Bactérias

A consideração do conceito de “microbial loop” ou elo microbiano tem propiciado a recente utilização da análise de isotópos estáveis no exame do papel das bactérias na ciclagem do carbono em ambientes aquáticos. Poucos trabalhos revelam que as bactérias podem alterar a razão isotópica, tanto de “pools” orgânicos quanto de inorgânicos (Coffin *et al.*, 1989).

Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CO}_2$  produzido por bactérias heterotróficas variam de  $-13,5$  a  $-27\text{‰}$ , com uma média de  $-18,5\text{‰}$ , para o lago Calado, localizado próximo ao rio Solimões, na planície de inundação do rio Amazonas (Waichman, 1996). Esses valores foram intermediários entre os valores observados para as plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , no entanto, cálculos de contribuição relativa de carbono de cada grupo autotrófico demonstram que as plantas  $\text{C}_4$  foram os maiores contribuintes de carbono para o bacterioplâncton. Dessa forma, as bactérias podem ser fundamentais na transferência de carbono das macrófitas  $\text{C}_4$  para os consumidores, uma vez que, peixes como, *Semaprochilodus insignis* e *Prochilodus nigricans* em seus estágios iniciais, alimentam-se de bacterívoros, como rotíferos, flagelados e ciliados (Fernandez, 1993).

### Considerações finais

Com base nas evidências apresentadas, pode-se afirmar que os mecanismos de absorção de carbono são preponderantes na distinção das razões isotópicas de produtores primários terrestres e de água doce. Em certos ambientes, no entanto, pode ocorrer sobreposição de valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos produtores primários, o que dificulta ou, inviabiliza o uso da técnica isotópica (France, 1995).

A distinção dos valores isotópicos de carbono, aliada ao conhecimento da dinâmica de sua variabilidade, possibilita a obtenção de informações fundamentais acerca de processos básicos. Mecanismos bioquímicos (identificação das vias fotossintéticas) e energéticos (determinação de contribuições das plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  na dieta de organismos consumidores) são imprescindíveis ao entendimento da origem e destino dos recursos em ambientes terrestres e aquáticos, e, conseqüentemente, na tomada de medidas de manejo coerentes com o fluxo de energia ao longo da teia trófica.

Dessa forma, a matéria orgânica disponível aos consumidores pode ser identificada quanto a sua origem: terrestre ou aquática. Plantas terrestres (principalmente  $\text{C}_3$ ) são geralmente empobrecidas em  $^{13}\text{C}$ , as macrófitas aquáticas (plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ ) caracterizam-se por valores isotópicos mais enriquecidos, enquanto que o fitoplâncton é considerado como intermediário (Fry e Sherr, 1984) ou então mais negativo que as plantas  $\text{C}_3$  terrestres (Victoria *et al.*, 1992). Nesse caso, a análise de  $\delta^{13}\text{C}$  pode atuar também, como uma ferramenta de biomonitoramento na investigação dos efeitos de desflorestamentos em consumidores aquáticos.

Embora o  $\delta^{13}\text{C}$  seja mais utilizado, como destacado anteriormente, promovendo diferenças marcantes entre detritos terrestres e de água doce, as diferenças oferecidas pelos  $\delta^{15}\text{N}$  são mais previsíveis, pois sua variabilidade é bem menor, dificultando a ocorrência de sobreposições. Além disso, o  $\delta^{15}\text{N}$  é indicador preciso da posição trófica de consumidores.

E por fim, a integração das bactérias nas análises isotópicas tem propiciado um melhor entendimento acerca das entradas de carbono aos produtores primários pouco compreendidas anteriormente, embora muitas questões ainda necessitem ser investigadas a fim de elucidar o papel e a disponibilidade de autótrofos em ecossistemas terrestres e de água doce

### Agradecimentos

Agradecemos ao Curso de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais e ao Nupélia pelo apoio logístico, a Maria Salete Ribelatto Arita pela assistência bibliográfica, e ao Prof. Luiz Carlos Gomes, pela elaboração do abstract.

### Referências

ANGRADI, T. R. Stable carbon and nitrogen isotope analysis of seston in a regulated rocky mountain river. *USA. Regul. Rivers Res. Manag.*, Chichester, v. 8, p. 251-270, 1993.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. *et al.* Energy sources for detritivorous fishes in the Amazon. *Science*, Washington, DC, v. 234, p. 1256-258, 1986.

BENEDITO-CECILIO, E. *et al.* Carbon sources of Amazonian fisheries. *Fish. Manag. Ecol.*, Oxford, v. 7, p. 305-315, 2000.

BOON, P. I.; BUNN, S. E. Variations in the stable isotope composition of aquatic plants and their implications for food web analysis. *Aquat. Bot.*, Amsterdam, v. 48, p. 99-108, 1994.

CIFUENTES, L. A. *et al.* Stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.*, Lawrence, v. 33, n.5, p. 1102-1115, 1988.

COFFIN, R. B. *et al.* Carbon isotope composition of estuarine bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, Lawrence, v. 34, p. 1305-1310, 1989.

CRAIG, H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, London, v. 3, p. 53-92, 1953.

DEINES, P. The isotopic composition of reduced organic carbon. In: FRITZ, P.; FONTES, J. C. (Ed.). *Handbook of environmental isotope geochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 329-406.

FARQUHAR, G. D. On the nature of carbon isotope discrimination in  $\text{C}_4$  species. *Aust. J. Plant Physiol.*, Collingwood, v. 10, p. 205-226, 1983.

FARQUHAR, G. D. *et al.* Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Palo Alto, v. 40, p. 503-537, 1989.

FARQUHAR, G. D. *et al.* On the relationship between carbon isotope discrimination and intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, Collingwood, v. 9, p. 121-137, 1982.

FERNANDEZ, J. M. *Fontes autotróficas de energia em juvenis de jaraqui Semaprochilodus insignis (Schomburgk, 1841) e curimatã, Prochilodus nigricans (Agassiz, 1829) (Pisces: Prochilontidae) da Amazônia central.* 1993. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1993.

FOGEL, M. L.; TUROSS, N. Transformation of plant biochemicals to geological macromolecules during early diagenesis. *Oecologia*, Berlin, v. 120, n. 3, p. 336-346, 1999.

FORSBERG B. R. *et al.* Autotrophic carbon sources for fish of the central Amazon. *Ecology*, New York, v. 74, n.3, p. 643-652, 1993.

FRANCE, R. L. Critical examination of stable carbon isotope analysis as a means for tracing carbon pathways in stream ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Ottawa, v. 52, p. 651-656, 1995.

FRANCE, R. L. Stable carbon and nitrogen isotopic evidence for ecotonal coupling between boreal forests and fishes. *Ecol. Freshw. Fish*, Copenhagen, v. 6, p. 78-83, 1997.

FRY, B. *et al.* Grasshopper food web analysis: use of carbon isotope ratios to examine feeding relationships among terrestrial herbivores. *Ecology*, New York, v. 59, n.3, p. 498-506, 1978.

FRY, B.; SHERR, E. B.  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contrib. Mar. Sci.*, Port Aransas, v. 27, p. 15-47, 1984.

HAMILTON, S. K.; LEWIS Jr., W. M. Stable carbon and nitrogen isotopes in algae and detritus from the Orinoco river floodplain, Venezuela. *Geochim. Cosmochim. Acta*, London, v. 56, p. 4237-4246, 1992.

HOBSON, K. A.; WASSENAAR, L. I. Stable isotope ecology: an introduction. *Oecologia*, Berlin, v. 120, n. 3, p. 312-313, 1999.

KEELEY, J. E.; SANDQUIST, D. R. Carbon: freshwater plants. *Plant Cell Environ.*, Oxford, v. 15, p. 1021-1035, 1992.

KEELING, C. D. The concentration and isotope abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas. *Geochim. Cosmochim. Acta*, London, v. 13, p. 322-334, 1958.

KEELING, C. D. *et al.* Recent trends in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of atmospheric carbon dioxide. *Nature*, London, v. 277, p. 121-123, 1979.

LANGE, O. L. *et al.* Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia*, Berlin, v. 71, p. 104-110, 1986.

LANGE, O. L. *et al.* Water status related photosynthesis and carbon isotope discrimination in species of the lichen

- genus green photobionts and in photosym-biodesmes. *Oecologia*, Berlin, v. 75, p. 104-110, 1988.
- MARTINELLI, L. A. *et al.* Utilização das variações naturais de  $\delta^{13}\text{C}$  no estudo de cadeias alimentares em ambientes aquáticos: princípios e perspectivas. *Acta Limnológica Brasiliensia*, Botucatu, SP, v. 11, p. 859-882, 1988.
- MARTINELLI, L. A. *et al.* Stable carbon isotope variation in  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plants along the Amazon river. *Nature*, London, v. 353, p. 57-59, 1991.
- MARTINELLI, L. A. *et al.*  $^{15}\text{N}$  natural abundance in plants of the Amazon river floodplain and potential atmospheric  $\text{N}_2$  fixation. *Oecologia*, Berlin, v. 90, p. 591-596, 1992.
- MARTINELLI, L. A. *et al.* Isotopic composition of major carbon reservoirs in the Amazon floodplain. *Internat. J. Ecol. Environ. Sci.*, New Delhi, v. 20, p. 31-46, 1994.
- MEDINA, E.; MINCHIN, P. Stratification of  $\delta^{13}\text{C}$  values of leaves in Amazonian rain forests. *Oecologia*, Berlin, v. 45, p. 377-378, 1980.
- NADELHOFFER, K. J.; FRY, B. Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. In: LAJTHA, K.; MICHENER, R. H. (Ed.). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. cap. 2, p. 22-44. (Methods in ecology).
- NIER, A. O.; GULBRANSEN, E. A. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, DC, v. 61, p. 697-698, 1939.
- PENG, T. H.; FREYER, H. D. Revised estimates of atmospheric  $\text{CO}_2$  variations based on the tree-ring  $^{13}\text{C}$  record. In: TRABALKA, J. R.; REICHLER, D. E. (Ed.). *The changing carbon cycle: a global analysis*. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 151-159.
- PETERSON, B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, Palo Alto, v. 18, p. 293-320, 1987.
- RIBEIRO, A. S. *et al.* Razão isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) na caracterização de plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  em habitats de transição entre áreas abertas e florestadas. *Publicações Avulsas do Centro Acadêmico Livre de Biologia*, São Cristóvão, n. 2, p. 27-30, 1988.
- ROUNICK, J. S.; WINTERBOURN, M. J. Stable carbon isotopes and carbon flow in ecosystems. *BioScience*, Washington, v. 36, n. 3, p. 171-177, 1986.
- SHEARER, G.; KOHL, D. H. Estimates of  $\text{N}_2$  fixation in ecosystems: the need for and basis of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance method. In: RUNDEL, J. R.; EHLERINGER, J. R.; NAGY, K. A. *Stable isotopes in ecological research*, New York: Springer-Verlag, 1988. p. 342-374.
- SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants. *Plant Physiol.*, Rockville, v. 47, p. 380-384, 1971.
- STEPHENSON, R. L. *et al.* Use of stable carbon isotope ratios to compare plant material and potential consumers in a seagrass bed and a kelp bed in Nova Scotia, Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf, v. 30, p. 1-7, 1986.
- VANDER-ZANDEN, M. J. *et al.* Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and literature dietary data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Ottawa, v. 54, p. 1142-1158, 1997.
- VICTORIA, R. L. *et al.* The use of stable isotopes in studies of nutrient cycling: carbon isotope composition of Amazon varzea sediments. *Biotropica*, Lawrence, v. 24, n. 2b, p. 240-249, 1992.
- VOGEL, J. C. Recycling of carbon in a forest environment. *Oecol. Plant*, Montrouge, v. 13, p. 89-94, 1978.
- WADA, E. *et al.*  $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$  Map of the middle rio Doce Valley lake ecosystem. In: TUNDISI, J. G.; SAIJO, Y. (Ed.). *Limnological studies on the rio Doce Valley lakes, Brazil*. São Paulo: Brazilian Academy of Sciences, USP, 1997. p. 189-196.
- WAICHTMAN, A. V. Autotrophic carbon sources for heterotrophic bacterioplankton in a floodplain lake of central Amazon. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 341, p. 27-36, 1996.
- WICKMAN, F. E. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes in plants. *Geochim. Cosmochim. Acta*, London, v. 2, p. 243-254, 1952.
- YOSHIOKA, T. *et al.* Analysis of lacustrine food web with natural carbon and nitrogen isotope ratios. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, Stuttgart, v. 23, p. 573-578, 1988.

Received on August 14, 2001.

Accepted on March 28, 2002.