

Problemi e prospettive dell'uso di analisi di isotopi stabili di carbonio e azoto per lo studio di reti trofiche lacustri



Rossana Caroni¹, Roberta Piscia¹, Amedeo Fadda, Marina Manca¹
¹CNR-Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Verbania

© CNR Edizioni
P.le Aldo Moro 7
00185 Roma
ISBN 978 88 8080 308 9

Il presente lavoro è stato realizzato nell'ambito del programma di monitoraggio del lago Maggiore finanziato dalla Commissione per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere (CIPAIS). Per maggiori informazioni visitare il sito: <http://www.cipais.org>

Indice

<i>Prefazione</i>	5
<i>Aspetti generali e metodologici nell' analisi degli isotopi stabili</i>	6
<i>Concetti generali e tecniche di analisi degli isotopi stabili</i>	7
<i>L'uso degli isotopi stabili di C e N in ambienti lacustri</i>	9
<i>La zona litorale</i>	11
<i>La zona pelagica</i>	12
<i>Eterogeneità spaziale e temporale dei laghi</i>	14
<i>Il plancton</i>	16
<i>Reti trofiche</i>	17
<i>Metodologie per lo studio delle reti trofiche lacustri</i>	19
<i>Il modello ARIMA</i>	19
<i>Differenze nel segnale isotopico di carbonio e azoto all'interno degli ecosistemi d'acqua dolce</i>	21
<i>Il concetto di linea di base nell'analisi degli isotopi stabili</i>	25
<i>$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ e stagionalità</i>	26
<i>Comunità fitoplanctoniche e segnali di $\delta^{13}\text{C}$</i>	28
<i>Stagionalità del segnale di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nello zooplancton pelagico del lago Maggiore</i>	29
<i>Analisi stagionale e inter-annuale di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dello zooplancton</i>	31
<i>Temperatura e segnale $\delta^{13}\text{C}$ di Daphnia</i>	35
<i>Modelli di reti trofiche del lago Maggiore tramite l'analisi degli isotopi stabili</i>	36
<i>Analisi degli isotopi stabili: confronto fra litorale e pelago</i>	38
<i>Analisi degli isotopi stabili in laghi a diversa tipologia</i>	42
<i>Analisi degli isotopi stabili e POPs</i>	56
<i>Conclusioni</i>	60
<i>Bibliografia</i>	61

Prefazione

Marina Manca

CNR-Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Verbania

Quando, dieci anni or sono, la Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere (CIPAIS) richiese all'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi di presentare progetti in ambito limnologico innovativi che servissero ad arricchire le conoscenze derivanti dal monitoraggio del lago Maggiore e del suo bacino imbrifero, l'occasione fu propizia per avviare indagini che servissero ad una caratterizzazione della rete pelagica lacustre nelle sue diverse componenti, individuando i rapporti trofici e la loro evoluzione nel tempo, in relazione al variare di parametri abiotici e biotici. Studi relativi alla caratterizzazione di rapporti biotici, includendo dinamiche di predazione e competizione all'interno dello zooplancton, dipendenza dalla base alimentare fitoplanctonica e dalla pressione predatoria da parte della fauna ittica, erano stati condotti in passato con metodi di analisi statistica, basati sull'utilizzo di dati derivanti dall'analisi della dinamica delle popolazioni zooplanctoniche. La consapevolezza dell'importanza delle conoscenze derivanti da questi primi studi, unita all'interesse personale per attività che potessero coniugare esperienze di laboratorio, di analisi elementari (cfr. Manca & Tognola 1993; Manca et al. 1994, 1995, 1997) con quelle microscopiche alla base della caratterizzazione del popolamento zooplanctonico del lago, sono stati gli elementi che hanno portato alla formulazione del progetto d'indagine della rete trofica pelagica del lago Maggiore anche attraverso l'uso di analisi di isotopi stabili di carbonio e azoto.

La passione e l'interesse per approcci molecolari volti allo studio delle interazioni trofiche nasceva anche, proprio sul caso di studio "lago Maggiore", dal desiderio di comprendere le ragioni del forte declino di *Daphnia*, osservato nel periodo 1989-1996, per il quale non poteva essere esclusa l'ipotesi di una forte limitazione dalla base alimentare. Su questo tema, la compianta studiosa Annie Duncan aveva lavorato, con la messa a punto di un metodo basato su analisi elementari di *Daphnia* e del loro variare stagionale in relazione alle risorse alimentari (Duncan 1985). L'utilizzo di questo metodo permetteva di arricchire le indagini usuali, improntate alla caratterizzazione della densità di popolazione del popolamento zooplanctonico, nelle sue diverse entità tassonomiche e nei diversi stadi di sviluppo, con quelle attività di laboratorio che mi avevano vista per tanti anni lavorare al

fianco di Riccardo de Bernardi e, nello specifico delle analisi elementari, con Gianluigi Giussani. L'utilizzo dell'analisi degli isotopi stabili di C ed N era da me già stato impiegato per un lago alpino sul quale lavoravo da tempo, con l'intento di caratterizzarne la rete trofica planctonica, anche in relazione al dibattito sulla dinamica del segnale isotopico dell'azoto in laghi privi di pesci (Cattaneo et al. 2004). Furono queste le basi conoscitive dalle quali scaturì il progetto d'indagine sul lago Maggiore, andatosi arricchendo nell'arco di dieci anni anche con aspetti più propriamente legati al flusso di inquinanti persistenti e alla stima della biomagnificazione, dando in tal modo un fondamentale contributo alle indagini sulle sostanze inquinanti ed al ruolo cruciale svolto dallo zooplancton in questo contesto, indagini promosse e finanziate dalla sottocommissione *ad hoc* istituita in seno alla CIP AIS a seguito della scoperta dell'inquinamento da DDT del lago e delle comunità in esso insediate.

Con questo progetto la modernità degli studi su base molecolare si coniugava con la tradizione di un approccio ecosistemico allo studio dei laghi, connaturata con l'Istituto ed espressa nella sua *mission*, per la quale fondamentale è stato il poter contare su un gruppo di lavoro multidisciplinare in grado di contribuire, con le specifiche competenze, alle diverse e complesse fasi delle attività.

Aspetti generali e metodologici nell'analisi degli isotopi stabili

Le sostanze biogeniche in natura contengono quantità significative di isotopi stabili (IS) di elementi leggeri quali idrogeno, carbonio, azoto e ossigeno. Ad esempio, un corpo umano di 50 kg contiene circa 225 g di isotopi più pesanti (Wada 2009). Sebbene gli IS di un particolare elemento abbiano simile comportamento chimico, i loro parametri termodinamici specifici e le costanti di velocità nelle reazioni chimiche e biologiche differiscono.

Gli IS delle sostanze biogeniche variano in dipendenza delle composizioni isotopiche dei reagenti, dei percorsi e delle modalità cinetiche delle dinamiche di reazione, e delle condizioni fisiche e chimiche. Di conseguenza, ogni materiale biogenico ha la sua propria, unica, composizione isotopica, nota come "*fingerprint* dinamico in isotopi stabili", determinato dalla sua funzione e dalla posizione nel flusso di materia dell'ecosistema in un dato momento (Minagawa & Wada 1984; Wada 2009).

I recenti progressi nelle scienze della vita hanno messo in evidenza come gli organismi viventi posseggano tre fondamentali *fingerprint* all'interno del loro corpo.

Il primo *fingerprint* è quello dell'informazione biologica ottenuta nel corso dell'evoluzione della vita nell'arco degli ultimi 3,5 miliardi di anni, il "*DNA fingerprint*", trasferito dai genitori alla prole.

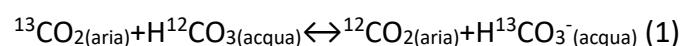
Il secondo *fingerprint* comunemente accettato è rappresentato dalla memoria immagazzinata nel cervello: man mano che cresce, un animale accumula memorie differenti nelle diverse circostanze. Oggigiorno, l'elasticità delle trasmissioni sinaptiche è considerata come una possibile chiave dei meccanismi della memoria del cervello, e molto vi è ancora da scoprire relativamente ai dettagli con i quali tali processi avvengono.

Il terzo *fingerprint*, come sopra anticipato, è l'"*IS fingerprint*", ovvero il modello isotopico caratteristico di un individuo, dato dalle abbondanze relative degli isotopi stabili in esso presenti, sostanzialmente determinate dalle abitudini alimentari e dalle modalità di escrezione. Determinazioni precise dei rapporti isotopici degli organismi consentono in linea di principio, di ricostruire dati fondamentali quali la storia di una molecola o di un materiale.

Secondo l'approccio degli studi sugli isotopi stabili, un ecosistema può essere trattato come la somma di complesse reazioni chimiche mediate da organismi viventi a diversa funzione e da fattori fisico-chimici. Accanto alle variazioni nella temperatura, nella pressione e nell'energia prodotta e consumata nel corso delle reazioni metaboliche, in questo tipo di studi si tiene conto del cosiddetto "*effetto isotopico*", o "*frazionamento isotopico*", vale a dire delle possibili differenze nei rapporti degli IS nei reagenti e nei prodotti. L'effetto isotopico che accompagna i processi metabolici consente la comprensione delle sequenze di reazione implicate nella fisiologia degli organismi vegetali e della funzione e posizione di organismi animali nella rete trofica. Esso può essere utilizzato a diversi livelli di complessità, da quello molecolare a quello ecosistemico, e può essere considerato come un parametro interdisciplinare degli ecosistemi naturali.

Concetti generali e tecniche di analisi degli isotopi stabili

Il frazionamento isotopico può essere suddiviso in due categorie. La prima categoria è quella delle reazioni di equilibrio di scambio isotopico, la più rappresentativa delle quali è la reazione di scambio che consente di mantenere il rapporto isotopico del carbonio costante nell'atmosfera quasi su tutto il pianeta:



La seconda categoria è il cosiddetto effetto isotopico cinetico, che può aver luogo in quasi tutte le reazioni biologiche, in dipendenza dal meccanismo di reazione. In generale, la molecola isotopica a più basso peso molecolare ha una costante di velocità di reazione più grande rispetto a quella della molecola più pesante. Il grado di frazionamento dipende dalle caratteristiche proprie dell'enzima interessato nella reazione. Ad esempio, è noto che la denitrificazione ha un fattore di frazionamento grande, fino a 1,04 (4%), mentre la fissazione biologica dell' N_2 ha un fattore di frazionamento piccolo, di 1,002 (0,2%). Il fattore di frazionamento di una data reazione in due specie differenti è in generale della stessa grandezza se i siti enzimatici sono simili. Di conseguenza, il rapporto $^{15}N/^{14}N$ della biosfera nel suo insieme è leggermente maggiore di quello dell'azoto atmosferico. D'altro canto, si osserva un fattore di frazionamento isotopico grande, di 1,03 (3%) nella carbossilazione delle piante C3, e questo risulta in un rapporto $^{13}C/^{12}C$ più basso nella biosfera nel suo insieme rispetto allo ione HCO_3^- delle acque.

Poiché le variazioni nei rapporti isotopici di carbonio e azoto negli ecosistemi naturali sono lievi, il contenuto in ^{13}C e ^{15}N è espresso come deviazione ‰ rispetto a uno standard, secondo le formule seguenti:

$$\delta^{13}C (\text{‰}) = \left[\frac{^{13}C/^{12}C_{\text{campione}}}{^{13}C/^{12}C_{\text{PDB}}} - 1 \right] \times 1000 \quad (2)$$

$$\delta^{15}N (\text{‰}) = \left[\frac{^{15}N/^{14}N_{\text{campione}}}{^{15}N/^{14}N_{\text{aria}}} - 1 \right] \times 1000 \quad (3)$$

Come standard vengono utilizzati, per il carbonio e l'azoto rispettivamente, la Belemnite Pee Dee (PDB), un carbonato di calcio fossile avente un contenuto di ^{13}C quasi identico a quello dello ione HCO_3^- delle acque, e l'azoto atmosferico (N_2). Valori positivi del δ ‰ stanno ad indicare che il campione ha un contenuto di ^{13}C e ^{15}N maggiore di quello dello standard corrispondente; al contrario, quando esso ne sia impoverito, il valore del δ ‰ del corrispondente isotopo risulta negativo. Naturalmente, $\delta^{13}C (HCO_3^-)_{(acqua)} = 0,0\text{‰}$ e $\delta^{15}N(N_{2(aria)}) = 0,0\text{‰}$.

Molte differenti sostanze biologiche e biogeniche sono state raccolte da diversi ecosistemi. I loro rapporti isotopici sono stati misurati mediante spettrometri di massa con metodologie descritte in dettaglio. E' così possibile identificare i principali fattori che governano le distribuzioni isotopiche in un ecosistema. Essi sono: 1) le composizioni isotopiche dei substrati utilizzati dai vegetali, quali la CO_2 , l' H_2O e i nitrati inorganici; 2) gli effetti cinetici degli isotopi durante i processi di assorbimento; 3) effetti trofici durante i processi di nutrizione; 4) metabolismo gassoso durante la mineralizzazione.

L'uso degli isotopi stabili di C e N in ambienti lacustri

Gli isotopi stabili sono uno strumento efficiente per rivelare la diversità e la complessità della rete trofica zooplanctonica dei laghi (Post 2002). Gli organismi zooplanctonici utilizzano fonti di carbonio autoctono, attraverso il *grazing* del fitoplancton, dei batteri e di altri organismi che dipendono dalla produzione fitoplanctonica. I batteri dipendono anche dal pool del carbonio organico disciolto prodotto attraverso molte altre fonti, ivi inclusi il fitoplancton, il perfiton, le macrofite e il carbonio alloctono. Gli studi sugli isotopi stabili sono stati utilizzati per distinguere tra fonti fitoplanctoniche e non fitoplanctoniche (bentoniche, litorali e alloctone) di carbonio in diversi ecosistemi lacustri, dimostrando che il grado di dipendenza dello zooplancton da fonti non fitoplanctoniche dipende dal grado di trofia, dalla stagione, e dal rapporto N/P (Karlsson et al. 2003).

Differenze nel $\delta^{13}\text{C}$ e nel $\delta^{15}\text{N}$ dello zooplancton possono risultare da uno *shift* nella linea di base pelagica, comunemente definita come la composizione isotopica delle fonti primarie di rifornimento della rete trofica pelagica. La linea pelagica comprende sia fonti fitoplanctoniche sia fonti non fitoplanctoniche: entrambe possono contribuire alla produzione secondaria della rete trofica pelagica. La linea di base pelagica di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ varia a seconda del lago, e in uno stesso lago, negli anni e a seconda della stagione (Matthews & Mazumder 2003). Le variazioni tra laghi sono tendenzialmente legate alle dimensioni del lago stesso (Post et al. 2000; Perga & Gerdeaux 2006). In uno stesso lago o in un gruppo di laghi simili il segnale della linea di base pelagica è influenzato dallo stato trofico (Perga & Gerdeaux 2006). Input di azoto e di nutrienti inorganici possono alterare la linea di base del $\delta^{15}\text{N}$ (Lake et al. 2001; Cole et al. 2004; Lehmann et al. 2004). Fattori ambientali quali temperatura, produzione primaria e riciclo dei nutrienti inorganici possono influenzare il $\delta^{13}\text{C}$ e il $\delta^{15}\text{N}$ del fitoplancton. Così come nell'arco dell'anno si possono osservare differenze nel $\delta^{13}\text{C}$ e nel $\delta^{15}\text{N}$ dei diversi *taxa* zooplanctonici in relazione a modificazioni nelle abitudini alimentari (vale a dire nella posizione trofica) e nella disponibilità delle risorse.

Il progetto finanziato dalla CIP AIS si proponeva di:

- dare una prima caratterizzazione del segnale isotopico di carbonio e azoto e del suo propagarsi lungo la rete trofica pelagica del lago Maggiore, dalla base alimentare fino ai pesci, nei quattro momenti stagionali. Come evidenziato nella parte introduttiva,

l'intervallo di valori del $\delta^{13}\text{C}$ lacustre ne riflette principalmente la tipologia, e dunque nel caso del Maggiore, ci si attendeva che esso sia raffrontabile a quello di altri laghi profondi subalpini. Il $\delta^{15}\text{N}$ dei laghi è invece principalmente legato allo stato trofico e tende ad innalzarsi in acque di scarico urbano (Cabana & Rasmussen 1996); il termine di paragone, nel caso del Maggiore, doveva dunque essere quello di ambienti oligotrofi;

- analizzare le variazioni nel tempo (con la stagione) e nello spazio (attraverso il confronto tra stazioni rappresentative dell'interferenza, nel pelago, di apporti di materiale alloctono - dal Fiume Toce, Stazione di Baveno-, e dal litorale - Stazione di Lesa) del segnale isotopico del carbonio;
- individuare il possibile contributo alla rete trofica pelagica di fonti di carbonio non pelagiche;
- identificare i rapporti trofici e il loro variare nel corso dell'anno, di organismi pelagici, dai consumatori primari zooplanctonici ai pesci predatori.

Nell'arco dei dieci anni durante il quale le misure sono state effettuate nell'ambito delle indagini limnologiche e nel periodo di tempo (2011-2018) durante il quale sono state realizzate all'interno del programma di monitoraggio delle sostanze tossiche nel lago, gli obiettivi sono stati pienamente realizzati, restituendo un quadro delle dinamiche stagionali e pluriennali alla base del flusso di materia ed energia attraverso la rete trofica pelagica, in relazione alle variabili biotiche ed abiotiche che le governano. Il lavoro completato ha permesso di mettere in luce problematiche e prospettive dell'uso di analisi di isotopi stabili di C e N per lo studio di reti trofiche lacustri e, arricchendosi lungo il suo percorso di esperienze in ambienti a diversa tipologia e con differente stato trofico, ha reso possibile evidenziare elementi comuni e distintivi delle dinamiche e del ruolo trofico degli organismi componenti lo zooplancton anche in relazione alle diverse variabili ambientali.

La zona litorale

La zona litorale di un lago è definita come la zona costiera nella quale la luce penetra fino ai sedimenti, permettendo la crescita delle piante acquatiche (macrofite). Le zone litorali sono considerate relativamente produttive poiché le macrofite hanno un accesso diretto ai nutrienti dei sedimenti. Piante emergenti, galleggianti e sommerse contribuiscono tutte alla produzione primaria di un lago. Le piante sommerse arrivano ad una profondità di crescita in cui c'è abbastanza luce da permettere il processo di fotosintesi e tale profondità dipende dalla trasparenza dell'acqua, la quale può variare da pochi decimetri fino a molti metri. La struttura della zona litorale può essere molto eterogenea, con zone di roccia, ghiaia, sabbia, limo o a copertura vegetale. Il tipo di substrato e la pendenza di costa determinano la struttura e il tipo di comunità biologica della zona litorale. Le zone litorali supportano una grande varietà di comunità biologiche, costituiscono l'habitat preferenziale per i macroinvertebrati e forniscono un rifugio per zooplancton e pesci. Le zone litorali sono soprattutto collegamenti importanti tra il bacino imbrifero e la zona pelagica del lago, agendo come interfaccia di scambio di materiali nel confine tra ambiente acquatico e ambiente terrestre (Fig. 1).

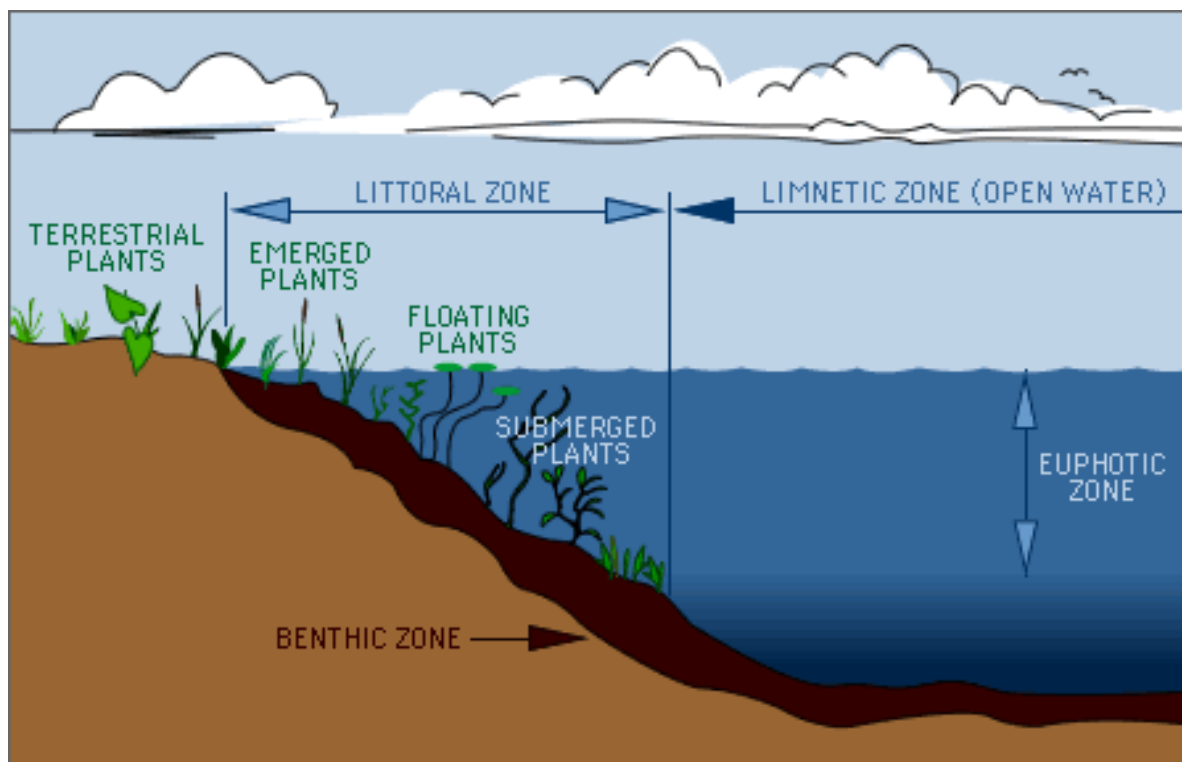


Fig. 1. Schema delle diverse zone di un lago (<https://biomesduff.wikispaces.com>).

Le zone litorali sono anche importanti per gli apporti di carbonio alloctono in un lago. Classicamente si pensava che la produttività nei laghi dipendesse principalmente dalla produzione autoctona (Carpenter et al. 1985). Tuttavia, studi recenti suggeriscono che input di materia organica dal bacino imbrifero giocano un ruolo importante alla base della rete trofica lacustre. Gli input terrestri di carbonio possono supportare il 30-70% della produzione secondaria nei laghi, a seconda del loro stato trofico, rappresentata da zoobentos, zooplankton e pesci. Sono ormai molti gli studi scientifici che supportano l'importanza di fonti terrestri e alloctone di carbonio per la produzione di un lago (Grey et al. 2001; Karlsson et al. 2003; Pace et al. 2004, 2007; Cole et al. 2006; Jansson et al. 2007; Berggren et al. 2014; Berggren et al. 2010; Tanentzap et al. 2014).

La zona pelagica

Nella zona pelagica di un lago si possono differenziare orizzontalmente diversi livelli. La zona eufotica è quella nella quale si svolge la fotosintesi e si compie la produzione primaria pelagica (Fig. 2A). Per il fitoplancton detta zona corrisponde allo strato d'acqua nel quale arriva almeno l'1% della luce solare incidente; la zona eufotica Z_{eu} può essere calcolata in modo approssimativo con la formula $Z_{eu} = \text{Trasparenza (misurata mediante Disco di Secchi) (m)} \times 1,7$. Nella maggior parte dei laghi la zona eufotica corrisponde all'epilimnio (Fig. 2B). Il termoclinio è lo strato o livello in cui, durante i periodi di stratificazione termica della colonna d'acqua, il gradiente di temperatura cambia più bruscamente del livello soprastante e sottostante. L'ipolimnio corrisponde al livello delle acque più profonde del lago, nel quale le temperature nei laghi profondi sono pressoché omogenee durante tutto l'arco dell'anno.

I laghi possono essere molto diversi tra loro per tipologia, con questo termine intendendo l'insieme delle loro caratteristiche geomorfologiche e fisico-chimiche. Importanti caratteristiche di un lago sono la profondità e l'area. Laghi molto profondi e laghi meno profondi hanno diverse strutture, dinamiche, funzionalità e, di conseguenza, sono diversi dal punto di vista ecologico. La geologia del bacino imbrifero è determinante per molte caratteristiche chimiche delle acque di un lago quali l'alcalinità, il pH, la conducibilità, il carbonio inorganico disciolto (DIC) e il colore, tratti che sono alla base della tipologia della struttura delle comunità biologiche in esso insediate. Geologia e utilizzo del suolo influenzano

la concentrazione di nutrienti (soprattutto fosforo e azoto) di un lago, determinando uno spettro di trofia delle acque che spazia dall'ultra-oligotrofia all'ipertrofia. Lo stato trofico di un lago determina a sua volta la biomassa e la struttura delle comunità biotiche quali fitoplancton, zooplancton e pesci (Bertoni 2018).

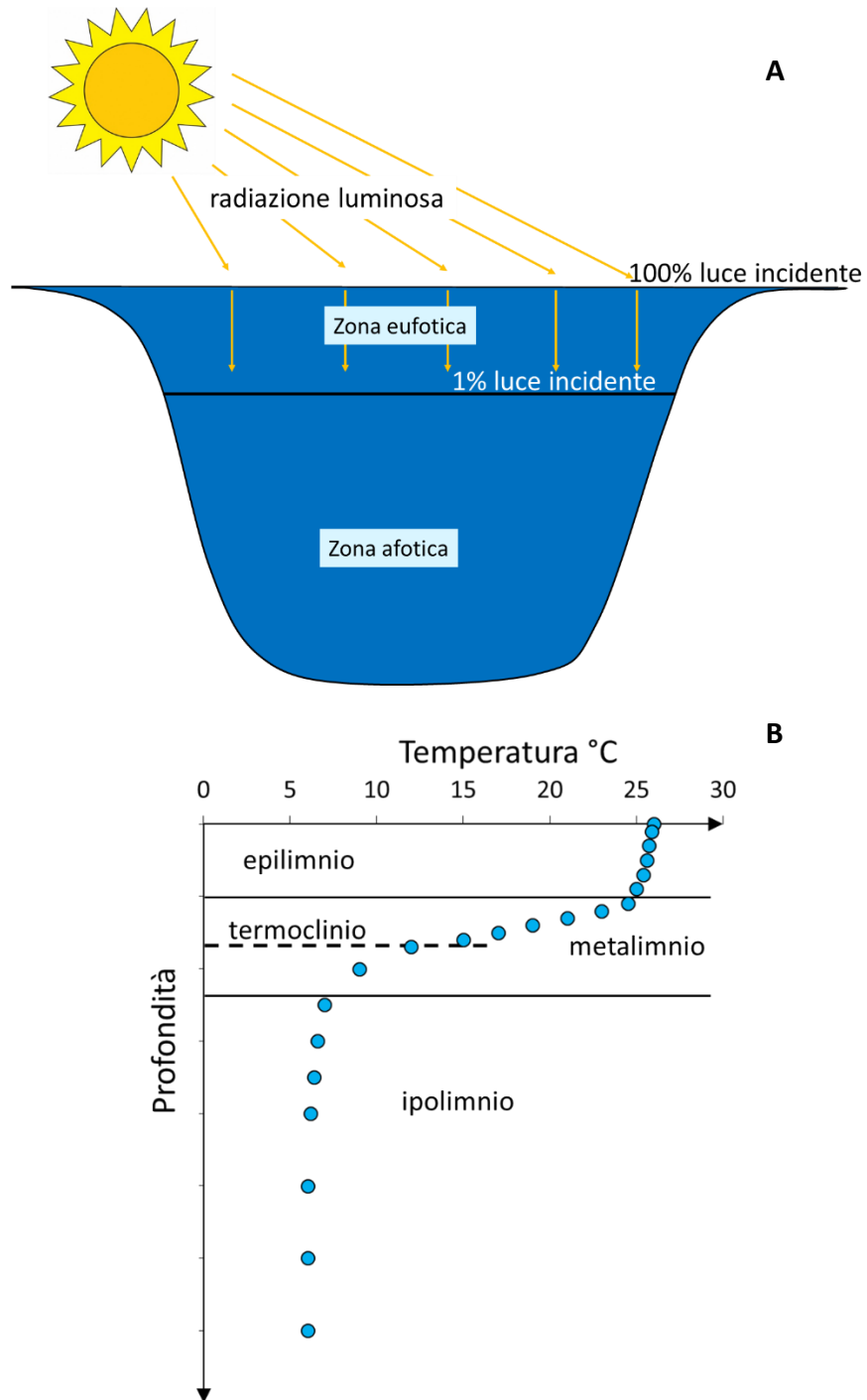


Fig. 2. Sezione trasversale di un lago, nel quale sono indicati gli strati d'acqua (eufotica e afotica) individuati sulla base della percentuale di luce incidente (A) ed esempio di profilo termico in estate di un lago sulla cui base sono definiti i differenti strati della colonna d'acqua (B).

Eterogeneità spaziale e temporale dei laghi

La zona pelagica di un lago presenta cambiamenti stagionali causati principalmente dalle variazioni delle condizioni atmosferiche stagionali e puntuali, dalla temperatura dell'aria e dai venti.

Lungo la colonna d'acqua di laghi relativamente profondi (>15 m), il maggior rimescolamento delle acque avviene durante la primavera e l'autunno, quando le acque a diversa temperatura e chimismo si rimescolano tra loro (Figg. 3 e 4). Tali laghi sono chiamati dimittici, in quanto il rimescolamento avviene due volte all'anno. Durante l'inverno, nei primi metri d'acqua esposti alle fredde temperature dell'aria e ai venti invernali, le temperature presentano valori lievemente inferiori rispetto a quelli delle acque più profonde. Con il progredire della stagione verso la primavera, le temperature più miti e i venti primaverili provocano il rimescolamento delle acque del lago. L'acqua superficiale scende verso il basso forzando l'acqua meno densa a salire verso la superficie. I valori dei profili dei parametri fisico-chimici diventano uniformi dalla superficie al fondo del lago; gli esempi nella figura 4 mostrano i profili di temperatura ed ossigeno disciolto. Durante l'estate, l'epilimnio diventa lo strato con temperature maggiori poiché direttamente riscaldato dal calore del sole. Nella colonna d'acqua si presenta una situazione di stratificazione termica, con un brusco cambiamento di temperatura e ossigeno disciolto a livello del termoclinio, e temperature più basse e concentrazioni minori di ossigeno nell'ipolimnio.

Questi cambiamenti fisico-chimici nella struttura della zona pelagica di un lago influenzano direttamente o indirettamente le comunità biologiche lacustri e, in particolare, conducono alle successioni stagionali planctoniche.

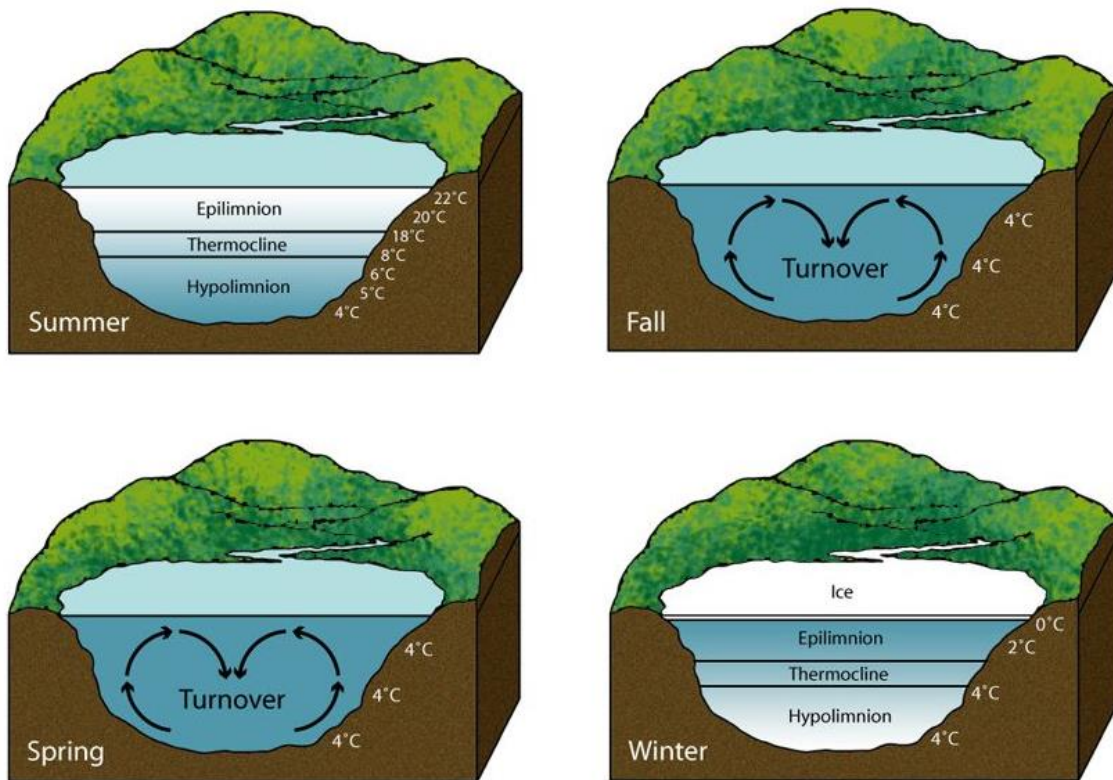


Fig. 3. Schema della stratificazione stagionale e degli eventi di circolazione delle acque in un lago dimittico (<http://education.nationalgeographic.org>).

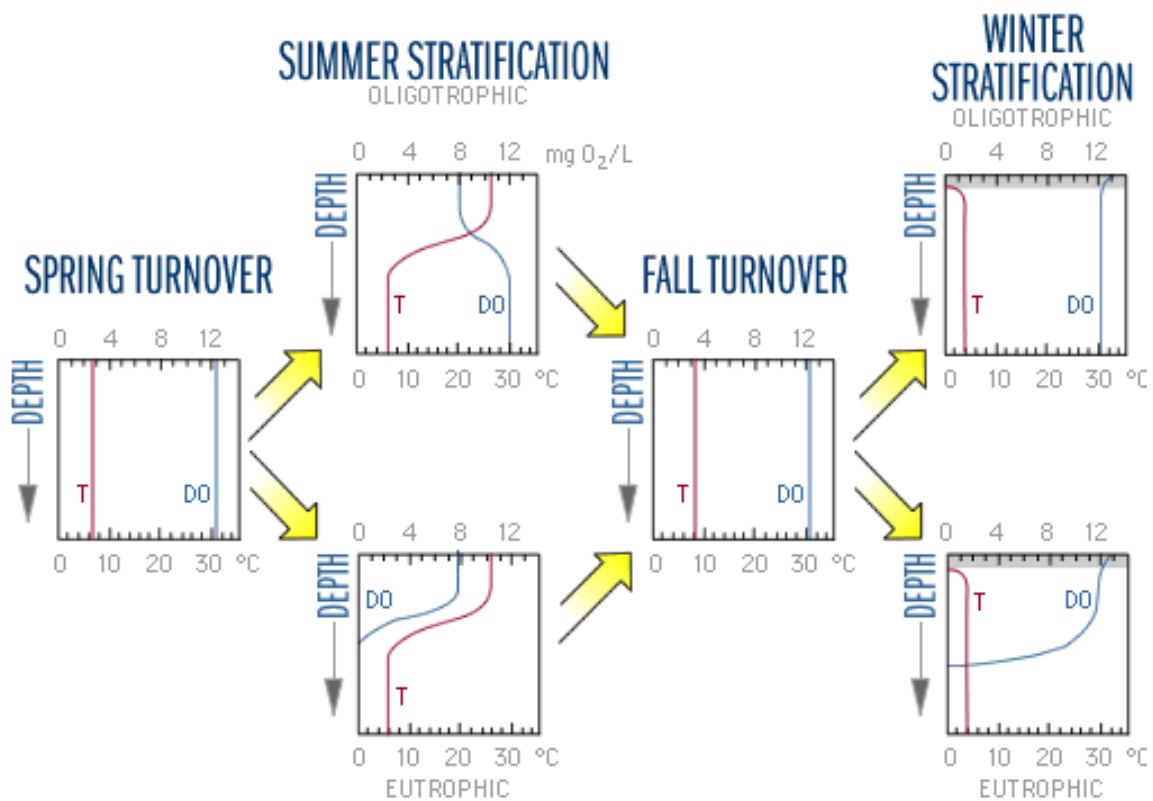


Fig. 4. Variazioni stagionali del profilo termico e della concentrazione di ossigeno disciolto lungo la colonna d'acqua (Wetzel 1975).

Il plancton

Il termine “plancton” sta ad indicare l’insieme degli organismi trasportati passivamente nel mezzo acquoso, incapaci di opporsi ai principali moti in seno alla massa d’acqua quali onde e correnti (Hensen 1889). Si tratta dunque di organismi adattati a trascorrere la vita nella colonna d’acqua senza sedimentare sul fondo, capaci di nuotare compiendo movimenti attivi su micro- e meso- scala, sia in senso orizzontale che verticale. Formazione di colonie, forma di cellule e colonie, presenza di spine e flagelli, vescicole gassose, involucri di mucillagine sono tutte strategie adattative degli organismi fitoplanctonici per contrastare la tendenza a precipitare sul fondo. Gli organismi zooplanctonici sono in grado di compiere movimenti attivi orizzontali e verticali per mezzo di appendici e antenne.

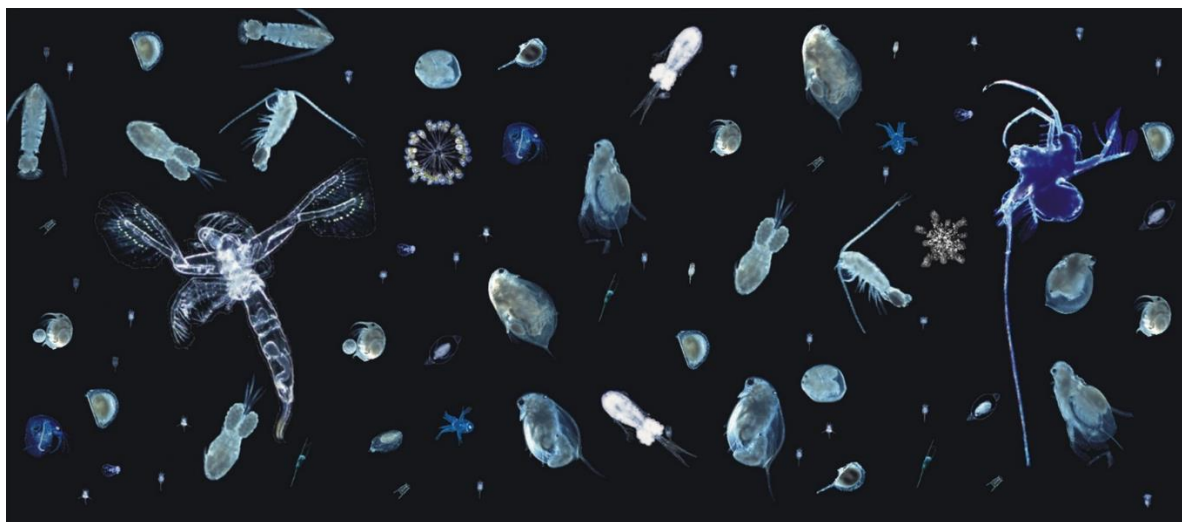


Fig. 5. Insieme di alcuni organismi componenti il popolamento zooplanctonico d’acqua dolce.

Le comunità fitoplanctoniche e zooplanctoniche vivono soprattutto nella zona pelagica di un lago. Esse si modificano con la stagione, seguendo le variazioni delle condizioni ambientali. Variazioni di temperatura e disponibilità di luce, input di nutrienti dal bacino e dai sedimenti, riciclo e disponibilità alimentari e di nutrienti sono tutti fattori determinanti le successioni planctoniche in un lago.

Rivisitiamo alcuni concetti importanti riguardanti le comunità planctoniche lacustri. Il principio di Gause (1934) o principio di competizione esclusiva così recita: “*Due specie che competono per la stessa risorsa limitata non possono coesistere a valori di popolazione costanti nel tempo*”. Fu il limnologo G. E. Hutchinson negli anni Sessanta a rivelare l’ingongruità tra questo principio e l’osservazione diretta della diversità specifica del plancton

in un lago, cioè in un habitat che si supponeva essere omogeneo. Tale concetto è noto come il “Paradosso del plancton”: *“The problem that is presented by the phytoplankton is essentially how it is possible for a number of species to coexist in a relatively isotropic or unstructured environment all competing for the same sorts of materials”* (Hutchinson 1961). L’intuizione di Hutchinson fu che diverse specie sono favorite da diverse condizioni ambientali, che se cambiano adeguatamente nel tempo, possono permettere la coesistenza di diverse specie in un lago. Con queste considerazioni fu sostanzialmente introdotto il concetto di “non-equilibrio”, una condizione presente nell’habitat lacustre e che porta ad una diversità specifica maggiore di quella attesa. Fu sempre Hutchinson a definire, su queste basi, il concetto moderno di nicchia ecologica, cioè il ruolo di una specie nel suo habitat e la sua interazione con le altre specie presenti (Hutchinson 1959).

Reti trofiche

Gli organismi di un ecosistema sono organizzati in reti trofiche (o di interazioni alimentari), nelle quali sono connessi tra loro con relazioni quali predazione e competizione. Possono occupare diversi livelli, a seconda che siano produttori, capaci di organizzare la sostanza organica, o consumatori, in grado di utilizzarla. A loro volta i consumatori possono essere secondari, terziari ecc. a seconda della base alimentare che essi utilizzano (Fig. 6).

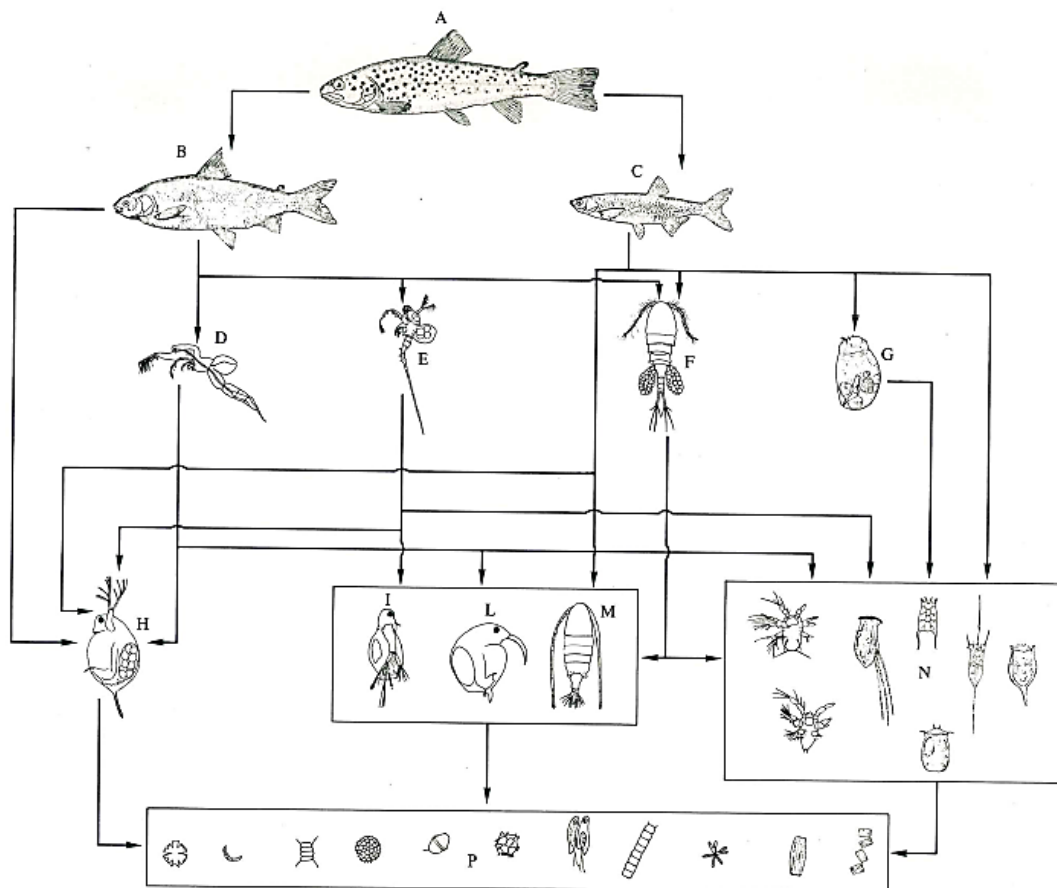


Fig. 6. Rappresentazione schematica della struttura della rete trofica lacustre, nella quale sono evidenziate le principali relazioni trofiche che intercorrono tra gli organismi (de Bernardi & Giussani 1984).

Le analisi di isotopi stabili di carbonio e azoto in ecologia acquatica si sono dimostrate uno strumento efficace per la ricostruzione dei processi sottesi alle reti trofiche lacustri. Attraverso l'utilizzo di analisi di isotopi stabili (SIA, *Stable Isotope Analysis*), gli ecologi hanno scoperto una maggiore complessità delle reti trofiche lacustri rispetto a quanto ritenuto in precedenza. In particolare, hanno realizzato che molti organismi acquatici sono onnivori e non necessariamente caratterizzati da un solo livello trofico. Inoltre, dimensioni e stadi di sviluppo diversi di un organismo possono avere differenti segnali isotopici, indicando una mobilità di livelli trofici durante il periodo di vita, come può avvenire negli organismi consumatori.

Metodologie per lo studio delle reti trofiche lacustri

Analisi convenzionali della dieta, necessarie per la caratterizzazione delle reti trofiche, sono state inizialmente condotte tramite analisi del contenuto stomacale di organismi (Hyslop 1980; Tóth 1985), mostrando dimensioni e tipologia del materiale ingerito e mettendolo in relazione alla disponibilità naturale nel suo habitat. Tali tipi di analisi presentano tuttavia problemi relativi allo stato di decomposizione del materiale analizzato e alla conseguente difficoltà di identificazione della fonte alimentare.

Un altro metodo, proposto da Schulz & Yurista (1995), consiste in analisi di elettroforesi e *laser scanning* per l'identificazione dei resti di tessuti molli; in particolare, il loro studio analizzava prede di *Bythotrephes cederstroemi* (oggi ritenuto la medesima specie di *Bythotrephes longimanus*), vorace predatore zooplanctonico, noto nel mondo anglosassone come "*spiny water flea*".

L'introduzione dell'analisi di isotopi stabili per lo studio delle reti trofiche lacustri ha permesso di discriminare tra il materiale ingerito e quello assimilato da un organismo. Il segnale isotopico stabile del carbonio fornisce informazioni sulla fonte di sostanza organica utilizzata nella dieta di un organismo, oltre a dare indicazioni sulla provenienza del carbonio, cioè se si tratta di carbonio alloctono o autoctono, se derivato da materiale proveniente dalla zona litorale o da quella pelagica del lago. Quando fonti multiple di alimento sono disponibili in un ambiente, il loro contributo relativo nella dieta di un consumatore può essere stimato tramite l'applicazione del *linear mixing models* (Phillips 2001; Phillips & Koch 2002). Inoltre, il *fingerprint* isotopico di un organismo ne identifica la posizione trofica, vale a dire il livello nella scala dei rapporti rispetto ai produttori primari (consumatori primari, secondari ecc.), in dipendenza dal livello di arricchimento nell'isotopo pesante dell'azoto ($\delta^{15}\text{N}$).

Il modello ARIMA

I primi studi per la ricostruzione delle reti trofiche nel lago Maggiore risalgono agli anni '70, con il modello statistico ARIMA (*Autoregressive Moving Average*) proposto da Argentesi & de Bernardi (1978). Tale modello investigava le relazioni preda-predatore all'interno della comunità zooplanctonica, partendo dalle serie temporali di dati di densità e biomassa e

prendendo in considerazione anche aspetti legati alle dimensioni corporee dello zooplancton, in particolare alla taglia e all'età di *Daphnia* sp. (Fig. 7).

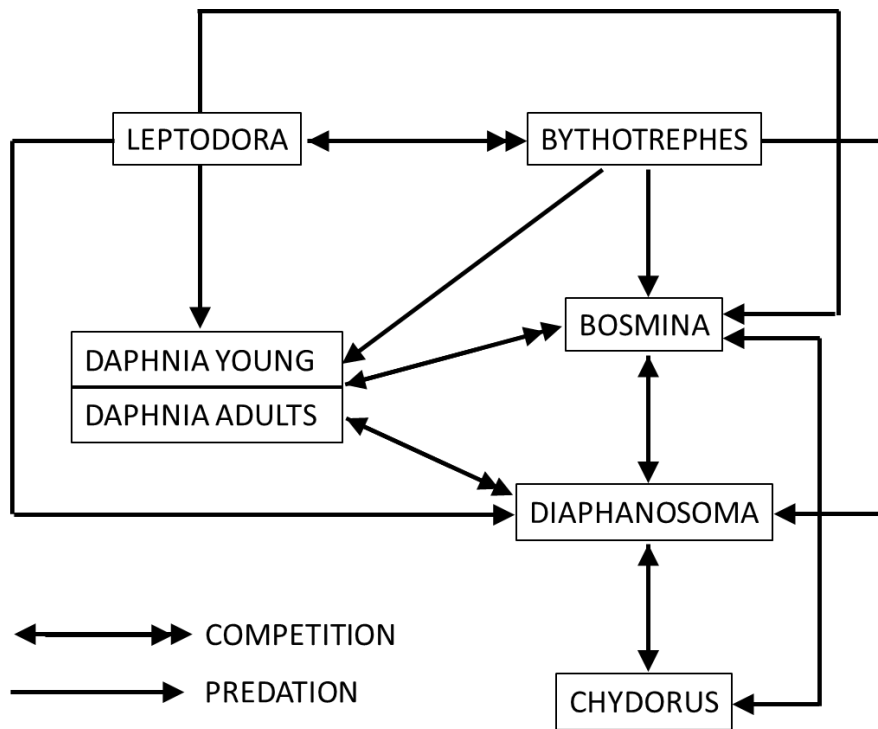


Fig. 7. Schema delle interazioni trofiche (predazione e competizione) che intercorrono tra i crostacei planctonici del lago Maggiore (Argentesi 1978).

Differenze nel segnale isotopico di carbonio e azoto all'interno degli ecosistemi d'acqua dolce

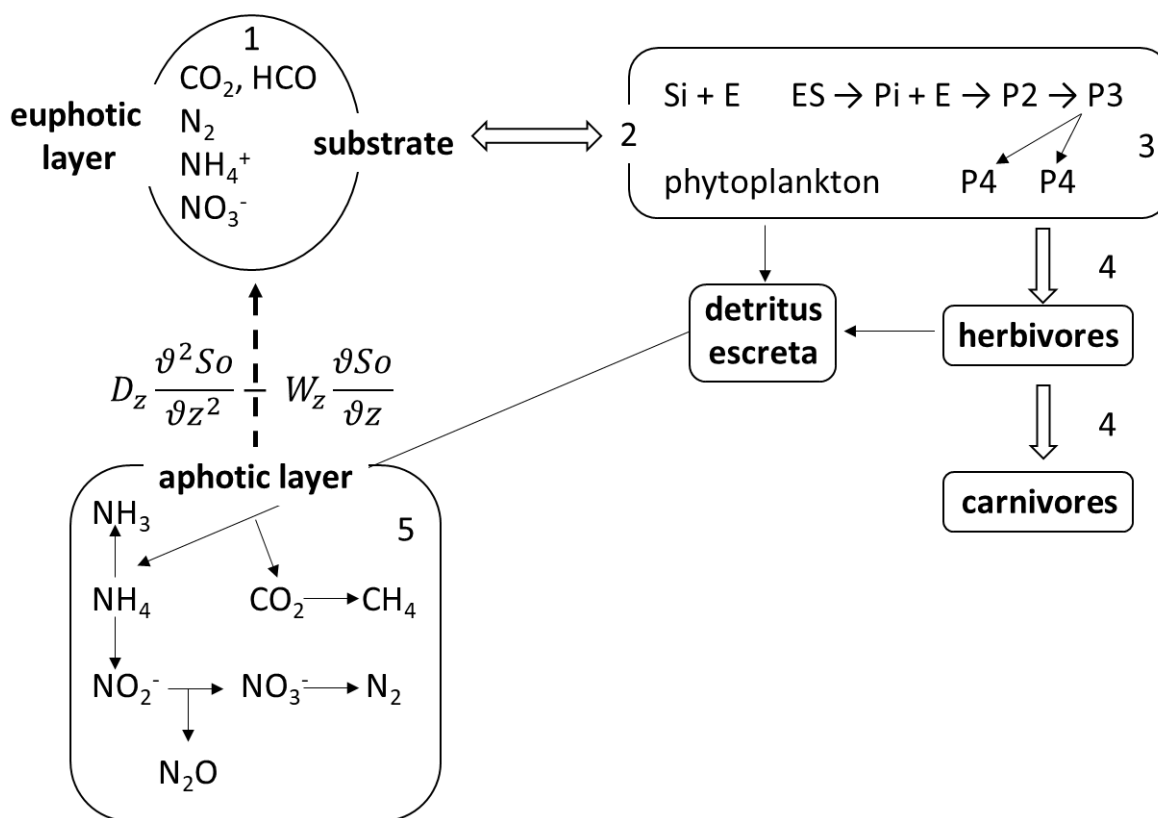


Fig. 8. Rappresentazione schematica dei diversi tipi di frazionamento del carbonio e dell'azoto negli ecosistemi acquatici d'acqua dolce (Wada 2009).

Le molecole sono sottoposte a diversi tipi di frazionamento; pertanto, la distribuzione degli isotopi negli ecosistemi non è omogenea. I principali fattori che regolano la distribuzione degli isotopi in un ecosistema (Fig. 8) sono:

(1) Il *fingerprint* isotopico dei substrati (come l'anidride carbonica e l'azoto inorganico). Infatti, la composizione isotopica sia della materia organica che inorganica è strettamente dipendente dalla sua origine;

(2) Gli effetti cinetici sugli isotopi durante i processi di assorbimento nei vegetali. In questi ultimi, il $\delta^{13}\text{C}$ è determinato dalla dinamica della fissazione di CO_2 durante la fotosintesi. Le piante C3 e C4 (a seconda del tipo di reazioni che avvengono nella seconda parte della fotosintesi) si distinguono piante C3 e C4. Per le C3 il primo

composto organico della fotosintesi è a gliceraldeide 3-fosfato, mentre per le piante C4 è l'ossalacetato, a quattro atomi di carbonio) e i vegetali terrestri presentano differenti contenuti in ^{13}C , e risultano a loro volta differire dal fitoplancton. Il contenuto di ^{13}C di quest'ultimo a sua volta differisce da quello del fitobenthos;

(3) Le reazioni biochimiche. Nell'acqua, le sostanze organiche e inorganiche sono sottoposte a processi fisico-chimici che possono modificare la loro composizione isotopica. Ad esempio, un aumento di $\delta^{15}\text{N}$ ‰ in un ecosistema può essere causato dall'evaporazione dell' NH_3 e dalla denitrificazione ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{N}_2$);

(4) Effetto trofico durante i processi di alimentazione. La correlazione tra il rapporto $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e il livello trofico corrispondente è stata dimostrata chiaramente in diversi ecosistemi. Il flusso di sostanza organica lungo la catena alimentare dai produttori primari (costituenti la base alimentare) agli animali di livelli trofici più elevati può essere ricostruito attraverso la misura dei loro $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$. I valori di $\delta^{13}\text{C}$ e di $\delta^{15}\text{N}$ degli animali, durante un singolo processo di nutrizione, il cosiddetto effetto trofico, vengono dunque descritti dalle seguenti equazioni:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{predatore}}\text{‰} = (1 \sim 2) \text{TL}_{\text{preda}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{preda}} \quad (4)$$

Valori di $\delta^{13}\text{C}$ del predatore entro al massimo 2 volte quelli della fonte alimentare sono indicativi della dipendenza dalle sante fonti di carbonio.

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{predatore}}\text{‰} = (3,4) (\text{TL}_{\text{predatore}} + \delta^{15}\text{N}_{\text{preda}}) \quad (5)$$

dove: TL= livello trofico (1 per i produttori primari, 2 per i consumatori ecc.) (Wada 2009). Dove 3,4= λ = frazionamento trofico.

Il segnale isotopico del predatore risulta arricchito rispetto a quello della preda in conseguenza del fatto che durante i processi metabolici viene favorita l'escrezione dell'isotopo più leggero, a cinetica più veloce. Il valore soglia di arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$, (altrimenti detto frazionamento trofico), trova in letteratura valori differenti. Secondo Post (2002) sarebbe pari, come sopra evidenziato a 3,4. Tuttavia, laddove possibile sembra essere preferibile utilizzare il valore minimo di arricchimento predatore –preda misurato nel corso dell'anno. Tale valore, come si vedrà più avanti, varia da ambiente ad ambiente, e nello stesso ambiente, in dipendenza dalla stagione, e dall'azione di predatore da parte della fauna ittica.

Quando vi è un'unica fonte alimentare, la posizione trofica può essere espressa dalla seguente relazione lineare:

$$X = (\delta^{15}\text{N}_{\text{predatore}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{preda}}) / \lambda + \text{TL} \quad (6)$$

Se un *taxon* occupa la stessa posizione trofica durante l'anno, la differenza:

$$\Delta\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{predatore}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{preda}} \quad (7)$$

dovrebbe rimanere costante ed esibire minore variabilità dell'arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ per livello trofico (λ) (Post 2002).

(5) Processo di rimineralizzazione batterica della materia organica, che porta ad un impoverimento del contenuto isotopico di carbonio.

Attraverso l'utilizzo di SIA, in particolare dall'indagine dei segnali di $\delta^{13}\text{C}$, è possibile distinguere se un organismo vive prevalentemente nella zona litorale o in quella pelagica, e all'interno di quest'ultima, se negli strati superficiali o in quelli profondi.

Molti studi hanno evidenziato in ambienti lacustri un arricchimento isotopico di carbonio dalla zona pelagica a quella litorale (Fig. 9; France, 1995; Kiyashko et al. 1998; Jones et al. 1998; Grey et al. 2000; Grey & Jones 2001; Visconti et al. 2011). Tale arricchimento è dovuto alla diversa composizione isotopica dei produttori primari nella zona litorale e pelagica, ai diversi percorsi metabolici degli organismi e alle diverse fonti di carbonio. Nella zona pelagica è maggiormente disponibile e abbondante il carbonio autoctono, mentre in quella litorale il carbonio alloctono.

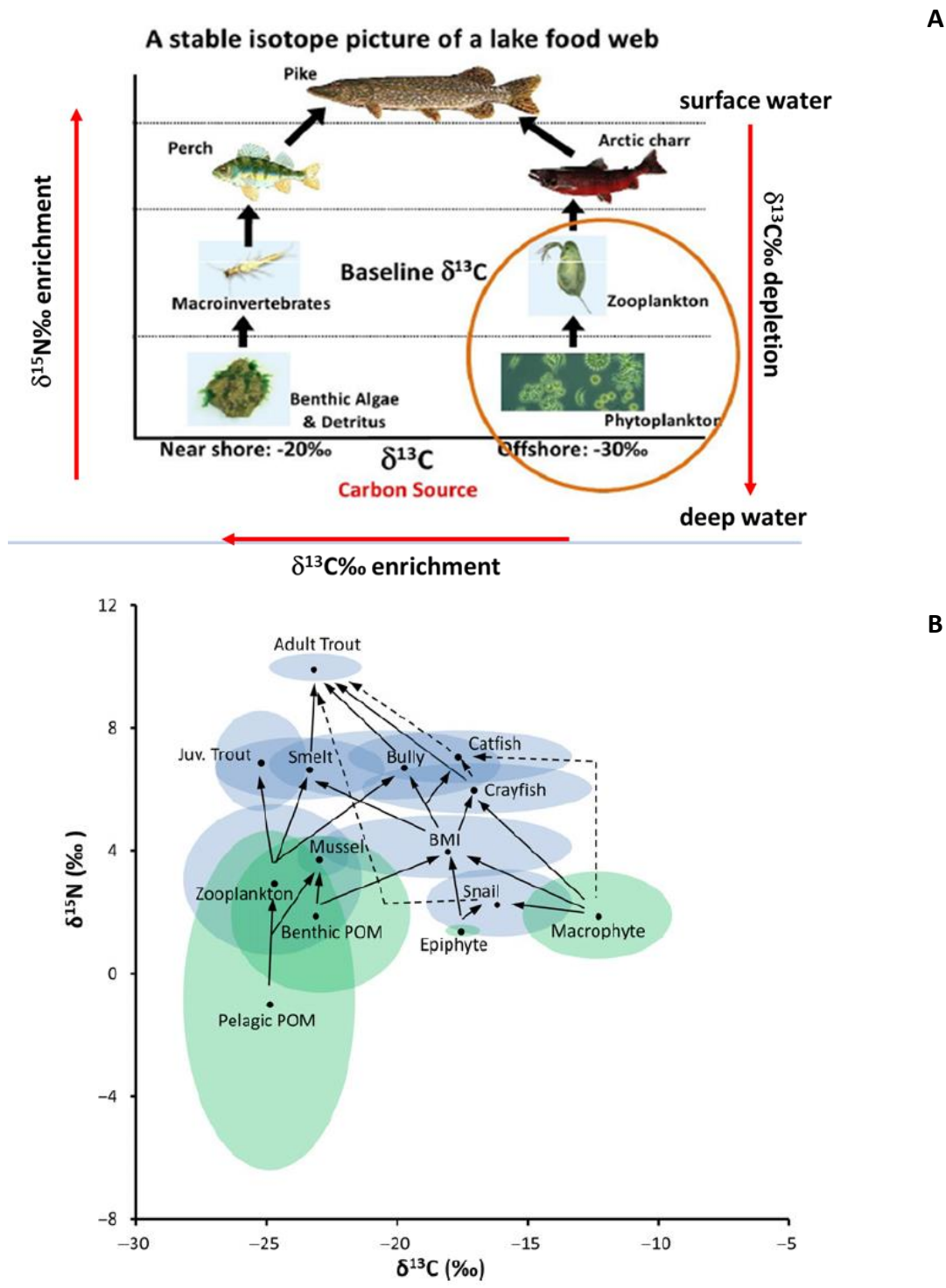


Fig. 9. Esempio della struttura della catena alimentare della zona pelagica e litorale di un lago (A) (www.slideshare.net). Valori medi (9 siti campionati 6 volte nel corso del biennio 2014-2015) dei segnali isotopici di azoto e carbonio della catena alimentare del lago Taupo. I punti neri rappresentano i valori medi del gruppo funzionale e le ellissi i valori di deviazione standard. Le fonti alimentari sono evidenziate dal colore azzurro, mentre i consumatori dal verde. Le frecce indicano le interazioni trofiche identificate dal modello misto Bayesiano MixSIAR (freccie tratteggiate = contributo alla dieta < 10%) (B) (Stewart et al. 2017).

Nella colonna d'acqua solitamente si registra un deperimento del carbonio dalla superficie verso le acque più profonde, a causa del frazionamento di CO₂ durante la dissoluzione e delle fonti di DIC (carbonio inorganico disciolto) che sono più arricchite in superficie a causa dei processi fotosintetici, e più negative in acque profonde a causa della mineralizzazione della sostanza organica (France & Peters 1997).

La figura 9 A mostra i segnali di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nelle diverse zone di un lago, con la zona litorale più arricchita in $\delta^{13}\text{C}$ rispetto a quella pelagica. La figura 9 B ben esemplifica le complicate interazioni trofiche che intercorrono tra gli organismi d'acqua dolce nello studio del lago Taupo lago (Stewart *et al.* 2017).

Il concetto di linea di base nell'analisi degli isotopi stabili

Gli ecosistemi hanno fonti alimentari multiple con distinti segnali isotopici di C e N, nonostante gli organismi possano occupare lo stesso livello trofico. Tali differenze nella composizione isotopica dei produttori primari pongono le basi di una linea di base che deve essere presa in considerazione nel calcolo di livelli trofici e delle interazioni all'interno della rete trofica. Inoltre, all'interno dello stesso ecosistema, i segnali isotopici dei produttori primari variano nelle diverse zone, cosicché sarebbe necessario definire un'appropriata linea di base per ogni diversa zona dello stesso lago (litorale, pelagica, profonda) per il calcolo delle posizioni nei livelli trofici (Vander Zanden & Rasmussen 1999).

I consumatori primari sono considerati da molti una scelta migliore come organismi rappresentativi della linea di base in quanto integrano le fonti alimentari su un lungo periodo di tempo e sono meno soggetti a rapida variabilità spaziale e temporale rispetto ai produttori primari.

Lo zooplancton è spesso utilizzato come linea di base pelagica di un lago e, tra i vari *taxa*, *Daphnia* sp. viene sempre più utilizzata come organismo rappresentativo della linea di base in quanto possiede delle abitudini alimentari sostanzialmente costanti e di tipo non selettivo, sia nelle diverse stagioni sia in diversi tipi di laghi.

Pertanto *Daphnia* sp. è stata scelta come organismo della linea di base pelagica del lago Maggiore. La presenza di una significativa correlazione tra seston (particellato sospeso di

dimensioni $\leq 50 \mu\text{m}$) e segnale isotopico del carbonio hanno convalidato tale scelta (Visconti & Manca 2011).

Secondo de Niro & Epstein (1978), una comune fonte di carbonio organico viene attribuita quando il frazionamento F segue questa formulazione:

$$F = \delta^{13}\text{C}_{\text{predatore}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{preda}} \leq 0.8 \text{‰} (\pm 1.1 \text{‰ S.D.}) \quad (8)$$

In generale, un *taxon* viene considerato supportato dalla linea di base pelagica quando il suo $\delta^{13}\text{C}$ differisce meno di 1-2 volte rispetto a quello misurato per la linea di base. Qualora esso sia differente, si ipotizza l'utilizzo di fonti multiple di carbonio da parte del *taxon* considerato (de Niro & Epstein 1978).

$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ e stagionalità

I segnali isotopici di C e N negli ecosistemi acquatici variano molto nel tempo e nello spazio. Una adeguata analisi per comprendere le cause della variabilità di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ nella comunità planctonica di un lago è un prerequisito per l'utilizzo dell'analisi degli isotopi stabili come strumento di ricerca ecologica.

La variabilità di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ nella comunità planctonica è determinata sia da fattori abiotici sia da fattori biotici.

Fattori abiotici:

- Temperatura dell'acqua, regime di luce, regime di pioggia sono determinanti della variabilità dei segnali di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. La temperatura controlla la solubilità della CO_2 e di conseguenza il frazionamento degli isotopi di carbonio durante l'uptake del fitoplancton (Rau et al. 1989). La stratificazione termica della colonna d'acqua influenza l'attività cellulare, l'assimilazione e la competizione per i nutrienti e per la luce, la velocità di diffusione di CO_2 e HCO_3^- e, come risultato, la successione delle specie e la composizione specifica della comunità fitoplanctonica (Zohary et al. 1994);
- Riciclo dei nutrienti;
- Variazioni nel contributo di sostanza organica terrestre (Grey et al. 2001). Evidenze che lo zooplancton lacustre è supportato da fonti di carbonio alloctono sono state fornite da molti studi ecologici (Salonen & Hammar 1986; Hessen et al. 1989;

Tanentzap et al. 2014), e l'utilizzo dell'analisi degli isotopi stabili ha reso possibile una quantificazione di tali fonti e rivelato che esiste una grande variabilità tra i diversi sistemi e le diverse stagioni (Salonen & Hammar 1986; Hessen et al. 1989);

- Produzione primaria e concentrazione di CO₂ (Takahashi et al. 1990).

Fattori biotici:

Le diverse caratteristiche delle variabili biologiche negli ecosistemi lacustri possono venir viste come risposte del fitoplancton alle fluttuazioni stagionali biogeochimiche. Le differenze nelle fonti primarie che sostengono le reti trofiche lacustri sono connesse alle successioni fitoplanctoniche. Specie fitoplanctoniche diverse hanno un diverso frazionamento del carbonio (Falkowski 1991) che porta a segnali diversi di $\delta^{13}\text{C}\%$. Poiché il segnale isotopico è funzione dei parametri ambientali e della concentrazione intracellulare di carbonio, differenze in dimensioni e morfologia delle cellule sono espressione del segnale isotopico del carbonio nelle diverse specie.

Le fonti non-fitoplanctoniche, ovvero batteri, protozoi e particolato organico sospeso, sono importanti fonti di carbonio specialmente in inverno, quando quelle fitoplanctoniche sono scarse nel lago.

I segnali di $\delta^{13}\text{C}$ nei consumatori primari zooplanctonici riflettono la loro dieta, per cui seguono le fluttuazioni stagionali, che dipendono soprattutto dal POM (*Particulate Organic Matter*) alloctono nei periodi invernali e dal fitoplancton in quelli tardo primaverili ed estivi (Pel et al. 2003; Matthews & Madzumder 2005; Perga & Gerdeaux 2006).

Nel corso delle stagioni avvengono anche cambiamenti nelle abitudini alimentari degli organismi zooplanctonici e delle loro posizioni trofiche (Karlsson et al. 2003). Tali cambiamenti devono venir presi in considerazione quando si analizzano i segnali di $\delta^{15}\text{N}$ nei consumatori primari e secondari (Grey et al. 2001; Karlsson et al. 2003).

Comunità fitoplanctoniche e segnali di $\delta^{13}\text{C}$

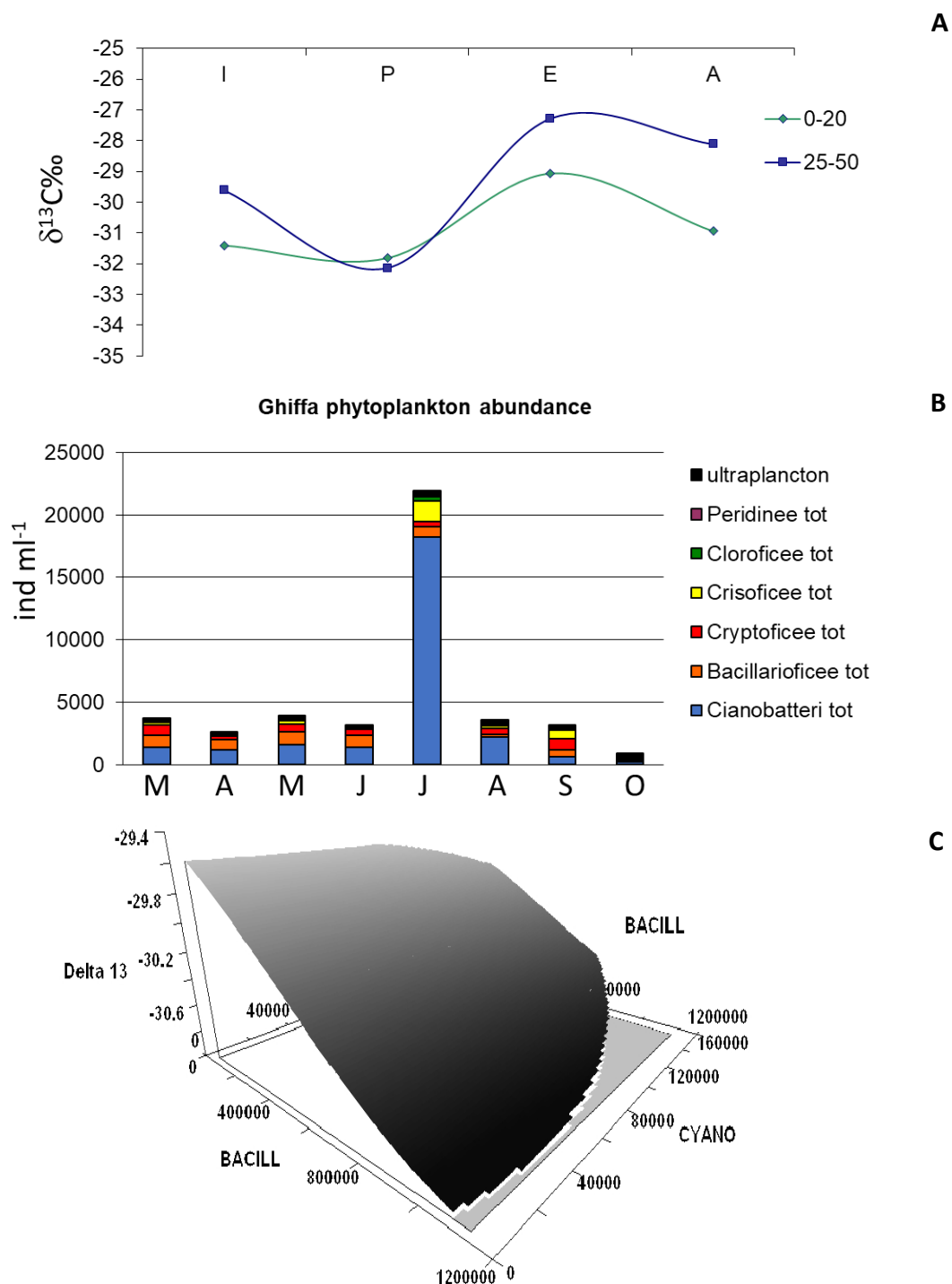


Fig. 10. Variazione stagionale del segnale isotopico di carbonio del particolato di dimensioni ≤ 50 μm del lago Maggiore durante il 2008 (A). Abbondanza numerica del popolamento fitoplanctonico del lago Maggiore nel corso del 2008 (B). Visualizzazione grafica dell'analisi di regressione moltiplicativa non-parametrica (NPMR) (C) (Caroni et al, 2012).

Il fitoplancton rappresenta la componente autotrofa dei produttori primari alla base delle reti trofiche acquatiche; è quindi di fondamentale importanza valutare il suo segnale isotopico quando si intraprendono studi globali di reti trofiche lacustri per mezzo dell'analisi degli isotopi stabili.

Uno studio condotto nel lago Maggiore (Caroni et al. 2012; Fig. 10) ha indagato la variazione stagionale del segnale isotopico di carbonio del seston durante il 2008. Tale segnale è risultato correlato alle variazioni stagionali della comunità fitoplanctonica, studiata in termini di specie, gruppi morfo-funzionali (MBFG), dimensioni e morfologia delle cellule. Nel corso del 2008 nel lago Maggiore le Bacillarioficee (es. diatomee) sono risultate dominanti durante i mesi primaverili, quando il valore di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ rilevato era più negativo, e diminuivano durante l'estate, quando il valore di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ era, invece, più arricchito. Contemporaneamente, durante i mesi estivi aumentava, in termini di abbondanza numerica, il gruppo dei Cianobatteri. I risultati sono stati perfettamente in linea con le nozioni pregresse, ovvero un minor impoverimento in $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ dato dai Cianobatteri come conseguenza della loro capacità di utilizzo di HCO_3^- , rispetto alle Bacillarioficee. Infatti, studi pregressi (e.g. Hollander & McKenzie 1991; Zohary et al. 1994; Jones et al. 1998) hanno dimostrato che le diatomee sono caratterizzate da valori più negativi di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$, ad esempio è stato calcolato che il genere *Melosira* sp. abbia segnali molto negativi di $\delta^{13}\text{C}$ pari a circa -32 ‰.

Nello studio del 2012, è stata utilizzata l'analisi di regressione moltiplicativa non-parametrica (NPMR) per identificare quale tra i parametri fitoplanctonici considerati (specie fitoplanctoniche, gruppi morfo-funzionali (MBFG), dimensioni e morfologia delle cellule) fosse il miglior predictor della variazione di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ del seston nel lago Maggiore. L'analisi ha evidenziato come parametri fitoplanctonici statisticamente significativi le Bacillarioficee e due gruppi morfo-funzionali (G3 and G6; Fig. 10C).

Stagionalità del segnale di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nello zooplancton pelagico del lago Maggiore

L'utilizzo di *Daphnia* sp. come linea di base nel lago Maggiore ha evidenziato fluttuazioni stagionali sia nel segnale di $\delta^{13}\text{C}$ sia di $\delta^{15}\text{N}$. Il trend stagionale di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ per *Daphnia* sp.

mostra solitamente un arricchimento durante i mesi estivi e un impoverimento durante i mesi invernali, con valori intermedi in primavera e in autunno (Fig. 11).

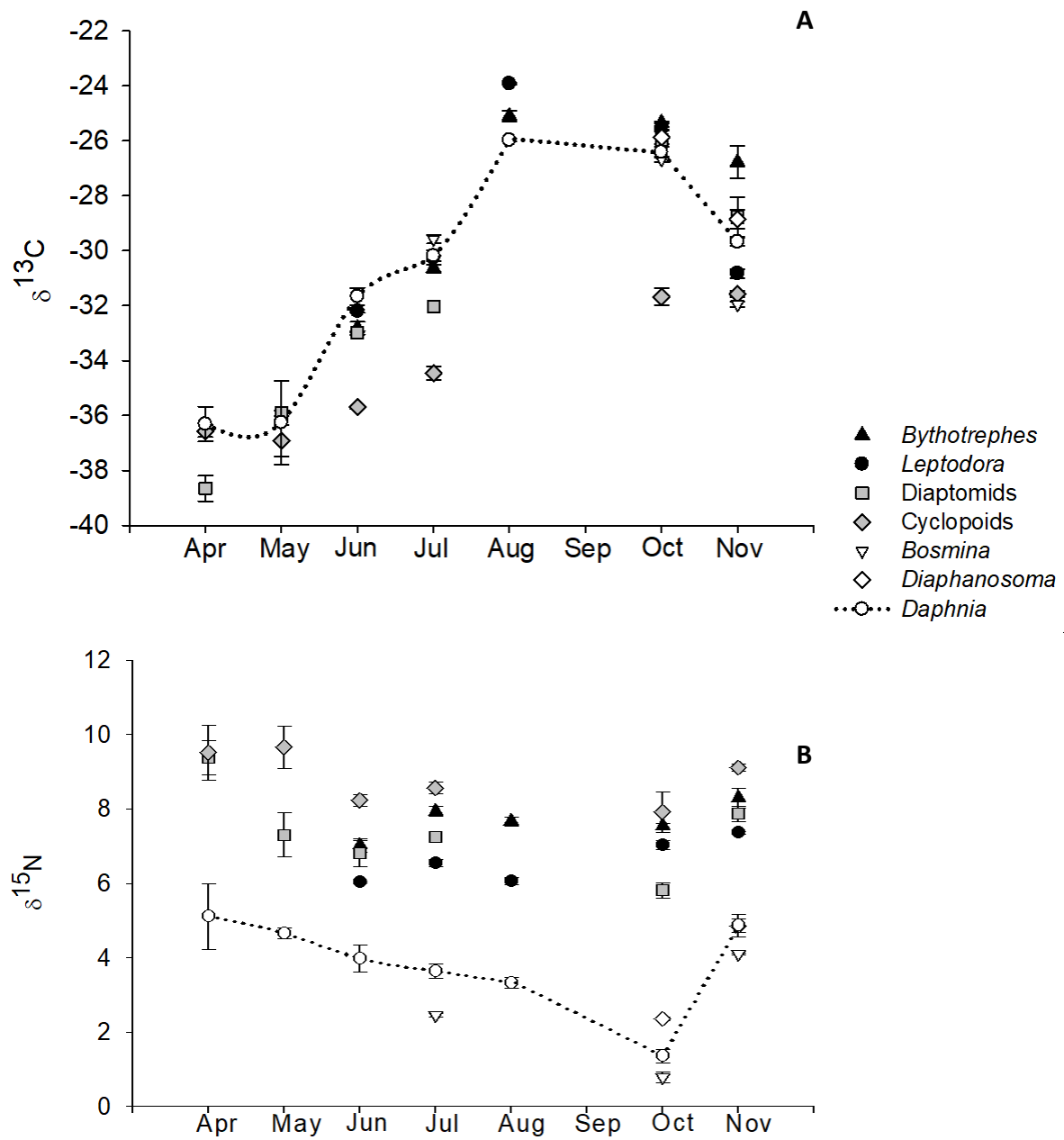


Fig. 11. Variazioni del segnale isotopico del carbonio (A) e dell'azoto (B) nei crostacei costituenti lo zooplancton pelagico del lago Maggiore nel corso del 2008 (Visconti & Manca 2011).

Il segnale di $\delta^{13}\text{C}$ di *Daphnia* sp., in quanto consumatore primario, riflette la sua dieta e quindi segue le fluttuazioni stagionali delle fonti alimentari. In inverno e all'inizio della primavera dipende largamente dal POM (Particulate Organic Matter) mentre in tarda

primavera e in estate maggiormente dal fitoplancton (Matthews & Madzumder 2005; Perga & Gerdeaux 2006).

Nel lago Maggiore si riscontra una tipica successione fitoplanctonica con dominanza di Bacillarioficee in primavera e un aumento di Cianobatteri in estate. Il $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ del fitoplancton si riflette nel segnale $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ dello zooplancton, poiché come visto in precedenza, le Bacillarioficee tendono ad avere valori più negativi di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ mentre i Cianobatteri valori meno impoveriti.

La correlazione trovata nel lago Maggiore tra la variazione stagionale del segnale $\delta^{13}\text{C}$ di *Daphnia* sp. e del seston ($r = 0.86$; $p < 0.01$; $N = 13$; Visconti et al., 2011) è un'ulteriore conferma che *Daphnia* sp. rappresenta un appropriato indicatore della linea di base pelagica del lago, con cui i segnali isotopici del carbonio degli altri organismi zooplanctonici e pesci zooplanctivori possono venir confrontati.

Il segnale isotopico di $\delta^{15}\text{N}$ di *Daphnia* sp. si presenta più alto nei mesi invernali, decresce durante i mesi primaverili ed estivi e raggiunge nuovamente valori maggiori in novembre e tardo autunno (Fig. 11B).

Analisi stagionale e inter-annuale di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dello zooplancton

La figura 12A mostra un esempio delle variazioni stagionali nei segnali isotopici di carbonio e azoto dei crostacei zooplanctonici del lago Maggiore. Nell'arco dell'anno si osserva una transizione da valori nel segnale isotopico dell'azoto invernali più arricchiti e più impoveriti nel segnale isotopico del carbonio a valori estivi meno ricchi nell'isotopo pesante dell'azoto e meno impoveriti in quello del carbonio. Con l'autunno si osserva un'inversione di tendenza con valori più vicini a quelli invernali. In buona sostanza i diversi organismi zooplanctonici compiono nell'arco dell'anno un vero e proprio ciclo. I consumatori secondari sembrano ricalcare le orme della linea di base pelagica costituita da *Daphnia*, con l'eccezione dei ciclopidi che risultano avere un ambito di variazione piuttosto ristretto in entrambi gli isotopi. La variazione stagionale è nettamente predominante rispetto a quella interannuale. Un esempio relativo alla linea di base per il periodo 2010-2018 è mostrato nella figura 12B. Le variazioni più ampie sono quelle relative al $\delta^{13}\text{C}$, con valori nei diversi periodi dell'anno sempre al di sotto del 10%.

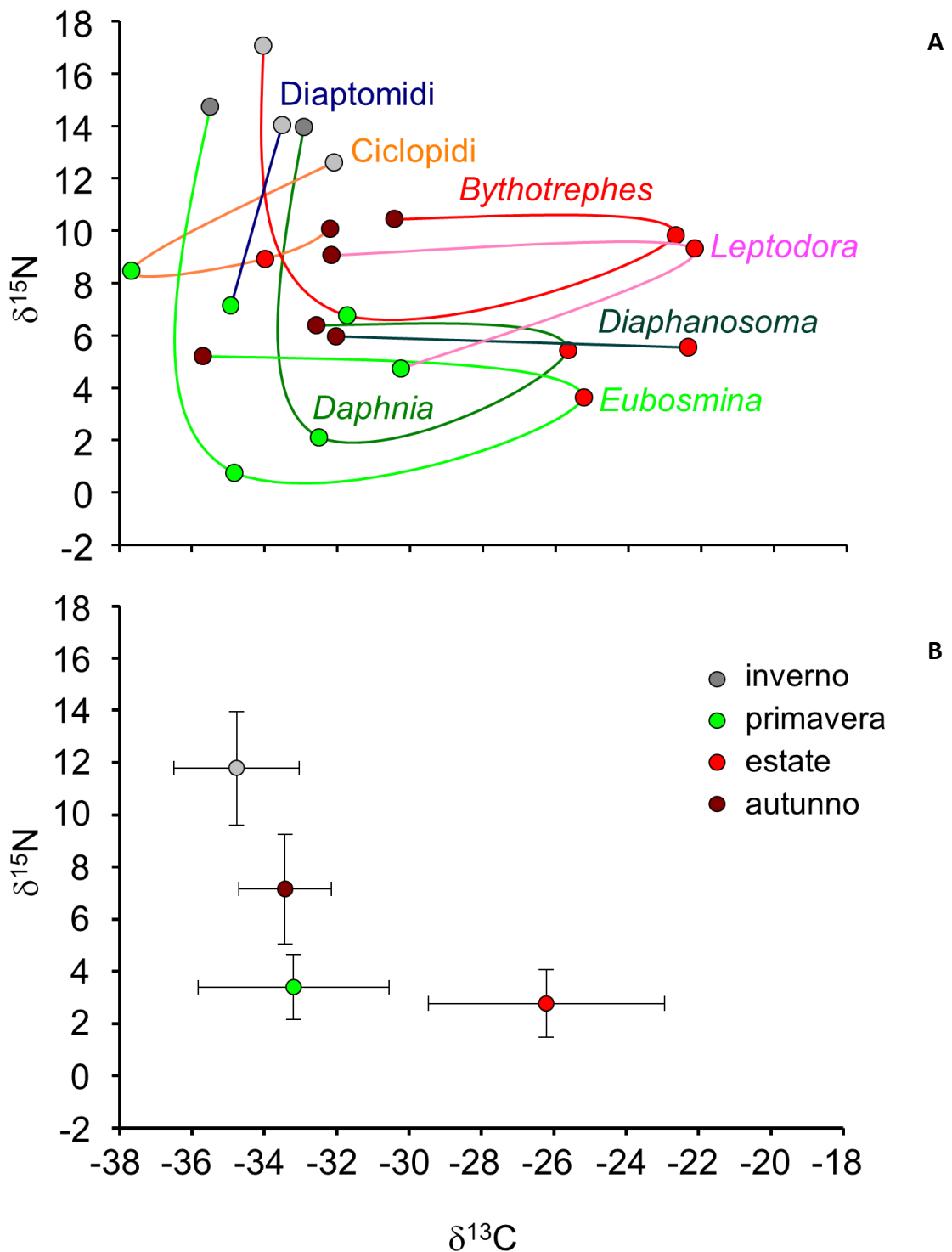


Fig. 12. Grafico trofochimico nel quale sono rappresentate le variazioni stagionali dei segnali isotopici di carbonio e azoto dei crostacei zooplanctonici pelagici del lago Maggiore nel corso del 2011 (A). Valori medi stagionali interannuali e relativa deviazione standard dei segnali isotopici di carbonio e azoto di *Daphnia* (linea di base) nel periodo 2010-2017 (B).

Uno studio ecologico iniziato nel 2018 nel lago Maggiore (Caroni et al. in prep.; Fig. 13) sta esaminando i segnali di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ della comunità zooplanctonica, in particolare i segnali delle diverse specie (*Daphnia longispina-galeata* gr., *Eubosmina longispina*, *Diaphanosoma brachyurum*, *Bythotrephes longimanus*, *Leptodora kindtii*) e gruppi presenti nel lago (diaptomidi e ciclopidi).

I segnali di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ delle singole specie e/o gruppi zooplanctonici sono stati analizzati insieme ad alcune variabili ambientali durante un periodo di tempo di otto anni (2009-2016) per identificare quali fattori determinino in maggior misura la variabilità stagionale e inter-annuale di $\delta^{13}\text{C}\%$ e $\delta^{15}\text{N}\%$.

Tra le molte tecniche statistiche, si è utilizzata una decomposizione dei dati in serie temporali mediante il programma R. Si è voluto in tal modo esaminare e rivelare la presenza di una stagionalità nei dati e di eventuali trend a lungo termine nel corso degli otto anni presi in considerazione. I segnali di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ delle singole specie e/o gruppi zooplanctonici sono stati analizzati singolarmente.

L'esempio qui presentato (Fig. 13) focalizza l'attenzione sul segnale di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ di *Daphnia*, organismo scelto anche in questo studio come rappresentativo della linea di base pelagica del lago Maggiore. Si può notare che esiste una evidente stagionalità nei segnali isotopici sia di $\delta^{13}\text{C}$ sia di $\delta^{15}\text{N}$ e un trend durante l'arco degli otto anni analizzati. I risultati ottenuti da questo tipo di analisi sono poi stati correlati ai trend a lungo termine di alcune variabili ambientali come temperatura e clorofilla *a*.

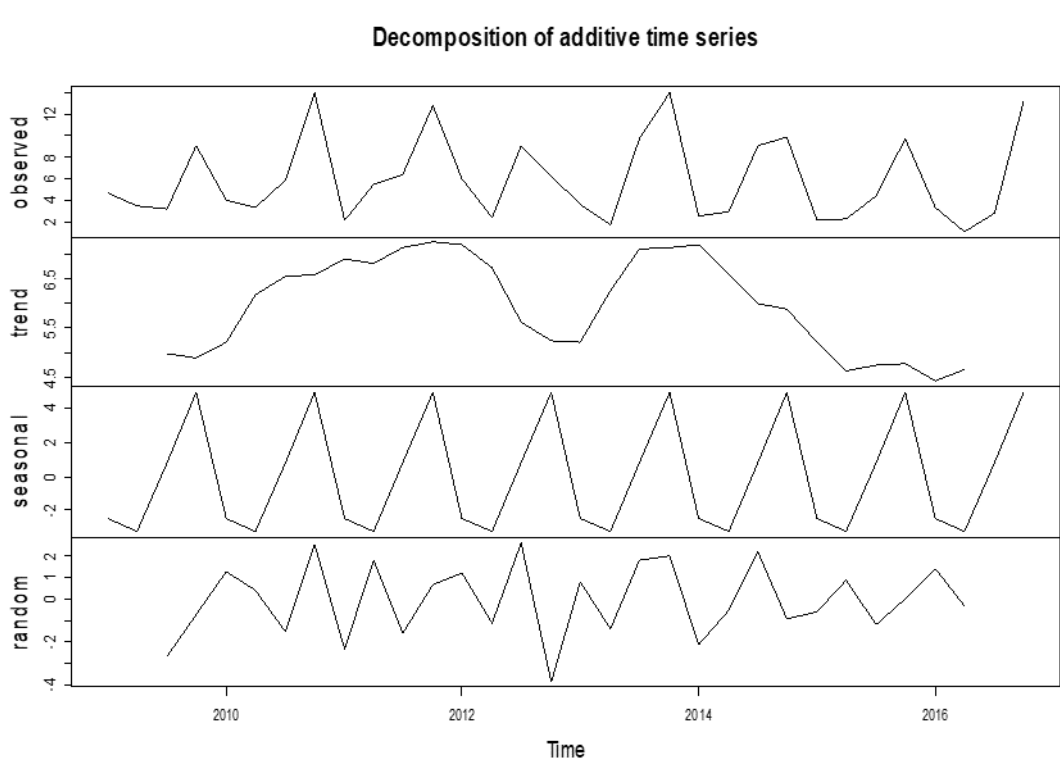
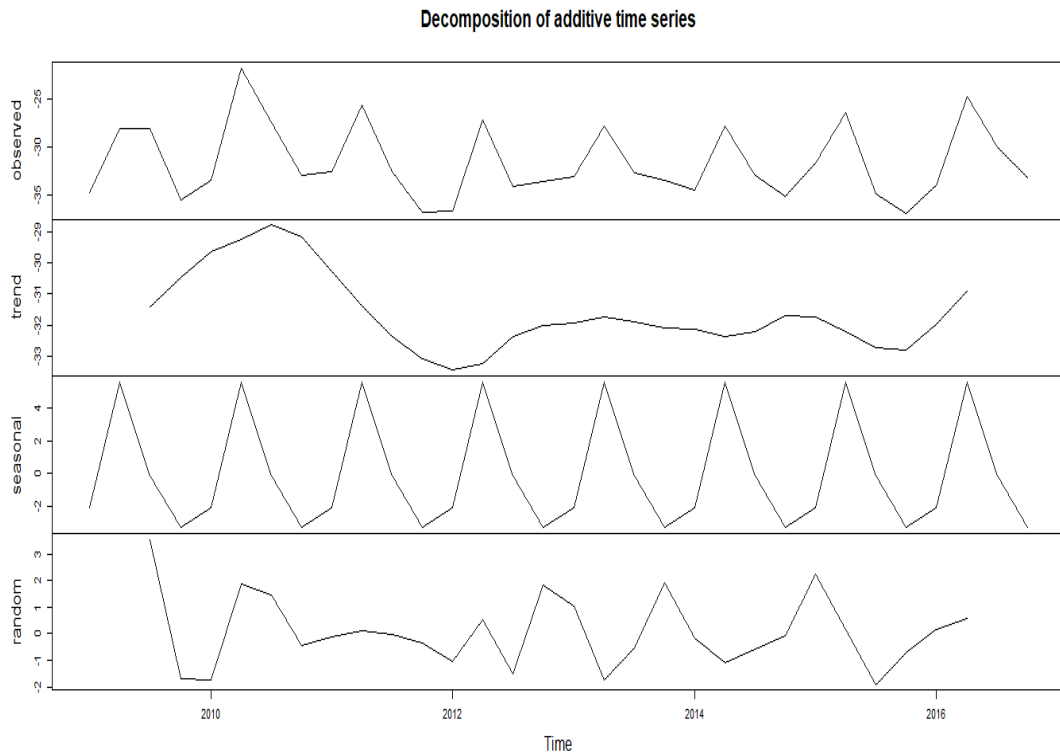


Fig. 13. Risultato della scomposizione dei dati in serie temporali, mediante il software R, del segnale isotopico di carbonio (A) e azoto (B) di *Daphnia* nel periodo 2008-2016 nel lago Maggiore (Caroni et al, in prep.).

Temperatura e segnale $\delta^{13}\text{C}$ di *Daphnia*

Le variabili fisiche, quali la temperatura, sono fattori importanti per le variazioni stagionali di $\delta^{13}\text{C}$. La temperatura controlla il frazionamento isotopico del carbonio e la stratificazione termica influenza le attività cellulari, l'assimilazione dei nutrienti, la competizione per la luce e, in ultima analisi, le successioni fitoplanctoniche in un lago.

Studi condotti nel lago Maggiore (Manca et al. 2009; Fig. 14) hanno dimostrato che i cambiamenti stagionali di $\delta^{13}\text{C}$ della linea di base sono correlati alla temperatura media dell'acqua (0-50 m di profondità). Analogamente ad altri laghi (e.g. lago di Ginevra) tali cambiamenti sono causati da variazioni delle fonti di carbonio del fitoplancton durante i periodi di stratificazione e di rimescolamento della colonna d'acqua. Anche nello studio più recente sul lago Maggiore (Caroni et al., 2018 in prep.) è stata trovata una relazione statisticamente significativa tra i valori di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ di *Daphnia* sp. e la temperatura dell'acqua sia stagionalmente nel corso di un solo anno (Fig 14 A), sia durante l'arco temporale di otto anni (2009-2016: Spearman rank correlation coefficient= 0.79. Fig. 14 B).

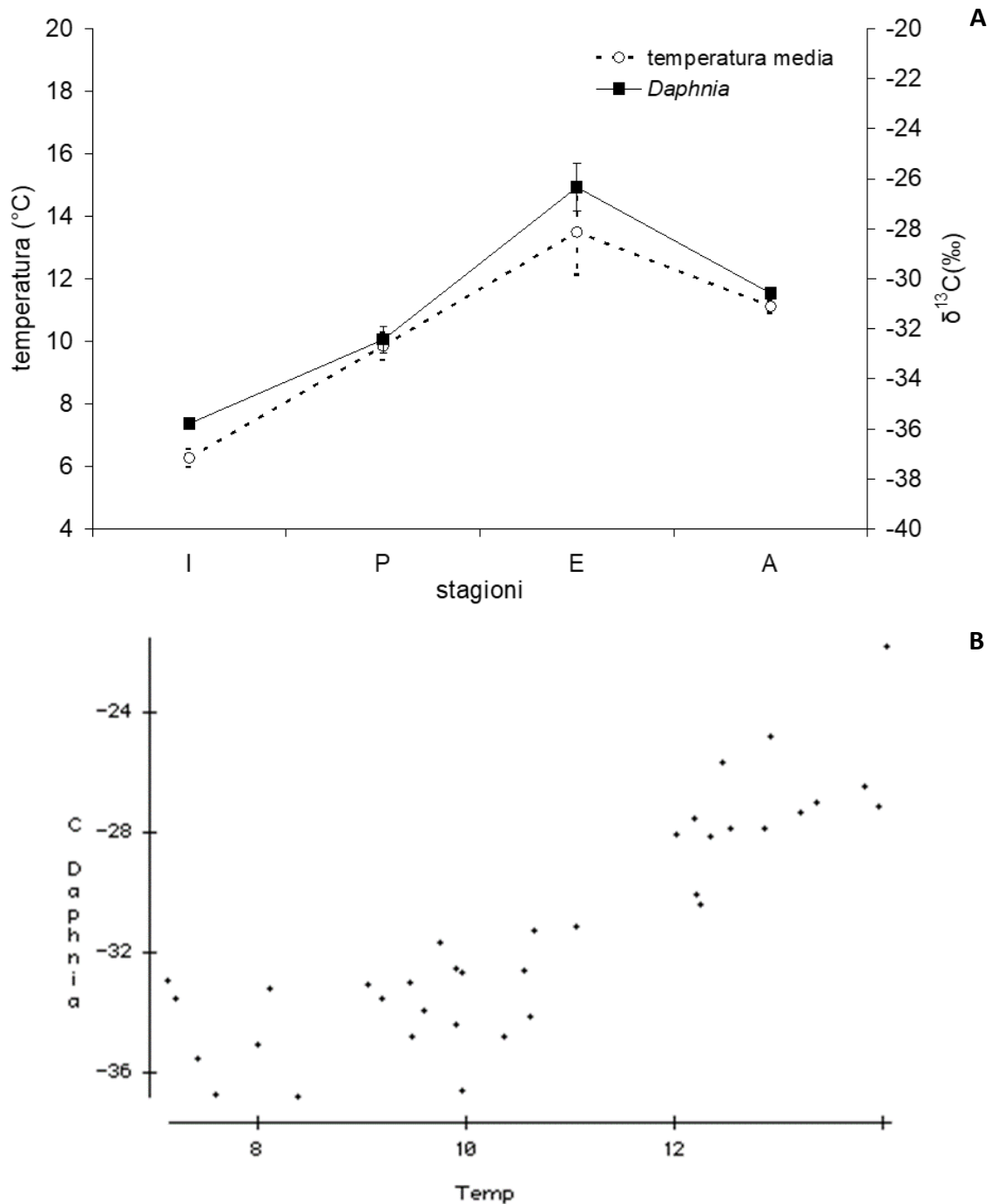


Fig. 14. Relazione tra temperatura media dello strato compreso tra 0-50 m della colonna d'acqua del lago Maggiore e segnali isotopici di carbonio del crostaceo zooplanctonico *Daphnia* nel 2008 (A; Manca et al. 2009) e nel periodo 2008-2016 (B; Caroni et al in prep.).

Modelli di reti trofiche del lago Maggiore tramite l'analisi degli isotopi stabili

Attraverso l'utilizzo di analisi di isotopi stabili di C e N, applicato ad organismi di diversi livelli trofici e di diverse zone del lago, è stato possibile ricostruire la rete trofica del lago

Maggiore. Il grafico in figura 15 rappresenta l'intervallo del segnale di $\delta^{13}\text{C}$ di ogni specie e/o gruppo zooplanctonico (asse x) e il livello trofico T (asse y).

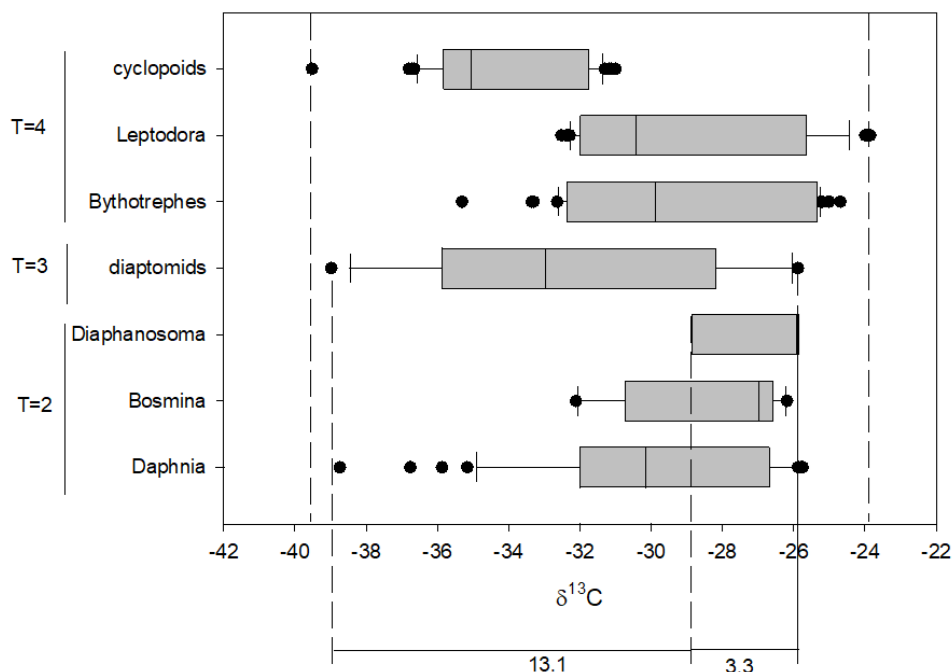


Fig. 15 Intervallo di variazione del segnale isotopico del carbonio nel corso del 2008 dei crostacei zooplanctonici del lago Maggiore nel corso del 2008 e relativo livello trofico(B).

Il grafico evidenzia che i diversi organismi sono specialisti o generalisti nell'utilizzo delle fonti alimentari. Ad esempio, *Diaphanosoma*, cladocero presente solamente durante il periodo tardo estivo, presenta un ridotto intervallo di variazione del segnale isotopico del carbonio rispetto agli altri consumatori primari e valori tipici delle acque calde e superficiali, data la loro tendenza ad occupare i primi 10 m d'acqua (Manca et al. 1990). I consumatori secondari (*Bythotrephes* e *Leptodora*) sono invece caratterizzati da un maggiore intervallo di variazione del segnale di $\delta^{13}\text{C}$, indice di una base alimentare ampia. Al contrario, i ciclopidi essendo caratterizzati da un intervallo ristretto appaiono meno generalisti nella scelta alimentare.

Un altro modo di rappresentare la rete trofica del lago Maggiore è questo diagramma concettuale (Fig. 16), in cui sono differenziate le diverse zone del lago, pelagica e litorale, in diverse stagioni dell'anno, inverno/primavera ed estate/autunno. In questo diagramma è ben evidente il cambiamento di habitat preferenziale di tre specie di pesci (coregone, agone e gardon) nelle diverse stagioni dell'anno e il conseguente cambio di abitudini alimentari, di

arricchimento isotopico e di interazioni all'interno della rete trofica lacustre. In particolare, risulta ben evidente il decremento nel segnale isotopico dell'azoto degli zooplanctonti predatori in primavera rispetto all'inverno, con la migrazione dei pesci zooplanctivori dal litorale al pelago lacustre.

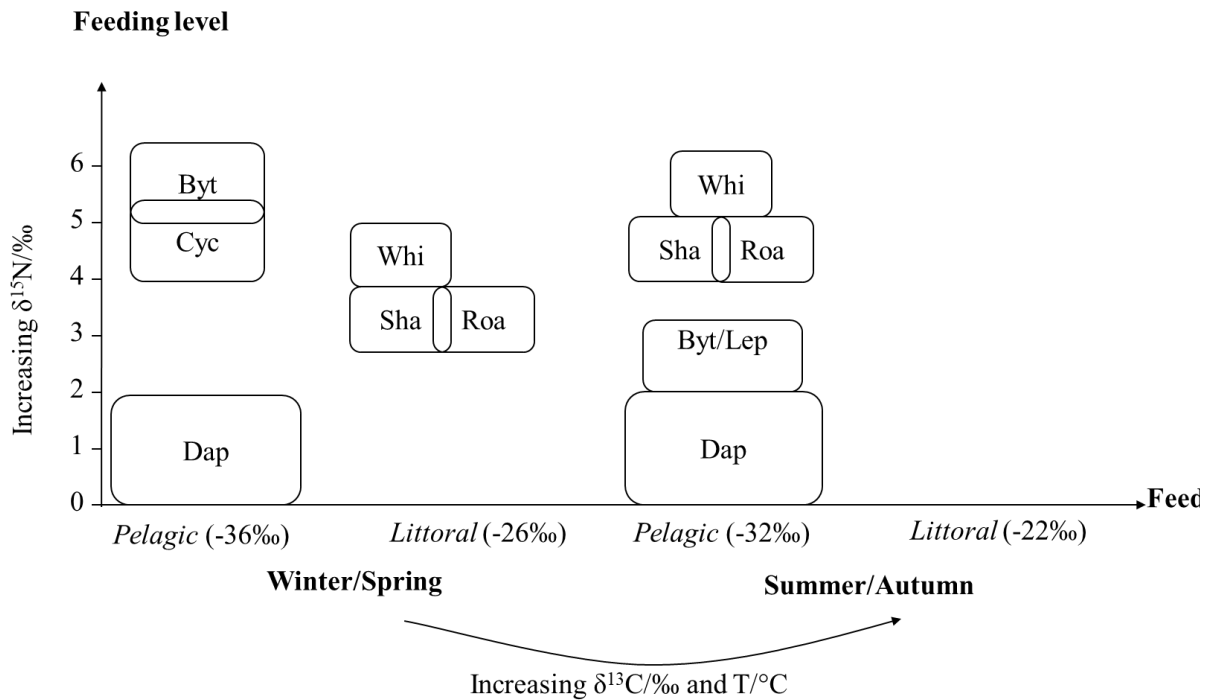


Fig. 16. Diagramma concettuale rappresentativo della rete alimentare pelagica e litorale del lago Maggiore. Byt: *Bythotrephes*; Lep: *Leptodora*; Cyc: Ciclopidi; Dap: *Daphnia*; Whi: Coregone; Sha: Agone; Roa: Gardon.

Analisi degli isotopi stabili: confronto fra litorale e pelago

È possibile ricostruire catene alimentari acquatiche utilizzando l'analisi degli isotopi stabili $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (SIA), come mostrato da Wada (2009). Il vantaggio dell'utilizzo di tale metodo consiste nella possibilità di scattare una sorta di fotografia istantanea di tutte le interazioni trofiche che intercorrono tra gli organismi acquatici. Tuttavia, tale schema non descrive le interazioni alimentari che intercorrono tra rete alimentare pelagica e litorale, che come è ben noto si possono verificare.

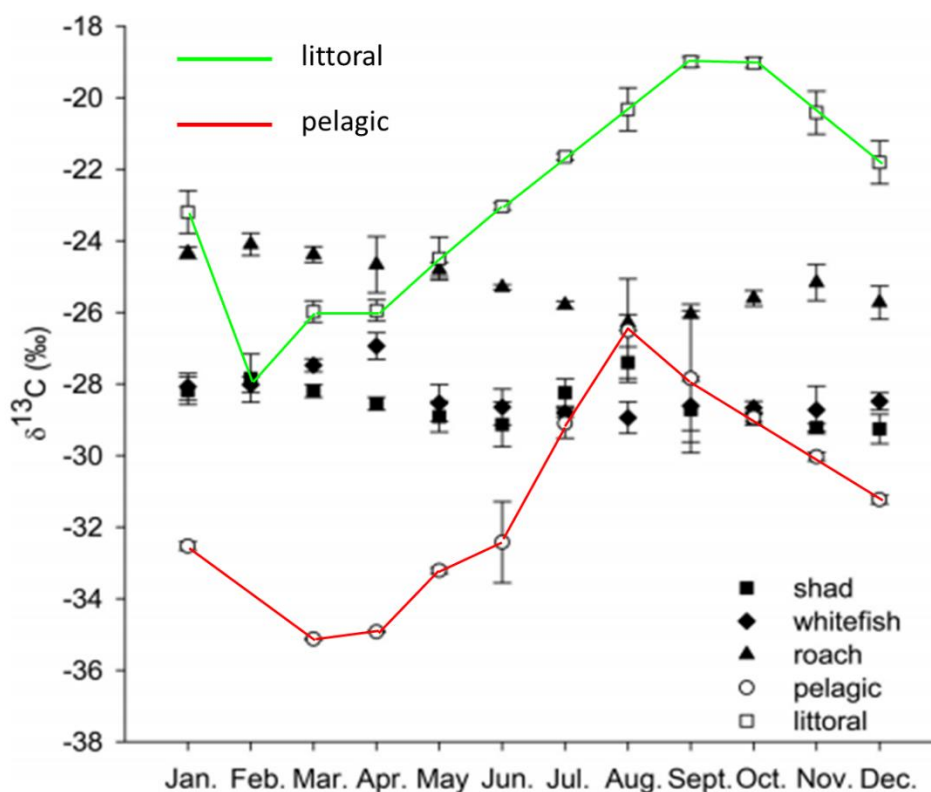


Fig. 17. Variazioni mensili dei segnali isotopici di carbonio e azoto di tre specie di pesci (agone, coregone e gardon) del lago Maggiore nel 2008. I simboli bianchi indicano il segnale isotopico delle linee di base litorali e pelagiche (Visconti et al. 2011).

Visconti et al. (2011) hanno condotto uno studio che individua e quantifica alcune delle interazioni alimentari che avvengono tra zona pelagica e litorale del lago. Nel grafico (Fig. 17) è rappresentata la firma isotopica del carbonio della linea di base della rete alimentare pelagica (linea rossa) e di quella litorale (linea verde). Lo studio ha evidenziato un costante impoverimento nel carbonio della linea di base pelagica rispetto a quella litorale durante tutto l'anno e un pattern temporale dei due segnali molto simile. Tale differenza consente di comprendere quando i consumatori, che in questo studio erano l'agone, il coregone e il gardon, erano maggiormente legati alle fonti alimentari litorali o a quelle pelagiche. Applicando il Modello Dinamico Misto (DMM) è possibile stimare il diverso contributo delle due fonti alimentari alla dieta di un consumatore. Ad esempio, a gennaio il gardon utilizzava solo fonti alimentari litorali, in quanto il valore di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ era molto simile a quello della linea di base del litorale, mentre in agosto si alimentava di prede pelagiche.

Il diverso *fingerprint* isotopico delle reti alimentari litorale e pelagica consente anche di rilevare l'impatto dell'invasione di nuove specie sulla rete alimentare acquatica (Fig. 18).

Vander Zanden et al. 1999). La figura posta in alto rappresenta i percorsi dei flussi di energia attraverso la rete alimentare in laghi non invasi, mentre nella figura in basso i flussi nei laghi in cui la specie aliena si è stabilita. Nei laghi di riferimento, le specie autoctone occupano il livello trofico più alto, grazie ad una dieta costituita per il 60% da pesci litorali arricchiti in ^{15}N e per il 40% di organismi zooplanctonici pelagici, che occupano il secondo livello trofico. Con l'introduzione della specie invasiva, i ricercatori hanno osservato un cambiamento nella struttura della rete alimentare e una predilezione delle specie native per le fonti alimentari pelagiche in seguito alla competizione con la specie invasiva per le prede litorali.

Un altro studio nel quale il metodo dell'analisi degli isotopi stabili è stato utilizzato per rilevare le conseguenze dell'invasione di una nuova specie sulla catena alimentare è quello condotto sul lago Maggiore da parte di Visconti et al. (2013; Fig. 19). Il grafico trofochimico rappresenta i segnali isotopici mensili di carbonio e azoto di tre specie ittiche (coregone, agone e gardon) nel corso del 2008. I simboli grigi indicano che le specie considerate utilizzavano fonti di carbonio pelagico mentre quelli bianchi che utilizzavano fonti di carbonio litorale. I dati riferiti al gardon, che è la specie invasiva, creano una nuvola che non si sovrappone mai ai dati delle altre specie. Ciò significa che il gardon e le specie native non predano mai contemporaneamente sulle stesse prede, pertanto non c'è competizione fra specie e per questo motivo questa invasione è stata definita "pacifica" (Visconti et al 2013).

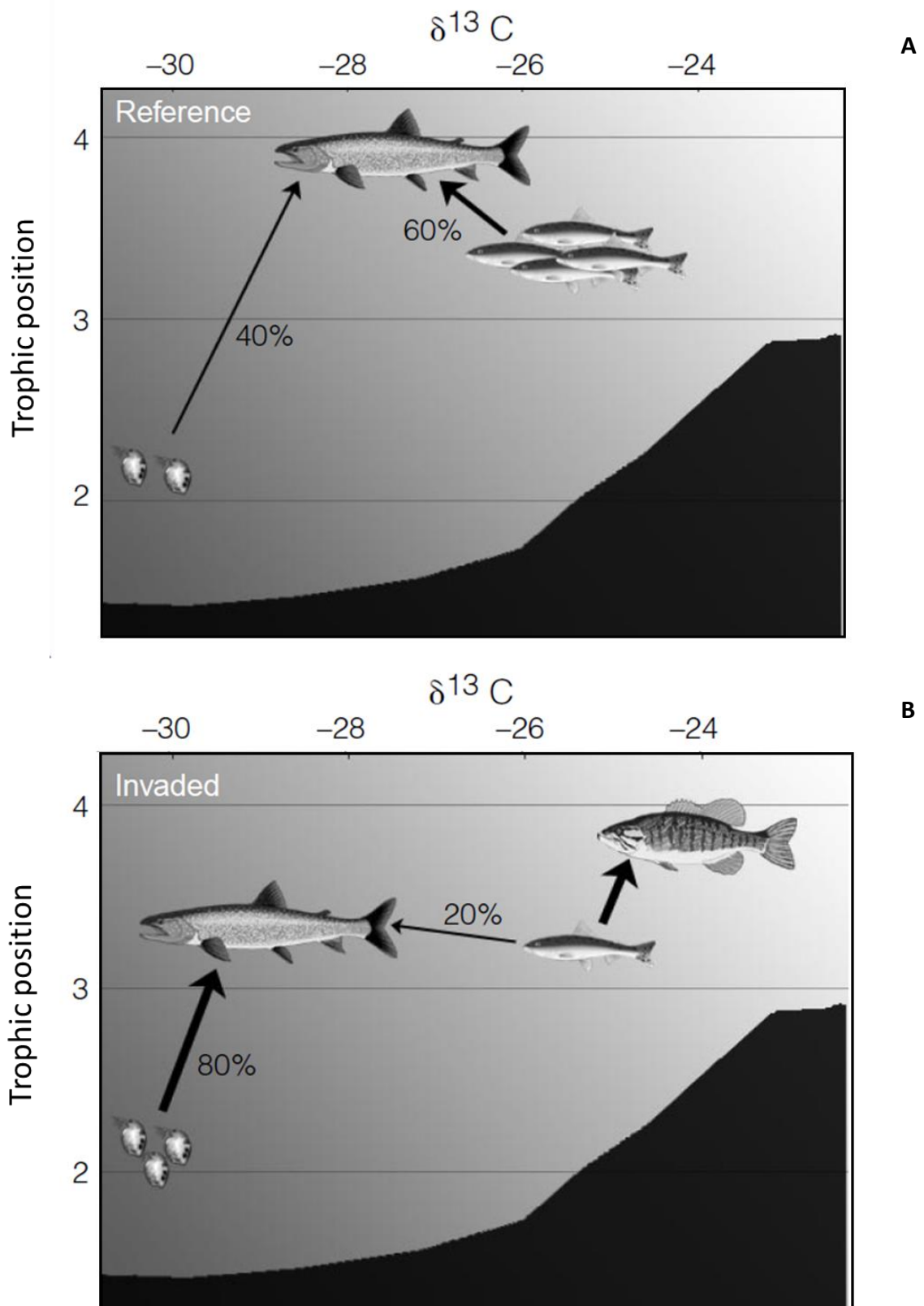


Fig. 18. Flusso di energia attraverso la catena alimentare nei laghi di riferimento (A), nei quali la specie invasiva è assente, e nei laghi nei quali la specie invasiva è presente (B) (Vander Zanden et al. 1999).

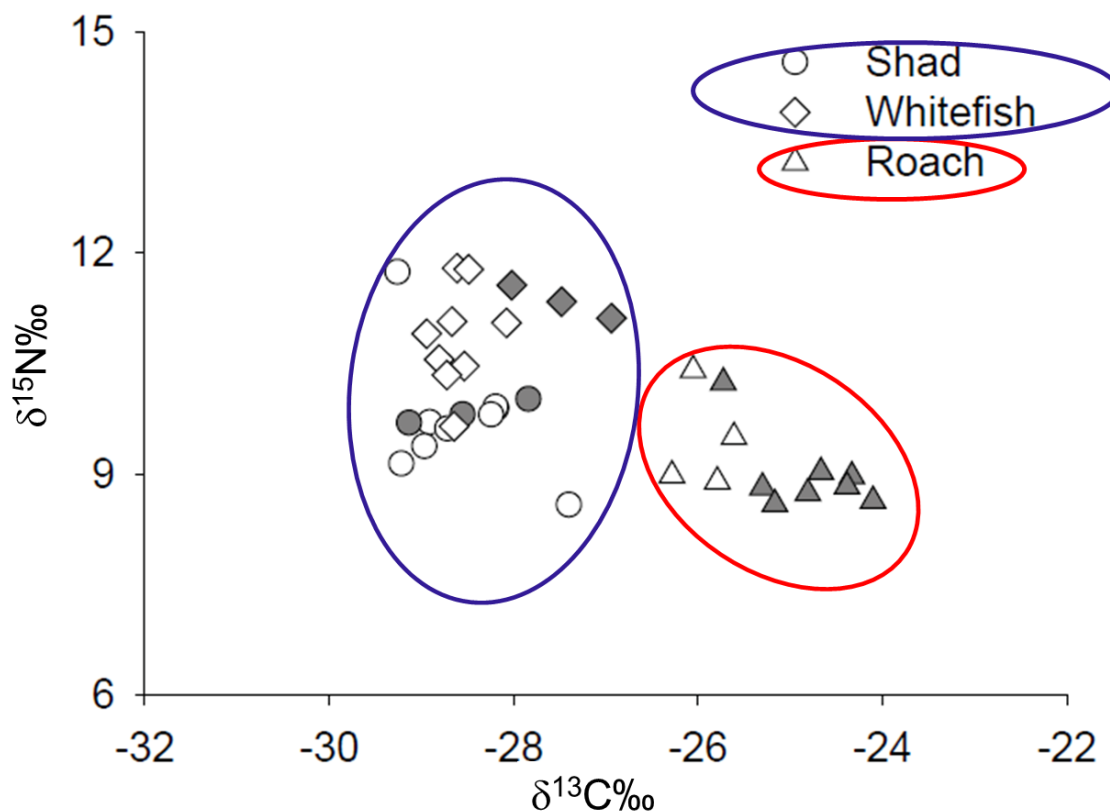
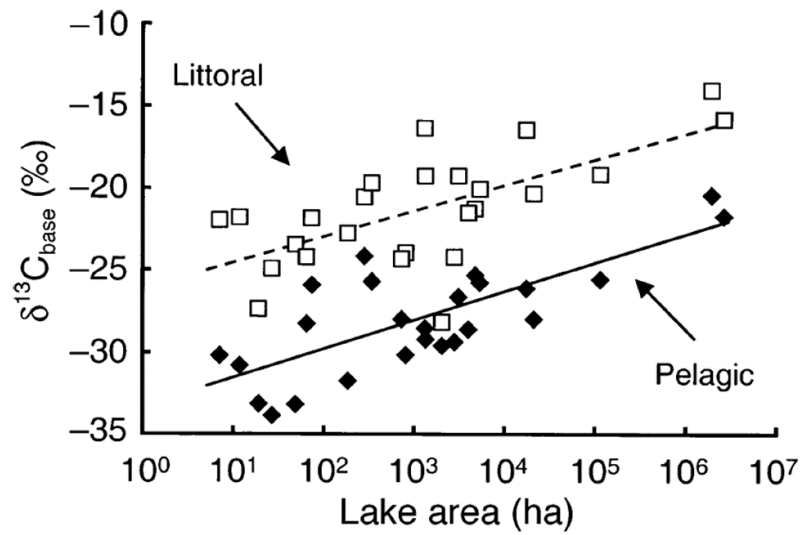


Fig. 19. Grafico trofochimico dei valori mensili di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ di tre specie di pesci del lago Maggiore (agone, coregone e gardon) nel corso del 2008. I simboli grigi indicano che l'organismo stava utilizzando fonti alimentari litorali, i bianchi pelagiche (Visconti et al. 2013).

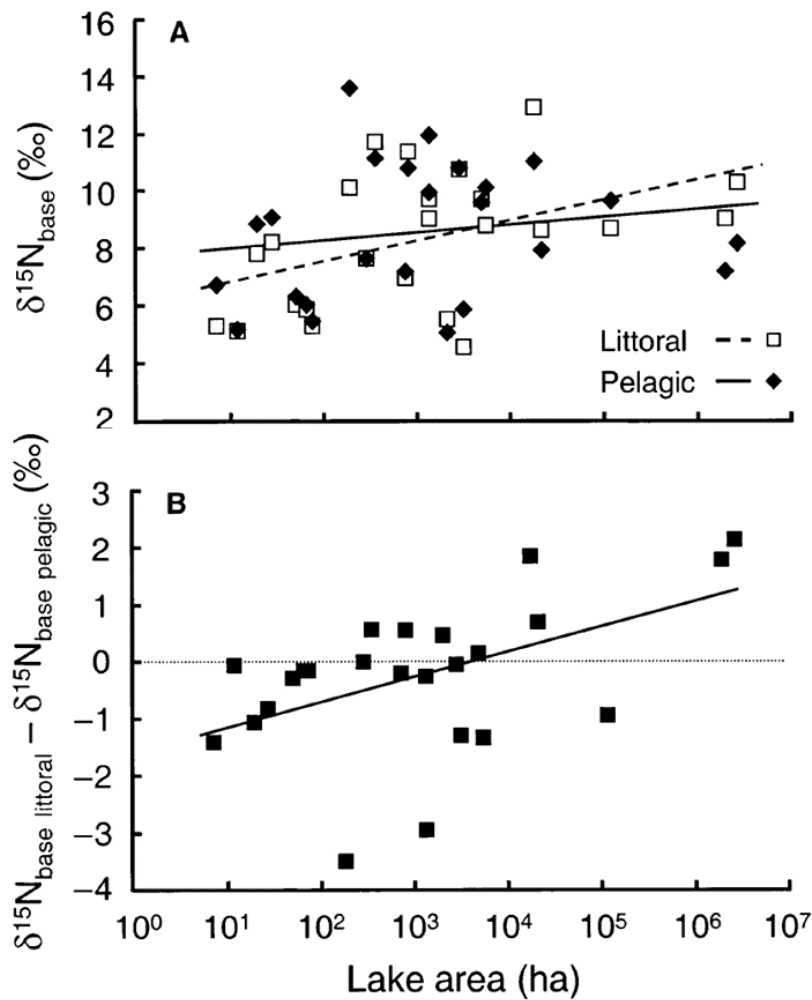
Analisi degli isotopi stabili in laghi a diversa tipologia

Ogni lago è caratterizzato da un proprio *fingerprint* isotopico, tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che tale segnale dipende anche dalla tipologia stessa del lago. Infatti, le differenze nel contenuto isotopico di carbonio e azoto tra i laghi possono essere correlate allo stato trofico e alla morfologia del lago in termini di dimensioni e profondità.

In uno studio del 2002, Post ha dimostrato l'esistenza di una forte correlazione positiva tra il $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ delle linee di base pelagica e litorale e l'area del lago (Fig. 20). Esistono, in generale, tre potenziali fonti di carbonio inorganico disciolto (DIC) nei laghi: la respirazione del carbonio organico di derivazione autoctona e alloctona, la CO_2 atmosferica e il DIC derivante dal bacino idrografico. Il carbonio proveniente dal processo di rimineralizzazione è generalmente isotopicamente leggero, al contrario, la CO_2 atmosferica disciolta e i carbonati derivanti dal dilavamento delle rocce del bacino imbrifero sono isotopicamente pesanti.



I



II

Fig. 20. (I) Correlazione tra superficie lacustre e segnale isotopico del carbonio della linea di base litorale e pelagica di 25 laghi dell'America del nord-est. (IIA) Correlazione tra area del lago e segnale isotopico dell'azoto della linea di base del litorale e del pelago. (IIB) Correlazione tra area del lago e differenza del segnale isotopico dell'azoto tra linea di base litorale e pelagica in 25 laghi del nord-est America (Post 2002).

Pertanto, il fatto che i laghi grandi siano tendenzialmente caratterizzati da valori meno negativi di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ implica che l'attività eterotrofa fornisca un contributo maggiore alla produzione totale nei piccoli laghi rispetto ai laghi grandi. Al contrario, all'aumentare della superficie lacustre, la produzione primaria fitoplanctonica assume maggiore importanza. Non esiste, invece, una relazione tra $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ della linea di base e area del lago. Tuttavia, nello stesso studio Post (2002) ha dimostrato che la differenza tra il $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ della linea di base litorale e quello dalla linea di base pelagica aumenta all'aumentare dell'area del lago, confermando che l'influenza del litorale sulle acque pelagiche è minore nei laghi più grandi.

Il *fingerprint* isotopico dipende dallo stato trofico del lago. Nella figura 21 sono riportati i dati isotopici del carbonio di organismi zooplanctonici e materiale organico particellato in laghi caratterizzati da differenti stati trofici. Le due serie di dati, zooplancton e POM, si sovrappongono solo nei laghi ad alta trofia, indicando che in questo tipo di ambienti lo zooplancton utilizza il POM come fonte di carbonio. Nel secondo grafico possiamo osservare che i valori di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ del POM e del fitoplancton sono molto simili nei laghi ad alta trofia e questo si verifica perché la maggior parte del particellato organico è costituita da alghe. Questi dati indicano che la dipendenza dello zooplancton da fonti alloctone diminuisce con l'aumentare della trofia del lago. Ovvero, nei laghi eutrofi gli organismi zooplanctonici dipendono maggiormente dalle fonti autoctone, mentre sono più legati alle fonti alloctone nei laghi oligotrofi, dove la produzione del fitoplancton è limitata e la respirazione equivale e/o è maggiore della produzione primaria.

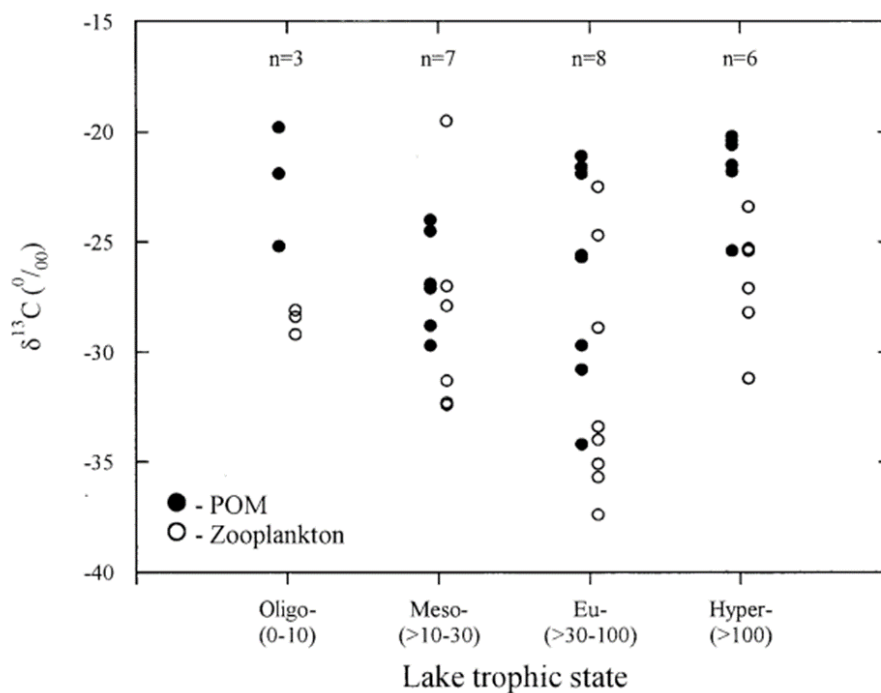
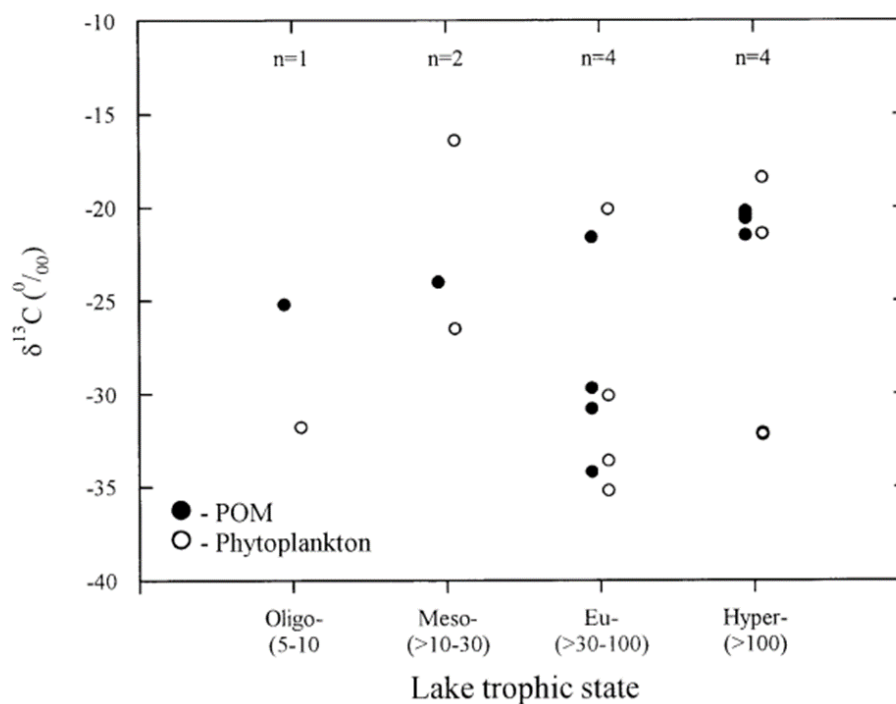
A**B**

Fig. 21. Segnali isotopici di carbonio dello zooplancton erbivoro e del POM (A) e del fitoplancton e del POM (B) raggruppati secondo lo stato trofico del lago in accordo con la classificazione OECD (in parentesi sono riportati i range di fosforo totale (TP) in $\mu g\ l^{-1}$) (Grey et al. 2000).

Anche il contenuto di ^{15}N è dipendente dallo stato trofico e di solito si osservano valori di $\delta^{15}N$ ‰ più elevati nei laghi eutrofici. Adams & Stern (2000) hanno dimostrato che negli organismi l'arricchimento nell'isotopo dell'azoto dipende dalla dieta. Nei laghi produttivi gli

organismi zooplanctonici sfruttano la sostanza organica particellata che è costituita non solo da fitoplancton ma anche da batteri, protozoi, *exuviae* di organismi zooplanctonici e *pellet* fecali arricchiti in ^{15}N . L'utilizzo da parte degli organismi zooplanctonici di questo materiale come base alimentare porta di per sé ad un arricchimento in ^{15}N . Inoltre, Wada (2009; Fig. 22) ha dimostrato anche l'esistenza di una forte correlazione positiva tra l'arricchimento nell'isotopo dell'azoto dei consumatori primari e la densità di popolazione umana residente nel bacino imbrifero di un lago, come conseguenza diretta dell'aumento del carico di azoto derivante dalle acque reflue domestiche.

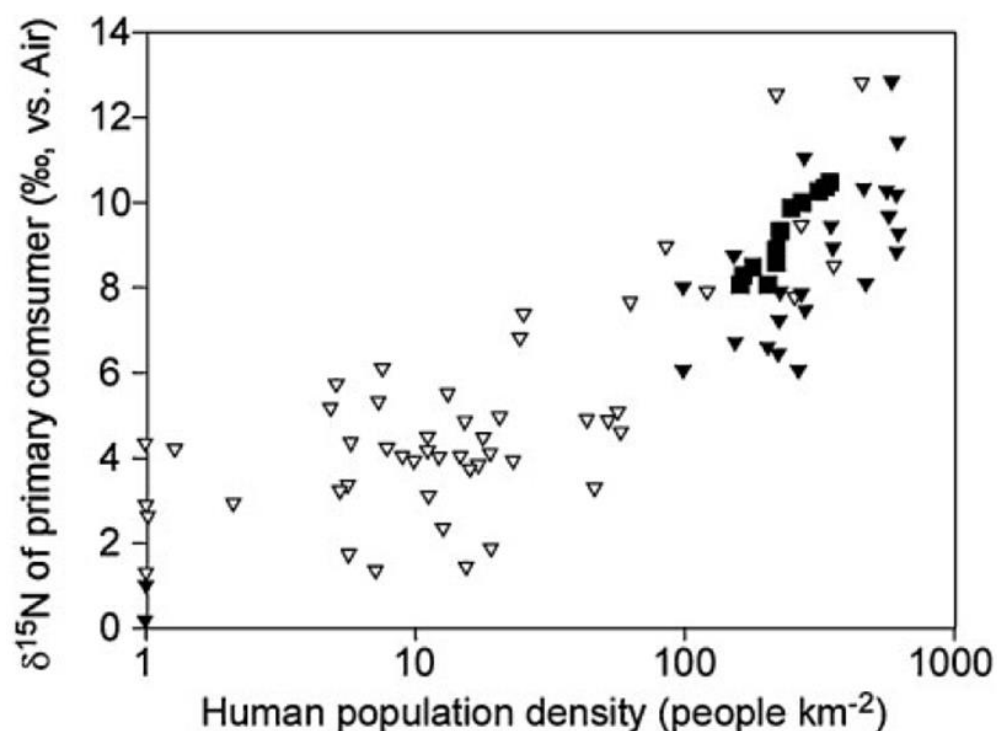


Fig. 22. Relazione tra segnale isotopico dell'azoto dei consumatori primari e densità di popolazione nel bacino del fiume Hebisuna (▽), nel Lago Biwa (▼) e in sistemi acquatici vari (■) (Wada 2009).

Uno studio recente (Piscia et al. 2018) ha confermato alcune delle ipotesi finora descritte. I laghi esaminati (Mergozzo, Pusiano, Comabbio, Endine e Moro) erano a diversa trofia (dall'oligotrofia del lago di Mergozzo all'iper-eutrofia del lago di Pusiano), e a diversa morfologia in termini di profondità e volume (laghi di Endine e Comabbio piccoli e poco profondi, laghi di Mergozzo e Pusiano di maggiori dimensioni e profondi, lago Moro piccolo e profondo; Tab. 1).

Tab. 1. Principali caratteristiche morfo-edafiche dei cinque laghi studiati (Piscia et al. 2018).

Lake	Altitude (m a.s.l.)	Volume (10 ⁶ m ³)	Depth _{max} (m)	P _{tot} (μgL ⁻¹)	Trophy
Mergozzo	194	83	73	1	oligotrophy
Moro	389	4	42	8	oligotrophy
Endine	334	12	9	17	eutrophy
Comabbio	243	16	8	72	iper-eutrophy
Pusiano	259	69	24	74	iper-eutrophy

In figura 23 sono rappresentate le variazioni del segnale isotopico delle linee di base pelagiche dei cinque laghi, dalla primavera all'estate. I dati hanno confermato alcune ipotesi già descritte. Il lago più arricchito in $\delta^{15}\text{N}$, infatti, è risultato l'iper-eutrofo lago di Pusiano mentre il meno arricchito l'oligotrofo lago di Mergozzo, e nei laghi meno profondi è stata rilevata la minore variazione di azoto dalla primavera all'estate. Inaspettatamente, i laghi di Comabbio e Endine hanno mostrato anche una tendenza opposta rispetto agli altri nella variazione segnale isotopico del carbonio dalla primavera all'estate. Tale peculiarità, per il lago di Comabbio ove è più evidente, viene spiegata come risultato di una migrazione orizzontale dal litorale al pelago in estate (Hamza et al. 1993).

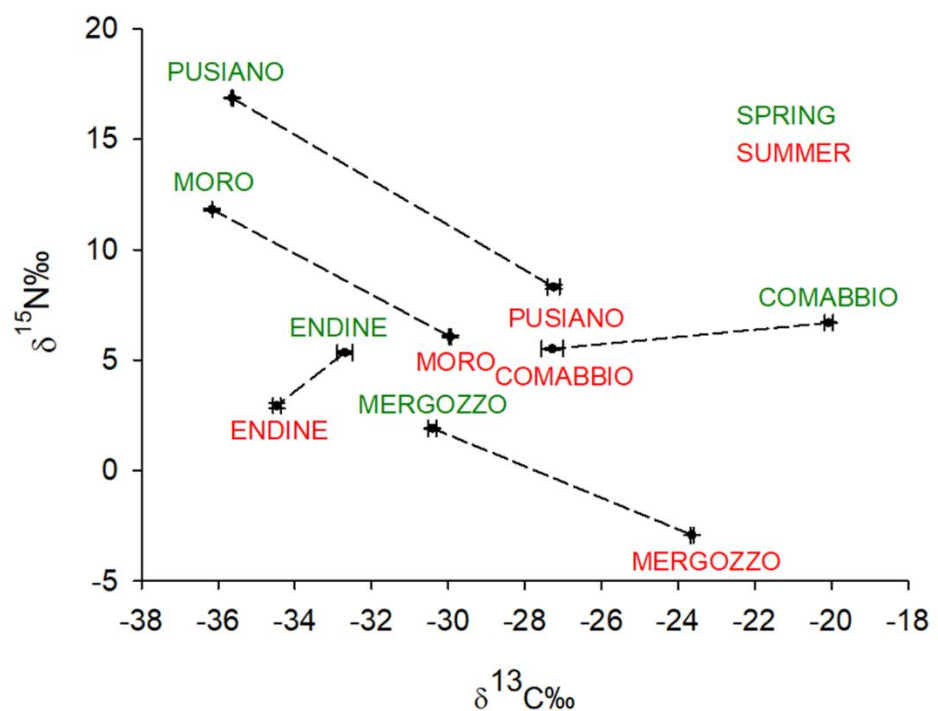


Fig. 23. Segnale isotopico di carbonio e azoto della linea di base (*Daphnia*) nei cinque laghi studiati (Piscia et al. 2018).

In figura 24 A vengono riportati i dati primaverili dei *taxa* zooplanctonici analizzati. Come riscontrato in precedenti studi, non tutti i *taxa* sono risultati utilizzare le fonti di carbonio pelagiche rappresentate dalla linea di base, ovvero dal segnale isotopico di carbonio del cladocero filtratore non selettivo *Daphnia* (i.e., i ciclopidi nel lago di Mergozzo e i diaptomidi nel lago d'Endine).

I dati estivi hanno evidenziato alcune relazioni trofiche: la competizione tra *Daphnia* e *Bosmina* nel lago d'Endine e tra *Daphnia*, Diaptomidi e *Diaphanosoma* nel lago di Mergozzo e una predazione mista del grande cladocero *Leptodora* su *Daphnia*, *Diaphanosoma* e *Bosmina*, nel lago di Mergozzo.

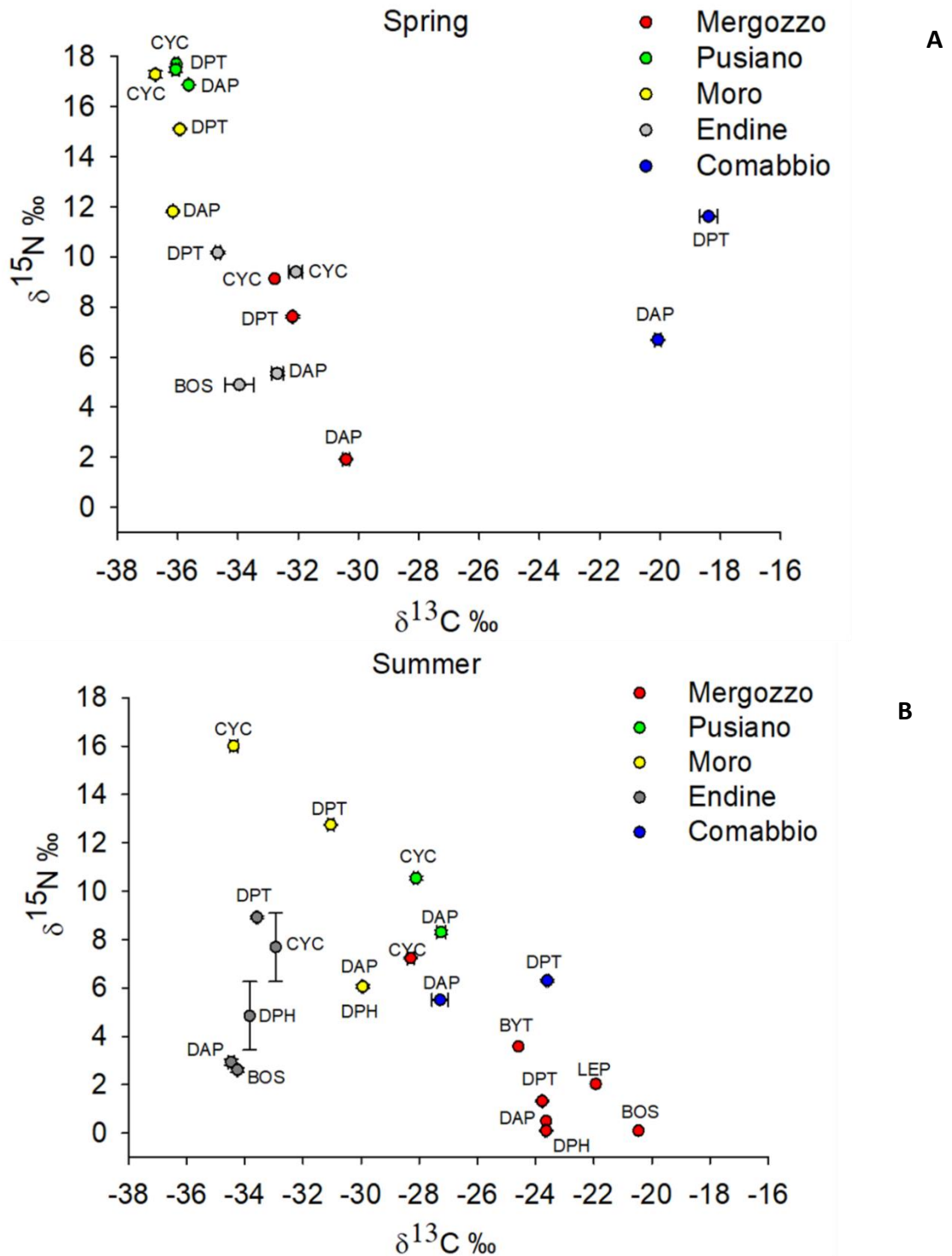


Fig. 24. Grafico trofochimico dei *taxa* zooplanctonici dei cinque laghi studiati in primavera (A) e estate (B). Le barre di errore rappresentano l'errore standard. CYC: ciclopidi; DPT: diatomidi; DAP: *Daphnia*; BOS: *Bosmina*; DPH: *Diaphanosoma*; BYT: *Bythotrephes*; LEP: *Leptodora* (Piscia et al. 2018).

Un altro esempio è rappresentato dai bacini artificiali, influenzati sia dalle caratteristiche climatiche dell'area geografica in cui si trova il lago sia dalla gestione della

risorsa idrica operata dall'uomo. In particolare, gli invasi artificiali del bacino mediterraneo sono caratterizzati da una idrodinamica peculiare che si manifesta in una marcata fluttuazione del livello dell'acqua legata alla stagionalità del regime di piogge (Fig. 25 A e B).

I laghi artificiali sono corpi idrici che presentano caratteristiche intermedie tra i laghi ed i fiumi (Tundisi & Straskraba 1999) e sono considerati ambienti per loro natura stressati (Leira & Cantonati 2008; Naselli-Flores 2003; Perbiche-Neves et al. 2011). Ricevono input significativi esterni durante la stagione delle piogge mentre fanno affidamento sui processi di riciclo interno che sostengono la componente biologica durante la stagione secca (Zohary & Ostrovsky 2011). Come gli altri laghi artificiali mediterranei (Naselli-Flores, 2003; Zohary & Ostrovsky 2011) il lago Sos Canales è soggetto ad un' importante variazione del livello delle acque nel corso dell'anno (Fig. 25; Fadda et al. 2014).

Il segnale isotopico di carbonio e azoto della linea di base del lago Sos Canales, ed in particolare del materiale particellato sospeso, varia stagionalmente, così come osservato nei laghi temperati naturali (Perga & Gerdeaux 2006; Visconti & Manca 2011; Woodland et al. 2012; Fadda et al. 2014, 2016). Le variazioni del segnale isotopico sono la conseguenza delle variazioni dei carichi esterni, della composizione delle specie fitoplanctoniche e dei cambiamenti nella concentrazione di carbonio e azoto inorganici disciolti (Fig. 26).

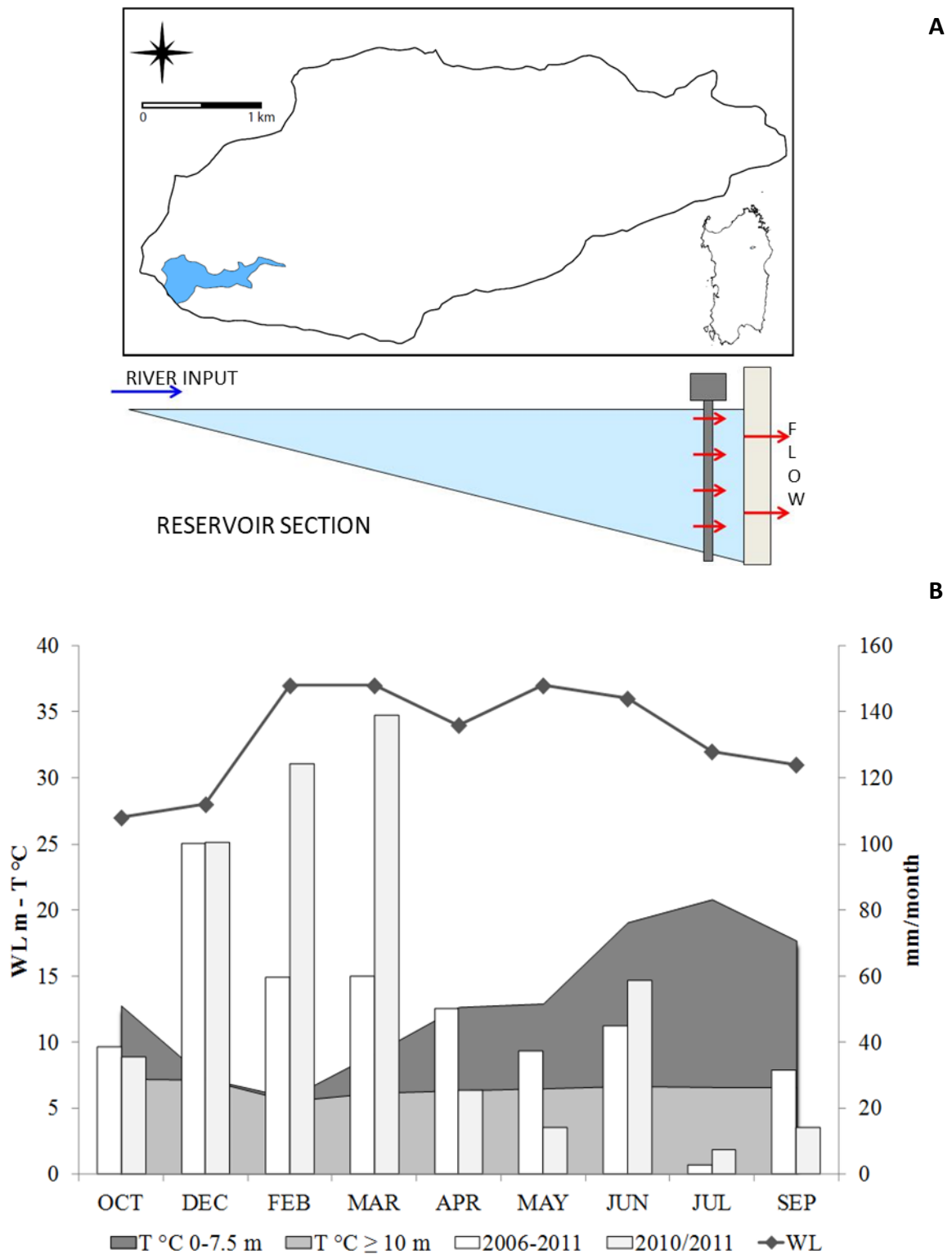


Fig. 25. **(A)** Mappa del lago Sos Canales (Sardegna) e schema della sezione dell'invaso. **(B)** Valori di piovosità mensile nel periodo 2010-2011 e medi nel periodo 2006-2011, livello del lago nel periodo 2010-2011, temperatura media dello strato superficiale (0-7,5m) e profondo (≥ 10 m) del lago (Fadda et al. 2014).

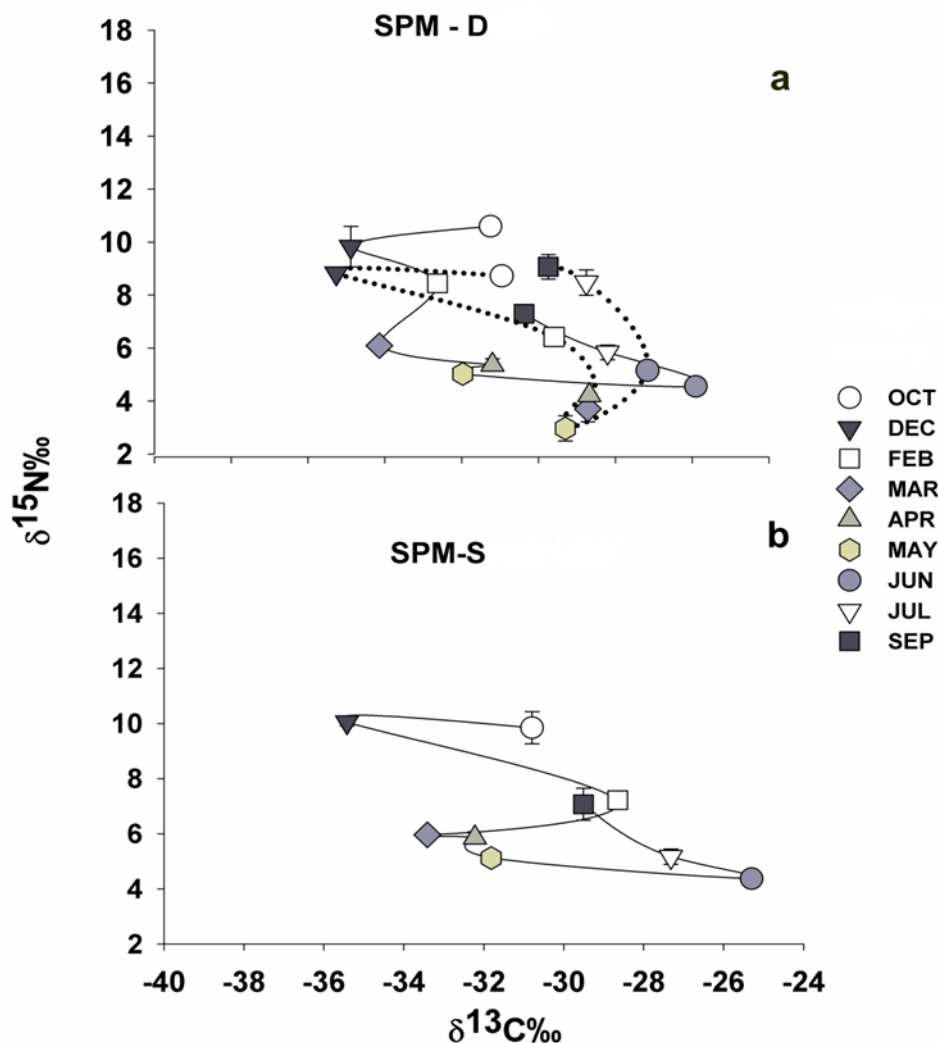


Fig. 26. Variazioni del segnale isotopico di carbonio e azoto del particolato sospeso in 2 stazioni diverse, pelagica (a) e litorale (b) e negli strati superficiale (0-7,5m; linea continua) e profondo ($\geq 10\text{m}$; linea tratteggiata) (Fadda et al. 2014).

Le variazioni stagionali del *fingerprint* isotopico di carbonio e azoto sono state registrate anche negli organismi del popolamento zooplanctonico (Fig. 27). Le variazioni dei segnali isotopici di carbonio e azoto del particolato sospeso son risultati ben rappresentati dal cladocero *Daphnia*, i cui esemplari provenienti dalle acque profonde erano, come atteso, maggiormente impoveriti nell'isotopo del carbonio. Anche le variazioni del segnale isotopico del carbonio di diaptomidi e ciclopidi sono risultati consistenti con quelli del particolato sospeso, tranne che in primavera quando, probabilmente ancora in dormienza, gli organismi erano visivamente molto ricchi di goccioline lipidiche.

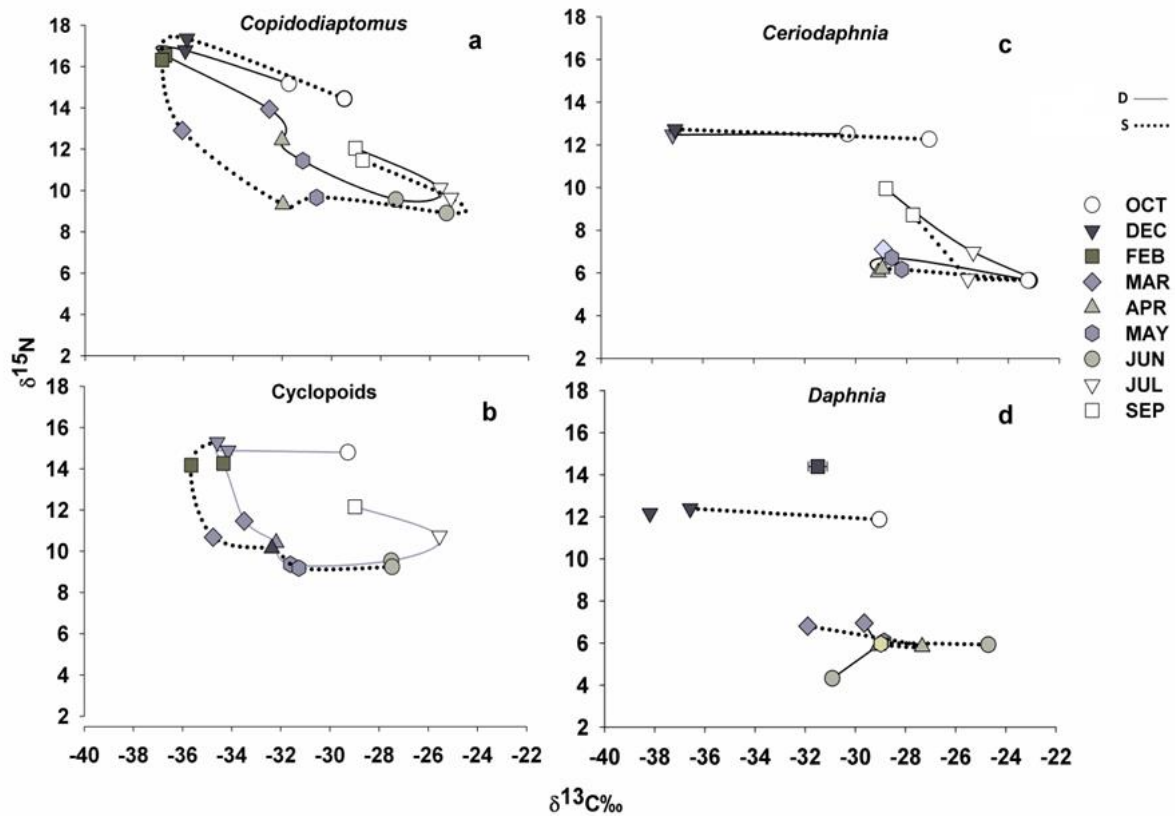


Fig. 27. Variazioni stagionali del segnale isotopico di carbonio e azoto in crostacei del lago Sos Canales provenienti da due diverse stazioni di campionamento, litorale (linea tratteggiata) e profonda (linea continua) (Fadda et al. 2014).

La temperatura e il ciclo idrologico hanno influenzato il comportamento alimentare dei pesci nel lago Sos Canales e quindi anche il loro segnale isotopico. I risultati delle analisi isotopiche e del contenuto stomacale (Figg. 28 e 29) hanno evidenziato una stretta dipendenza durante tutto l'anno dalle fonti alimentari littorali solo per la trota fario, mentre la gambusia ha evidenziato un cambio nel comportamento alimentare prediligendo fonti alimentari littorali nel periodo piovoso e fonti alimentari pelagiche nel periodo secco (Fadda et al. 2016).

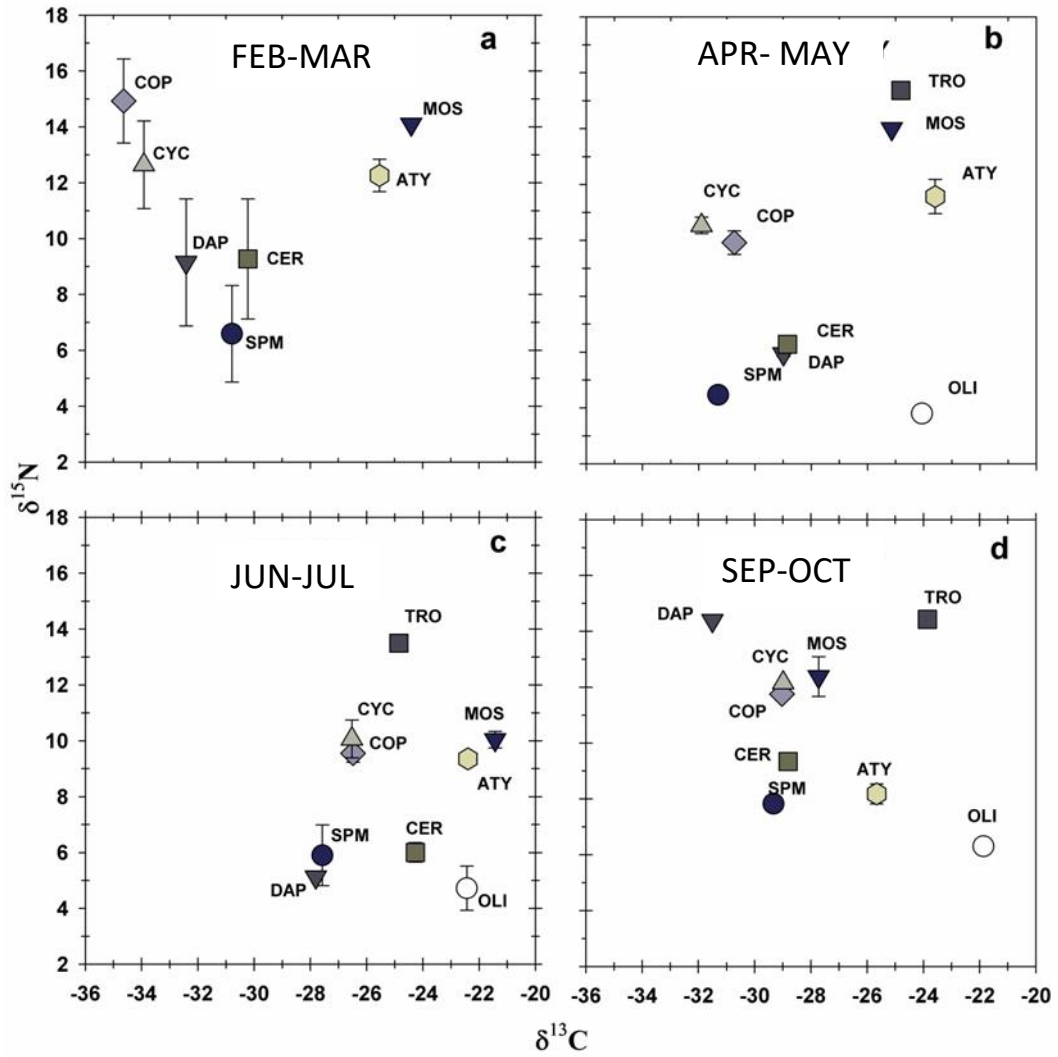


Fig. 28. Variazioni del segnale isotopico di carbonio e azoto nel particolato sospeso (SPM) e nei *taxa* analizzati del lago Sos Canales. DAP = *Daphnia*; CER = *Ceriodaphnia*; CYC = Ciclopidi; ATY = *Atyaephyra*; OLI = oligocheti; TRO = trota; MOS = gambusia (Fadda et al. 2016).

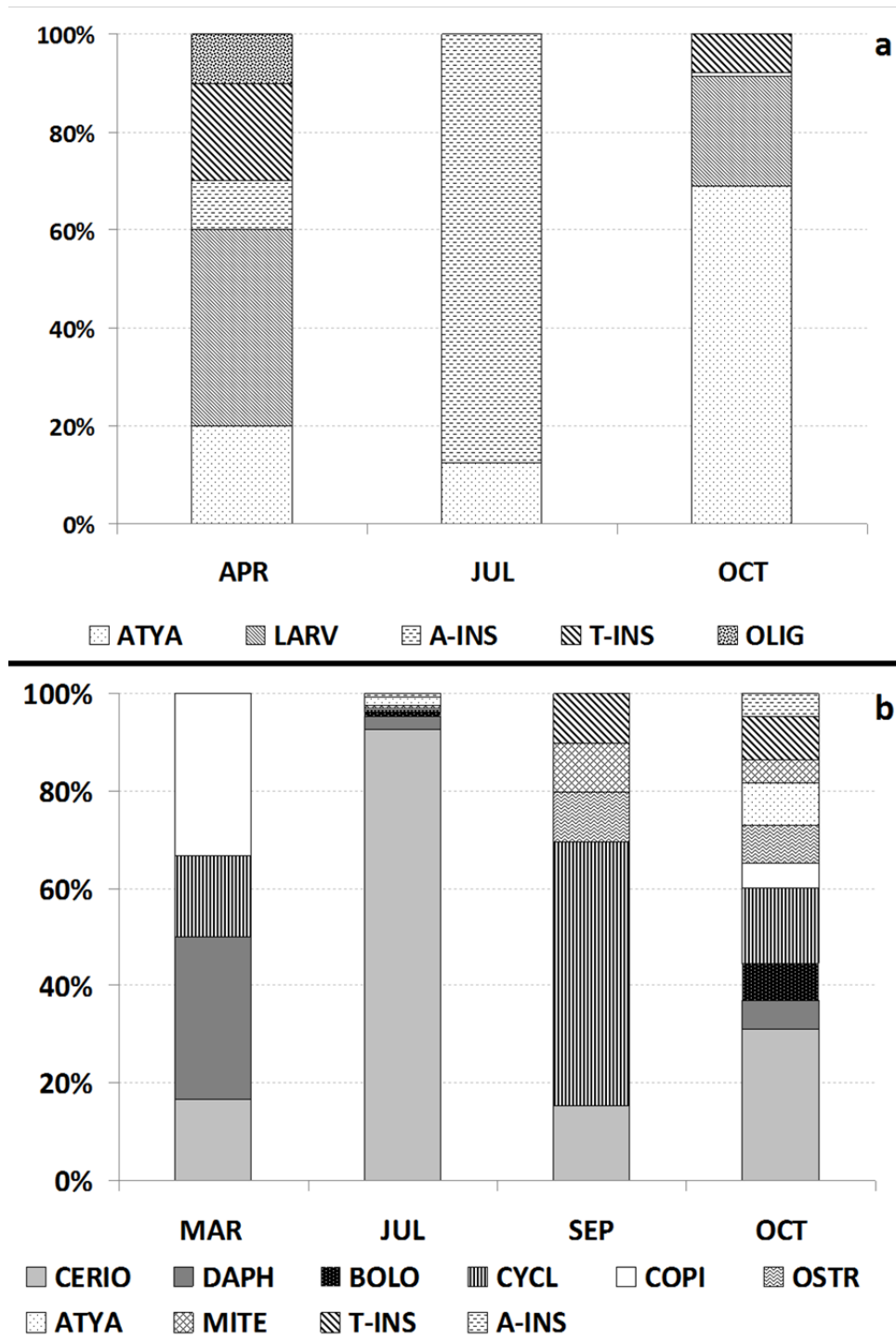


Fig. 29. Variazioni del segnale isotopico di carbonio e azoto nel particolato sospeso (SPM) e nei *taxa* analizzati del lago Sos Canales. DAP = *Daphnia*; CER = *Ceriodaphnia*; CYC = Ciclopidi; ATY = *Atyaephyra*; OLI = oligochaeti; TRO = trota; MOS = gambusia. Contenuto stomacale delle trote e gambusie del lago Sos Canales. ATYA = *A. desmaresti*; LARV = larva non identificata; A-INS = insetto acquatico; T-INS = insetto terrestre; OLIG = oligochaeti; CERIO = *Ceriodaphnia*; DAPH = *Daphnia* spp.; COPI = *Copidodiaptomus*; CYCL = ciclopidi; BOLO = *Bosmina longirostris*; MITE = acaro acquatico; OSTR = ostracode (Fadda et al. 2016).

Analisi degli isotopi stabili e POPs

Anche gli studi sugli inquinanti organici persistenti (POPs, *Persistent Organic Pollutants*) traggono vantaggio dall'applicazione dell'analisi degli isotopi stabili. Sia la posizione trofica che il segnale isotopico dell'azoto sono largamente utilizzati per stimare la biomagnificazione dei POPs lungo le catene alimentari. Infatti, esiste una relazione positiva tra concentrazione di inquinante normalizzata sul contenuto lipidico e livello trofico o contenuto di ^{15}N . Questa relazione concorda perfettamente con il concetto di biomagnificazione, per il quale la concentrazione degli inquinanti aumenta lungo la catena alimentare. Un esempio di questa correlazione è fornito da Borgå et al. (2004), i quali hanno dimostrato l'esistenza di una chiara relazione tra livello trofico e concentrazione di inquinante negli organismi della rete alimentare marina pelagica della Baia di Baffin (Artico), dallo zooplancton agli uccelli marini e alle foche (Fig. 30).

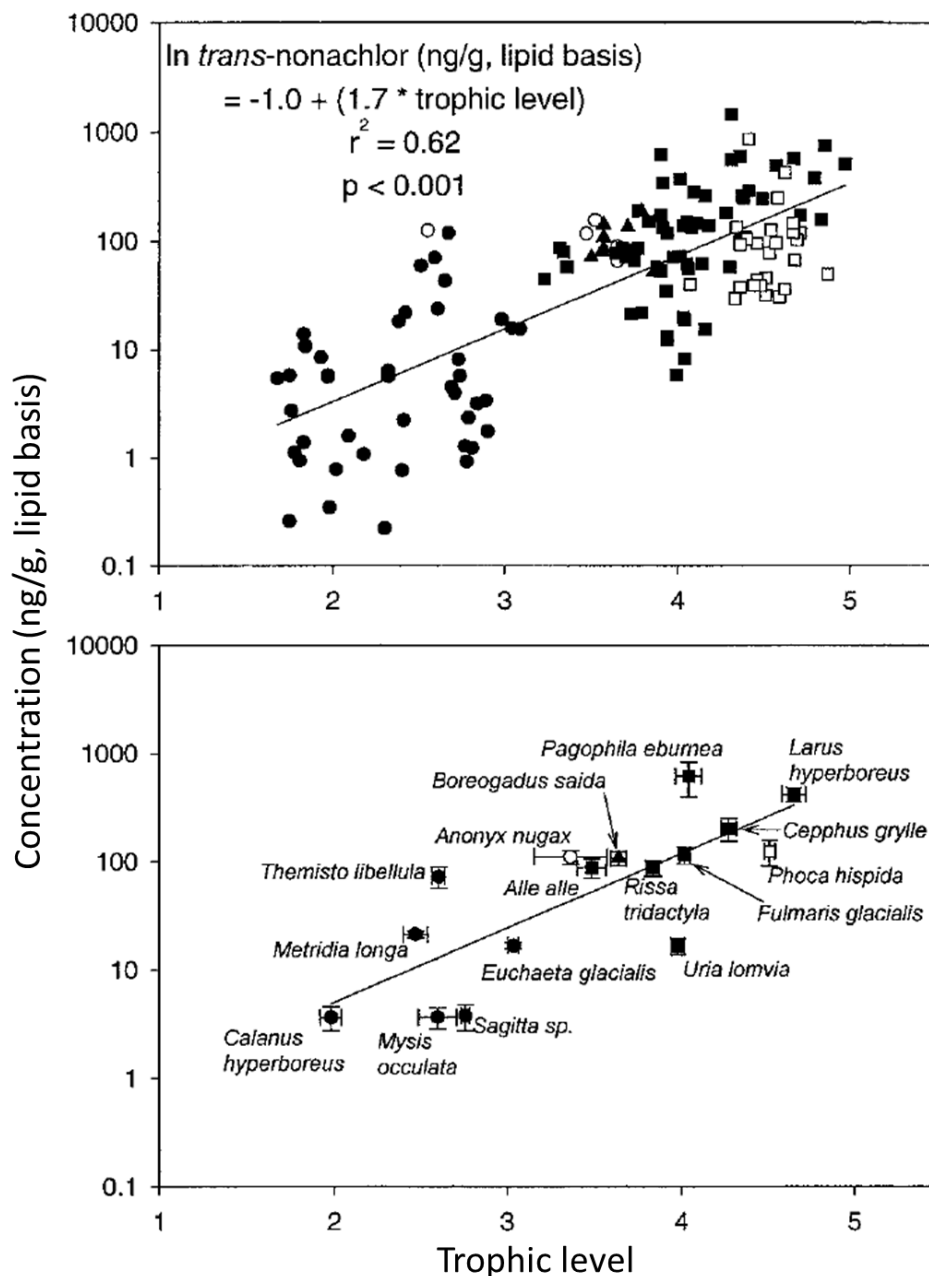


Fig. 30. Relazione tra la concentrazione su base lipidica del trans-nonachlor e posizione trofica (definita in base al segnale isotopico di azoto) nella rete trofica marina della zona a nord della Baia di Baffin. Il grafico superiore riporta tutti i dati, quello inferiore I valori medi con I relative errori standard per ogni specie (Borgå et al. 2004).

Un altro esempio è fornito da Hobson et al. (2002), i quali hanno trovato una relazione tra concentrazione di inquinante su base lipidica e $\delta^{15}\text{N}\%$ (Fig. 31).

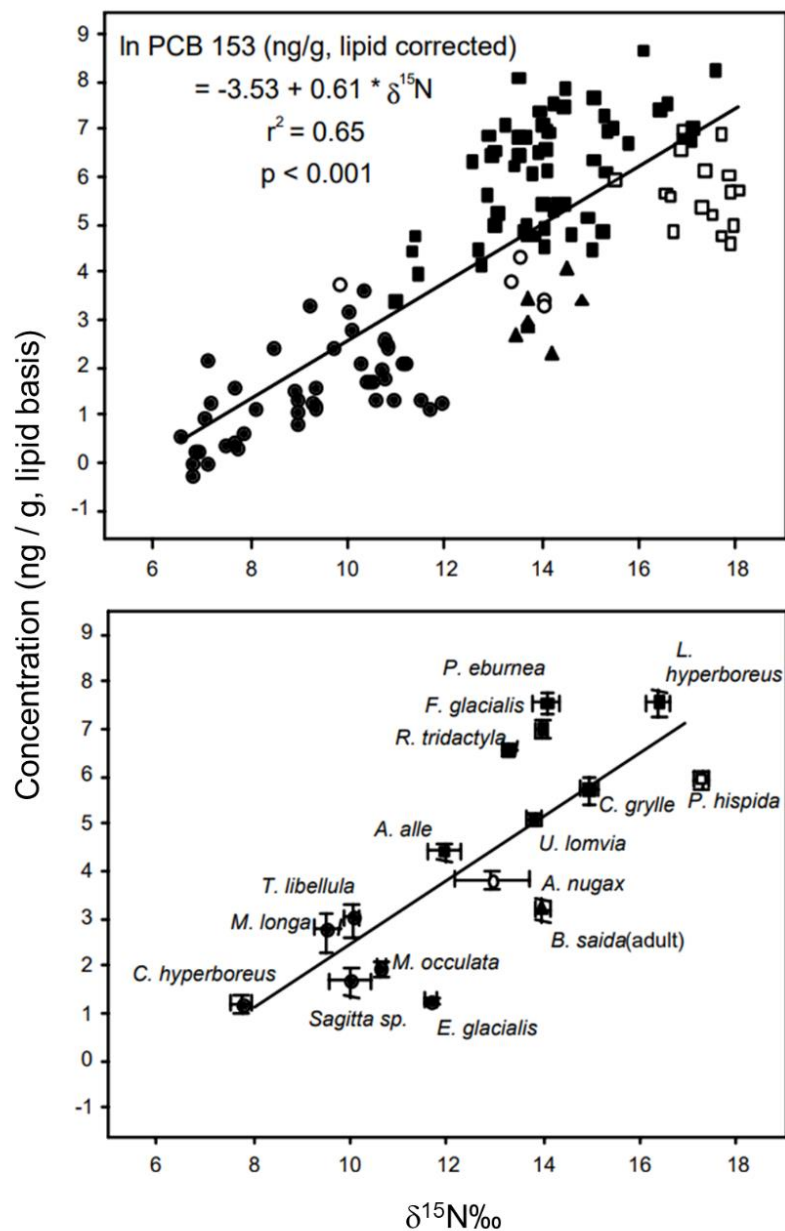


Fig. 31. Relazione tra la concentrazione su base lipidica di PCB 153 e I valori di $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ nella catena alimentare marina delle acque del Mare del Nord. Il grafico superiore riporta tutti i dati, quello inferiore i valori medi e gli errori standard delle singole specie (Hobson et al. 2002).

Abbiamo trovato la stessa relazione nel lago Maggiore, ma mentre Hobson et al. (2002) hanno scattato una sorta di fotografia istantanea dell'intera rete alimentare pelagica, i nostri dati hanno evidenziato differenze nel tempo e differenze dovute a variazioni nella composizione del popolamento zooplanctonico. I risultati qui riportati si riferiscono a due diverse frazioni dimensionali del popolamento zooplanctonico pelagico del lago Maggiore, scelte con lo scopo di selezionare solo gli organismi che vengono realmente predati dai pesci zooplanctivori. Le differenze nella composizione delle due frazioni dimensionali spiegano sia

le variazioni nella concentrazione degli inquinanti, sia nell'arricchimento dell'isotopo dell'azoto. Di solito, infatti, abbiamo osservato un aumento della concentrazione di inquinanti dalla primavera (simboli verdi) all'inverno (simboli grigi), che concorda perfettamente con l'aumento in $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ dovuto anche al diverso contributo in termini di biomassa dei consumatori primari e secondari. Questo risultato suggerisce che la concentrazione di inquinante nei pesci non dipende solo dall'input iniziale dell'inquinante stesso nell'ecosistema, ma dipende anche dalla composizione del popolamento zooplanctonico che a sua volta varia stagionalmente.

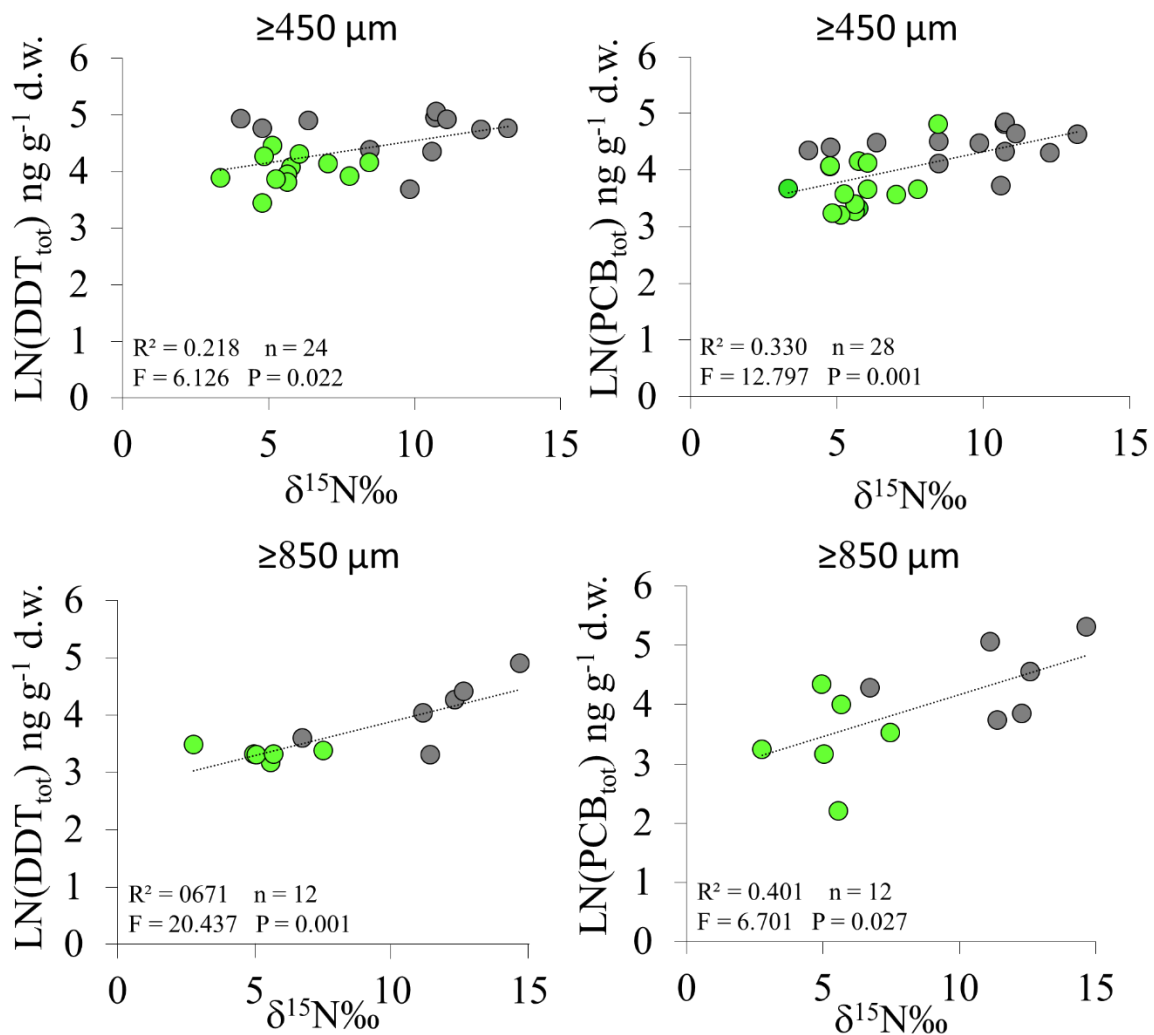


Fig. 32. Correlazione tra la concentrazione di inquinante e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ in due frazioni dimensionali. I simboli grigi rappresentano i campioni autunnali/invernali, i simboli verdi quelli primaverili/estivi (Piscia et al. 2016).

Conclusioni

L'analisi degli isotopi stabili è uno strumento valido ed efficace per lo studio delle reti trofiche, utile per l'individuazione di meccanismi, quali la predazione e/o competizione, che consentono una classificazione funzionale, basata sul ruolo trofico degli organismi che popolano un lago. Con il presente volume abbiamo scelto di discutere alcuni aspetti dai quali non si può prescindere se si vogliono studiare le reti trofiche lacustri. Ogni ambiente, dal punto di vista del segnale isotopico di carbonio ed azoto, pur conservando la propria unicità, presenta delle caratteristiche nel segnale isotopico, quali la stagionalità e le differenze tra le diverse zone del lago (i.e. litorale vs pelago e superficie vs fondo), che accomunano i laghi delle regioni temperate. Tali caratteristiche sono il risultato delle complesse reazioni, anche metaboliche, che avvengono all'interno dell'ecosistema, delle diverse cinetiche di reazione alle quali gli isotopi sono sottoposti e delle diverse fonti di carbonio e azoto, a loro volta strettamente dipendenti dalle caratteristiche morfo-geologiche della conca lacustre e del bacino imbrifero.

Sebbene ambienti simili, dal punto di vista della trofia e/o della morfologia (i.e. superficie, profondità ecc.), presentino caratteristiche simili (e.g. la variazione stagionale del $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ è molto più pronunciata nei laghi profondi rispetto a quelli poco profondi e i valori di $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ sono più elevati nei laghi eutrofici), uno studio corretto delle reti trofiche attraverso l'analisi degli isotopi stabili non può prescindere dall'individuazione di linee di base rappresentative delle variazioni del segnale isotopico della zona litorale e pelagica. Solo rapportando i valori dei segnali isotopici di carbonio e azoto dei singoli organismi alle linee di base è possibile estrapolare informazioni corrette (e.g. se un organismo appartiene alla catena alimentare pelagica o litorale) e comparare i risultati di ambienti diversi.

L'analisi degli isotopi stabili trova, inoltre, un'utile applicazione anche in campo ecotossicologico, in particolare per la determinazione dei fattori di biomagnificazione degli inquinanti organici persistenti nelle catene alimentari acquatiche, in quanto, esiste una correlazione diretta tra $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$, e quindi livello trofico, e concentrazione dell'inquinante. In particolare, studi recenti hanno evidenziato che la concentrazione di POPs nello zooplancton lacustre subisce variazioni stagionali non trascurabili, in dipendenza dalla composizione percentuale della biomassa (consumatori primari vs consumatori secondari), con importanti implicazioni anche per l'accumulo di tali inquinanti nei pesci zooplanctivori.

Bibliografia

- Argentesi F, de Bernardi R (1978) A methodology for the study of the trophic interactions in zooplanktonic communities. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 20: 100-104.
- Berggren M, Ziegler SE, St-Gelais NF, Beisner BE, del Giorgio PA (2014) Contrasting patterns of allochthony among three major groups of crustacean zooplankton in boreal and temperate lakes. *Ecology*, 95(7): 1947-1959.
- Bertoni R (2018) *Laghi e scienza. Introduzione alla limnologia*. E-book: 256 pp.
- Adams TS, Sterner RW (2000) The effect of dietary nitrogen content on trophic level ^{15}N enrichment. *Limnology and Oceanography*, 45(3): 601-607.
- Berggren M, Ström L, Laudon H, Karlsson J, Jonsson A, Giesler R, Bergstro A-K, Jansson M (2010) Lake secondary production fueled by rapid transfer of low molecular weight organic carbon from terrestrial sources to aquatic consumers. *Ecology Letters*, 13(7): 870-880.
- Borgå K, Fisk AT, Hoekstra PF, Muir DCG (2004) Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in arctic marine food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (10): 2367–2385.
- Cabana G, Rasmussen JB (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20): 10844-10847.
- Cattaneo A, Manca M, Rasmussen JB (2004) Peculiarities in the stable isotope composition of organisms from an alpine lake. *Aquatic Sciences*, 66 (4): 440–445.
- Caroni R, Free G, Visconti A, Manca M (2012) Phytoplankton functional traits and seston stable isotopes signature: a functional-based approach in a deep, subalpine lake, Lake Maggiore (N. Italy) *Journal of Limnology*, 71(1): 84-94.
- Caroni R, Piscia R, Manca M , in prep. A multi-annual study of seasonal changes in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of the Lago Maggiore pelagic food web.
- Carpenter SR, Kitchel JF, Hodgson JR (1985) Cascading trophic interactions and lake productivity. *BioScience*, 35(10): 634-639.

- Cole ML, Valiela I, Kroeger KD, Tomasky GL, Cebrian J, Wigand C, McKinney R, Grady SP, Carvalho da Silva MH (2004) Assessment of a $\delta^{15}\text{N}$ isotopic method to indicate anthropogenic eutrophication in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Quality*, 33(1): 124-132.
- Cole JJ, Carpenter SR, Pace ML, Van de Bogert MC, Kitchell JL, Hodgson JR (2006) Differential support of lake food webs by three types of terrestrial organic carbon. *Ecology Letters*, 9(5), 558-568.
- De Niro MJ, Epstein S (1978) Influence of the diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42: 495-506.
- Duncan A (1985) Body carbon in daphnids as an indicator of the food concentration available in the field. *Archiv für Hydrobiologie—der Limnologie BeiheftErgebnisse*, 21: 81-90.
- Fadda A, Rawcliffe R, Padedda BM, Lugliè A, Sechi N, Camin F, Ziller L, Manca M (2014) Spatio temporal dynamics of C and N isotopic signature of zooplankton: A seasonal study on a man-made lake in the Mediterranean region. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 50: 279–287.
- Fadda A, Manca M, Camin F, Ziller L, Buscarino P, Mariani M, Padedda BM, Sechi N, Viridis T, Lugliè A (2016) Study on the suspended particulate matter of a Mediterranean artificial lake (Sos Canales Lake) using Stable Isotope Analysis of carbon and nitrogen. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 52: 401–412.
- Falkowski PG (1991) Species variability in the fractionation of ^{13}C and ^{12}C by marine phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 13: 21-28.
- France RL (1995) Differentiation between littoral and pelagic food webs in lakes using stable carbon isotopes. *Limnology and Oceanography*, 40 (7): 1310-1313.
- France RL, Peters RH (1997) Ecosystem differences in the trophic enrichment of ^{13}C in aquatic food webs. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 54: 1255-1258.
- Gause GF (1934) *The Struggle for Existence*. Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 167 pp.
- Giussani G, de Bernardi R (1984) *Conoscere un lago*. Documenta dell'Istituto italiano di Idrobiologia, 4: 71 pp.
- Grey J, Jones RI, Sleep D (2000) Stable isotope analysis of the origins of zooplankton carbon in lakes of differing trophic state. *Oecologia*, 123(2): 232-240.

- Grey J, Jones RI (2001) Seasonal changes in the importance of the source of organic matter to the diet of zooplankton in Loch Ness, as indicated by stable isotope analysis. *Limnology and Oceanography*, 46(3): 505–513.
- Grey J, Jones RI, Sleep D (2001) Seasonal changes in the importance of the source of organic matter to the diet of zooplankton in Loch Ness, as indicated by stable isotope analysis. *Limnology and Oceanography*, 46(3): 505-513.
- Hamza W, Ruggiu D, Manca M (1993) Diel zooplankton migrations and their effect on the grazing impact in Lake Candia (Italy). *Archiv für Hydrobiologie–BeiheftErgebnisse der Limnologie*, 39: 175-185.
- Hobson KA, Fisk A, Karnovsky N, Holst M, Gagnon JM, Fortier M (2002) A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(22-23), 5131-5150.
- Heincke DF (1889) *Die Untersuchungen von Hensen über die Produktion des Meeres an belebter Substanz*. Deutscher Fischerei-Verein, Mittheilungen der Sektion für Küsten- und Hochsee-Fischerei, 15(3-5): 35-58.
- Hessen V (1893) Ergebnisse der in dem Atlantischen Ocean von Mitte Juli bis Anfang November 1889 ausgeführten Plankton-Expedition der Humboldt-Stiftung” (Kiel-Leipzig. 1892). “Das Plankton der üstlichen Ostee und des Stettiner Haffs,” in Bericht der Kommission zur wissenschaftlichen Untersuchung der deutschen Meere in Kiel für die Jahre 1887–1891 (1893), pp. 103–137
- Hessen DO (1989) Differential grazing and resource utilization of zooplankton in a humic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 114: 321-347.
- Hyslop EJ (1980) Stomach contents analysis—a review of methods and their application. *Journal of fish biology*, 17(4): 411-429.
- Hobson KA, Fisk A, Karnovsky N, Holst M, Gagnon JM, Fortier M (2002) A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: implications for evaluating tropho-dynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(22-23): 5131-5150.
- Hollander DJ, McKenzie JA (1991) CO_2 control and carbon-isotope fractionation during aqueous photosynthesis: a paleo- pCO_2 barometer. *Geology*, 138: 929-932.

- Hutchinson G. E. 1959. Il concetto moderno di nicchia ecologica. Mem. Istituto Ital. Idrobiologia II: 9-22.
- Hutchinson GE (1961) The paradox of the plankton. *The American Naturalist*, 95(882): 137-145.
- Jones RI, Grey J, Sleep D, Quarmby C (1998) An assessment, using stable isotopes, of the importance of allochthonous organic carbon sources to the pelagic food web in Loch Ness. *Proceedings of Royal Society of London B*, 265: 105-111.
- Jansson M, Persson L, De Roos AM, Jones RI, Tranvik LJ (2007) Terrestrial carbon and intraspecific size-variation shape lake ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(6): 316-322.
- Karlsson J, Johnsson A, Meili M, Jansson M (2003) Control of zooplankton dependence on allochthonous organic carbon in humic and clear-water lakes in northern Sweden. *Limnology and Oceanography*, 48: 269-276.
- Kiyashko SI, Richard P, Chandler T, Koxlklova TA, Williams DF (1998) Stable isotope carbon ratios differentiate autotrophs supporting animal diversity in lake Baikal. *Comptes Rendus Mathematique Academie des Sciences, Paris*, 321: 509-516.
- Lake JL, McKinney RA, Osterman FA, Pruell RJ, Kiddon J, Ryba SA, Libby AD (2001) Stable nitrogen isotopes as indicators of anthropogenic activities in small freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(5): 870-878.
- Lehman JT, Abella S, Litt AH, and Edmondson WT. 2004. Fingerprints of biocomplexity: Taxon-specific growth of phytoplankton in relation to environmental factors. *Limnology and Oceanography*, 49: 1446-1456.
- Leira M, Cantonati M (2008) Effects of water-level fluctuations on lakes: an annotated bibliography. *Hydrobiologia*, 613(1): 171-184.
- Manca M, Giussani G, de Bernardi R (1990) Dinamica di popolazione e distribuzione verticale di cladoceri planctonici del Lago Maggiore in relazione a parametri ambientali. *Atti VIII Congr. A.I.O.L.*: 511-520.
- Manca M, Tognota AG (1993) Seasonal changes in morphology and size of *Daphnia hyalina* Leydig in Lago Maggiore. *Hydrobiologia*, 264(3): 159-167.
- Manca M, Spagnuolo T, Comoli P (1994) Variation in carbon and nitrogen content with body length of *Daphnia hyalina-galeata* s.l. from laboratory and field observations. *Journal of Plankton Research*, 16: 1303-1341.

- Manca M, Comoli P (1995) Seasonal changes in size of the feeding basket of *Leptodora kindtii* (Focke) in Lago Maggiore as related to variations in prey size selection. *Limnology and oceanography*, 40(4): 834-838.
- Manca M, Comoli P, Spagnuolo T (1997) Length-specific carbon content of the *Daphnia* population in a large subalpine lake, Lago Maggiore (Northern Italy): The importance of seasonality. *Aquatic sciences*, 59(1): 48-56.
- Manca M, Visconti A, Fadda A, Caroni R, Cerutti I, Volta P (2009) Indagini sullo zooplancton e sulla rete trofica pelagica attraverso analisi d'isotopi stabili di carbonio e azoto. In: C.N.R.-I.S.E. Sede di Verbania. 2009. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 2008-2012. Campagna 2008. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 34-52.
- Matthews B, Mazumder A (2003) Compositional and interlake variability of zooplankton affect baseline stable isotope signatures. *Limnology and Oceanography*, 48(5): 1977-1987.
- Matthews B, Mazumder A (2005) Temporal variation in body composition (C:N) helps explain seasonal patterns of zooplankton $\delta^{13}\text{C}$. *Freshwater Biology*, 50: 502–515.
- Minagawa M, Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 48: 1135–1140.
- Naselli-Flores L (2003) Man-made lakes in Mediterranean semi-arid climate: the strange case of Dr Deep Lake and Mr Shallow Lake. *Hydrobiologia*, 506(1-3): 13-21.
- Pace ML, Cole JJ, Carpenter SR, Kitchell JF, Hodgson JR, Van de Bogert MC, Bade DL, Kritzberg ES, Bastwiken D (2004) Whole-lake carbon-13 additions reveal terrestrial support of aquatic food webs. *Nature*, 427: 240-243.
- Pace ML, Carpenter SR, Cole JJ, Coloso JJ, Kitchell JF, Hodgson JR., Middelburg JJ, Preston ND, Solomon CT, Weidel BC (2007) Does terrestrial organic carbon subsidize the planktonic food web in a clear-water lake?. *Limnology and Oceanography*, 52(5): 2177-2189.
- Pel R, Hoogveld H, Floris V (2003) Using the hidden isotopic heterogeneity in phyto- and zooplankton to unmask disparity in trophic carbon transfer. *Limnology and Oceanography*, 48(6): 2200-2207.
- Perbiche-Neves G, Ferreira R, Nogueira M (2011) Phytoplankton structure in two contrasting cascade reservoirs (Paranapanema River, Southeast Brazil). *Biologia*, 66(6): 967-976.

- Perga ME, Gerdeaux D (2006) Seasonal variability in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the zooplankton taxa in two alpine lakes. *Acta Oecologica*, 30: 69-77.
- Phillips DL (2001) Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. *Oecologia*, 127: 166–170.
- Phillips DL, Koch PL (2002) Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia*, 130: 114–125.
- Piscia R, Boggio E, Bettinetti R, Mazzoni M, Manca M (2018) Carbon and Nitrogen Isotopic Signatures of Zooplankton Taxa in Five Small Subalpine Lakes along a Trophic Gradient. *Water*, 10(1): 94. <https://doi.org/10.3390/w10010094>.
- Piscia R, Bettinetti R, Boggio E, Caroni R, Manca M (2016) Trophic role of crustacean zooplankton and transfer of POPs through the pelagic food web. Poster presentato al XXIII Congresso SIL (International Society of Limnology), Torino 31 Luglio-5 Agosto 2016.
- Post DM, Pace ML, Hairstone Jr NG (2000) Ecosystem size determines foodchain length in lakes. *Nature*, 405: 1047-1049.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3): 703–718.
- Rau GH, Takahashi T, des Marais DJ (1989) Latitudinal variations in plankton ^{13}C : implications for CO_2 and productivity in past oceans. *Nature*, 341: 516-518.
- Salonen K, Hammar T (1986) On the importance of dissolved organic matter in the nutrition of zooplankton in some lake waters. *Oecologia*, 68(2): 246-253.
- Schulz KL, Yurista PM (1995) Diet composition from allozyme analysis in the predatory cladoceran *Bythotrephes cederstroemi*. *Limnology and Oceanography*, 40(4): 821-826.
- Stewart SD, Hamilton DP, Baisden WT, Dedual M, Verburg P, Duggan IC, Hicks BJ, Graham BS (2017) Variable littoral-pelagic coupling as a food-web response to seasonal changes in pelagic primary production. *Freshwater Biology*, 62(12): 2008-2025.
- Takahashi K, Billings JD, Morgan JK (1990) Oceanic province: assessment from the time-series diatom fluxes in the northeastern Pacific. *Limnology and Oceanography*, 35(1): 154-165.
- Tanentzap AJ, Szkokan-Emilson EJ, Kielstra BW, Arts MT, Yan ND, Gunn JM (2014) Forests fuel fish growth in freshwater deltas. *Nature communications*, 5: 4077.
- Tóth LG, Zánkai NP (1985) Feeding of *Cyclops vicinus* (Uljanin)(Copepoda: Cyclopoida) in Lake Balaton on the basis of gut content analyses. *Hydrobiologia*, 122(3): 251-260.

- Tundisi, J. G., & Straskraba, M. (Eds.). (1999). Theoretical reservoir ecology and its applications. Backhuys Publishers 586 pp.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1999) Primary consumer $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 80: 1395–1404
- Vander Zanden MJ, Casselman JM, Rasmussen JB (1999) Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature*, 401(6752): 464.
- Visconti A, Manca M (2011) Seasonal changes in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of the Lago Maggiore pelagic food web. *Journal of Limnology*. 70: 263–271.
- Visconti A, Volta P, Fadda A, Manca M (2013) Roach in lake Maggiore: a peaceful invasion detected with C, N stable isotope analysis. *Global Journal of Science Frontier Research Agriculture and Veterinary*, 13: 1-8.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1999) Primary consumer $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 80(4): 1395-1404.
- Visconti A, Manca M (2011) Seasonal changes in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of the Lago Maggiore pelagic food web. *Journal of Limnology*, 70(2): 263-271.
- Wada E (2009) Stable $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ isotope ratios in aquatic ecosystems. *Proceedings of Japan Academy (B)*, 85: 98-107.
- Wetzel RG (1975) *Limnology*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, p. 767.
- Woodland RJ, Rodríguez MA, Magnan P, Glémet H, Cabana G (2012) Incorporating temporally dynamic baselines in isotopic mixing models. *Ecology*, 93: 131–144.
- Zohary T, Erez J, Gophen M, Berman-Frank I, Stiller M (1994) Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret. *Limnology and Oceanography*, 39(5): 1030-1043.
- Zohary T, Ostrovsky I (2011) Ecological impacts of excessive water level fluctuations in stratified freshwater lakes. *Inland Waters*, 1(1): 47-59.

ISBN 978 88 8080 308 9