

Università degli Studi dell'Insubria
Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia



Scuola di Dottorato in Scienze Esatte e Alta Tecnologia

DOTTORATO IN SCIENZE AMBIENTALI

- XXVII ciclo -

**Un approccio funzionale per lo studio della
biomagnificazione: analisi degli isotopi stabili per
indagare il trasferimento dei contaminanti lungo le
reti trofiche lacustri**

Emanuela Boggio

Tutors:

Dr. Bettinetti Roberta, Università degli studi dell'Insubria

Dr. Manca Marina, CNR-ISE (Istituto per lo Studio degli Ecosistemi) di Verbania

A.A. 2013/2014

Sommario

	Abstract.....	3
	Riassunto.....	5
	Introduction.....	7
1	Introduzione.....	9
1.1	La catena trofica lacustre: il ruolo dello zooplancton.....	9
1.1.1	Cladoceri.....	10
1.1.2	Copepodi.....	11
1.1.3	Predazione nello zooplancton.....	12
	Stable Isotope Analysis in freshwater ecology.....	14
1.2	Analisi degli Isotopi Stabili (S.I.A.) in ecologia delle acque dolci.....	17
1.2.1	Aspetti generali del metodo.....	17
1.2.2	L'utilizzo degli isotopi stabili per l'identificazione delle catene trofiche negli ecosistemi lacustri.....	19
1.2.3	Linea di base e posizione trofica.....	20
	Persistent Organic Pollutants - POPs.....	23
1.3	Contaminanti organici persistenti (POPs).....	25
1.3.1	POPs indagati.....	26
	Pesticidi organoclorurati (OCs) - DDT.....	26
	PCB.....	27
1.4	POPs negli ecosistemi acquatici: bioaccumulo nelle catene alimentari acquatiche ..	28
	Aims of the study.....	32
2	Scopi della ricerca.....	33
	Study site.....	35
3	Area di studio.....	36
3.1	I cinque piccoli laghi subalpini oggetto di studio.....	36
3.2	Un grande lago profondo subalpino: il Lago di Como.....	38
	Materials and methods.....	41
4	Materiali e metodi.....	43
4.1	Metodi di campionamento ed analisi.....	43
	Results of SIA.....	48
5	Risultati e discussione - SIA.....	50
5.1	SIA per i cinque piccoli laghi subalpini.....	50
5.2	SIA per il Lago di Como.....	61
5.2.1	Dervio.....	61
5.2.2	Argegno.....	69
5.2.3	Confronto tra le due stazioni del Lago di Como.....	78

6	Conclusioni - SIA	81
	Persistent Organic Pollutants of the pelagic food web of Lake Como and Lake Maggiore	87
7	Microinquinanti organici persistenti nello zooplancton e nei pesci del Lago di Como 2013 ..	88
	7.1 Variazioni stagionali nella densità di popolazione zooplanctonica del Lago di Como	88
	7.2 Contaminanti nello zooplancton del Lago di Como	90
	7.3 Contaminanti nei pesci del Lago di Como	100
8	Microinquinanti Organici Persistenti nello zooplancton del Lago Maggiore 2013.....	103
	8.1 Variazioni stagionali nella densità di popolazione zooplanctonica del Lago Maggiore	103
	8.2 Contaminanti nello zooplancton del Lago Maggiore	105
9	Contaminazione dello zooplancton del Lago di Como e del Lago Maggiore.....	111
10	Conclusioni	116

Abstract

Lacustrine ecosystems are complex systems characterized by large temporal and spatial variability in biological as well as physico-chemical aspects (de Bernardi et al. 1988; Bertoni et al. 2004), in which it is important to know the relationships between the different organisms of the food webs, in order to ensure proper management of these environments. The variability may be accompanied by important seasonal changes in the relative positions of zooplankton taxa and fish in the food web, and in the role of primary and secondary consumers in the transfer of matter and energy along trophic food web.

The stable isotope analysis is a useful tool to investigate the functionality of the different components of the lacustrine food web, to discriminate the different potential sources of nutrients and to study the trophic relationships between different organisms. The attention was posed in particular on the stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) which highlight uniquely the complex interactions and also trace the flow of energy and matter that occur in lake's ecosystems.

Because diet is an important route of exposure to organic contaminants for animals (Thomann et al., 1984; Hall et al., 1997), the use of stable isotopes can be a powerful tool for ecotoxicologist to explain the variability in the concentrations of contaminants, analyzing food choices and biomagnification of animal populations.

Identify the lake-specific function of the different species of organisms belonging to the zooplankton and fish seems therefore useful for better understanding the dynamics of contaminants through the food webs (Borgå et al., 2001; McIntyre and Beauchamp, 2007; Walters et al., 2008; Banas et al., 2009; Jardine et al., 2006).

This PhD work was intended to quantify the functional diversity of organisms belonging to the pelagic food web through stable isotope analysis of a large deep subalpine lake, Lake Como, and five other smaller lakes of the same geographical area. Furthermore, the results of the various components of the pelagic food web of Lake Como were compared with the results from Lake Maggiore's monitoring campaign from the CIP AIS project (International Commission for the Protection of Italian-Swiss Waters). First, the zooplankton was characterized from the point of view of the functional diversity, for each taxon was calculated trophic position and were examined seasonal variations.

Knowing in detail the diet behavior of the various components of the zooplankton and of two zooplanctivorous fish species, it was possible to identify and motivate some anomalies in the bioaccumulation of pollutants, as a result of changes in space and time of the various components of the community.

The contamination of DDT and PCBs were quantified, the “old generation POPs” particularly persistent that despite being prohibited by time are still present in the environment; the chemical-physical characteristics of these contaminants give them a special ability to bioaccumulate in organisms and to move along the trophic food web of lakes. The contamination levels recorded for the zooplankton of Lake Como for DDT ranged from 120.1 ng g⁻¹ lip. and 509.2 ng g⁻¹ lip. while the total PCBs are between 175 and 7073.3 ng g⁻¹ lip. The situation is different for the Lake Maggiore with higher values for DDT, between 181.9 and 1400.4 ng g⁻¹ lip., and values ranging between 102.5 and 3052.4 ng g⁻¹ lip. for total PCBs. The explanation for these differences is related to the history and evolution of the area surrounding the two basins and the different sources of pollution.

The zooplankton organisms for their short life span, low ability of detoxification and high capacity of assimilation, were found to be more contaminated than their predators both for Lake Como that Lake Maggiore. This confirms the suggestion to use this group of organisms as an early sentinel of possible contamination of the pelagic zone of lakes.

Riassunto

Gli ecosistemi acquatici lacustri sono sistemi complessi caratterizzati da ampia variabilità spazio-temporale sia dal punto di vista biologico sia da quello chimico-fisico (de Bernardi et al. 1988; Bertoni et al. 2004), nei quali è importante conoscere le relazioni che intercorrono tra i diversi organismi delle reti trofiche, al fine di garantire una corretta gestione di tali ambienti. La variabilità può essere accompagnata da importanti cambiamenti stagionali delle posizioni trofiche delle specie zooplanctoniche e dei pesci, nel trasferimento di massa ed energia lungo le reti trofiche ad opera dei consumatori primari e secondari.

L'analisi degli isotopi stabili è un utile strumento per investigare dal punto di vista funzionale le varie componenti della rete trofica lacustre, discriminare le diverse potenziali fonti di nutrimento e consente di studiare le relazioni trofiche tra i diversi organismi. L'interesse è rivolto in particolare agli isotopi stabili di azoto ($\delta^{15}\text{N}$) e carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) che evidenziano in modo univoco le interazioni anche complesse e permettono di tracciare i flussi di energia e materia che si verificano negli ecosistemi lacustri.

Dal momento che la dieta è un'importante via di esposizione ai contaminanti organici per gli animali (Thomann et al., 1984; Hall et al., 1997), l'utilizzo degli isotopi stabili può diventare un potente strumento per gli ecotossicologi per spiegare la variabilità nelle concentrazioni dei contaminanti, analizzando le scelte alimentari e la biomagnificazione delle popolazioni animali.

Identificare la funzione lago-specifica delle diverse specie di organismi appartenenti allo zooplancton e ai pesci pare quindi utile per una migliore comprensione delle dinamiche dei contaminanti attraverso le reti trofiche (Borgå et al., 2001; McIntyre e Beauchamp, 2007; Walters et al., 2008; Banas et al., 2009; Jardine et al., 2006).

Con il presente lavoro di Dottorato si è inteso quantificare la diversità funzionale degli organismi appartenenti alla rete trofica pelagica attraverso l'analisi degli isotopi stabili di un grande lago profondo subalpino, il Lago di Como, e di altri cinque piccoli laghi appartenenti alla stessa area geografica. Inoltre, i risultati delle diverse componenti della rete trofica pelagica del Lago di Como sono stati confrontati con i risultati derivanti dalla campagna di monitoraggio del Lago Maggiore in ambito del progetto CIP AIS (Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere). Per prima cosa, è stata caratterizzata dal punto di vista funzionale la componente zooplanctonica, per ogni taxon è stata calcolata la posizione trofica e sono state esaminate le variazioni stagionali.

Conoscendo in dettaglio i comportamenti alimentari delle varie componenti dello zooplancton e di due specie ittiche zooplanctofaghe, è stato possibile identificare e motivare alcune

anomalie nel bioaccumulo degli inquinanti, come conseguenza dei cambiamenti nello spazio e nel tempo delle varie componenti della comunità.

Dal punto di vista della contaminazione sono stati quantificati i DDT e i PCB, composti di vecchia generazione particolarmente persistenti che pur essendo vietati da tempo sono ancora presenti nell'ambiente; le caratteristiche chimico-fisiche di questi contaminanti conferiscono loro una particolare capacità di bioaccumulare negli organismi e di trasferirsi lungo le reti trofiche lacustri. I livelli di contaminazione registrati per lo zooplancton del Lago di Como per il DDT sono compresi tra 120,1 ng g⁻¹ lip. e 509,2 ng g⁻¹ lip. mentre i PCB totali sono compresi tra 175 e 7073,3 ng g⁻¹ lip. Diversa è la situazione per il Lago Maggiore con valori maggiori per i DDT, compresi tra 181,9 e 1400,4 ng g⁻¹ lip., e valori che oscillano tra 102,5 e 3052,4 ng g⁻¹ lip. per i PCB totali. La spiegazione di tali differenze è legata alla storia e all'evoluzione del territorio circostante i due bacini e la diversa origine dell'inquinamento.

Gli organismi zooplanctonici con cicli vitali particolarmente rapidi, scarsa capacità di detossificazione e forte capacità di assimilazione, sono risultati essere più contaminati dei loro predatori sia per il Lago di Como che per il Lago Maggiore. Si conferma quindi il suggerimento di utilizzare questo gruppo di organismi come bioindicatore precoce di una possibile contaminazione della zona pelagica dei laghi.

INTRODUCTION

The subalpine deep lakes Como and Maggiore, represent a resource of great economic and environmental importance and constitute, with Lake Garda, Lugano and Iseo, over 80% of all water resources in Italy (IRSA, 1984; Marchetti et al., 1992).

These two lakes are located within the Po basin and these freshwater bodies are characterized by catchments area with extension that exceeds thirty times the surface area of the lake itself and they are also subject to frequent flood events, with particular reference to Como and Maggiore.

The presence of these deep lakes also affects the climate, because of the ability of the great lakes to store heat during the summer and return it to the atmosphere in winter; also, the area is identified as the area of the so-called "great lakes", with intermediate characteristics between the continental climate of the Po valley and the alpine zone of the mountains.

Simplifying, the pelagic food web involves primary producers (phytoplankton), primary consumers (zooplanktonic grazers), secondary consumers (invertebrate predators and zooplanktivorous fish) and ichthyophagous fishes.

Differently from what is deemed in the past from ecotoxicologists, the zooplankton is composed of primary and secondary consumers and it is a group of organisms of key importance in regulating patterns and mechanisms through which matter, energy and pollutants are transferred from the base to the upper levels of food webs.

Zooplankton communities considered in this thesis belong to the class of planktonic crustaceans consist of two subgroups, cladocerans and copepods, which are the most important primary and secondary consumers of the lake.

There is no doubt that predation plays a dominant role in maintaining plankton community structure (Hrbáčková, 1962; Brooks and Dodson, 1965).

In fact, predation is an important factor in regulating the abundance and distribution of species and size classes of zooplankton and it is operated both by vertebrate (fish) and invertebrates (adult copepods and cladocerans predators) predators.

These two types of predators act in a different way: while the former tend to select the preys in more visibility and size, the latter usually have a range of preferential size of the prey that depend on the size of the structures designed to capture them. As is well summarized in the *Size-Efficiency Hypothesis*, formulated by Brooks and Dodson in 1965, the two types of predation, of course, produce different situations: an intense predation by fish, affecting to a greater extent on undertakings bigger size organisms, will encourage the dominance of small cladocerans and rotifers.

Zooplankton is the basic source of food for juvenile stages of all fish species in the case of subalpine lakes, and even adult forms of species such as whitefish (*Coregonus sp.*), Bleak (*Alburnus alburnus*) and shad (*Alosa fallax lacustris*) are consumers.

In these environments, predation by invertebrate predator *Bythotrephes longimanus* and *Leptodora kindtii* is of considerable importance (Giussani, 1974; de Bernardi, 1974; Manca and Tognota Galli, 1993; Manca and Comoli, 1995). Their rate of predation is a function of environmental variables, such as temperature of the water: in general, it increases with the increasing of temperature (Garton et al., 1990), although there is a different optimum for the two species; the first would be more intolerant of low temperatures, the second would show a higher discomfort at high temperatures (Berg and Garton, 1988).

Furthermore, the rate of predation is a density-dependent phenomenon: increasing of population density of prey, increases the likelihood of meeting them. This probability, also, depends on the speed at which predator travels, which is also primarily dependent of temperature (Browman et al., 1989). Secondly, the cruising speed is relatable to the age, since the adults are faster of young (Auer, 1988), sex and physiological condition of the animal.

1 INTRODUZIONE

I grandi laghi profondi subalpini Como e Maggiore rappresentano una risorsa di grande importanza economica ed ambientale e costituiscono, insieme ai laghi di Garda, di Lugano ed Iseo, oltre l'80% di tutte le risorse idriche in Italia (IRSA, 1984; Marchetti et al., 1992).

Per implementare la corretta gestione di questi ecosistemi lacustri è necessario comprendere i meccanismi alla base della loro evoluzione naturale in assenza di impatto umano, quindi è necessario approfondire la conoscenza riguardo i processi chimico-fisici e le componenti biologiche presenti.

1.1 La catena trofica lacustre: il ruolo dello zooplancton

Le comunità ecologiche non sono entità statiche ma al contrario sono dinamiche nella loro composizione e funzione. Ciascuna specie non può esistere in completo isolamento, infatti è coinvolta in un sistema di complesse interazioni preda/predatore nel quale gli organismi della comunità sono in grado di accumulare e trasformare energia e materia.

La premessa fondamentale per capire come funziona il trasferimento di energia e di materia in un ecosistema è la descrizione dei rapporti alimentari che intervengono in una comunità ecologica che si realizza attraverso le reti trofiche.

Il lago è un sistema dinamico, dove è possibile individuare una fitta rete di relazioni. Una prima distinzione, legata alla morfologia del lago, può essere fatta tra la zona litorale e quella pelagica.

La rete trofica pelagica, semplificando, coinvolge i produttori primari (fitoplancton), i consumatori primari (erbivori zooplanctonici), i consumatori secondari (predatori di invertebrati e pesci zooplanctivori) e pesci ittiofagi (figura 1).

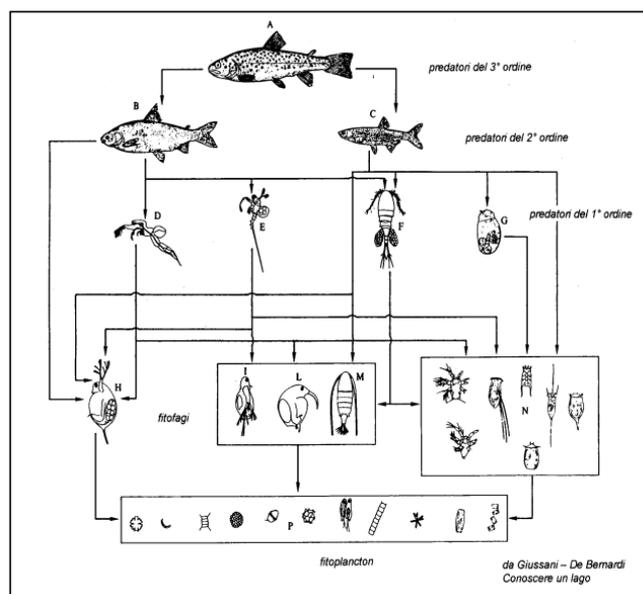


Figura 1: Rappresentazione schematica della catena trofica pelagica.

Lo zooplancton è un gruppo di organismi di importanza fondamentale nel regolare i processi ed i meccanismi attraverso i quali la materia, l'energia e le sostanze inquinanti vengono trasferiti dalla base ai livelli superiori delle reti alimentari. Lo zooplancton è rappresentato dai consumatori primari e secondari.

Le comunità di zooplancton considerate in questa tesi appartengono alla classe dei crostacei planctonici, costituito da due sottogruppi: cladoceri e copepodi, i più importanti consumatori primari e secondari del lago.

1.1.1 Cladoceri

Il sottordine dei Cladoceri, appartenente alla classe dei Branchiopodi, costituisce un gruppo di animali prevalentemente d'acqua dolce. Sono organismi di piccole dimensioni (0,2-3 mm), che eccezionalmente arrivano a 12 mm (i.e. *Leptodora kindtii*).

La maggior parte è fitofaga e detritivora; i complessi movimenti delle appendici toraciche creano una corrente d'acqua attraverso le valve che, oltre ad ossigenare il corpo, fa sì che le particelle alimentari vengano convogliate lungo una doccia ventrale dove vengono filtrate e portate alla bocca.

Daphnia utilizza particelle differenti in funzione della taglia dell'animale: sia il tasso di rimozione, dipendente dalla velocità di movimento delle antenne in grado di creare flussi di acqua più o meno intensi, sia la dimensione massima delle particelle ingeribili aumentano, infatti, con l'aumento delle dimensioni. La terza e la quarta coppia di arti funzionano come filtri, con una struttura a pettine, in cui la distanza varia a seconda delle dimensioni del corpo in quasi tutte le specie (Burns, 1968; Geller e Müller, 1985). Nadin-Hurley e Duncan (1976) mostrano, tuttavia, che anche la forma dell'alga è importante, poiché il fattore critico di ingestione è rappresentato dalla lunghezza. Così colonie di *Fragilaria* possono essere ingerite da *Daphnia* quando la loro lunghezza è inferiore alla lunghezza di una singola cellula, cioè con un numero di celle inferiore di 13; analogamente, colonie sferiche di *Eudorina* o *Microcystis* sono filtrabili se hanno un diametro inferiore a 50 micron (Ferguson et al., 1982). Cambiamenti nelle dimensioni della popolazione di *Daphnia* comportano pertanto variazioni nello spettro dimensionale delle particelle ingerite.

Per queste ragioni, la maggioranza dei cladoceri può essere definita sia come detritivori che come erbivori (Kerfoot e Kirk, 1991).

Per *Bosmina* le preferenze alimentari variano con l'età e, limitatamente agli adulti, secondo una selezione al gusto. Questo comportamento si chiama alimentazione duale (*dual-feeding* - De Mott, 1986, De Mott e Kerfoot, 1982).

Per *Diaphanosoma*, Kerfoot e Kirk (1991) avanzano l'ipotesi, non ulteriormente approfondita, di una elevata variabilità nella selezione su base dimensionale che, contrariamente a quanto

sostenuto da Gliwicz (1969), indicherebbe una grande adattabilità anche a grandi spettri alimentari ($> 50 \mu\text{m}$).

All'interno di questo gruppo di animali non mancano forme predatrici, come *Leptodora kindtii* e *Bythotrephes longimanus*.

1.1.2 Copepodi

La sottoclasse dei Copepodi, appartenenti alla classe dei Maxillopodi, comprende l'ordine dei Calanoidi e dei Ciclopoidi. Il loro corpo è allungato e metamerico, sono organismi le cui dimensioni vanno da 0,3 a 5 mm al massimo.

I Copepodi Calanoidi vengono classificati, in accordo alle loro abitudini alimentari, come "onnivori con una tendenza all'erbivoria" e in alcuni casi (per esempio *Eurytemora lacustris*) sono certamente carnivori (Williamson e Butler, 1986). Non sono dei filtratori, perché creano una corrente con l'apparato boccale e il materiale in sospensione non viene incanalato passivamente, come si credeva erroneamente in passato, ma è indirizzato all'interno di una zona di cattura utilizzando le seconde mascelle che catturano e separano le alghe dalla corrente alimentare. Ancora prima di catturare con le mascelle, altre appendici dirigono le alghe nell'area di cattura attraverso un meccanismo a "clap" e "fling" e le sminuzzano in parti più piccole.

La selezione del materiale dalla corrente alimentare permette ai Calanoidi di sopravvivere anche in ambienti con una ridotta quantità di nutrienti (Strickler, 1982).

Posseggono due differenti modalità di nutrizione in relazione alle dimensioni delle particelle. Nel primo caso, con dimensioni inferiori a $12 \mu\text{m}$, si comportano come dei veri filtratori nutrendosi principalmente di alghe e detrito fresco, operando una forte selezione in virtù del sapore ("selezione del gusto" - "taste selection").

Sono inoltre in grado di produrre piccole particelle partendo da materiale più grossolano (Richman et al., 1980).

La seconda modalità di nutrizione interessa le particelle maggiori di $12 \mu\text{m}$ ed è di tipo attivo, ed è inoltre implementata con prede animali, come i rotiferi. Tra questi vengono preferiti quelli con un corpo molle, del tipo *Synchaeta*, e privi di spine o appendici che ne favoriscono la fuga (eg. *Keratella*, *Polyarthra*) (Williamson e Butler, 1986).

I Rotiferi non rappresentano una risorsa alternativa e meno valida delle alghe: la loro selezione viene operata anche in presenza delle alghe, anche se tende ad aumentare al decremento delle densità algali.

I Copepodi Ciclopoidi sono dei sospensivori allo stadio naupliare e nei primi due stadi di copepodite. Come suggerito da Kerfoot (1980), i copepoditi sono anche divoratori di uova ed in particolare sono in grado di penetrare nella sacca ovigera delle grandi dafnie e predarne le

uova (Gliwicz e Stibor, 1993). Solamente vengono colpite le dafnie di dimensioni maggiori, mentre quelle al di sotto di 2,25 mm (Gliwicz e Lampert, 1994) sono immuni alla predazione delle uova indipendentemente dalla specie o dalla taglia di prima riproduzione.

Tuttavia, si può ritenere che i copepoditi delle specie piccole, così come *Mesocyclops leuckarti*, siano in grado di penetrare in dafnie anche di dimensioni inferiori.

Gli stadi adulti dei ciclopoidi sono tipicamente dei predatori che cercano attivamente le loro prede.

1.1.3 Predazione nello zooplancton

Non c'è dubbio che la predazione giochi un ruolo dominante nel mantenimento della struttura della comunità planctonica (Hrbáček, 1962; Brooks e Dodson, 1965).

In realtà, la predazione è un fattore importante nel regolare l'abbondanza e la distribuzione delle specie e delle classi dimensionali di zooplancton ed è gestito sia da predatori vertebrati (pesci) che invertebrati (copepodi adulti e cladoceri predatori).

Questi due tipi di predatori agiscono in modo diverso: mentre i primi tendono a selezionare le prede in relazione alla visibilità e alla dimensione, i secondi invece hanno una gamma di dimensioni preferenziali della preda in funzione delle dimensioni delle strutture progettate per catturare quest'ultima. Come è ben sintetizzato nella ipotesi Taglia-Efficacia (*Size-Efficiency Hypothesis*), formulata da Brooks e Dodson nel 1965, i due tipi di predazione, ovviamente, producono situazioni diverse: una predazione intensa esercitata dai pesci, che colpiscono in misura maggiore organismi di dimensioni maggiori, andrà a favorire il predominio delle piccole specie di cladoceri e rotiferi.

Lo zooplancton è la fonte principale di cibo per gli stadi giovanili di tutte le specie ittiche nel caso di laghi subalpini, ma anche gli adulti di alcune specie come il coregone (*Coregonus* sp.), l'arborella (*Alburnus alburnus*) e l'agone (*Alosa fallax lacustris*) sono zooplattivori.

In questi ambienti, la predazione da parte di predatori invertebrati come *Bythotrephes longimanus* e *Leptodora kindtii* è di notevole importanza (Giussani, 1974; de Bernardi, 1974; Manca e Tognola Galli, 1993; Manca e Comoli, 1995). Il loro tasso di predazione è in funzione delle variabili ambientali, quali ad esempio la temperatura dell'acqua: in generale, aumenta con l'aumentare della temperatura, anche se il intervallo è differente per le due specie (Garton et al., 1990). Il primo risulta più sensibile alle basse temperature, il secondo invece sfugge alle alte temperature (Berg e Garton, 1988).

Inoltre, il tasso di predazione è un fenomeno densità-dipendente: l'aumento della densità di popolazione delle prede aumenta la probabilità di incontrarle. Questa probabilità, inoltre, dipende dalla velocità di movimento dei predatori, che è anche in funzione della temperatura (Browman et al., 1989). Secondariamente, la velocità di spostamento è in funzione dell'età,

dal momento che gli adulti sono più veloci dei giovani (Auer, 1988), a parità di sesso e condizione fisiologica dell'animale.

La curva di elettività di un predatore invertebrato è tipicamente rappresentata da una campana, che indica la presenza di una dimensione ottimale della preda, oltre la quale la selettività diminuisce con l'aumentare delle dimensioni della preda (Zaret, 1980). Tuttavia, questo rapporto non è del tutto vero, perché alcuni studi hanno dimostrato la capacità di *Bythotrephes longimanus* di utilizzare anche grandi prede, e di *Leptodora kindtii*, in grado di predare su base visiva (Lehman e Branstrator, 1995; Lehman e Cáceres, 1993; Manca et al., 2000; Muirhead e Sprules, 2003).

Stable Isotope Analysis in freshwater ecology

Stable isotope method has rapidly increased to investigate freshwater food web ecology. Stable isotope analysis allows us to answer questions related to plant and animal ecophysiology, trophic structure, and energy pathways within freshwater ecosystems and at their interfaces with marine and terrestrial ecosystems.

Stable isotope studies are particularly useful in aquatic settings because of limited opportunities for direct observations, high degree of spatial complexity and diverse potential sources of nutrients, organic matter, and prey (Finlay and Kendall, 2007). Specifically, there has been a substantial increase in the use of nitrogen and carbon stable isotopes to study trophic relationships in aquatic ecosystems, and the results obtained can help in focusing on some general patterns.

Stable isotopes maintain their proton composition unvaried over time and the isotope analysis determines the isotopic fingerprint of a substance; that is, the relative abundance of different isotopes of an element in the sample.

Carbon, Nitrogen and Sulfur are commonly the stable (heavy) isotopes used in food web studies.

Biological materials naturally contain varying proportions of carbon and nitrogen in the form of their stable isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) and isotope fractionation along the food web; this means that a different isotopic distribution in the reagents and products, may cause an isotopic enrichment in relation to the composition of the resources used and then indicate the trophic state (Doucette et al., 1996; Wada, 2009). So, the flow of energy through food webs can be characterized by Analysis of Stable Isotopes of carbon and nitrogen (DeNiro and Epstein, 1978, 1981) and their ratio (Begon et al., 1989).

These isotopes enable to estimate trophic position and carbon flow to consumers in food webs, integrating the assimilation of energy or mass flow through all the different trophic pathways leading to an organism because the foods that animals eat often exhibit proper characteristic isotopic signatures.

Stable isotopes have the potential to simultaneously capture complex interactions, including trophic omnivory, and to track energy or mass flow through ecological communities (Peterson and Fry, 1987; Kling et al., 1992; Cabana and Rasmussen, 1996), particularly important in aquatic ecosystems where large temporal and spatial variability in biological as well as physico-chemical structure are present (de Bernardi et al., 1988; Bertoni et al., 2004). The variability may be accompanied by important seasonal changes in the relative positions of zooplankton taxa in the food web, and in the role of primary and secondary consumers in the transfer of matter and energy along food web pathways, but, predominantly, signatures of

primary producers are characterized by temporal fluctuations depending on seasonal Dissolved Inorganic Carbon (DIC) variations, Particulate Organic Matter (POM) composition, algal productivity, species composition, metabolic processes (Matthews and Madzumder, 2005; Vuorio et al., 2006; Gu et al., 2006), temperature and inorganic nutrient recycling (Perga and Gerdeaux, 2006).

Also, contribution of primary producer to suspended matter may prevail in deep large lakes (Cabana and Rasmussen, 1996; Vander Zanden and Rasmussen, 1999; Post, 2002; Matthews and Madzumder, 2003; Vuorio et al., 2006; Visconti et. Al., 2011) and high turnover rates and seasonal changes in phytoplankton species composition result in seasonal changes in isotopic signatures. Generally in lakes of temperate regions, carbon isotopic signature oscillates between summer maxima and winter minima (^{13}C depleted) (Perga and Gerdeax, 2006; Visconti and Manca, 2011).

In complex systems, such as the littoral, isotope technique allows to distinguish the main sources of organic matter (phytoplankton, macroalgae, allochthonous organic matter) and, therefore, to identify their relative trophic role for consumers (Michener and Schell, 1994). Isotopic analysis may also be a good way to highlight the adaptability of species at different trophic environmental situations, emphasizing both temporal (Goering et al., 1990; Yoshioka et al., 1994; Riera and Richard, 1997; Vizzini and Mazzola, 2002, 2003), and spatial variations occurring even on a small scale (Zieman et al., 1984; Riera and Richard, 1996; Deegan and Garritt, 1997; Jennings et al., 1997; Marguillier et al., 1997).

The stable nitrogen isotope analysis has also been used as a tool for the detection of environmental changes due to the contribution of allochthonous organic matter (Rau et al., 1981; Van Dover et al., 1984; Risk et al., 1994; Risk and Erdmann, 2000; Costanzo et al., 2001). The analysis of $\delta^{15}\text{N}$ values in organisms of various trophic levels allows to discriminate the relative contribution of trophic organic matter than organic sources of anthropogenic nature, and therefore to determine the impact of allochthonous inputs (i.e. organic matter discharges of various kinds) on coastal ecosystems.

The results will be obtained from isotopic analysis allow to trace the source of nourishment for different organisms in different environments and different zones on the same lake (France, 1995; Cabana and Rasmussen, 1996; Vander Zanden and Rasmussen, 1999).

In lakes, $\delta^{13}\text{C}$ allow the discrimination between two major sources of available energy, littoral (near shore) production from attached algae and detritus, and pelagic (open water) production from phytoplankton, because the $\delta^{13}\text{C}$ of the base of the littoral food web tends to be enriched in ^{13}C (less negative $\delta^{13}\text{C}$) relative to the base of the pelagic food web (France 1995).

In lakes with different trophic levels there is an alteration in the difference between the carbon content of the food base and that of zooplankton grazers, and a different contribution of non-phytoplankton sources to their diet (Grey et al., 2000). An analysis of stable isotopes, extended to leading deep subalpine lakes, representing different degrees of trophic level, would allow to verify if and how the baseline and the role of different zooplankton taxa vary depending on the trophic state. It would also assess the level of functional vicariance of different taxa, which is necessary to define and understand the "operational diversity" (Moss et al., 2009) of these environments.

Each species have a particular carbon isotopic signature, that integrate food isotopic composition, depending on a proper time-scale, ranging between weeks for zooplankton and benthos, months for fish (Grey, 2000; Heisslein et al., 1991; Heisslein et al., 1993; Perga and Gerdeaux, 2005; Woodland et al., 2012). Therefore, integration of temporal variations of diet signature is a necessary step for estimating consumer's role in food web.

Primary consumers are typically selected as baseline organisms due to their known trophic position and capacity to dampen the temporally variable isotopic values of autotrophic resources (Cabana and Rasmussen 1996; Post, 2002).

Zooplankton are commonly used to establish a baseline isotopic signature for pelagic production in lakes. In particular, *Daphnia* is often used for measuring the baseline $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in the pelagia of lakes, because *Daphnia*, as a short-lived organism, is better suited for finer scale temporal integration of pelagic $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ signatures. Also, *Daphnia* feeding behaviours seems to be seasonally stable and similar in different lakes.

Anyway, a good baseline will (1) integrate isotopic changes at a time scale near that of the secondary consumer of interest, (2) cover the same time period as the secondary consumer of interest (i.e., be collected in the same year), and (3) capture the spatial variability that contributes to the isotopic signature of the secondary consumer of interest (Post, 2002).

Trophic position of a single taxon was referred to its baseline, and the discrepancy from it (ΔN e ΔC) define its trophic position and the utilized food source: if a taxon shows $\delta^{13}\text{C}$ values similar to those of the baseline it means that C sources is unique for all population; on the contrary, values that significantly moves it away from that of base line, demonstrate that there is a multiple carbon source for the population. In general, the $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signatures of individuals of the same species feeding on the same prey may vary as much as 2‰ (Grey and Jones, 1999; Matthews and Madzumder, 2003).

A $\delta^{15}\text{N}$ isotopic taxon values differs from those of the base line less than the enrichment value between trophic levels it means that they occupies the same trophic level.

1.2 Analisi degli Isotopi Stabili (S.I.A.) in ecologia delle acque dolci

L'utilizzo del metodo degli isotopi stabili (S.I.A.) è rapidamente aumentato in campo ecologico per lo studio delle reti trofiche. L'analisi degli isotopi stabili permette di rispondere a domande relative all'ecofisiologia vegetale ed animale, di comprendere la struttura trofica ed i percorsi energetici degli ecosistemi di acqua dolce ed il loro interfacciarsi con ecosistemi marini e terrestri.

Lo studio degli isotopi stabili è particolarmente utile in ambienti acquatici per la mancanza di osservazioni dirette, per l'elevato grado di complessità spaziale e per le diverse potenziali fonti di nutrienti, quali la sostanza organica e le prede (Finlay e Kendall, 2007). In particolare, vi è stato un notevole interesse all'uso degli isotopi stabili di azoto e carbonio negli ecosistemi acquatici per realizzare modelli più generali.

1.2.1 Aspetti generali del metodo

In natura esistono diversi isotopi dello stesso elemento. Essi sono caratterizzati da differenze nel numero di neutroni, quindi hanno masse diverse, e questo provoca la separazione parziale degli isotopi più leggeri da quelli più pesanti durante le reazioni chimico-fisiche. Questo processo è chiamato frazionamento isotopico.

Tre meccanismi portano al frazionamento isotopico:

- Il frazionamento isotopico all'equilibrio è la separazione parziale degli isotopi tra due o più sostanze in equilibrio chimico, cioè un frazionamento isotopico tra diverse fasi o composti di un sistema. Durante le reazioni di equilibrio, l'isotopo più pesante diventa generalmente arricchito (si accumula preferenzialmente) nelle specie o composti con lo stato energetico più elevato.
- Il frazionamento isotopico cinetico si verifica in sistemi non in equilibrio isotopico nel quale la reazione non è chimicamente reversibile oppure quando i prodotti ed i reagenti sono separati in modo da evitare la reazione inversa. Le reazioni possono essere unidirezionali se i prodotti di reazione diventano fisicamente isolati dai reagenti. Quindi, gli isotopi più leggeri reagiscono più prontamente e tendono a concentrarsi nei prodotti ed i reagenti residui diventano arricchiti in isotopi pesanti.
- Gli effetti isotopici di spin nucleare non sono dipendenti dalla massa; si verificano a causa delle differenze nella struttura nucleare a livello isotopico e portano a differenze di spin nucleare.

Gli isotopi stabili mantengono il loro numero di protoni invariato nel tempo e l'analisi degli isotopi determina la firma isotopica di una sostanza cioè l'abbondanza relativa dei diversi isotopi di un elemento nel campione.

Carbonio, azoto e zolfo sono generalmente isotopi stabili (pesanti) e vengono utilizzati negli studi delle reti alimentari.

I materiali biologici contengono naturalmente proporzioni variabili di carbonio e azoto sotto forma dei loro isotopi stabili $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) con caratteristico frazionamento isotopico lungo la catena alimentare; questo significa che una diversa distribuzione isotopica nei reagenti e nei prodotti, può causare un arricchimento isotopico in relazione alla composizione delle risorse utilizzate e quindi indicare lo stato trofico (Doucette et al., 1996; Wada, 2009). Quindi, il flusso di energia attraverso le reti alimentari può essere caratterizzato mediante l'analisi degli isotopi stabili di carbonio ed azoto (DeNiro e Epstein, 1978, 1981) ed il loro rapporto (Begon et al., 1989).

Questi isotopi permettono di stimare la posizione trofica e il flusso di carbonio dei consumatori all'interno di una catena alimentare, integrando l'assimilazione di energia o il flusso di massa attraverso tutti i diversi livelli trofici dal momento che gli alimenti che gli animali mangiano spesso mostrano caratteristiche firme isotopiche.

Gli isotopi stabili hanno il potenziale di registrare simultaneamente interazioni complesse, tra cui l'onnivoria, e per monitorare il flusso di energia o di massa attraverso le comunità ecologiche (Peterson e Fry, 1987; Kling et al., 1992; Cabana e Rasmussen, 1996).

Il contenuto isotopico viene espresso in ‰ come la differenza tra il campione ed uno standard di riferimento usando la seguente equazione (Hobson e Welch, 1992):

$$\delta = (R_{\text{campione}} / R_{\text{standard}} - 1) \cdot 1000$$

dove R è il rapporto isotopico tra l'isotopo pesante e quello leggero, R_{campione} è il rapporto isotopico del campione, e R_{standard} è quello dello standard di riferimento. Gli standard utilizzati rispettivamente sono la Pee dee Belemnite (PDB) per il carbonio e l'azoto atmosferico per l'azoto.

Un δ ("delta") positivo indica che il campione è più arricchito in isotopi pesanti rispetto allo standard, mentre un valore di delta negativo indica che il campione è impoverito di isotopi pesanti rispetto allo standard.

I rapporti isotopici sono tipicamente misurati attraverso l'utilizzo di uno spettrometro di massa per il rapporto isotopico (IRMS - Isotope Ratio Mass Spectrometry), inventato da J. J. Thompson nel 1910, in cui i metodi di spettrometria di massa sono utilizzati per misurare l'abbondanza relativa di atomi o molecole cariche in un dato campione, sulla base del loro rapporto massa-carica.

È noto che il rapporto tra gli isotopi stabili dell'azoto ($\delta^{15}\text{N}$) può essere utilizzato per stimare la posizione trofica perché il $\delta^{15}\text{N}$ di un consumatore è tipicamente arricchito del 3-4 ‰ rispetto alla sua dieta (DeNiro e Epstein, 1981; Minagawa e Wada, 1984; Peterson e Fry, 1987). Al contrario, il rapporto isotopico del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) attraverso le reti alimentari cambia meno (Rounick e Winterbourn, 1986; Peterson e Fry, 1987; France e Peters, 1997), con un incremento di circa l'1 ‰ (De Niro e Epstein, 1978), e, pertanto, può essere utilizzato per valutare le fonti principali di carbonio per un organismo, rivelando così i contributi delle diverse fonti di cibo.

Il contenuto isotopico di un organismo indica il numero medio di trasferimenti trofici che esistono tra lui e le specie di base in relazione al livello trofico medio di cui si nutre.

1.2.2 L'utilizzo degli isotopi stabili per l'identificazione delle catene trofiche negli ecosistemi lacustri

Il metodo dell'analisi degli isotopi stabili è particolarmente importante nello studio degli ambienti acquatici, che sono caratterizzati da una notevole variabilità temporale, spaziale e fisico-chimica (de Bernardi et al., 1988; Bertoni et al., 2004.). La variabilità può essere accompagnata da importanti cambiamenti stagionali nelle relative posizioni dei taxa zooplanctonici nella catena alimentare e nel ruolo dei consumatori primari e secondari nel trasferimento di materia e di energia lungo le reti alimentari; le firme isotopiche dei produttori primari fluttuano temporalmente in funzione delle variazioni stagionali del carbonio inorganico disciolto (DIC), della composizione del particolato organico (POM), della produttività delle alghe, della composizione delle specie, dei processi metabolici (Matthews e Madzumder, 2005; Vuorio et al, 2006; Gu et al., 2006), dalla temperatura e dall'utilizzo dei nutrienti inorganici (Perga e Gerdeaux, 2006).

Nei grandi laghi profondi inoltre il contributo dei produttori primari (Cabana e Rasmussen, 1996; Vander Zanden e Rasmussen, 1999; Post, 2002; Matthews e Madzumder, 2003; Vuorio et al., 2006, Visconti et al., 2011) e i tassi di turnover elevati e le variazioni stagionali nella composizione delle specie fitoplanctoniche si rivelano nelle variazioni stagionali delle firme isotopiche. Generalmente nei laghi delle regioni temperate, la firma isotopica del carbonio oscilla tra i massimi estivi (C meno impoverito in ^{13}C) e i minimi invernali (C più impoverito in ^{13}C) (Perga e Gerdeax, 2006; Visconti e Manca, 2011).

Nei sistemi complessi, come il litorale, il metodo degli isotopi permette di distinguere le principali fonti di materia organica (fitoplancton, macroalghe, materia organica alloctona) e, di conseguenza, permette di identificare il loro ruolo trofico in relazione ai consumatori (Michener e Schell, 1994). L'analisi isotopica può anche essere un buon metodo per evidenziare l'adattabilità di una specie in diverse situazioni ambientali a diversa trofia,

sottolineando sia variazioni temporali (Goering et al., 1990; Yoshioka et al., 1994; Riera e Richard, 1997; Vizzini e Mazzola, 2002 e 2003), che spaziali, anche su piccola scala (Zieman et al., 1984; Riera e Richard, 1996; Deegan e Garritt, 1997; Jennings et al., 1997; Marguillier et al., 1997).

L'analisi degli isotopi stabili dell'azoto è utilizzata come strumento per l'individuazione dei cambiamenti ambientali dovuti al contributo di materia organica alloctona (Rau et al., 1981; Van Dover et al., 1984; Risk et al., 1994; Risk e Erdmann, 2000; Costanzo et al., 2001). L'analisi dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ negli organismi ai vari livelli trofici permette di discriminare l'eventuale apporto di materia organica originaria da fonti di natura antropica, e quindi di determinare l'impatto di ingressi di materiale alloctono (cioè scarichi di materia organica di vario genere) sugli ecosistemi costieri.

I risultati ottenuti dall'analisi isotopica permetteranno di tracciare la fonte di nutrimento per i diversi organismi in differenti ambienti e differenti zone dello stesso lago (France, 1995; Cabana e Rasmussen, 1996; Vander Zanden e Rasmussen, 1999).

Nei laghi, il $\delta^{13}\text{C}$ consente la discriminazione tra due principali fonti di energia disponibili. È possibile distinguere infatti tra la produzione litorale di alghe adese al substrato e detrito, e la produzione pelagica (di acque profonde) di fitoplancton, poiché hanno firme isotopiche differenti, in quanto il litorale tende ad avere un segnale meno impoverito in ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$ meno negativo) rispetto a quello del pelago (France, 1995).

Nei laghi a diversa trofia è evidente un'alterazione nella differenza tra il contenuto di carbonio della base alimentare e quello dello zooplancton erbivoro, con un diverso contributo delle fonti non fitoplanctoniche alla loro dieta (Grey et al., 2000). L'analisi degli isotopi stabili, esteso ai principali laghi profondi subalpini, con diversi gradi di trofia, consentirebbe di verificare se e come la linea di base e il ruolo dei diversi taxa zooplanctonici varino a seconda dello stato trofico. Si vorrebbe anche valutare il livello di vicarianza funzionale dei diversi taxa, al fine di definire e comprendere la "diversità operativa" (Moss et al., 2009) di questi ambienti.

1.2.3 Linea di base e posizione trofica

La linea di base riflette la firma isotopica della fonte primaria di produzione della catena alimentare (Cabana e Rasmussen, 1994; Post, 2002). Tuttavia, la scelta e la ricerca di una base di riferimento adeguata dipende dal contesto spaziale e temporale in cui si opera. Ad esempio, la scelta può ricadere su un unico raggruppamento tassonomico, con un comportamento alimentare ben conosciuto, da utilizzare come linea di base di riferimento per la produzione di un determinato habitat (*sensu* Kling et al., 1992; Post, 2002).

Ogni specie ha una particolare firma isotopica del carbonio, che integra la composizione isotopica della fonte alimentare, in riferimento ad una corretta scala temporale, che varia dalle settimane per lo zooplancton ed il benthos, ai mesi per i pesci (Grey, 2000; Heisslein et al., 1991; Heisslein et al., 1993; Perga e Gerdeaux, 2005; Woodland et al., 2012). Pertanto, l'integrazione delle variazioni temporali della firma isotopica della dieta è un passo necessario per stimare il ruolo di un consumatore in una rete alimentare.

I consumatori primari sono tipicamente scelti come organismi di base a causa della loro posizione trofica nota e la capacità di attenuare le variazioni temporali dei valori isotopici delle risorse autotrofe (Cabana e Rasmussen, 1996; Post, 2002).

Lo zooplancton è comunemente utilizzato per stabilire una firma isotopica di riferimento per la produzione pelagica nei laghi. In diversi studi infatti è stato utilizzato il bulk, ovvero l'insieme di tutti gli organismi zooplanctonici presenti in un determinato periodo, per stabilire una linea di base di riferimento per l'ambiente pelagico (Cabana e Rasmussen, 1994; Post 2002). Utilizzare l'insieme dei taxa zooplanctonici è metodologicamente semplice, ma è adatto solo se la composizione dei taxa riflette il segnale isotopico per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ della fonte primaria di cibo del pelago.

In ogni caso, una buona linea di base dovrà (1) integrare le modifiche isotopiche in una scala temporale vicino a quella del consumatore secondario di interesse, (2) essere presente nello stesso periodo del consumatore secondario di interesse (ad esempio, essere raccolti nello stesso anno), e (3) cogliere la variabilità spaziale che contribuisce alla firma isotopica del consumatore secondario di interesse (Post, 2002).

Molto spesso viene utilizzata *Daphnia* come segnale di base pelagico dei laghi. *Daphnia*, dal momento che è un organismo dal ciclo vitale breve, è più adatta per l'integrazione dei segnali pelagici di $\delta^{13}\text{C}$ pelagico o $\delta^{15}\text{N}$ su scale temporali con una maggiore risoluzione. Inoltre, i comportamenti alimentari di *Daphnia* sembrano essere stabili stagionalmente e simili nei diversi laghi (Matthews e Madzumder, 2003; Perga e Gerdeaux, 2006).

Tuttavia, all'interno dello stesso sistema, i segnali isotopici possono variare tra i consumatori primari di zone diverse, per cui sarebbe necessario definire un segnale di riferimento adeguato per ogni diversa zona del lago stesso (zona profonda-pelago-litorale) per definire la reale posizione trofica dei livelli successivi.

Una caratterizzazione isotopica accurata delle risorse alla base delle reti trofiche è complicata a causa dei naturali gradienti temporali che si registrano nella composizione isotopica delle fonti alimentari e dalla disponibilità di nutrienti (ad esempio, DIC, DIN) e dei produttori primari, in particolare delle alghe planctoniche e di quelle adese al substrato (Zohary et al., 1994; Finlay, 2004; Gu et al., 2011). Questa variabilità nel segnale isotopico si propaga attraverso i vari livelli trofici (Kline, 1999; Grey et al., 2001; Nordström et al., 2009) a

partire dai consumatori primari, ma tende generalmente a diminuire in modo esponenziale con l'aumentare delle dimensioni del corpo del consumatore a causa dell'integrazione all'interno dei tessuti con un turnover maggiore (Cabana e Rasmussen, 1996). Quindi è importante considerare una linea di base dinamica, che segua l'andamento stagionale delle diverse componenti.

Le variazioni temporali intraspecifiche della firma isotopica del $\delta^{13}\text{C}$ tra lo zooplancton e le sue fonti alimentari non sono lineari a causa delle variazioni del contenuto lipidico (Matthews e Mazumder, 2005). I lipidi hanno un segnale di $\delta^{13}\text{C}$ inferiore rispetto agli altri composti, quindi, il rapporto tra $\delta^{13}\text{C}$ ed i lipidi sarà sempre negativo. Il contenuto di lipidi nei tessuti biologici è direttamente proporzionale al rapporto C:N e quindi, il rapporto tra $\delta^{13}\text{C}$ ed il rapporto C:N è generalmente negativo (Matthews e Mazumder, 2005).

La posizione trofica di un unico taxon viene sempre riferita alla sua linea di base, e la discrepanza da essa (ΔN e ΔC) definisce la sua posizione trofica e la fonte di cibo utilizzata: se un taxon mostra valori di $\delta^{13}\text{C}$ simili a quelli della linea di base significa che la fonte di carbonio è unica per tutta la popolazione; al contrario, se i valori si discostano molto da quello della linea di base, dimostrano che c'è una fonte multipla di carbonio per la popolazione. In generale, le firme isotopiche di $\delta^{13}\text{C}$ per organismi della stessa specie che utilizzano le stesse prede/risorse possono variare al massimo fino a 2 ‰ (Grey e Jones, 1999; Matthews e Madzumder, 2003).

Per quanto riguarda l'azoto, se le firme isotopiche di un singolo taxon differiscono meno del valore di arricchimento rispetto alla linea di base, significa che occupano lo stesso livello trofico.

Il modello più semplice per stimare la posizione trofica di un consumatore secondario è: $\text{posizione trofica} = \lambda + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore secondario}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}) / \Delta n$, dove λ è la posizione trofica dell'organismo utilizzato per stimare $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ (ad esempio, $\lambda = 1$ per i produttori primari), $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore secondario}}$ viene misurato direttamente, e Δn è l'arricchimento in azoto per livello trofico (Post, 2002).

La firma isotopica dell'azoto è quindi influenzata dalle condizioni ambientali e dalla trofia del lago (Matthews e Madzumder, 2005).

Persistent Organic Pollutants - POPs

Persistent Organic Pollutants (POPs) are a set of chemical substances carbon-based defined by the Stockholm Convention of 2001 as substances that persist in the environment for long time, bioaccumulate through the food web because of their lipophilicity, are long-intervallo transported because they are semi-volatile and have potential adverse effects to human health and the environment.

This group of pollutants consists in organic compound that include pesticides and herbicides, industrial chemicals and secondary products, which were widely used after World War II, able to accumulate in the fatty tissue of living organisms including humans, they are transported by air, water and migratory species and accumulate in terrestrial and aquatic ecosystems, especially at higher levels in the food chain. So, pollution caused by POPs is a cross-border problem which makes international action.

The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, that entered into force in 2004, expect to minimize and remove global emissions of these persistent substances to safeguard human health and the environment from highly harmful chemicals. Initially, the Convention focused on 12 intentionally and unintentionally produced chemicals (the so called 'Dirty Dozen'), than the Convention began adding additional substances to the agreement in May of 2009 and always continuously updated (<http://chm.pops.int/>).

These 12 priority POPs are aldrin, chlordane, dieldrin, endrin, heptachlor, mirex, toxaphene, hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls (PCBs), for which has been prohibited production, dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT), subject to restrictions on production and use, and minimise the unintentional production and release of dioxins and furanes, that are produced by industrial and combustion processes.

As a result of releases to the environment over the past several decades due especially to human activities, POPs are now widely distributed over large regions (including those where POPs have never been used), also due to their slow degradation and, in some cases, they are found around the globe. In fact, being semi-volatile compounds, POPs are able to move long distances in the atmosphere before deposition occurs. They volatilize at warm temperatures and condense at cooler temperatures, reaching the cooler regions of the world (northern latitudes and high altitudes) and causing the contamination even of the pristine areas as the Poles; this phenomenon is called "Global distillation".

These substances are toxic and can cause both acute and chronic health effects on wildlife and humans with resulting damage to reproductive and neurological functions, carcinogenesis and endocrine disruption.

The distribution of POPs in different environment compartments depends on their physico-chemical properties.

In this PhD thesis the attention was posed on some “old generation POPs”, in particular on DDT, and PCBs.

POPs can reach the aquatic environment from the atmosphere, through groundwater transport and run-off from landscape and through direct discharges from point sources. In the water column, several processes will influence the fate and the transport of the POPs.

Large amounts of POPs have been accumulated in sediments and in the aquatic environment can be the main source of contaminants with a continuous remobilization.

It is widely observed that organisms can achieve high concentrations of certain organic contaminants relative to concentrations of these substances in the environment they inhabit (Mackay and Fraser, 2000).

Aquatic organisms can assume contaminants through water, where the organisms live, and sediment, in which they dwell and may contact intimately, and through the food which they consume.

In lacustrine ecosystems, zooplankton accumulate contaminants both from water and from food, and may do so much more rapidly than their predators, because of their short life span, low ability of detoxification and high capacity of assimilation (Borga et al., 2005; Bettinetti et al., 2012). Specifically, zooplankton are expected to respond much faster than their predators to fluctuations of pollutants occurring in the water column and this component may be used as an early warning tool of a possible contamination.

1.3 Contaminanti organici persistenti (POPs)

I contaminanti organici persistenti, spesso chiamati POPs, sono una serie di composti chimici a base di carbonio definiti dalla Convenzione di Stoccolma del 2001 come sostanze che persistono nell'ambiente per lungo tempo, si bioaccumulano attraverso le catene alimentari a causa della loro lipofilità, vengono trasportate su vasta scala poiché sono semi-volatili e causano effetti avversi alla salute dell'uomo e dell'ambiente.

Questo gruppo di inquinanti è costituito da composti organici che includono pesticidi ed erbicidi, composti industriali e prodotti secondari, i quali sono stati ampiamente utilizzati dopo la Seconda Guerra mondiale, in grado di accumularsi nei tessuti adiposi degli organismi viventi, incluso l'uomo, e vengono trasportati sia in aria, che in acqua ma anche dalle specie migratorie, andando ad accumularsi negli ecosistemi acquatici e terrestri, specialmente nei livelli alti della catena alimentare. Di conseguenza, l'inquinamento causato da POPs è un problema mondiale che necessita di azioni internazionali e non solo all'interno dei propri confini territoriali.

La Convenzione di Stoccolma sui contaminanti organici persistenti, che è entrata in vigore nel 2004, ha lo scopo di ridurre e rimuovere le emissioni globali di queste sostanze per salvaguardare la salute umana e l'ambiente da queste sostanze potenzialmente dannose. Inizialmente, la Convenzione pose l'attenzione sulla produzione intenzionale ed accidentale di 12 contaminanti (la cosiddetta "Sporca Dozzina"), per poi aggiungere altre sostanze nel Maggio 2009 e tutt'oggi è in continua evoluzione (<http://chm.pops.int/>).

Queste 12 sostanze prioritarie sono l'aldrina, il clordano, la diedrina, l'endrina, l'eptacloro, il mirex, il toxafene, l'esaclorobenzene e i policlorobifenili (PCB), per le quali è stata proibita la produzione, il diclorodifeniltricloroetano (DDT), soggetto a restrizioni per la produzione e l'uso, e minimizzare così la produzione accidentale ed il rilascio di diossine e furani, i quali vengono prodotti nei processi industriali e di combustione.

In seguito al rilascio nell'ambiente durante i secoli scorsi a causa delle attività umane, i POPs sono ora ampiamente diffusi in ampie regioni della Terra (anche in zone remote dove i POPs non sono mai stati utilizzati) anche a causa della loro lenta degradazione e, in alcuni casi, hanno una diffusione mondiale. Infatti, essendo composti semi-volatili, queste sostanze sono in grado di percorrere ampie distanze in atmosfera prima che avvenga la loro deposizione. Volatilizzano ad alte temperature e condensano a basse temperature, raggiungendo così le regioni fredde del mondo (alte latitudini ed altitudini) e ne provocano la contaminazione anche in aree vergini come i Poli; questo fenomeno prende il nome di "Distillazione globale".

Queste sostanze sono tossiche e possono avere effetti sia cronici che acuti sull'uomo e sulla natura con Danni alle funzioni riproduttive e neurologiche, disfunzioni endocrine e carcinogenesi.

La distribuzione di queste sostanze nei diversi comparti ambientali è in funzione alle loro proprietà chimico-fisiche.

1.3.1 POPs indagati

In questa tesi di dottorato l'attenzione è stata posta a "contaminanti di vecchia generazione", in particolare sono stati ricercati DDT e PCB.

Pesticidi organoclorurati (OCs) - DDT

Introdotti per la prima volta negli anni '40 e '50, i pesticidi clorurati sono idrocarburi clorurati utilizzati in modo estensivo in agricoltura, in silvicoltura e per il controllo delle zanzare, utilizzati in molti prodotti commerciali, in forme differenti (per esempio, polveri o liquidi) fino a quando la maggior parte sono stati vietati negli anni 1970 e 1980.

Gli insetticidi organoclorurati sono solidi stabili con una tensione di vapore bassa, solubilità in acqua molto bassa e alta lipofilia. Alcuni di loro sono altamente persistenti nella loro forma originale o come metaboliti stabili.

I pesticidi organoclorurati, anche se spesso considerati come un gruppo omogeneo di sostanze altamente persistenti e tossiche per l'organismo e per l'ecosistema nel suo complesso, in realtà sono un gruppo eterogeneo la cui tossicità e persistenza sono molto variabili. La tossicità degli OCs è in funzione della specie, del sesso, dell'età, di fattori di stress di vario genere, delle formulazioni utilizzate, e numerosi altri fattori. La sensibilità delle diverse specie è molto variabile tra tutti i taxa. La maggior parte dei OCs, ma soprattutto DDT, telodrina, aldrina, endrina, dieldrina, e eptacloro, sono troppo tossici per il rilascio nell'ambiente; questo è particolarmente vero per le specie più sensibili che sono costantemente a rischio per questi composti (Hoffman et al., 2003).

DDT ed i suoi metaboliti primari, DDE e DDD, sono sostanze sintetizzate non presenti in natura (Who, 1979).

Negli anni '40 e '50, il DDT (diclorodifeniltricloroetano) è stato l'insetticida clorurato più largamente utilizzato e il DDT era anche l'arma principale a livello globale nella "guerra contro la malaria" durante questo periodo, e continua ad essere utilizzato per il controllo della malaria ancora in alcuni paesi.

È altamente insolubile in acqua (solubilità di circa 1 mg / litro) ma molto solubile nei grassi animali.

DDT commerciale contiene il 70-80% degli isomeri pp'-DDT, il restante 20% dell'insetticida commerciale è rappresentato dagli isomeri op'-DDT, che sono più facilmente biodegradabili di pp'-DDT e ha bassissima tossicità per gli insetti e i vertebrati. Tuttavia, nei ratti, per esempio, è stato dimostrato che il DDT interferisce nell'attività estrogena, e talvolta, insieme ad altri composti del gruppo DDT, è stato implicato in casi di presunte alterazioni endocrinologiche in natura.

Ci sono voluti diversi anni supplementari per documentare il grave rischio di effetti subletali causati dal DDT; cioè, gli effetti del suo metabolita DDE per l'embriotossicità, l'assottigliamento del guscio d'uovo, e i relativi effetti che influenzano negativamente il successo riproduttivo dell'avifauna.

Le proprietà fisico-chimiche del DDT e dei suoi metaboliti permettono a questi composti di essere assunti prontamente dagli organismi. L'elevata solubilità lipidica e la bassa solubilità in acqua permettono l'accumulo del DDT e dei suoi metaboliti stabili nel tessuto adiposo.

Gli organismi possono assumere queste sostanze chimiche dall'ambiente circostante e dal cibo. Negli organismi acquatici, l'assorbimento dall'acqua è generalmente più importante, mentre per la fauna terrestre la fonte principale è rappresentata dal cibo.

PCB

I policlorobifenili (PCB) sono una classe di 209 composti, avente da 1 a 10 atomi di cloro come sostituenti nella molecola di bifenile.

A causa delle loro proprietà (non infiammabilità, bassa volatilità a temperatura ambiente, ecc.), i PCB sono adatti per molte applicazioni industriali (dielettrici per condensatori e trasformatori, scambiatori di calore, inchiostri da stampa e carte "autocopianti", vernici, plastificanti, lubrificanti, ecc.). In relazione al progresso delle conoscenze sui rischi ambientali dei PCB e alla loro tossicità per l'uomo, il loro impiego è stato regolamentato o limitato.

I prodotti commerciali a base di PCB sono stati commercializzati in tutto il mondo, sotto una varietà di nomi commerciali, come miscele di diversi derivati.

Tutti i congeneri di PCB sono lipofili, hanno una solubilità in acqua molto bassa e un basso tasso di metabolismo ed eliminazione. Per questo motivo, possono facilmente entrare in circolo nella catena alimentare e accumularsi nel tessuto adiposo di molti organismi.

1.4 POPs negli ecosistemi acquatici: bioaccumulo nelle catene alimentari acquatiche

I POP possono raggiungere l'ambiente acquatico dall'atmosfera, attraverso il trasporto delle acque sotterranee ed il run-off del terreno e attraverso scarichi diretti provenienti da fonti puntuali. Nella colonna d'acqua, molti processi possono influenzare il destino ed il trasporto dei POPs (figura 2).

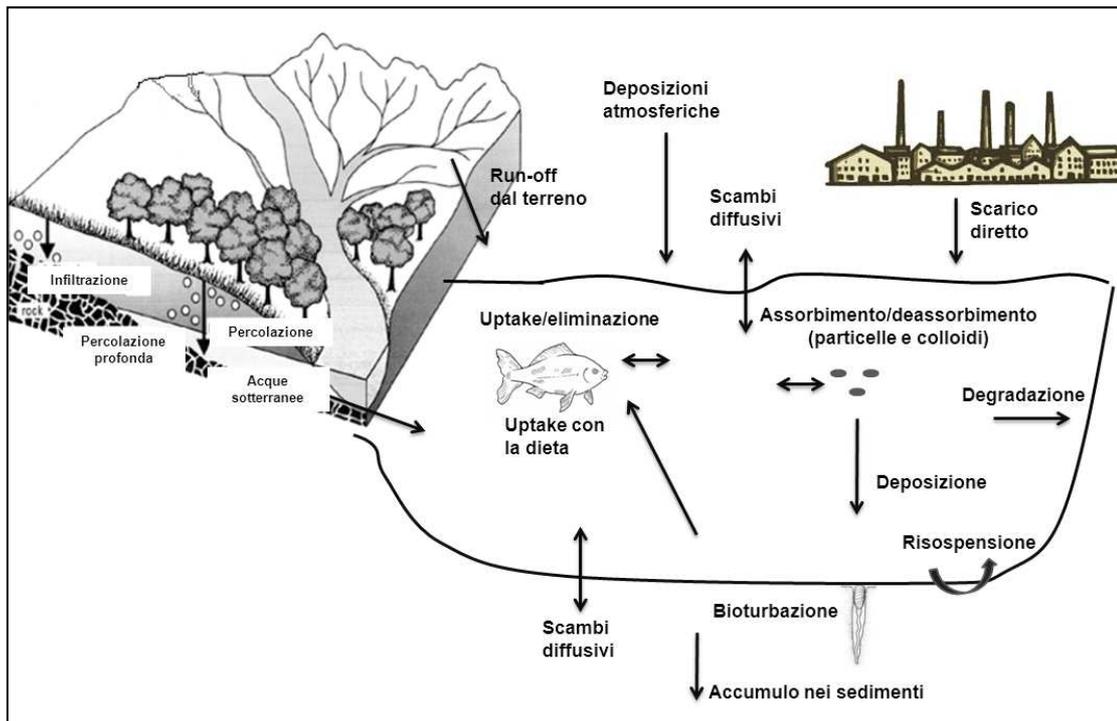


Figura 2: Processi coinvolti nel destino e trasporto dei POPs nell'ambiente acquatico.

Grandi quantità di inquinanti organici persistenti sono state accumulate nei sedimenti e, nell'ambiente acquatico, possono essere considerati come la principale fonte di contaminanti in seguito ad una rimobilizzazione continua.

È stato ampiamente osservato che gli organismi possono raggiungere elevate concentrazioni di alcuni contaminanti organici in relazione alle concentrazioni di queste sostanze nell'ambiente in cui vivono (Mackay e Fraser, 2000).

Gli organismi acquatici infatti possono assumere i contaminanti attraverso l'acqua, dove vivono, e dai sedimenti, in cui vivono o sono in stretto contatto, e attraverso il cibo che consumano.

Quindi, queste definizioni possono essere molto utili (Gobas e Morrison, 2000; Mackay e Fraser, 2000):

Bioconcentrazione dall'acqua: è l'assorbimento passivo di un organismo dall'ambiente circostante per assorbimento attraverso la superficie respiratoria e/o la pelle. La concentrazione dei contaminanti nell'organismo supera quella dell'acqua.

Il fattore di bioconcentrazione (BCF) si definisce come il rapporto tra la concentrazione chimica in un organismo C_B rispetto alla concentrazione totale nel mezzo acquoso C_{WT} , o di C_{WD} , la concentrazione dei contaminanti liberi in acqua potenzialmente assimilabili, ed è espresso come segue:

$$BCF = C_B/C_{WT} \text{ oppure } C_B/C_{WD}$$

L'utilizzo di C_{WD} viene preferito perché prende in considerazione solo la frazione di contaminanti che è biologicamente disponibile per l'assorbimento.

L'utilizzo delle concentrazioni nel mezzo "esterno" per la valutazione del rischio è stata generalmente accettata in tossicologia ambientale ed acquatica (Suter, 1993). Questo approccio, tuttavia, si basa su una fonte principale di esposizione e non riesce a riconoscere l'importanza relativa delle diverse vie di esposizione ed i tassi a cui si verificano questi trasferimenti tra le fonti e gli organismi.

Bioaccumulo: è il processo attraverso cui le sostanze tossiche persistenti si accumulano all'interno di un organismo, in concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante a causa dell'assunzione attraverso tutte le vie di esposizione, tra cui l'assorbimento attraverso il cibo ingerito, il trasporto attraverso la superficie respiratoria e l'assorbimento cutaneo. Il bioaccumulo può quindi essere visto come una combinazione di bioconcentrazione e assorbimento attraverso il cibo.

Il fattore di bioaccumulo (BAF) è il rapporto della concentrazione dei contaminanti in un organismo C_B , rispetto alla concentrazione in acqua, allo stesso modo di BCF:

$$BAF = C_B/C_{WT} \text{ oppure } C_B/C_{WD}$$

La condizione di stato stazionario (ad esempio, l'equilibrio raggiunto tra l'assunzione e la perdita dei contaminanti in un organismo) rappresenta l'accumulo massimo che può essere raggiunto per un dato insieme di condizioni di esposizione. Tuttavia, le condizioni possono cambiare abbastanza rapidamente che lo stato stazionario non può essere raggiunto se non solo in situazioni controllate.

Biomagnificazione: è un caso particolare di bioaccumulo nel quale la concentrazione dei contaminanti aumenta lungo una catena trofica: la concentrazione nell'organismo predatore è più alta rispetto a quella rilevabile nelle prede.

Casi di biomagnificazione nelle catene alimentari acquatiche sono generalmente limitati a contaminanti persistenti, alogenati e molto idrofobi.

Il fattore di biomagnificazione (BMF) è il rapporto tra la concentrazione nell'organismo a quella nella dieta dell'organismo (C_A):

$$BMF = C_B / C_A$$

È meglio esprimere le concentrazioni su base lipidica normalizzata perché il contenuto lipidico è un fattore importante nel controllo dell'entità del bioaccumulo delle sostanze organiche e perché riduce la variabilità se si considerano organismi con concentrazioni lipidiche differenti che utilizzano la stessa risorsa (Barron, 1990). Un problema sorge ovviamente quando si vuole definire il BMF per un organismo che ha diverse fonti alimentari con differenti concentrazioni di POPs.

Per quantificare il fenomeno di bioaccumulo vengono utilizzati diversi modelli a bilancio di massa in cui vengono quantificati i vari processi di assorbimento e di perdita dei contaminanti. In generale, l'approccio consiste nell'identificare i processi rilevanti per lo specifico organismo e successivamente cercare di quantificare il tasso di uptake e rilascio dei contaminanti. Ovviamente, l'affidabilità dei modelli dipende dalla precisione dei dati di input che possono derivare da acqua, sedimenti e biota.

L'attenzione ai fenomeni di biomagnificazione iniziò a partire dagli anni '60, per giungere poi alla fine degli anni '80 dove molti studi hanno segnalato l'effettiva esistenza della biomagnificazione in ambiente acquatico e sono stati sviluppati diversi modelli per singoli organismi e catene alimentari di differenti ecosistemi. Ad ogni modo, l'approccio generale è innanzitutto identificare i processi che interessano l'organismo specifico e poi cercare di quantificare i tassi di uptake e di clearance del contaminante in esame.

Il fenomeno del bioaccumulo di prodotti chimici idrofobici può essere previsto attraverso l'impiego del coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}). Utilizzando dei modelli matematici possono essere ottenute, per esempio, previsioni riguardo ai livelli di contaminanti nel pesce (Gobas, 1993); tuttavia i sistemi ambientali e la composizione delle reti trofiche sono così complessi che non sempre le informazioni raccolte sono attendibili.

Poco si sa ancora sul ruolo del trasferimento dei

contaminanti provenienti dai livelli trofici più bassi nei laghi; spesso non si conoscono i meccanismi di assorbimento ed il ruolo svolto nel processo di biomagnificazione. Pertanto, lo

zooplancton è ancora poco utilizzato nelle indagini di contaminazione in relazione alla sua composizione e comportamento.

I modelli utilizzati fino ad ora considerano generalmente lo zooplancton come un comparto unico di consumatori primari (Connolly e Pedersen, 1988; Campfens e Mackay, 1997), che controlla la comunità fitoplanctonica, ma in realtà questa classe è molto complessa, con differenze specie-specifiche nei cicli di vita, dimensioni ed abitudini alimentari.

È senza dubbio più corretto distinguere tra consumatori primari e consumatori secondari (predatori) anziché ritenerlo costituito esclusivamente da consumatori primari. Inoltre, durante l'anno, si assiste ad una notevole variabilità nella composizione della biomassa totale, per esempio, le specie carnivore possono rappresentare una parte significativa della comunità durante determinati periodi (Visconti e Manca, 2011), mentre in altri sono gli erbivori a prevalere.

È quindi importante determinare le differenze di bioaccumulo che esistono tra lo zooplancton carnivoro ed erbivoro, anche in funzione del suo possibile utilizzo come input nei modelli di bioaccumulo. Ora, poco si sa circa i processi che guidano l'accumulo e l'eliminazione dei POPs all'interno dello zooplancton.

Nello zooplancton, molti altri processi, oltre alla dieta, possono influenzare l'accumulo finale dei POPs, come ad esempio lo scambio diretto con l'acqua attraverso il partizionamento passivo, e la produzione di pellet fecali e uova.

AIMS OF THE STUDY

In lacustrine ecosystems, zooplankton accumulate contaminants both from water and from food, and may do so much more rapidly than their predators, because of their short life span, low ability of detoxification and high capacity of assimilation (Borga et al., 2005; Bettinetti et al., 2012). Specifically, zooplankton are expected to respond much faster than their predators to fluctuations of pollutants occurring in the water column and this component may be used as an early warning tool of a possible contamination.

Through the analysis of stable isotopes of carbon and nitrogen in the primary and secondary consumers within the zooplankton we want to identify the trophic position of organisms that contribute most, directly or indirectly, to the diet and to the contamination of zooplanktivorous fish species, on which measures of contaminants are made and of which seasonal variations in the fingerprint isotopic have been determined.

The occurrence of biomagnification from zooplankton to fish can be used as a signal of the existence of a steady-state condition enabling the application of predictive bioenergetic models to calculate the potential risk for top predators and man of persistent bioaccumulative compounds. However, even when local pollution sources are negligible and a steady-state condition can be reached, seasonal variability of fish foraging habits and of signatures of different zooplankton taxa must be considered to improve the reliability of biomagnification models (Bettinetti et al., 2012).

So, finally aim is to model the distribution of DDT residues in different trophic levels of the biota (Bettinetti et al., 2006) and to examine the seasonal trend of OC concentrations in zooplankton in order to evaluate its influence on the contamination of their potentially predators.

2 SCOPI DELLA RICERCA

L'utilizzo degli isotopi stabili di carbonio ed azoto consente di dare una prima caratterizzazione del segnale isotopico di carbonio e azoto e del suo propagarsi lungo la rete trofica pelagica dei laghi di interesse.

Le composizioni isotopiche nei tessuti degli animali sono una misura integrata della loro dieta e possono essere usate per valutare la posizione relativa degli animali nella catena alimentare.

In particolare l'analisi degli isotopi stabili permette di identificare il ruolo trofico delle diverse componenti dello zooplancton dal momento che le composizioni isotopiche nei tessuti degli animali sono una misura integrata della loro dieta permettendo così di valutare la loro posizione relativa nella catena alimentare, in laghi differenti e di valutare le variazioni nel tempo (con la stagione) e nello spazio e identificare eventuali apporti di materiale alloctono (fonti di carbonio non pelagiche).

Un'analisi degli isotopi stabili, estesa ai principali laghi profondi subalpini, rappresentativi di diversi gradi di trofia, consentirebbe di verificare se e come la linea di base e il ruolo di diversi taxa zooplanctonici varino in funzione dello stato trofico. Essa permetterebbe anche di verificare il livello di vicarianza funzionale dei diversi taxa, necessario per definire e comprendere la "operational diversity" (Moss et al., 2009) di questi ambienti.

Dal momento che la dieta è un'importante via di esposizione ai contaminanti organici per gli animali (Thomann et al., 1984; Hall et al., 1997), l'utilizzo degli isotopi stabili può diventare un potente strumento per gli ecotossicologi per spiegare la variabilità nelle concentrazioni dei contaminanti, analizzando le scelte alimentari e la biomagnificazione delle popolazioni animali.

L'utilizzo degli isotopi stabili di carbonio ed azoto consente di studiare le relazioni trofiche negli ecosistemi acquatici e le variazioni stagionali che si verificano, permettendo così di comprendere meglio ed identificare i meccanismi ed i trend attraverso i quali i contaminanti vengono trasferiti dalla base ai livelli più alti della rete trofica e comprendere quali organismi contribuiscano maggiormente, direttamente o indirettamente, alla dieta e alla contaminazione delle specie ittiche.

Conoscendo in dettaglio i comportamenti alimentari delle varie componenti dello zooplancton, sarà possibile identificare e motivare anche eventuali anomalie nella concentrazione degli inquinanti, come conseguenza dei cambiamenti nello spazio e nel tempo delle varie componenti della comunità.

Lo zooplancton infatti è un'importante componente degli ecosistemi lacustri coinvolta nel trasferimento di materia, energia e contaminanti nella catena alimentare, in grado di

accumulare i contaminanti sia dall'acqua che dal cibo molto rapidamente (Borga et al., 2005; Bettinetti et al., 2012).

Gli organismi zooplanctonici, di conseguenza, rispondono molto più velocemente rispetto ai loro predatori alle fluttuazioni di inquinanti presenti nella colonna d'acqua e questa componente può essere utilizzata come un campanello di allarme di una possibile contaminazione.

Analisi comparative di zooplancton e pesci sono essenziali per raggiungere una quantificazione realistica del rischio per gli organismi acquatici a causa dell'accumulo di sostanze chimiche dannose. Verrà esaminato l'andamento stagionale delle concentrazioni dei microinquinanti organici persistenti nello zooplancton per valutare l'influenza di quest'ultimo sulla contaminazione dei loro potenziali predatori (specie ittiche zooplanctivore) e misurare la biomagnificazione attraverso le reti alimentari piuttosto che per le singole specie. Inoltre verranno analizzati i fattori responsabili di eventuali anomalie nella dinamica di trasferimento delle sostanze tossiche nelle reti trofiche pelagiche.

STUDY SITE

Part of this study was carried out in 5 small subalpine lakes from the same region of North of Italy. They are representative of different trophy, size and depth. They range from eutrophic Lake Pusiano to oligotrophic Lake Mergozzo, the latter being once closely related to Lake Maggiore.

All lakes are located within the Po basin, an area of great economic and environmental importance.

Also Lake Como was involved in stable isotope analysis and POPs investigations for the pelagic food web.

Lake Como is also known as Lario and is the third largest Italian lake after Lake Garda and Lake Maggiore. It is located in a valley depression cross the mountains of the Alps of Lombardy and is the deepest of Italy with the maximum depth of 420 m, characterized by upside-down “Y” shape because it has three branches: Colico at the north (“high lake”), Lecco at the south-east, Como at the south-west. Bellagio promontory marking the bifurcation between the latter two branches.

Lake Como is classified as warm monomictic, in that the epilimnio has a temperature that never drops below 4°C; full circulation occurs in late winter, i.e. at the end of the cooling phase, and occurs a summer stratification. However, this phenomenon does not happen every year in all its completeness, but only periodically, in correspondence with cold winters and windy. Therefore, the lakes can be defined as oligo-mimictics with the spring mixing typically involving the first 150-200 m, and a complete turnover being rare (Ambrosetti and Barbanti, 1992).

Lake Como have a condition of high trophy and it is classified meso-eutrophic (Salmaso et al., 2006). During the 1960s Lake Como has involved in an intense eutrophication.

3 AREA DI STUDIO

3.1 I cinque piccoli laghi subalpini oggetto di studio

Sono stati studiati, attraverso l'analisi degli isotopi stabili, cinque piccoli laghi subalpini del nord Italia, tutti compresi nel bacino idrografico del fiume Po. Sono rappresentativi di diversi gradi di trofia, dimensione e profondità. Le principali caratteristiche sono presentate in tabella 1, ciò che li contraddistingue è la ridotta profondità e le piccole dimensioni.



Tabella 1: I cinque laghi di interesse e loro principali caratteristiche.

Lago	Altezza (m s.l.m.)	Volume ($10^6 m^3$)	Profondità massima (m)	P_{tot} ($\mu g L^{-1}$)
Mergozzo	194	83	73	1
Moro	389	4	42	8
Endine	334	12	9	17
Comabbio	243	16	8	72
Pusiano	259	69	24	74

Il Lago di Mergozzo, un tempo, faceva parte del Lago Maggiore, dal quale si separò cinque secoli fa in seguito ai depositi alluvionali lasciati dal Fiume Toce. Il Lago di Mergozzo è un lago monomittico caldo che presenta una netta stratificazione termica nel periodo estivo-autunnale, durante il quale i primi 20 metri della colonna d'acqua sono interessati da un'escursione termica di circa 15 °C, e un periodo di massimo rimescolamento delle acque lacustri in corrispondenza di gennaio-febbraio, in cui la temperatura dell'intera colonna d'acqua si assesta intorno ai 5 - 6 °C.

Il Lago Moro è un lago meromittico caratterizzato da acque fredde.

Il Lago d'Endine è un lago dimittico a basso tempo di ricambio con rimescolamenti in inverno ed autunno. Attualmente è un lago mesotrofo, in seguito ad un graduale recupero della qualità delle acque in seguito ad una progressiva riduzione delle concentrazioni di fosforo.

Il Lago di Comabbio è un lago polimittico con stratificazione termica estiva evidente.

Il Lago di Pusiano, è classificabile come monomittico caldo con un periodo di completo rimescolamento delle acque in inverno, e largamente influenzato dall'immissione di acque di falda.

Questi laghi, ad eccezione del Lago di Mergozzo, durante inverni molto rigidi per brevi periodi possono coprirsi parzialmente di ghiaccio.

Di seguito, in tabella 2, vengono elencate le specie zooplanctoniche presenti in ciascun lago considerato.

Tabella 2: Lista delle specie zooplanctoniche presenti nei diversi laghi (de Bernardi e Soldavini, 1977; 1° Rapporto OLL, 2004).

TAXA	Mergozzo	Moro	Endine	Comabbio	Pusiano
<i>Daphnia hyalina</i>	x	x	x		x
<i>Daphnia cucullata</i>				x	
<i>Bosmina longirostris</i>			x		x
<i>Bosmina longispina</i>					
<i>Bosmina coregoni</i>	x	x			
<i>Eubosmina longispina</i>				x	
<i>Ceriodaphnia pulchella</i>				x	
<i>Ceriodaphnia quadrangula hamata</i>			x		x
<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	x			x	x
<i>Cyclops abyssorum</i>	x	x		x	x
<i>Cyclops strenuus</i>			x		
<i>Mesocyclops leuckartii</i>	x	x	x	x	x
<i>Mesocyclops hyalinus</i>	x				
<i>Thermocyclops crassus</i>			x	x	
<i>Thermocyclops hyalinus</i>					x
<i>Eudiaptomus gracilis</i>					x
<i>Eudiaptomus padanus padanus</i>	x	x		x	
<i>Leptodora kindtii</i>	x				x
<i>Bythotrephes longimanus</i>	x				

3.2 Un grande lago profondo subalpino: il Lago di Como

Il lago profondo subalpino di Como rappresenta una risorsa economica ed ambientale di grande importanza e costituisce, con il Lago Maggiore, il Lago di Garda, Lugano e Iseo, oltre l'80% di tutte le risorse idriche in Italia (IRSA, 1984; Marchetti et al., 1992), facendo parte del più grande distretto lacustre italiano.

Il Lago di Como ricade nel bacino del Po (figura 3), regione altamente popolata, industrializzata e con importanti attività agricole. È caratterizzato da sponde strette, con ripidi pendii e l'orientamento del talweg è, in generale, in direzione Nord-Sud. La sua origine è inizialmente legata all'escavazione fluviale, successivamente il bacino lacustre si è originato, durante un periodo di 100.000 anni, in seguito all'azione di scavo operata dai ghiacciai wurmiani. In realtà, viene classificato come grande lago subalpino terminale di origine glaciale.

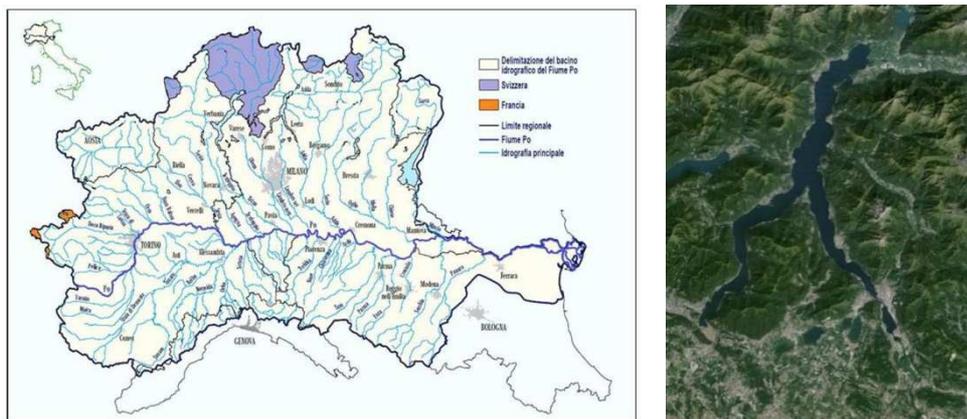


Figura 3: Il bacino del Po e dettaglio del Lago di Como.

Questi corpi d'acqua dolce hanno un'area di captazione delle acque con un'estensione che è più di trenta volte la superficie del lago stesso e sono spesso soggetti a fenomeni di piena, soprattutto per quanto riguarda il Lago di Como.

In seguito alle forti piogge, il livello del lago varia notevolmente. Generalmente, questi fenomeni si verificano in primavera ed autunno.

La presenza di questi grandi laghi influenza il clima, grazie alla capacità dei grandi laghi di immagazzinare calore durante l'estate e di restituirlo all'atmosfera in inverno; inoltre, l'area è identificata come l'area dei cosiddetti "grandi laghi", con caratteristiche intermedie tra il clima continentale della valle del Po e delle zone alpine circostanti.

Il Lago di Como, conosciuto anche con il nome Lario, è il terzo lago italiano per estensione dopo i laghi di Garda e Maggiore. È situato all'interno di una depressione valliva tra le catene montuose delle Alpi lombarde ed è il lago più profondo d'Italia con la profondità massima

raggiunta ad Argegno di 425 m. La sua caratteristica forma a Y rovesciata è data dai tre rami di: Colico a nord ("alto lago"), Lecco a sud-est, Como a sud-ovest. Il promontorio di Bellagio segna il passaggio tra gli ultimi due rami.

Il Lago di Como viene classificato monomittico caldo, in quanto l'ipolimnio ha una temperatura che non scende mai al di sotto dei 4°C; la piena circolazione avviene in tardo inverno, ovvero in corrispondenza alla fine della fase di raffreddamento, e si registra una stratificazione estiva. Tuttavia, questo fenomeno non accade ogni anno, in tutta la sua completezza, ma solo periodicamente, in corrispondenza di inverni freddi e ventosi. Pertanto, il lago può essere definito come olo-oligomittico con un rimescolamento primaverile che coinvolge i primi 150-200 m mentre un turnover completo è raro (Ambrosetti e Barbanti, 1992).

Per il biennio 1991-1992, per quanto riguarda il Lago di Como, nelle stazioni di Como, Colico e Lecco si è registrata una completa miscelazione delle acque; invece, nelle stazioni di Lierna, Menaggio e Argegno la circolazione ha interessato lo strato di acqua che raggiunge una profondità di 100-150 m. L'ultimo evento di rimescolamento totale delle acque risale all'inverno 2005-2006.

Il Lago di Como ha una condizione di elevata trofia ed è classificato come meso-eutrofico (Salmaso et al., 2006). Nel corso del 1960 il Lago di Como è stato interessato da un fenomeno di eutrofizzazione intenso.

Va notato che il ramo occidentale ha una dinamica diversa rispetto all'alto lago ed al ramo orientale, presentando elevate concentrazioni medie di fosforo. Questo meccanismo è probabilmente correlato alle diverse condizioni morfologiche e idrologiche dei sottobacini: il bacino occidentale ha, infatti, una profondità media superiore ed è privo di effluenti, ne risente così in modo negativo il tempo di sostituzione dell'acqua e aumenta, di conseguenza, il coefficiente di ritenzione del fosforo.

Le principali caratteristiche morfometriche sono riportate in tabella 3.

Tabella 3: Principali parametri morfometrici del Lago di Como (progetto PLINIUS, 2006)

	Lago di Como
Altezza media dello spartiacque (m a.s.l.)	1569
Livello medio del lago (m a.s.l.)	198
Superficie del bacino imbrifero (km ²)	4572
Superficie del lago (km ²)	146
Profondità media (m)	153
Profondità massima (m)	425
Profondità della criptodepressione (m)	212
Volume (km ³)	22,5
Tempo teorico di rinnovo (anni)	4.5
	8,3–30 (bacino occ.)
Tempo medio di residenza (anni)	5,6–8,7 (alto lago)
	3,6–6,4 (bacino est)

MATERIALS AND METHODS

Zooplankton samples for the five small lakes were collected in spring and late summer by vertical hauls in the deepest part of the lake, with a 126 μm light plankton net with an opening mouth of 20 cm of diameter and preserved in alcohol 95%.

Zooplankton samples for Lake Como were collected during a year for the four seasons. The samplings were carried out by vertical hauls close to the deepest part of the Como lake (425 m, in front of Argegno, western basin) with three different light plankton nets (200, 450 and 850 μm) with an opening mouth of 58 cm of diameter filtering the water column of 0-20 m (the layer where the majority of zooplankton live). All the net mesh sizes facilitated high filtration efficiency and ensured that large phytoplankton colonies were avoided; moreover taxa of smaller body size, such as rotifers, were missed. Total volume filtered was ca. 20 m^3 per zooplankton collection.

Only crustacean zooplankton was used for SIA. Samples were sorted by taxa, level of resolution being to species for some taxa, while, being cyclopoids and diaptomids not distinguished by species or genus level. Only adults or subadults of the latter two groups were used.

Two replicates/sample were performed and a number between 25 and 600 animals were sorted, depending on their individual body weight.

One third of each zooplankton sample was immediately fixed and preserved in 95% ethanol until identified later at 63x using compound microscopy. On the basis of the species, zooplankton organisms were grouped into primary consumers (herbivores) and secondary consumers (predators). The rest of each sample was filtered on a 2 μm pore glass fibre filter (GF/C, 4.7 cm of diameter), and then frozen at -20°C until freeze-drying.

Each freeze-dried sample was introduced into a glass microfibre thimble (19 mm I.D., 90 mm length, Whatman, England) and extracted in a modified Soxhlet equipment (Velp Scientifica, ECO 6 Thermoreactor, Italy) with 50 mL of a mixture 1:1 (v/v) of *n*-hexane and acetone (pesticide analysis grade, Carlo Erba, Italy) for 2 h. The zooplankton extracts were characterised for lipid content. The gravimetric determination of lipids was performed after solvent evaporation of the extract. Lipids were then suspended in 2 mL *n*-hexane and degraded with 2 mL H_2SO_4 (98%, Carlo Erba, Italy). Chlorinated compounds were then recovered by several *n*-hexane washings. All the extracts were reduced to a small volume (2 mL) under vacuum and were cleaned up on a Florisil[®] column (7 mm I.D., 40 mm length, Merck, Germany) eluting with 25 mL of a mixture 85:15 (v/v) *n*-hexane and dichloromethane (pesticide analysis grade, Carlo Erba, Italy) according to a procedure used in an intercalibration exercise (Galassi et al., 1981). After the addition of 1 mL of iso-octane

(pesticide analysys grade, Carlo Erba, Italy), the purified extracts were concentrated to 0.5 mL and analysed by gas chromatography (Top 8000 GC, Carlo Erba, Italy) coupled with ^{63}Ni electron capture detector (ECD 80, ThermoQuest, Carlo Erba, Italy), heated at 290°C, using an on-column injection system (volume injected, 1 μL). The column was a WCOT fused silica CP-Sil-8 CB (0.25 mm I.D., 50 m length, 0.25 μm film thickness, Varian, USA), and the used temperature programme was from 60°C to 190°C at 20° C min^{-1} , followed by a run from 190°C to 250°C at 1.5°C min^{-1} and a further run from 250°C to 270°C at 3°C min^{-1} , and a final isotherm at 270 °C for 17 min. The carrier gas was helium (1 mL min^{-1}), while nitrogen served as the auxiliary gas (30 mL min^{-1}).

The external standards Custom Pesticide Mix (o2si, USA), and Custom PCB Calibration Mix (o2si, USA) and Aroclor 1260 (Alltech, USA) were used for DDTs and PCBs quantification, respectively. The analysed DDTs consisted of: pp'DDT, op'DDT, pp'DDD, op'DDD and pp'DDE; while the analysed PCBs congeners were: PCB 18, 28+31, 44, 52, 95, 101, 118+149, 138, 153, 170, 174, 177, 180, 183, 187, 194, 195, 201, 203, 206 and 209. The sum of PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180 is reported as indicator PCBs since these 7 congeners are the most representative on the basis of their persistence in food webs and tendency for bioaccumulation.

The detection limit was 0.01 ng g^{-1} dry weight for all the chlorinated compounds.

Good laboratory practices were tested on the standard reference materials BCR-598 and BCR-349 (Community Bureau of Reference, Belgium) for DDTs and PCBs residues, respectively, analysing samples in triplicate. The percentage of recovery of DDTs varied between 106.2 ($\pm 4.0\%$) and 107.5 ($\pm 4.0\%$), and of PCBs between 91.3 ($\pm 1.1\%$) and 102.2 ($\pm 1.6\%$).

Since it is hard to have enough quantity of material to perform the analysis of the contaminants in zooplankton, the variability of concentrations among different analyses of the same sample (three subsamples of 100 mg dry weight) was considered the one previously assessed (Bettinetti et al., 2010): 5.4-7.3% for DDTs and 4.0-16.9% for PCBs, whilst for lipids it was 4.7%.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Metodi di campionamento ed analisi

I campioni di zooplancton per l'analisi degli isotopi stabili dei cinque piccoli laghi subalpini sono stati collezionati in primavera e tarda estate nel punto più profondo di ciascuno di essi attraverso l'utilizzo di reti napoletane con un diametro di 20 cm e maglie pari a 126 μm lungo la verticale e subito conservati in alcool 95%.

Le profondità massime raggiunte durante il campionamento sono riportate in tabella 4 e queste variano a seconda delle dimensioni di ciascun lago.

Tabella 4: Profondità di campionamento dello zooplancton per ciascun lago.

	Mergozzo	Moro	Endine	Comabbio	Pusiano
Primavera	0-35 m	0-38 m	0-50 m	0-6 m	0-20 m
Estate	0-50 m	0-38 m	0-7 m	0-6 m	0-20 m

I campioni necessari per la SIA e per l'analisi dei contaminanti del Lago di Como, dovendo verificare l'andamento stagionale, sono stati raccolti nelle quattro stagioni.

Sono state identificate due stazioni di campionamento: per l'anno 2011 i campionamenti sono stati fatti in prossimità di Dervio, mentre per l'anno 2013 e l'inverno 2014 i prelievi sono stati eseguiti in corrispondenza di Argegno (figura 4).

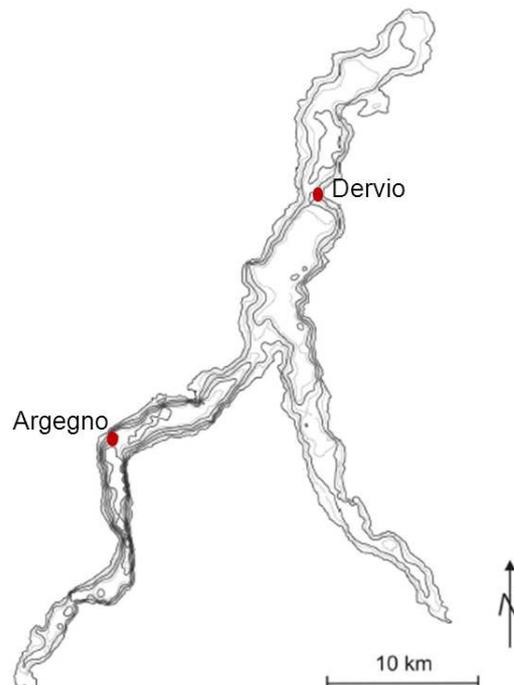


Figura 4: Localizzazione delle due stazioni di campionamento per la raccolta dello zooplancton pelagico.

Per ciascun anno di riferimento, i campionamenti dello zooplancton sono stati effettuati in un'unica stazione nel punto più profondo del lago per rappresentare il pelago, utilizzando una rete napoletana con un diametro di 58 cm calata lungo la verticale fino a 20 metri di profondità. Le reti in nylon utilizzate presentano maglie differenti: 200 μm , 450 μm e 850 μm , in modo da ottenere una prima suddivisione su base dimensionale ma non taxa-specifica.

Ciascuna di queste reti garantisce un'alta efficienza di filtrazione e assicura di evitare la collezione della maggior parte delle colonie fitoplanctoniche, seppur tuttavia alcune grosse alghe o alcuni aggregati algali possono essere presenti ugualmente.

Un terzo di ciascun campione di zooplancton della stazione di Argegno è stato immediatamente fissato in alcool 95% per poi procedere alla classificazione tassonomica ed al conteggio al microscopio con ingrandimenti 63x. In ogni conteggio, oltre al numero dei soggetti dei taxa individuati appartenenti a Cladoceri e Copepodi, si è provveduto anche alla determinazione del numero di naupli di copepodi presenti nel subcampione.

Sono stati prelevati anche dei campioni dal litorale attraverso l'utilizzo di retini per il benthos.

SIA

I campioni destinati all'analisi degli isotopi stabili sono stati subito congelati per essere conservati e successivamente isolati e smistati gli organismi in quantità sufficienti da garantire le analisi isotopiche. Sono stati isolati da 50 a 1000 esemplari per ciascun taxa presente, a seconda delle specie e delle dimensioni del corpo dell'organismo, presso l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (I.S.E.) CNR di Verbania.

Tutti i campioni sono stati essiccati in forno a 60°C per 48 ore, polverizzati ed omogeneizzati e sono stati pesati due sottocampioni di c.a. 1 mg di peso secco per ciascun taxa isolato. I campioni sono stati trasferiti in capsulini di stagno 5x9 mm ed inviati al laboratorio G.G. Hatch Stable Isotope presso l'Università di Ottawa in Canada per le analisi degli isotopi stabili, attraverso uno spettrometro di massa a flusso continuo per il rapporto isotopico per $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, la percentuale di carbonio e azoto, ed il rapporto C:N.

La precisione analitica delle analisi (D.S.) basata su standard interni al laboratorio (C-55) è solitamente superiore allo 0,2‰ per entrambi gli isotopi indagati.

I risultati sono riportati in notazione δ , come la variazione da uno standard di riferimento espressa come parte per mille (‰).

Le analisi statistiche sono state eseguite con STATISTICA (data analysis software system - StatSoft, Inc. 2003, versione 6.1).

Analisi dei contaminanti organici persistenti

I campioni destinati all'analisi dei contaminanti organici invece sono stati subito filtrati attraverso filtri in microfibra di vetro con pori di 1,2 μm (GF/C, 4,7 cm di diametro) e congelati

a -20°C. Dopo essere stati liofilizzati e pesati per la determinazione del peso secco, ciascun campione è stato inserito in un ditale di fibra di vetro (19x9x90 mm, Whatman, Inghilterra) per l'estrazione attraverso un estrattore Soxhlet modificato (Velp Scientifica, Termoreattore ECO 6, Italia) con una miscela 1:1 di n-esano e acetone (Carlo Erba, Italy) per 120 minuti ad 80°C. Dopo evaporazione del solvente dall'estratto, si è proceduto alla determinazione gravimetrica dei lipidi per poi risospendere il tutto in 2 ml di n-esano ed essere degradati con 2 ml di H₂SO₄ (98%, Carlo Erba, Italia). I composti clorurati sono stati recuperati tramite ripetuti lavaggi con n-esano e portati a volume ridotto (c.a. 2 ml). Il campione è stato purificato attraverso una colonna preparata con Florisil® attivato (7 mm I.D., 40 mm di lunghezza, Merck, Germania) ed eluendo con 25 ml di miscela 85:15 di n-esano e diclorometano secondo la procedura indicata da Galassi et al., 1981. L'estratto è stato riportato a 0,5 ml di volume ed analizzato presso il laboratorio dell'Università degli Studi dell'Insubria a Varese mediante gascromatografia (Top 8000 GC, Carlo Erba, Italia) con rilevatore a cattura di elettroni (ECD 80, ThermoQuest, Carlo Erba, Italia) con iniezione on-column (volume iniettato 0,5 µl), utilizzando per la quantificazione uno standard esterno preparato a partire dai singoli composti in isoottano.

La colonna utilizzata è WCOT in silice CP-Sil-8 CB (0,25 mm I.D., 50 m di lunghezza, 0,25 µm di spessore del film, Varian, USA) ed il programma di temperature utilizzato è il seguente:

- ✓ da 60°C a 190°C con l'incremento di 20°C al minuto ;
- ✓ da 190°C a 250°C con l'incremento di 1,5°C al minuto;
- ✓ da 250°C a 270°C con l'incremento di 3°C al minuto ;
- ✓ una fase terminale isoterma della durata di 17 minuti.

Il carrier gas utilizzato è l'elio (1 mL min⁻¹), mentre l'azoto viene utilizzato come gas ausiliario (30 mL min⁻¹).

Per la quantificazione delle concentrazioni di DDT e PCB, rispettivamente, sono stati utilizzati degli standard esterni: il Custom Pesticide Mix (o2si, USA), il Custom PCB Calibration Mix (o2si, USA) e l'Aroclor 1260 (Alltech, USA).

Le analisi per il DDT hanno interessato i seguenti metaboliti: pp'DDT, op'DDT, pp'DDD, op'DDD e pp'DDE, mentre i congeneri per i PCB sono: PCB 18, 28+31, 44, 52, 95, 101, 118+149, 138, 153, 170, 174, 177, 180, 183, 187, 194, 195, 201, 203, 206 e 209.

Per tutti i composti il limite analitico di rilevazione è di 0,1 ng g⁻¹ di peso secco.

La contaminazione viene riferita al contenuto lipidico per ridurre la variazione interspecifica poiché la concentrazione lipidica varia in funzione della posizione tassonomica ed al tipo di dieta.

Ad Argegno sono state campionate anche due specie di pesci zooplanctivori pelagici: l'agone (*Alosa fallax lacustris*) ed il coregone (*Coregonus lavaretus*). Le catture sono state fatte negli stessi giorni dei campionamenti dello zooplancton da Davide Ioculano, pescatore professionista, e nella stessa stazione. Sono stati prelevati sei esemplari per ciascuna specie, i quali sono stati misurati (lunghezza totale espressa in cm) in modo tale da ottenere repliche omogenee. È stata prelevata una porzione di muscolo compresa tra la testa e la prima pinna dorsale nella porzione superiore del corpo fino alla linea laterale da ciascun individuo e si è provveduto subito a congelare a -20°C per almeno 24 ore. I campioni congelati sono stati liofilizzati ed i sei filetti sono stati polverizzati e miscelati tra loro in modo tale da ottenere un campione omogeneo.

Successivamente, come per lo zooplancton, i filetti di pesce sono stati analizzati sia per gli isotopi stabili che per i contaminanti organici, utilizzando le stesse procedure. Quindi una porzione del campione è stata pesata e trasferita in capsulini di stagno (due repliche per ciascun campione) per poi procedere all'analisi degli isotopi stabili, mentre un'altra quota è stata destinata all'estrazione ed alla purificazione per l'analisi dei contaminanti organici.

Stima della densità e della biomassa per la componente zooplanctonica

Dal conteggio dei singoli taxa zooplanctonici si è ottenuto il valore degli individui totali campionati, conoscendo la profondità di campionamento ed il volume d'acqua filtrato. I valori ottenuti per le singole repliche sono stati utilizzati in seguito per il calcolo del valore medio di densità e biomassa di ciascun gruppo faunistico.

La densità esprime la presenza degli individui al m³. Per calcolare il suo valore è necessario conoscere il numero di individui conteggiati ed il volume d'acqua campionato. Il numero di individui presenti nel campione è stato quindi rapportato al numero di pescate verticali eseguite per il volume d'acqua filtrato per una singola retinata secondo la seguente formula:

$$D = \frac{n \cdot c}{V}$$

dove D è la densità (ind/m³), n è il numero medio di individui riferiti ai ml conteggiati, c è il volume nel quale il campione è stato risospeso (ml) e V è il volume di acqua filtrata (m³).

La biomassa rappresenta la massa della sostanza vivente prodotta in un determinato periodo di tempo da una popolazione in un particolare ambiente biologico. Viene espressa come g o mg di individui al m³. È un'informazione molto utile nella stima dell'energia immagazzinata sotto forma di materia organica e per la valutazione di un potenziale produttivo dell'ecosistema.

La biomassa è stata calcolata applicando l'equazione di regressione riferita al rapporto di lunghezza/peso per ciascun taxa (McCauley, 1984; Manca e Comoli, 2000):

$$\ln W = \ln \alpha + \beta \ln L$$

dove α e β sono costanti fisse specie-specifiche, W è il peso secco di un organismo (μg) e L è la lunghezza del corpo in mm, misurata attraverso l'utilizzo di un microscopio ottico. Per ottenere il peso di una popolazione si calcola prima il peso per un numero sufficiente di individui con la formula appena illustrata e poi si calcola il peso medio.

RESULTS OF SIA

Increasing concern on biodiversity consequent to human impacts on the environment provides a basis for quantifying the role of organisms in transferring matter and energy through the trophic web, i.e. paths and processes responsible for ecosystem functioning. Aquatic environments, and freshwater in particular, have been identified as extremely sensitive to biodiversity loss consequent to human activities. To understand and ultimately prevent loss of ecosystem functioning, however, impact of environmental variables on operational diversity has to be estimated. A possible approach to quantify roles and understand vicariance, is by applying carbon and nitrogen stable isotopes analyses. By measuring carbon and nitrogen isotopic signatures, organism food sources and position level along food webs are tracked, thus providing quantitative estimates of bi-dimensional niches. We applied C and N stable isotopes analysis to zooplankton taxa from lakes to compare how and whether taxa specific isotopic signatures vary along a morpho-edaphic gradient. Analyses were performed on zooplankton taxa from 5 lakes of the same subalpine region, collected in two seasons representative of different degrees of carbon fractionation and nitrogen enrichment. We provided basic information for understanding the possible impact of environmental variables, such as algal nutrient enrichment and lake size, on the complexity of between-taxa interactions which are crucial for estimating vulnerability of lacustrine ecosystems to human impacts.

Analyses were performed also on the different components of the pelagic food web of the subalpine great Lake Como through the use of stable isotope analysis. By analyzing $\delta^{15}\text{N}$ signature of zooplankton and fish of Lake Como during different seasons, we aimed at quantifying changes in trophic level (by $\delta^{15}\text{N}$ enrichment, E) and taxa specific changes in food preferences (Phillips and Eldridge, 2006; Grey and Jones, 2001).

We focused the attention at the zooplankton communities as mainly composed by the taxon of planktonic crustaceans made by two subgroups, cladocerans and copepods, which represent the most important primary and secondary consumers of the lake, and two zooplanktivorous fish species, the shad (*Alosa fallax*) and the whitefish (*Coregonus lavaretus*). In lakes, $\delta^{13}\text{C}$ allows the discrimination between two major sources of available energy, - littoral (near shore) production from attached algae and detritus, and pelagic (open water) production from phytoplankton, - because the $\delta^{13}\text{C}$ of the base of the littoral food web tends to be enriched in ^{13}C (less negative $\delta^{13}\text{C}$) relative to the base of the pelagic food web (France 1995).

In general, for the majority of taxa, there is more ^{15}N -enriched and ^{13}C -depleted values in winter and least ^{15}N -enriched and ^{13}C -depleted values in full summer.

The variability may be accompanied by important seasonal changes in the relative positions of zooplankton taxa in the food web, and in the role of primary and secondary consumers in the transfer of matter and energy along food web pathways, but, predominantly, signatures of primary producers are characterized by temporal fluctuations depending on seasonal Dissolved Inorganic Carbon (DIC) variations, Particulate Organic Matter (POM) composition, algal productivity, species composition, metabolic processes (Matthews and Madzumder, 2005; Vuorio et al., 2006; Gu et al., 2006), temperature and inorganic nutrient recycling (Perga and Gerdeaux, 2006).

However, seasonal pattern among lakes is not necessarily consistent. In fact, in shallow lakes exchanges between littoral / pelagic are prevalent and the isotopic signature of the pelagic baseline (*Daphnia*) is lake-specific.

Finally, results from Lake Como were compared with that of Lake Maggiore by the CIPAIS project (International Commission for the Protection of Italian-Swiss Waters on Lago Maggiore).

5 RISULTATI E DISCUSSIONE - SIA

5.1 SIA per i cinque piccoli laghi subalpini

Sono stati analizzati un totale di 52 campioni pelagici zooplanctonici per la determinazione degli isotopi stabili di carbonio ed azoto appartenenti ai cinque piccoli laghi subalpini di interesse.

I segnali isotopici della linea di base di carbonio ed azoto delle acque pelagiche è rappresentato dai punti corrispondenti a *Daphnia* in figura 5 per le due stagioni considerate (primavera ed estate).

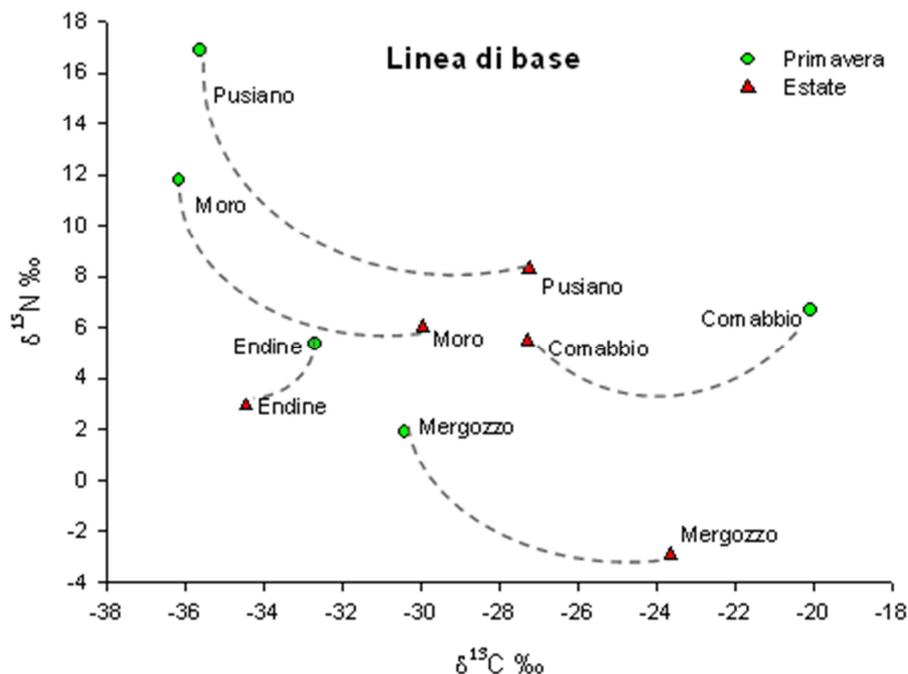


Figura 5: Segnali isotopici della linea di base pelagica nelle due stagioni per ciascun lago.

È evidente una specificità nella firma isotopica per ciascun lago nelle due stagioni, senza alcuna sovrapposizione dei segnali.

I segnali isotopici di carbonio ed azoto mostrano un gradiente in riferimento ai differenti stati trofici di ognuno di essi. *Daphnia* risulta più arricchita nell'isotopo pesante dell'azoto nel Lago di Pusiano, il lago più eutrofo, e meno arricchito nel Lago di Mergozzo, il quale è oligotrofo.

Il Lago di Comabbio, il quale è il meno profondo ("shallow lake") in confronto degli altri, sembra avere un comportamento stagionale inverso. Lo stesso comportamento si registra anche per il Lago d'Endine, anch'esso a causa della scarsa profondità.

Le variazioni stagionali dei segnali isotopici del carbonio della linea di base sono solidali, variando tra valori più negativi in primavera e valori meno negativi in estate ($-36,11‰ \pm 0,004$ ES nel Lago Moro in primavera e $-23,67‰ \pm 0,053$ ES nel Lago di Mergozzo in estate).

Per quanto riguarda i segnali del carbonio, il Lago di Mergozzo risulta meno impoverito con valori del carbonio comparabili a quelli del Lago Maggiore (CIP AIS, 2012) nelle stesse stagioni, mentre i valori più negativi sono assunti dal Lago Moro (figura 6).

In ogni caso, i segnali isotopici del carbonio sembrano assumere i valori meno negativi in estate, mentre in primavera risultano più impoveriti.

Le variazioni stagionali risultano evidenti anche per gli altri taxa campionati. In generale, per la maggior parte dei taxa, con l'avanzare della stagione e con l'inizio della stratificazione termica, si assiste ad un incremento generale dei valori del $\delta^{13}\text{C}$, con l'eccezione dei laghi di Comabbio e d'Endine, a causa della scarsa profondità. (Rapporto OLL, 2004).

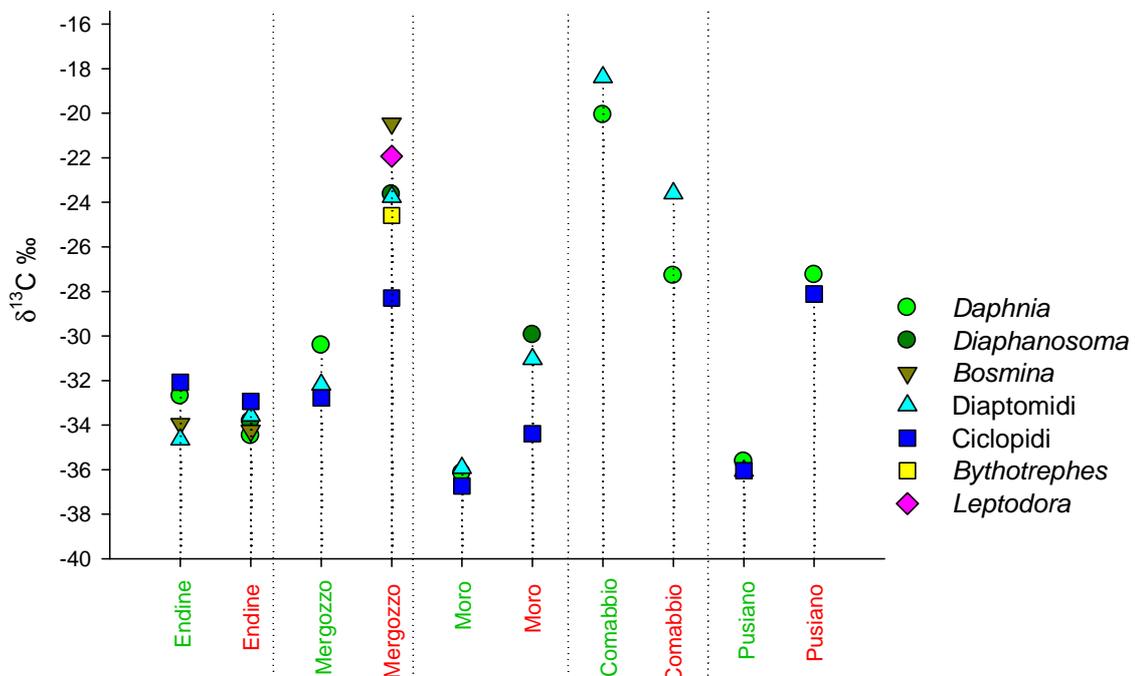


Figura 6: Variazioni stagionali dei segnali isotopici del carbonio dei taxa pelagici zooplanctonici nelle due stagioni (in verde i valori primaverili, in rosso quelli estivi).

I segnali isotopici dell'azoto risultano essere più arricchiti in primavera, mentre in estate risultano meno arricchiti (figura 7).

Per l'isotopo pesante dell'azoto, i valori massimi di arricchimento vengono raggiunti per il Lago di Pusiano, i valori più bassi si registrano per il Lago di Mergozzo mentre gli altri laghi presentano valori intermedi, rispecchiando così i diversi gradi di trofia dei laghi considerati. Analogamente, gli intervalli di variazione nell'arricchimento di $\delta^{15}\text{N}$, risultano essere minori nel Lago di Pusiano e maggiori invece nei laghi oligotrofi/ultraoligotrofi.

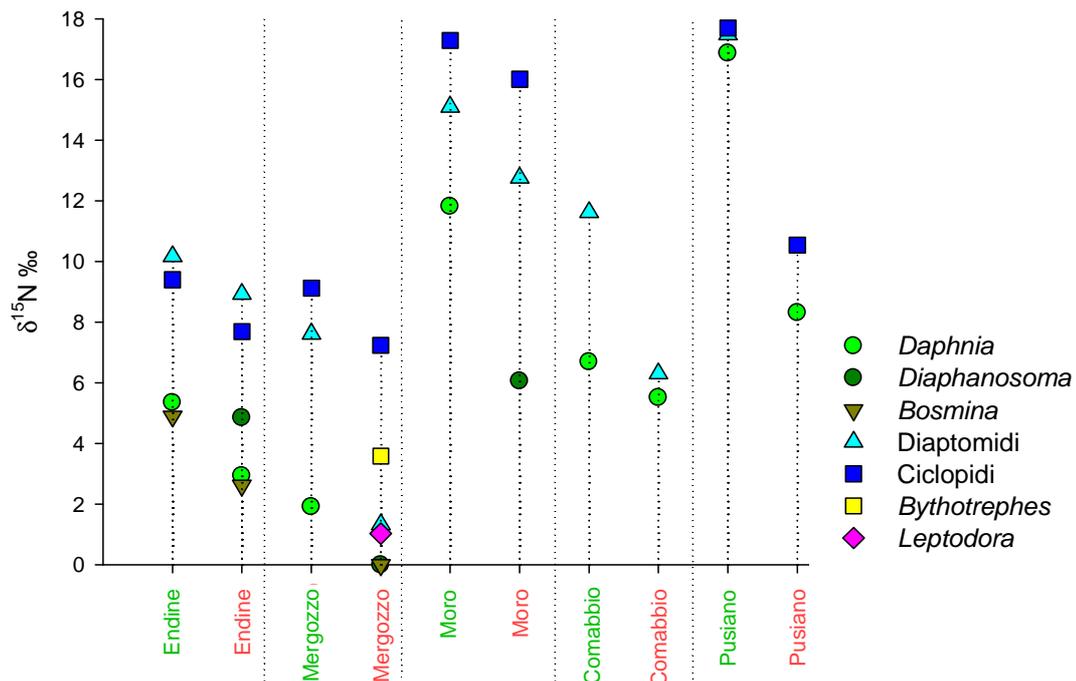


Figura 7: Variazioni stagionali dei segnali isotopici dell'azoto dei taxa pelagici zooplanctonici (in verde i valori primaverili, in rosso quelli estivi).

Osservando il grafico trofochimico per il periodo primaverile (figura 8), si può notare che i segnali isotopici di carbonio ed azoto nel Lago di Pusiano di *Daphnia*, di ciclopidi e di diaptomidi sono molto vicini tra loro, quasi indistinguibili.

Nel Lago Moro, *Daphnia* ed i diaptomidi presentano la stessa firma isotopica di $\delta^{13}\text{C}$, il che significa che utilizzano una fonte di carbonio comune. Confrontando i segnali dell'azoto, si deduce che i diaptomidi consumano una risorsa intermedia con lo stesso segnale isotopico di carbonio di *Daphnia*. I copepodi ciclopidi occupano il livello più alto della catena trofica, probabilmente stando ad una profondità maggiore rispetto a *Daphnia* perché presentano un $\delta^{13}\text{C}$ più negativo, e si nutrono con una preda intermedia, come rotiferi o stadi giovanili di copepodi (Visconti et al., 2011).

Nel Lago d'Endine, in aggiunta a *Daphnia*, anche *Bosmina* era presente in quantità sufficienti per l'analisi degli isotopi stabili: *Daphnia* presenta un valore di carbonio paragonabile a quello dei ciclopidi, mentre *Bosmina* risulta relazionata ai diaptomidi, questi ultimi due taxa si trovano più in profondità nella colonna d'acqua.

Nel Lago di Mergozzo, *Daphnia* risulta essere chiaramente separata dagli altri componenti dello zooplancton, con sia i ciclopidi che i diaptomidi molto più $\delta^{13}\text{C}$ -impoveriti rispetto a *Daphnia*. Verosimilmente, i copepodi si nutrono a profondità maggiori rispetto a *Daphnia*.

Come è prevedibile per un lago relativamente poco profondo (France, 1997), il Lago di Comabbio presenta valori meno negativi per i segnali isotopici del carbonio ed è possibile

identificare un gradiente orizzontale, con i diatomi che si nutrono più vicini al litorale rispetto a *Daphnia*, e sono al vertice della catena trofica.

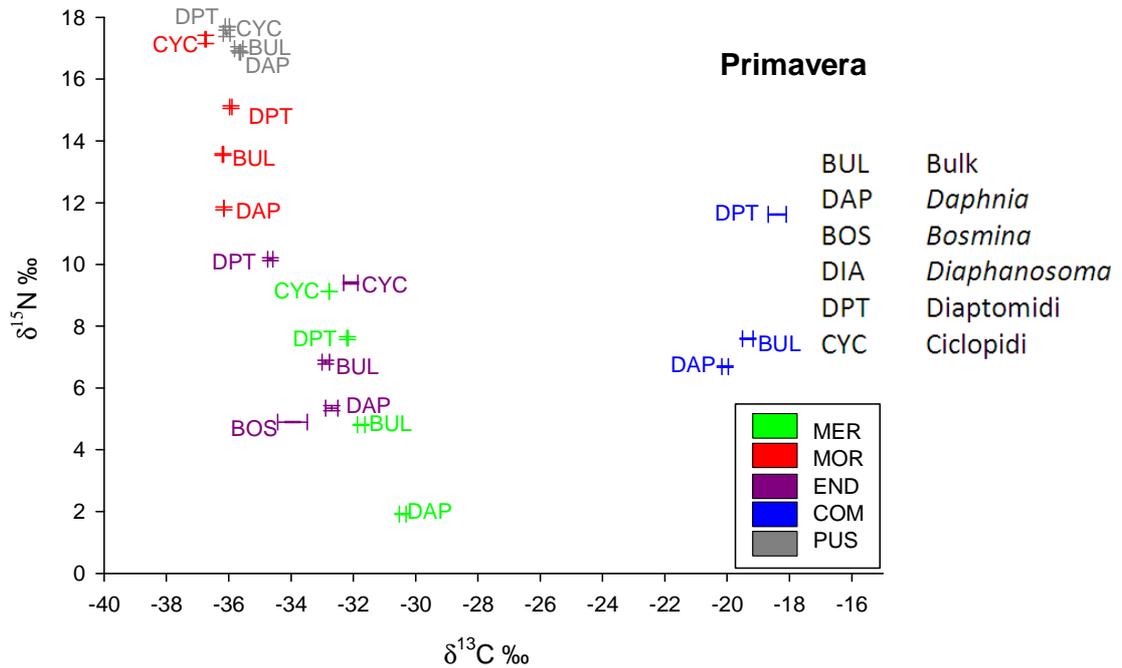


Figura 8: Grafico trofochimico con i segnali isotopici specifici per ogni lago per la primavera.

In estate, i segnali isotopici subiscono uno spostamento verso valori meno impoveriti di carbonio e meno arricchiti di azoto (figura 9).

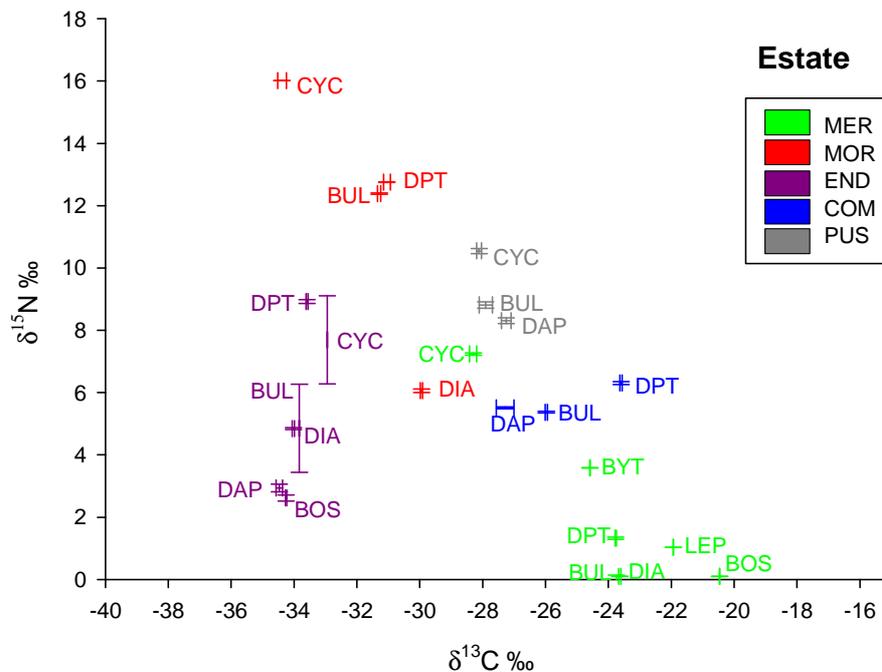


Figura 9: Grafico trofochimico con i segnali isotopici specifici per ogni lago per l'estate.

In alto nel grafico trofochimico, troviamo per il Lago Moro i ciclopidi ben separati da *Diaphanosoma*, i quali risultano essere a profondità maggiori.

Nel Lago Endine la competizione tra *Daphnia* – *Diaphanosoma* – *Bosmina* è evidente, e, ai livelli più alti, i diaptomidi ed i ciclopidi utilizzano una preda intermedia, giovani stadi di copepodi e/o rotiferi.

Nel Lago di Mergozzo, così come è stato trovato nel Lago Maggiore 2009-2012 (CIP AIS, 2013), i ciclopidi sono ben separati e a profondità maggiori rispetto agli altri taxa di zooplancton crostaceo. In acque meno profonde troviamo i consumatori primari, *Diaphanosoma* e *Bosmina*, entrambi predati da *Leptodora*, e ad un livello più alto troviamo *Bythotrephes* in grado di predare sia i diaptomidi che *Diaphanosoma*.

La prevalenza di un gradiente orizzontale nel Lago di Comabbio è ancora più enfatizzata dai campioni estivi, con i diaptomidi, come già evidenziato nel Lago Maggiore (Visconti et al., 2011), molto più influenzati dalle fonti di carbonio del litorale rispetto a *Daphnia*.

Questa prevalenza di una migrazione orizzontale rispetto ad altri pattern di variazione stagionale risulta ancora più evidente se si confrontano le due stagioni di interesse (figura 10a): *Daphnia* risulta essere più legata al litorale in primavera, mentre effettua migrazioni in acque più profonde in estate, analogamente per i diaptomidi.

Anche per il Lago d'Endine è evidente una migrazione orizzontale tra la zona pelagica ed il litorale, seppur con variazioni inferiori, con un andamento inverso nelle due stagioni dei segnali isotopici per la maggior parte dei taxa. Fanno eccezione i diaptomidi che presentano un $\delta^{13}\text{C}$ più negativo in primavera e un arricchimento in azoto maggiore mentre in estate il segnale del carbonio è meno impoverito e l'azoto risulta meno arricchito (figura 10b).

In generale, l'intervallo di variazione dei segnali isotopici dei diversi taxa presenti nelle varie stagioni può differire, come è facile osservare in figura 10c per il Lago di Mergozzo. Per esempio, i ciclopidi, che non sono suddivisi a livello di specie, risultano avere un intervallo di variazione ristretto (pari a 4,88 per $\delta^{13}\text{C}$ e 3,845 per $\delta^{15}\text{N}$), in confronto a *Daphnia* (intervallo pari a 9,97 per $\delta^{13}\text{C}$ e 13,36 per $\delta^{15}\text{N}$), suggerendo una maggiore selettività e/o una dipendenza maggiore alle acque profonde per la nutrizione. Diverse sono le variazioni per i diaptomidi, con un intervallo di variazione maggiore e simile a quello di *Daphnia*. Si tenga presente, tuttavia, che in estate non era presente il segnale di *Daphnia*, nel grafico viene ipotizzato facendo riferimento anche ai segnali isotopici di *Diaphanosoma* e *Bosmina*.

Un andamento simile è stato riscontrato anche nel Lago Moro (figura 10d).

Un intervallo ristretto, tuttavia, non sempre si osserva in tutti i consumatori secondari: nel Lago di Pusiano l'intervallo di variazione dei ciclopidi è paragonabile con quello del consumatore primario *Daphnia* (figura 10e).

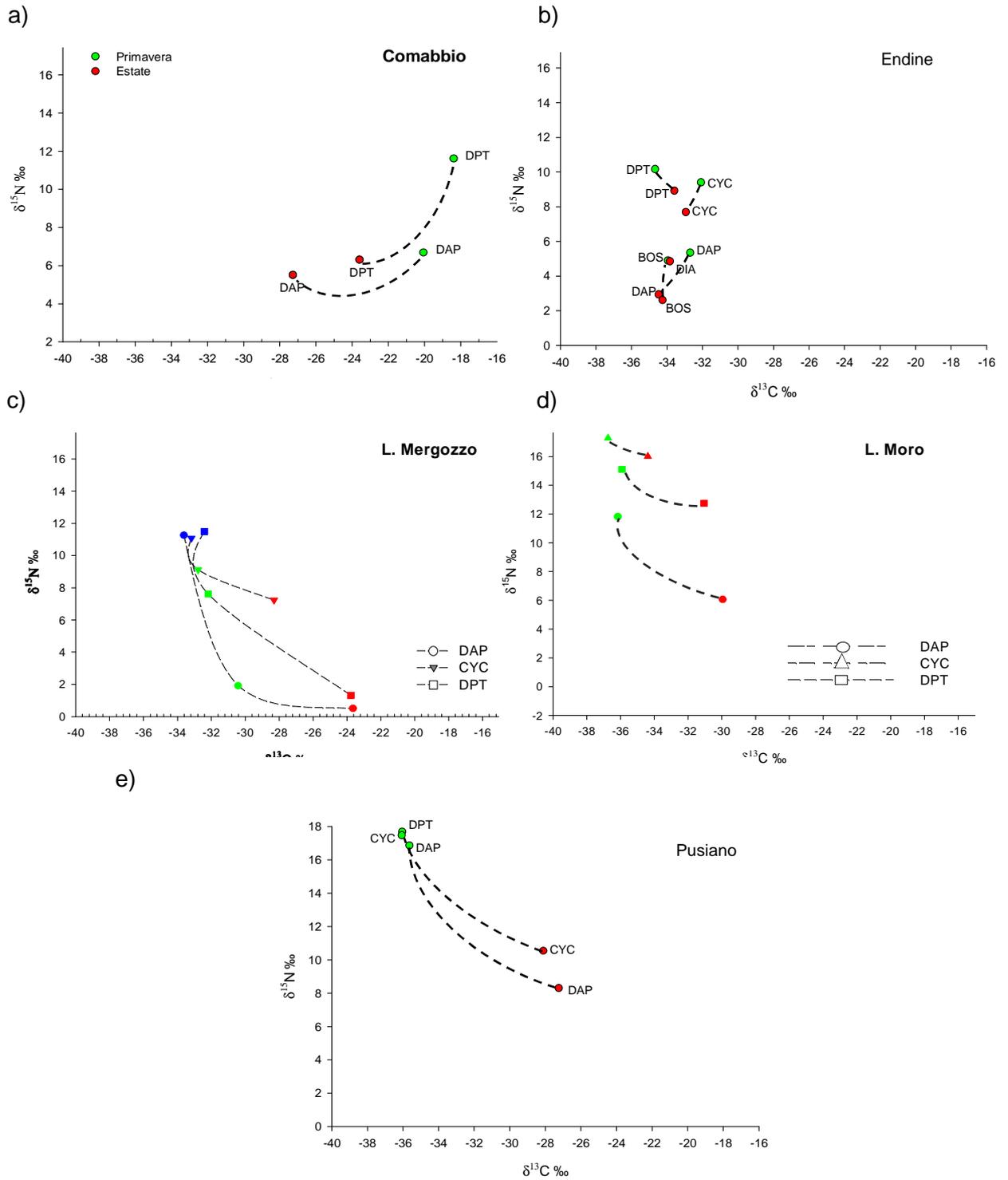


Figura 10: Grafici trofochimici dei cinque laghi di interesse nelle due/tre stagioni considerate (in verde i valori primaverili, in rosso quelli estivi e in blu quelli invernali).

Riassumendo, i segnali isotopici di carbonio ed azoto variano con le stagioni e queste variazioni assumono intervalli differenti nei diversi laghi. In figura 11 vengono mostrate queste variazioni tra la primavera e l'estate dei segnali isotopici di carbonio (in orizzontale) e di azoto (in verticale).

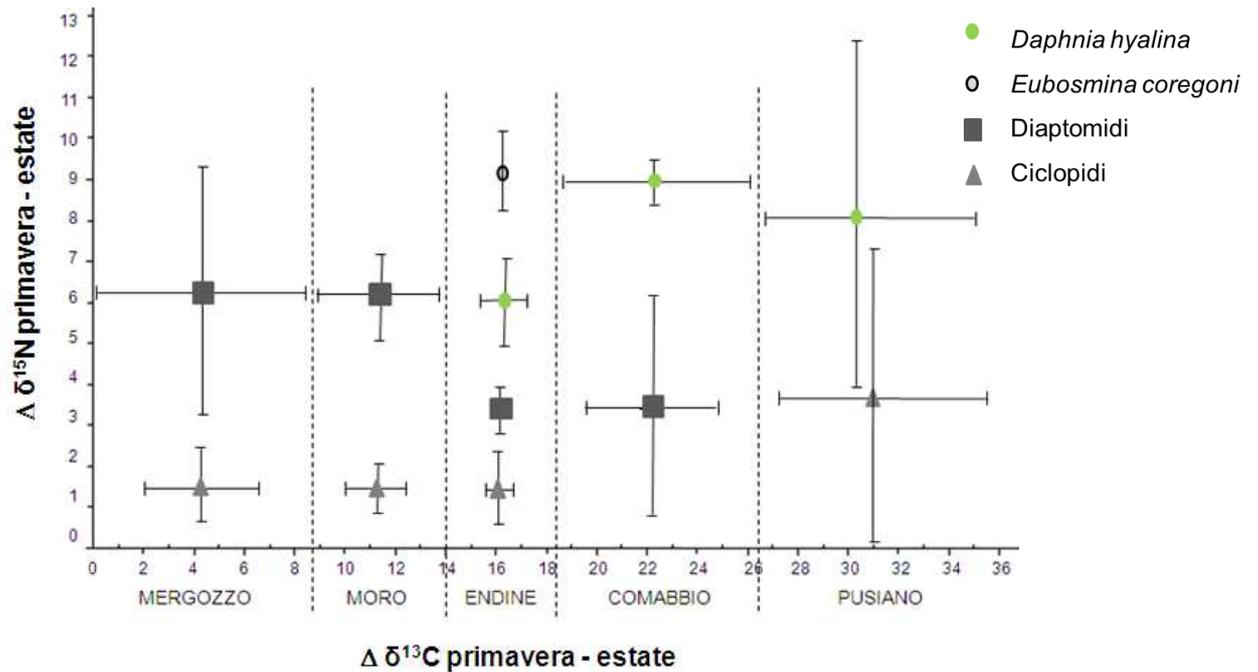


Figura 11: intervalli di variazione dei segnali isotopici di carbonio ed azoto tra la primavera e l'estate dei taxa campionati.

Come si può vedere, le variazioni maggiori si registrano nel Lago di Mergozzo e nel Lago di Pusiano, i laghi più profondi e con un volume di bacino maggiore tra quelli considerati, mentre le variazioni minori, soprattutto per il segnale del carbonio, si evidenziano nel Lago d'Endine, caratterizzato da volume e profondità ridotti.

Per quanto riguarda il carbonio, queste variazioni sono indice di una più o meno ampia plasticità nella dieta dell'animale, mentre l'azoto indica una certa variabilità nella posizione trofica dell'animale.

La posizione trofica di un singolo taxon viene riferita alla sua linea di base, e la discordanza da essa ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) definisce la sua posizione trofica e la fonte di cibo utilizzata: se un taxon mostra un valore di $\delta^{13}\text{C}$ simile a quello della linea di base significa che la fonte di carbonio è unica per tutta la popolazione; al contrario, valori che variano significativamente da quelli registrati per il segnale della linea di base stanno ad indicare l'esistenza di una fonte di carbonio multipla per la popolazione. Per determinare se due organismi utilizzano la stessa fonte di carbonio della linea di base viene utilizzata la relazione che si basa sul valore del frazionamento isotopico calcolata come:

$$F = C_{\text{predatore}} - C_{\text{linea di base}}$$

Quando il frazionamento isotopico del carbonio (F) riferito alla linea di base è $\leq 0.8 \pm 1.1$ ES, l'organismo considerato appartiene alla stessa catena alimentare (Peterson e Fry, 1987).

I valori del frazionamento isotopico riferito alla loro linea di base dei diversi laghi sono mostrati in tabella 5. Come segnale della linea di base si è scelta *Daphnia*; nel caso in cui questa è risultata assente (ad esempio per Mergozzo in estate) si è scelto *Diaphanosoma*, poiché presenta il valore più basso.

Tabella 5: Valori di frazionamento isotopico del carbonio per gli organismi pelagici riferiti alla loro linea di base (in rosso i valori dei taxa che si discostano da *Daphnia*).

		Frazionamento isotopico - carbonio	
		Primavera	Estate
Mergozzo	Ciclopidi	-2,37	-4,66
	Diaptomidi	-1,78	-0,13
	<i>Bosmina</i>		3,18
	<i>Bythotrephes</i>		-0,95
	<i>Leptodora</i>		1,71
Moro	Ciclopidi	-0,59	-4,44
	Diaptomidi	0,23	-1,1
Endine	Ciclopidi	0,62	1,53
	Diaptomidi	-1,97	0,89
	<i>Bosmina</i>	-1,26	0,22
	<i>Diaphanosoma</i>		0,64
Comabbio	Diaptomidi	1,68	3,69
Pusiano	Ciclopidi	-0,41	-0,87
	Diaptomidi	-0,43	

I dati mostrano come i ciclopidi nel Mergozzo e nel Moro in estate non appartengono alla stessa catena alimentare di *Daphnia*. Questo può essere dovuto al fatto che spesso occupano profondità maggiori rispetto a quest'ultima.

Nel Lago di Mergozzo in estate, *Bosmina* si discosta da *Daphnia*, risentendo maggiormente dell'influenza del litorale ($\delta^{13}\text{C}$ meno negativo).

Anche i diaptomidi nel Comabbio in estate differiscono da *Daphnia*, infatti sembrano dipendere maggiormente da fonti di origine litorale.

Per ciascun taxon è stato calcolato il livello trofico sulla base dell'arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ utilizzando la seguente formula:

$$\text{Posizione trofica} = \lambda + [(\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{baseline}})/2,55]$$

dove λ è la posizione trofica dell'organismo utilizzato come linea di base (*Daphnia*), $\delta^{15}\text{N}$ è il segnale isotopico del consumatore e di *Daphnia* e 2,55 è il valore medio di arricchimento per ogni livello trofico (Matthews e Mazumder, 2008).

Se i segnali sono molto simili, significa che due organismi occupano lo stesso livello trofico.

Tabella 6: Posizione trofica per gli organismi pelagici riferiti alla loro linea di base (*Daphnia*, se non presente è stata sostituita da *Diaphanosoma*) per i cinque laghi considerati (indicati con le prime tre iniziali del loro nome).

Posizione trofica	MER		MOR		END		COM		PUS	
	Pri	Est								
<i>Daphnia</i>	2		2		2	2	2	2	2	2
Ciclopidi			4,1		3,6	3,9			2,3	2,9
Diaptomidi	4,2	3,7	3,3	4,6		4,3	3,9		2,2	
<i>Bythotrephes</i>		4,5								
<i>Leptodora</i>										
<i>Bosmina</i>		0,9			1,8	1,9				
<i>Diaphanosoma</i>		2		2		2				

Nel Lago di Mergozzo al vertice della rete trofica zooplanctonica è presente *Bythotrephes* in estate ed i diaptomidi in primavera. I ciclopidi in entrambe le stagioni e *Leptodora* in estate non fanno parte della stessa catena alimentare di *Daphnia*.

Nei restanti laghi, non sono stati campionati in quantità sufficienti per le analisi i cladoceri predatori.

Nei laghi Moro, Endine e Comabbio al vertice possiamo individuare i diaptomidi ed i ciclopidi, quando condividono la stessa catena alimentare della linea di base.

Nel lago di Pusiano invece sembrano comportarsi tutti da consumatori primari, non discostandosi da *Daphnia*, ad eccezione dei ciclopidi in estate che si avvicinano ad una posizione trofica superiore.

Bosmina occupa sempre una posizione inferiore rispetto a *Daphnia*, probabilmente a causa della sua maggiore selettività alimentare, in quanto spesso predilige i cianobatteri.

Ad ulteriore conferma dell'unicità del fingerprint isotopico di ciascun lago per il carbonio e l'azoto, vengono ora presentati i segnali isotopici registrati in primavera in altri otto laghi subalpini del nord Italia, campionati nello stesso periodo e con le stesse modalità dei cinque laghi fin qui analizzati.

In tabella 7 vengono indicate le principali caratteristiche di ciascun bacino. In questo caso sono presenti anche tre grandi laghi profondi: il Lago di Garda, il lago di Como ed il lago di Lugano.

Tabella 7: Laghi di interesse e loro principali caratteristiche.

Lago	Altezza (m s.l.m.)	Volume (10 ⁶ m ³)	Profondità massima (m)	P _{tot} (µgL ⁻¹)
Garda	65	50350	350	10
Segrino	374	1	9	12
Idro	370	684	122	24
Sirio	271	5	43	24
Alserio	260	7	8	26
Como	198	22500	425	35
Lugano	271	5860	288	47
Varese	238	160	26	82

I segnali isotopici del carbonio sono compresi tra -39‰ e -27‰, con l'eccezione del Lago di Comabbio che, come abbiamo visto, risente maggiormente dell'influsso da parte del litorale con valori compresi tra -20‰ e -18‰. I tre grandi laghi profondi sono compresi tra -27,8‰ e -34‰. Nel Lago di Como è evidente la sovrapposizione tra *Daphnia* ed *Eubosmina*, con una conseguente competizione alimentare. Quando presente, negli altri laghi *Bosmina* assume valori differenti rispetto a *Daphnia*, prediligendo profondità maggiori nei laghi Endine, Idro e Varese mentre nel Lago Segrino presenta un $\delta^{13}\text{C}$ meno negativo rispetto a *Daphnia*. Per i segnali isotopici dell'azoto, presenta sempre un arricchimento minore rispetto al segnale della linea di base.

I segnali isotopici dell'azoto sono compresi tra 2‰ e 18‰ con intervalli di variazione differenti tra i diversi laghi. I ciclopidi ed i diaptomidi presentano sempre valori di arricchimento maggiori rispetto a *Daphnia* in tutti i laghi, ad eccezione dei diaptomidi nel Lago Sirio.

Dall'analisi dei componenti principali (PCA) tra i segnali isotopici di ciascun taxa dei cinque laghi oggetto di studio si evidenzia una correlazione significativa (test di sfericità di Bartlett: $p < 0,0001$) e si nota subito una netta suddivisione in funzione del grado di trofia di ciascun lago (figura 12).

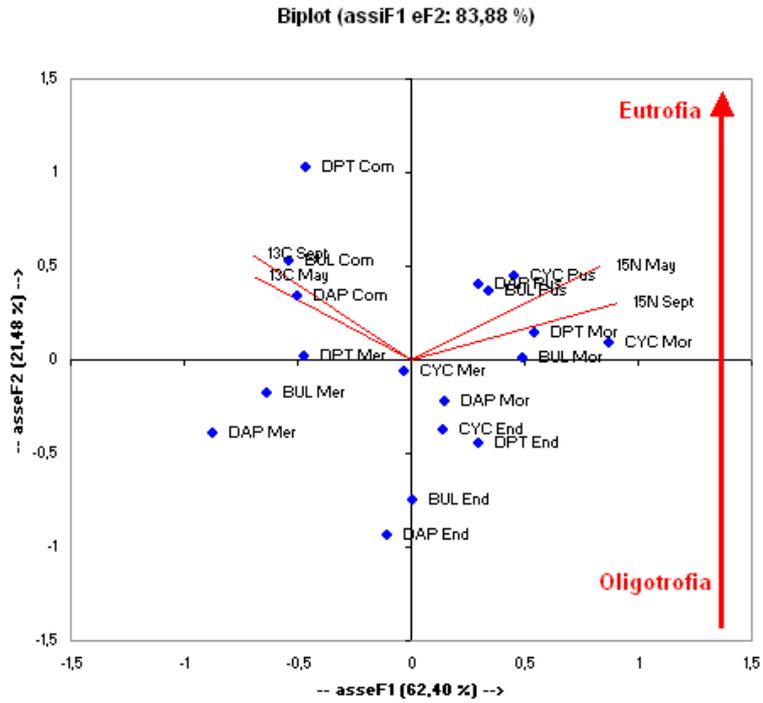


Figura 12: Analisi dei componenti principali per i cinque laghi oggetto di studio. Ciascun punto è rappresentato da tre lettere maiuscole che indicano il taxa e le successive tre lettere invece fanno riferimento alle iniziali del nome del lago.

5.2 SIA per il Lago di Como

5.2.1 Dervio

Sono stati analizzati un totale di 33 campioni pelagici zooplanctonici e 6 campioni del litorale per il contenuto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Dai risultati ottenuti è evidente un andamento stagionale dei segnali isotopici del carbonio dei singoli taxa zooplanctonici ($\delta^{13}\text{C}$ Kruskal-Wallis test $H(3, N= 18) = 12,2$ $p=0,0068$); diversa è la situazione per i segnali isotopici dell'azoto ($\delta^{15}\text{N}$ Kruskal-Wallis test $H(3, N= 18) = 4,4$ $p=0,2246$), dove sono presenti variazioni maggiori nel corso dell'anno della posizione trofica assunta dai diversi taxa.

Come si può vedere dal grafico trofochimico riportato di seguito (figura 13), rappresentativo delle nicchie trofiche di ciascun taxa zooplanctonico nelle quattro stagioni, il carbonio nei mesi freddi assume valori più negativi mentre l'azoto risulta essere più arricchito, mentre in estate il carbonio è più arricchito e l'azoto è più impoverito. Inoltre, si tenga presente che, in generale, valori più negativi del $\delta^{13}\text{C}$ si riferiscono a zone di lago più profonde mentre valori meno negativi sono rappresentativi delle zone del litorale o di acque superficiali.

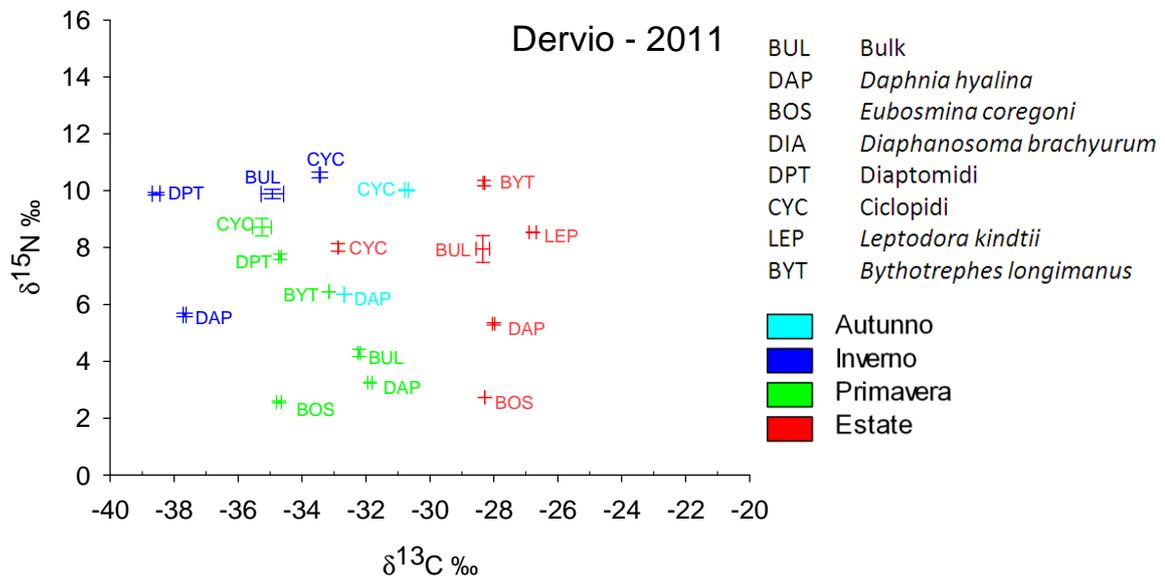


Figura 13: Variazioni stagionali per i segnali isotopici di carbonio ed azoto dei taxa zooplanctonici per la stazione di Dervio.

Il segnale isotopico di *Daphnia* viene utilizzato come rappresentante della linea di base pelagica poiché riflette l'andamento del segnale isotopico del seston (Visconti e Manca, 2011), rappresentante del primo livello trofico e difficile da isolare. È stata scelta *Daphnia* poiché è un filtratore non selettivo con un comportamento alimentare costante sia durante

l'anno che nei diversi laghi (Matthews e Madzumder, 2003; Perga e Gerdeaux, 2006), in grado di riflettere l'andamento stagionale delle diverse componenti alimentari.

I segnali isotopici per il carbonio di *Daphnia* assumono valori meno negativi in estate (-28,01‰ e -26,83‰ rispettivamente) e più negativi in inverno (-37,67‰). La variazione del $\delta^{13}\text{C}$ di *Daphnia* riflette i cambiamenti nella dieta che dipendono principalmente dalla materia organica particellata (POM) in inverno e primavera e dal fitoplancton in tarda primavera e in estate (Pel et al., 2003; Matthews e Madzumder, 2005; Perga e Gerdeaux, 2006).

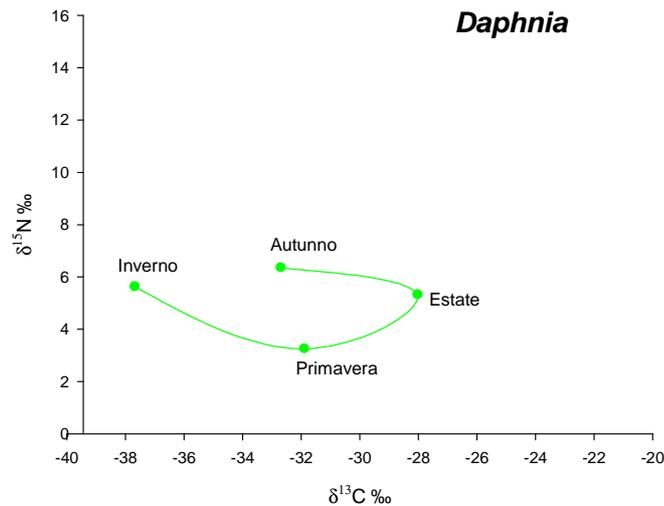


Figura 14: Andamento stagionale dei segnali isotopici di carbonio ed azoto di *Daphnia*.

Per l'isotopo pesante dell'azoto, i valori massimi di arricchimento vengono raggiunti in autunno ed inverno, in primavera si raggiungono i valori minimi mentre in estate ci troviamo in una situazione intermedia. Il intervallo di variazione è compreso tra 6,35‰ ($\pm 0,0$ ES) del periodo autunnale e 3,25‰ ($\pm 0,01$ ES) di quello primaverile.

Considerando tutte le componenti zooplanctoniche, per la stazione di Dervio i valori assunti per il carbonio sono compresi tra -26,79 ($\pm 0,11$ ES) e -38,57 ($\pm 0,12$ ES) con $\delta^{13}\text{C}$ meno negativi in estate e più negativi in inverno e valori intermedi in primavera e autunno per tutti i singoli taxa (figura 15).

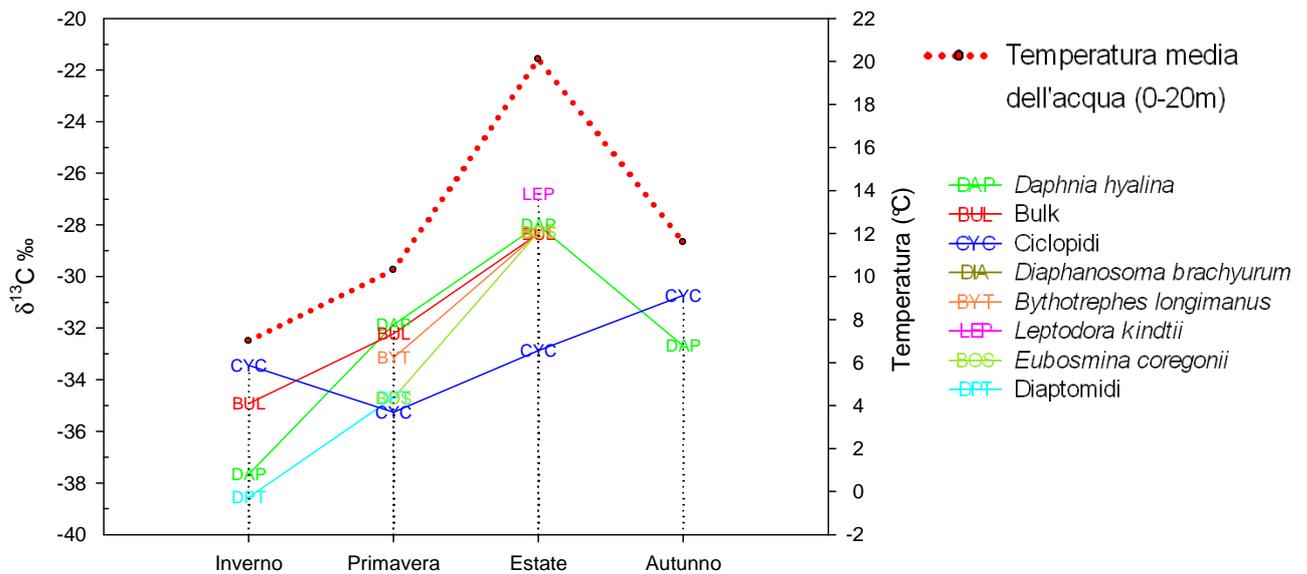


Figura 15: Segnali isotopici di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ misurati nel corso dell'anno in diversi taxa dello zooplancton del Lago di Como campionati a Dervio e relative temperature medie della colonna d'acqua (0-20 m di profondità).

Nei grandi laghi profondi, il segnale isotopico del carbonio può essere messo in relazione alla profondità perché negli strati d'acqua più profondi i valori di carbonio diventano più negativi a causa dell'aumentata attività respiratoria rispetto agli organismi che vivono più in superficie (Vander Zanden e Rasmussen, 1999; Grey et al., 2000; Cattaneo et al., 2004). Quindi, all'aumentare della profondità i valori di $\delta^{13}\text{C}$ diventano più negativi e si può osservare così una migrazione stagionale dei taxa da acque meno profonde (acque superficiali o litorali) del periodo estivo ad acque più profonde nei mesi più freddi.

Il grafico, oltre ad evidenziare come il segnale isotopico del carbonio dei diversi taxa cambi al variare delle stagioni, mostra anche come questo cambi al variare delle temperature medie entro lo strato d'acqua campionato (da 0-20 m di profondità).

La temperatura ambientale, influenza direttamente la solubilità del carbonio in acqua (Zohary, 1994; Perga e Gerdeax, 2006; Visconti et al., 2010; Caroni et al., 2012). Infatti, all'aumentare della temperatura diminuisce la solubilità del carbonio atmosferico, influenzando così il frazionamento isotopico di quest'ultimo durante l'assunzione da parte del fitoplancton (Rau et al., 1989 e 1992; Caroni et al., 2012).

I segnali isotopici dell'azoto sono maggiori in autunno ed inverno, mentre diminuiscono in primavera ed estate (Figura 16). Tuttavia i taxa campionati non sempre sono presenti nel corso dell'anno, di conseguenza i valori risultano compresi tra 10,55‰ ($\pm 0,11$ ES), valore attribuito a *Bythotrephes* in estate (assente in inverno), e 3,25‰ ($\pm 0,01$ ES) di *Daphnia* in primavera.

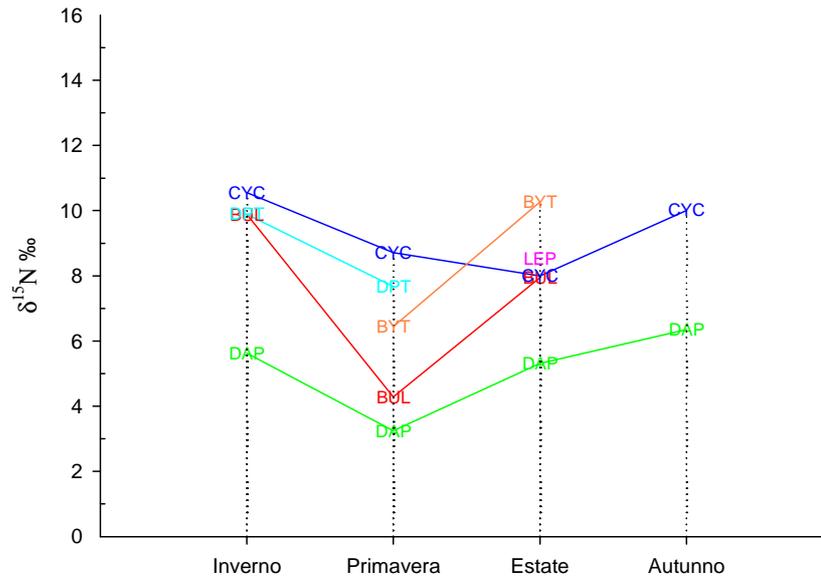


Figura 16: Segnali isotopici del $\delta^{15}\text{N}$ ‰ misurati nel corso dell'anno in diverse componenti dello zooplancton campionate a Dervio.

Daphnia presenta un maggior arricchimento in inverno ed autunno, mentre in primavera ed estate risulta meno arricchita.

I ciclopidi copepodi occupano una posizione dominante nel grafico del $\delta^{15}\text{N}$ ‰ ad eccezione dell'estate, probabilmente dovuto all'assenza dei cladoceri predatori nelle altre stagioni. In primavera, pur essendo presente *Bythotrephes*, i ciclopidi occupano una posizione superiore. I diaptomidi hanno un andamento simile ai precedenti per le due stagioni in cui sono presenti.

Le variazioni del segnale isotopico dell'azoto al variare delle stagioni possono indicare fonti alimentari diverse e quindi un singolo taxon può occupare posizioni trofiche differenti nel corso dell'anno, inoltre il segnale dell'azoto consente di mettere in luce lo sviluppo nel corso dell'anno dei rapporti trofici tra gli organismi componenti lo zooplancton del lago, consentendo anche l'individuazione di ruoli vicarianti tra essi, a condizione che condividano una stessa base alimentare.

La posizione trofica dei diversi taxa zooplanctonici nell'arco dell'anno è ben chiara dall'analisi dei grafici trofochimici riportati di seguito (figura 17). I diversi colori si riferiscono alle quattro diverse stagioni.

La stagionalità nel comportamento alimentare può essere identificata mediante i cambiamenti nelle firme isotopiche; queste variazioni possono essere attribuite alle variazioni delle fonti alimentari, alle diverse fasi di sviluppo dei diversi taxa della popolazione e/o a spostamenti nella colonna d'acqua o verso il litorale nei diversi periodi dell'anno.

Il segnale isotopico del pool zooplanctonico (identificato con il termine *bulk*) riflette il segnale complessivo delle diverse componenti della popolazione considerata e, di conseguenza,

assume valori più vicini al taxon presente in quantità maggiore in termini di biomassa per quel dato campionamento. Ad esempio, per il campionamento primaverile di Dervio il segnale isotopico del carbonio del bulk è molto vicino al segnale di *Daphnia*, di conseguenza la composizione della popolazione in quel momento vedeva prevalere *Daphnia* ed in misura minore gli altri taxa, presenti con densità inferiori.

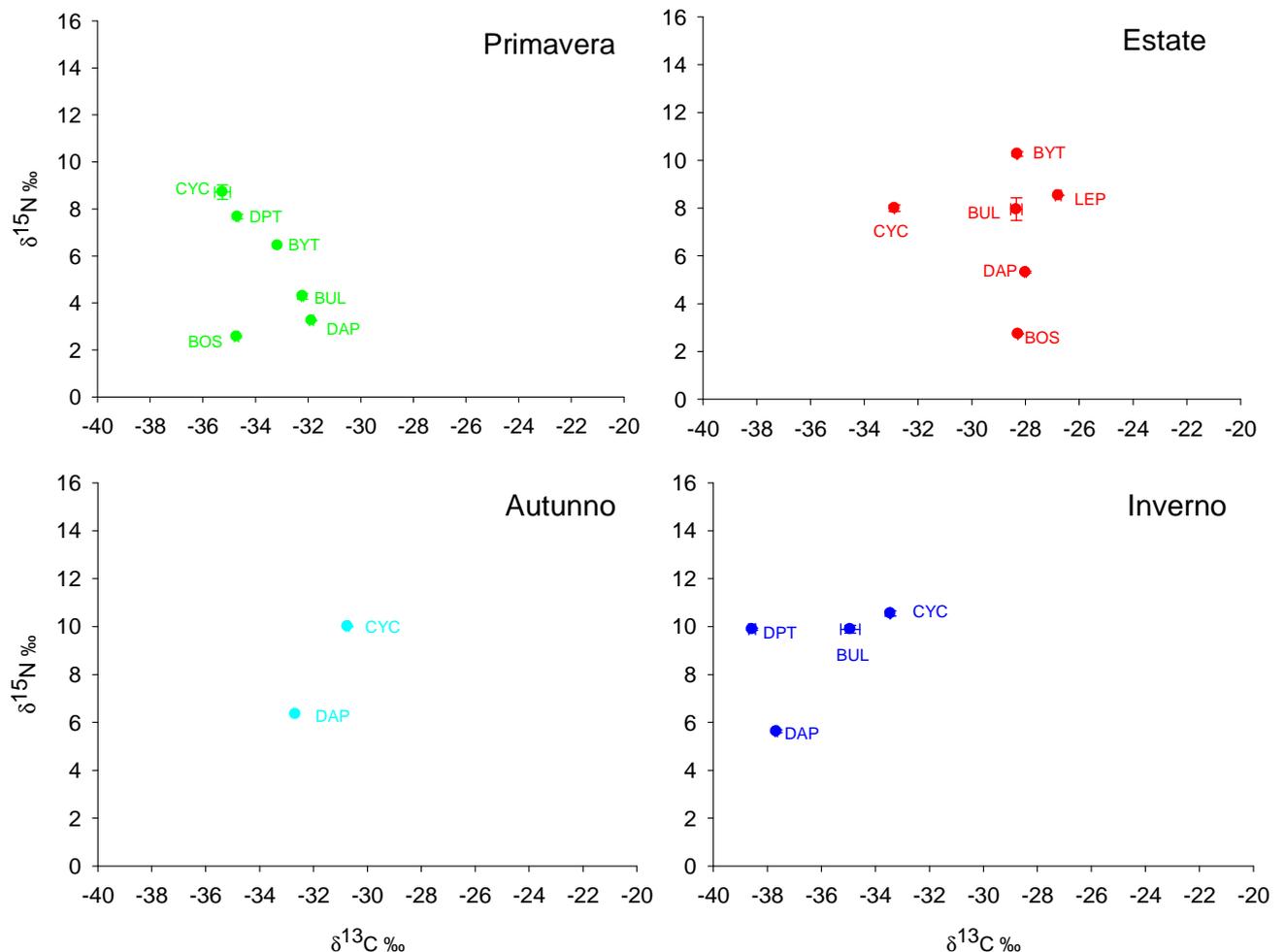


Figura 17: Grafici trofochimici relativi ai segnali isotopici rilevati per la stazione di Dervio (2011) nelle diverse stagioni nei principali organismi zooplanctonici del Lago di Como.

Alcuni organismi zooplanctonici, quali i cladoceri predatori ed i diaptomidi adulti, ricalcano fedelmente le variazioni stagionali della linea di base pelagica; questo sta ad indicare una dipendenza delle stesse fonti alimentari utilizzate da *Daphnia*.

Per la stazione di Dervio (figura 17), i segnali isotopici non sono presenti per tutti i taxa considerati per l'anno intero a causa della loro scarsa abbondanza in alcuni periodi dell'anno. Il segnale isotopico del carbonio dei ciclopidi mostra valori meno negativi in estate e autunno ($-32,88\text{‰} \pm 0,004 \text{ ES}$ e $-30,74\text{‰} \pm 0,05 \text{ ES}$), per poi assumere valori più negativi in inverno e primavera rispettivamente ($-33,45\text{‰} \pm 0,02 \text{ ES}$ e $-35,26\text{‰} \pm 0,3 \text{ ES}$).

I calanoidi, presenti solo in inverno e primavera, risultano essere più impoveriti dell'isotopo pesante del carbonio in inverno con un valore pari a $-38,57 (\pm 0,12 \text{ SE})$ passando poi ad un valore pari a $-34,69 (\pm 0,04 \text{ ES})$ in primavera.

Questo andamento stagionale del carbonio sembra essere seguito anche da *Bythotrephes* ed *Eubosmina*, presenti esclusivamente nei campioni primaverile ed estivo. Il segnale isotopico del carbonio di *Eubosmina* in primavera si discosta molto dal valore di *Daphnia* ($-34,72\text{‰} \pm 0,08 \text{ ES}$ e $-31,88\text{‰} \pm 0,07 \text{ ES}$ rispettivamente), mentre i valori estivi sono pressoché solidali. Ciò significa che in estate questi due cladoceri utilizzano le stesse fonti alimentari, mentre nel periodo primaverile sembrano prediligere profondità differenti, con *Eubosmina* a profondità maggiori e quindi occupare nicchie trofiche differenti senza alcuna competizione per le risorse alimentari.

Il segnale isotopico dell'azoto dei ciclopidi risultava pari a $8,7\text{‰} (\pm 0,31 \text{ ES})$ e $8\text{‰} (\pm 0,13 \text{ ES})$ in primavera ed estate rispettivamente. Il massimo valore di $\delta^{15}\text{N}$ ($10,55\text{‰} \pm 0,11 \text{ ES}$) viene misurato in inverno.

I cladoceri predatori assumono i valori massimi in estate, mentre in primavera il massimo livello di arricchimento nell'isotopo pesante dell'azoto viene registrato nei ciclopidi e nei diaptomidi.

Sono stati raccolti anche campioni di litorale, rappresentati dai chironomidi per tre stagioni (figura 18).

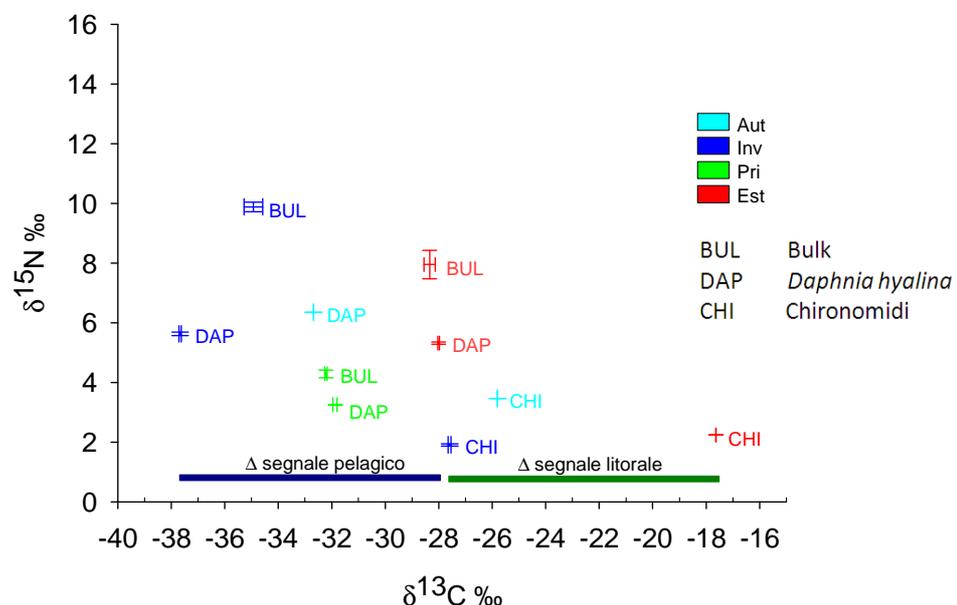


Figura 18: grafico trofochimico per i segnali isotopici dei chironomidi del litorale in confronto con quelli riportati per *Daphnia* e bulk pelagico nelle quattro stagioni.

I segnali isotopici rispetto allo zooplancton assumono valori inferiori per il carbonio e l'azoto, con valori più simili alle piante terrestri C3 (Jones et al., 1998; Grey et al., 2000; Grey e Jones, 2001; Pace et al., 2004).

Tuttavia, anche questi organismi seguono un certo andamento stagionale con valori minori in inverno per poi aumentare con l'avanzare della stagione, pur mancando il valore per la stagione primaverile. Inoltre, si può vedere come durante il corso dell'anno i segnali isotopici del litorale e del pelago non si sovrappongano mai.

L'appartenenza di un organismo alla stessa catena alimentare è verificata quando il frazionamento del carbonio (F) rispetto alla base alimentare è $\leq 0,8 \pm 1,1$ (Peterson e Fry, 1987).

Quindi, per ogni singolo taxa è stato calcolato il frazionamento isotopico rispetto al segnale di *Daphnia*, attraverso la seguente formula:

$$F = {}^{13}\text{C}_{\text{predatore}} - {}^{13}\text{C}_{\text{base}}$$

In primavera, il frazionamento isotopico di ciclopidi e diaptomidi è stato riferito ad *Eubosmina* poiché non c'era alcuna correlazione con *Daphnia*. È stata scelta *Eubosmina* perché presenta un $\delta^{13}\text{C}$ simile a questi due taxa ed occupa una posizione bassa nella catena alimentare (tabella 8).

Tabella 8: Valori di frazionamento isotopico del carbonio in riferimento al segnale della linea di base. (In rosso sono riportati i valori dei taxa che non condividono la stessa rete alimentare). * Anziché a *Daphnia*, i valori sono stati riferiti ad *Eubosmina*.

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Bythotrephes</i>	-1,29	-0,31		
<i>Leptodora</i>		1,22		
Ciclopidi	-0,54*	-4,87	1,95	4,23
Diaptomidi	0,04*			-0,90
<i>Eubosmina</i>	-2,85	-0,28		

Come si può vedere dalla tabella, non tutti i taxa considerati condividono la stessa rete alimentare di *Daphnia*. I ciclopidi nella stazione di Dervio si discostano notevolmente da *Daphnia* ad eccezione della stagione autunnale, probabilmente perché si nutrono di cianobatteri e/o occupano nicchie differenti nella colonna d'acqua. Durante l'inverno sembrano risentire maggiormente dell'influsso del litorale mentre in primavera ed estate prediligono acque più profonde, sempre rispetto a *Daphnia*.

In primavera i diaptomidi ed *Eubosmina* non sono solidali a *Daphnia*, essendo confinati più in profondità.

Per i taxa che condividono la stessa base alimentare è stato calcolato l'arricchimento nell'isotopo pesante dell'azoto (tabella 9) con la seguente equazione: $E = \delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{linea di base}}$

Tabella 9: Valori di arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ di diversi organismi zooplanctonici rispetto a *Daphnia*. * Anziché a *Daphnia*, i valori sono stati riferiti ad *Eubosmina*.

	DERVIO 2011			
	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Bythotrephes</i>	3,19	4,95		
<i>Leptodora</i>		3,22		
Ciclopidi	6,15*			
Diaptomidi	5,1*			4,26
<i>Eubosmina</i>		-2,59		

Sono emersi valori variabili con le stagioni. I valori maggiori sono assunti da *Bythotrephes* e *Leptodora*, seguiti da ciclopidi e diaptomidi.

Partendo da questi risultati, è stato possibile calcolare la posizione trofica di ciascun organismo:

$$\text{Posizione trofica} = \lambda + [(\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{linea di base}})/2,55]$$

Tabella 10: Posizione trofica dei diversi organismi zooplanctonici rispetto a *Daphnia*. * Anziché a *Daphnia*, i seguenti valori sono stati riferiti ad *Eubosmina*.

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Daphnia</i>	2	2	2	2
Ciclopidi	4,4*			
Diaptomidi	4,0*			3,7
<i>Bythotrephes</i>	3,3	3,9		
<i>Leptodora</i>		3,3		
<i>Eubosmina</i>		1,0		

Al vertice della rete trofica troviamo *Bythotrephes* e *Leptodora*, quando presenti. I ciclopidi in autunno ed i diaptomidi in inverno occupano un livello trofico superiore rispetto a *Daphnia*, mentre, in estate *Eubosmina* occupa un livello inferiore rispetto a *Daphnia*.

In figura 19, viene presentata graficamente la variazione della strategia alimentare dei taxa considerati, facendo riferimento ai segnali isotopici di carbonio ed azoto. Ciascun taxon viene raffigurato da un riquadro con colori differenti, e l'ampiezza di quest'ultimo rappresenta l'intervallo di variazione dei segnali isotopici di carbonio ed azoto tra due stagioni considerate. In verticale è possibile vedere la variabilità della posizione trofica ($\delta^{15}\text{N}$) di

ciascun taxon, mentre in orizzontale viene rappresentata la variabilità alimentare e la dipendenza dalla zona pelagica o litorale ($\delta^{13}\text{C}$).

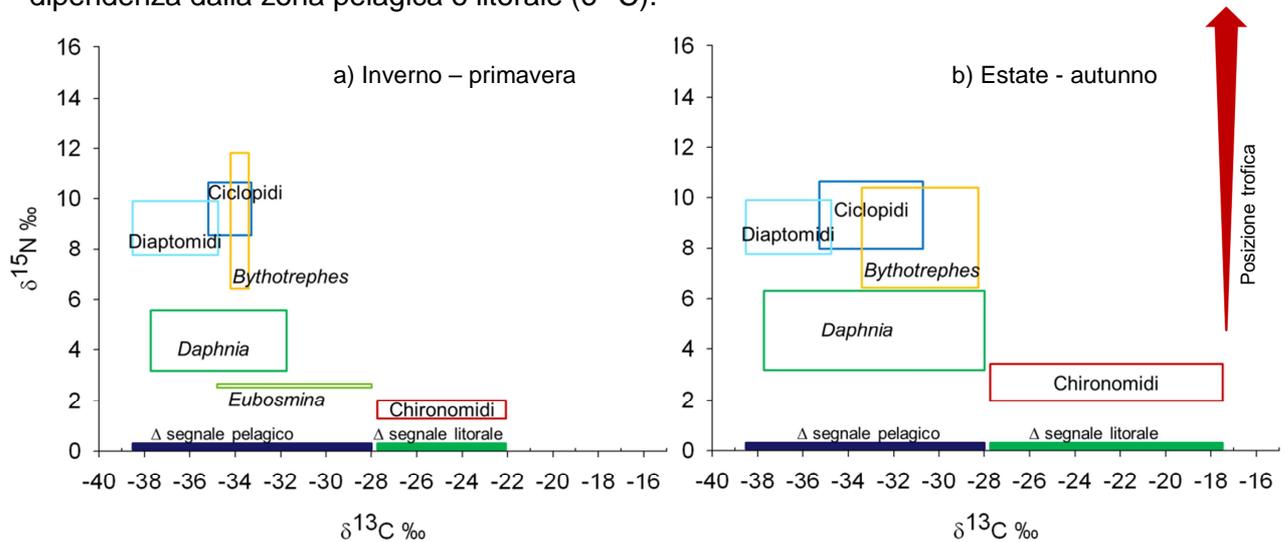


Figura 19: Variazioni stagionali dei segnali isotopici di carbonio ed azoto dei taxa considerati.

È evidente la netta distinzione tra i segnali isotopici del litorale (chironomidi) e quelli pelagici (zooplancton), senza alcuna sovrapposizione. La variabilità dei segnali per ciascun taxon è differente durante il corso dell'anno: *Daphnia* presenta una variabilità maggiore in inverno e primavera per entrambi i segnali isotopici, mentre *Eubosmina* non effettua variazioni sostanziali per il segnale isotopico dell'azoto, e al contrario per il carbonio si osserva un'ampia variabilità, con valori compresi tra -28 e -34‰. Situazione inversa si osserva per *Bythotrephes* che ha una variazione notevole per il segnale dell'azoto ($6\text{‰} < \delta^{15}\text{N} > 12\text{‰}$) ma non per il carbonio.

In estate ed autunno le variazioni dei segnali isotopici sono inferiori, ad eccezione per i chironomidi.

I ciclopidi invece sembrano avere intervalli di variazione costanti nei due periodi.

5.2.2 Argegno

Sono stati analizzati un totale di 58 campioni zooplanctonici pelagici per il contenuto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ a partire dalla primavera 2013 fino a febbraio del 2014. Sono stati analizzati anche 18 campioni di pesci appartenenti alle due specie *Alosa fallax* e *Coregonus lavaretus*, pescati nello stesso periodo dei campionamenti dello zooplancton.

Risulta evidente un andamento stagionale dei segnali isotopici dei singoli taxa ($\delta^{13}\text{C}$ Kruskal-Wallis test: $H(3, N=28)=21,9$ $p=0,001$; $\delta^{15}\text{N}$ Kruskal-Wallis test: $H(3, N=20)=12,6$ $p=0,0056$).

Dal grafico trofochimico riportato di seguito (figura 20), si evince come anche per la stazione di Argegno il carbonio nei mesi freddi assume valori più negativi mentre l'azoto risulta essere più arricchito.

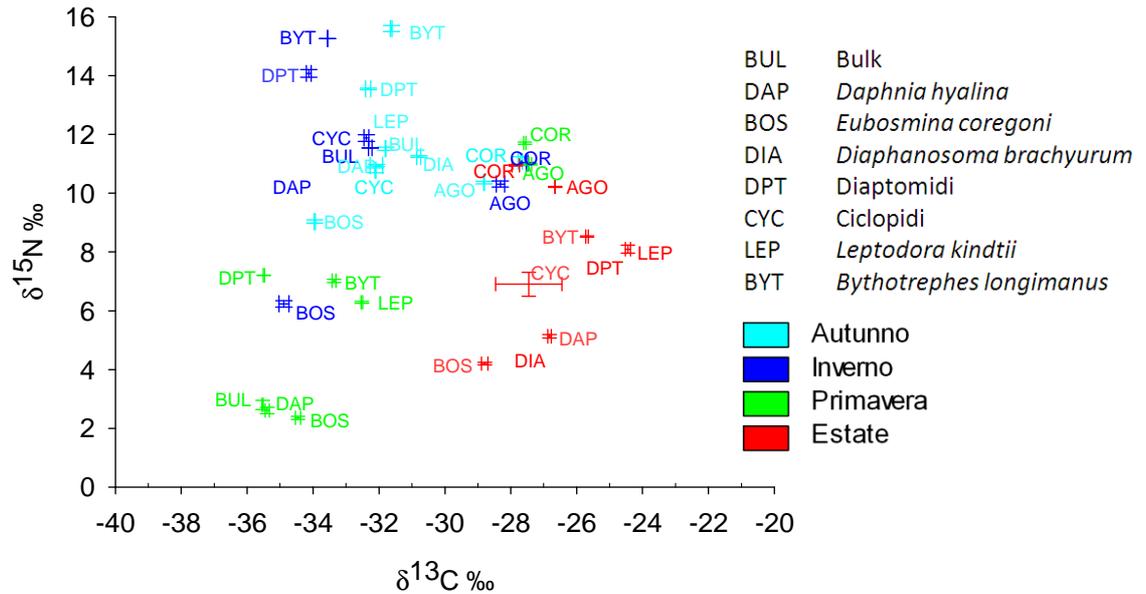


Figura 20: Variazioni stagionali per i segnali isotopici di carbonio ed azoto dei taxa zooplanctonici per la stazione di Argegno.

I segnali isotopici per il carbonio di *Daphnia* assumono valori meno negativi in estate (-26,83‰) e più negativi in primavera (-35,39‰). Nelle altre due stagioni i segnali isotopici assumono valori intermedi (figura 21).

Per l'isotopo pesante dell'azoto, i valori sono compresi tra 10,23‰ ($\pm 0,0$ ES) del periodo autunnale e 2,60‰ ($\pm 0,06$ ES) di quello primaverile.

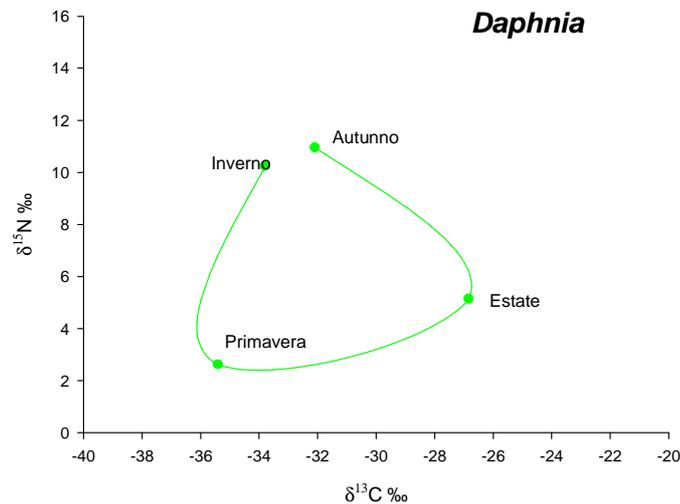


Figura 21: Andamento stagionale dei segnali isotopici di carbonio ed azoto di *Daphnia*.

Osservando l'intera popolazione zooplanctonica, l'andamento dei segnali del carbonio oscilla tra valori compresi tra -24,45 ($\pm 0,08$ ES) e -35,495 ($\pm 0,02$ ES) (figura 22).

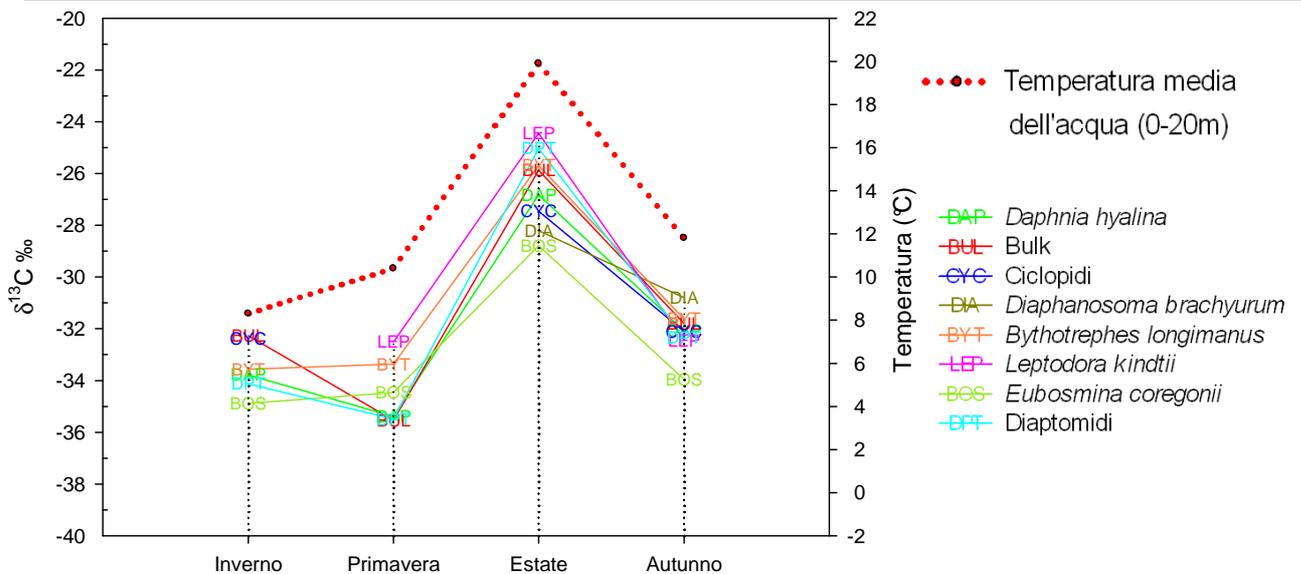


Figura 22: Segnali isotopici di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ misurati nel corso dell'anno in diversi taxa dello zooplancton del Lago di Como e relative temperature medie della colonna d'acqua (0-20 m di profondità).

La variazione del segnale isotopico del carbonio dei diversi taxa nei mesi più freddi è minore, mentre in primavera ed estate si evidenzia un differenziamento maggiore nel segnale che con tutta probabilità riflette una diversa distribuzione verticale nel corso dell'anno, assumendo valori più negativi all'aumentare della profondità.

Le variazioni del segnale isotopico del carbonio seguono l'andamento delle temperature della colonna d'acqua (0-20 m di profondità).

I segnali isotopici dell'azoto sono compresi tra 15,6‰ ($\pm 0,10$ ES), valore attribuibile a *Bythotrephes* in inverno, e 2,36‰ ($\pm 0,05$ ES), valore estivo di *Eubosmina*, assumendo così valori più alti in autunno ed inverno, mentre diminuiscono all'aumentare delle temperature (figura 23).

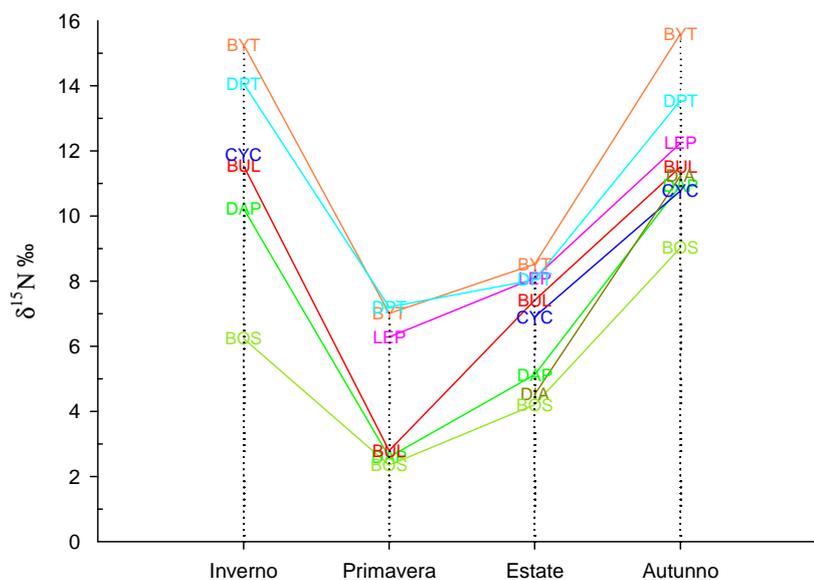


Figura 23: Segnali isotopici del $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ misurati nel corso dell'anno in diverse componenti dello zooplancton.

I ciclopidi copepodi occupano una posizione intermedia nel grafico del $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ compresa tra i cladoceri predatori e *Daphnia*; i diaptomidi hanno un andamento simile ma con valori più elevati in autunno ed in inverno, mentre in primavera ed estate sono molto più vicini ai segnali dei predatori come *Bythotrephes* e *Leptodora*.

Eubosmina presenta i valori più bassi in tutte le stagioni, a causa di una maggiore selettività nei confronti dei cianobatteri azoto-fissatori (France e Schlaepfer, 2000).

Osservando i diversi grafici trofochimici stagionali, per la stazione di Argegno (figura 22), il segnale isotopico del carbonio del periodo primaverile dei cladoceri predatori *Bythotrephes* e *Leptodora* si discosta da *Daphnia*, assumendo valori meno negativi, subito seguiti da *Eubosmina*.

In estate, procedendo da valori meno negativi troviamo i cladoceri predatori ed i diaptomidi, seguiti da *Daphnia* ed i ciclopidi e più in profondità *Diaphanosoma* ed *Eubosmina*, solidali tra loro. Infine, in autunno osserviamo *Eubosmina* con valori più negativi per il carbonio e, invece, *Diaphanosoma* con valori meno negativi rispetto a *Daphnia* ed ai taxa restanti. Ciò sta ad indicare che le nicchie trofiche di questi cladoceri non entrano in contatto tra loro, andando ad occupare molto probabilmente strati d'acqua a profondità diverse, con *Eubosmina* più in profondità, seguita da *Daphnia* e poi *Diaphanosoma* più in superficie o maggiormente influenzata dal litorale.

In inverno, il segnale isotopico del carbonio dei diversi taxa zooplanctonici è piuttosto solidale a quello di *Daphnia* (-33,78‰), con valori compresi tra -32,38‰ dei ciclopidi e -34,13‰ dei diaptomidi.

Da notare, il fatto che il segnale isotopico per il carbonio per *Eubosmina* non si discosti molto da c.a. -34‰ al variare delle stagioni ad eccezione dell'estate dove assume un valore meno negativo.

Il massimo livello di arricchimento nell'isotopo pesante dell'azoto è raggiunto da *Bythotrephes longimanus* per l'intero anno, seguito subito dopo dai diaptomidi e da *Leptodora*.

I ciclopidi sembrano occupare una posizione intermedia tra il vertice della rete trofica zooplanctonica e la linea di base, ad eccezione del valore autunnale che è solidale a quello di *Daphnia*.

Diaphanosoma, quando è presente assume valori molto simili a *Daphnia*; diversa sembra la situazione per *Eubosmina coregonii*, la quale in primavera ed estate è solidale ai segnali di *Daphnia*, mentre in autunno ed inverno si discosta maggiormente per il segnale dell'isotopo pesante dell'azoto con valori inferiori rispettivamente di 1,9 e 4‰ rispetto a quelli misurati per *Daphnia*. *Eubosmina* in queste due stagioni probabilmente utilizza cianobatteri o altre risorse rispetto a *Daphnia*, occupando una posizione più bassa.

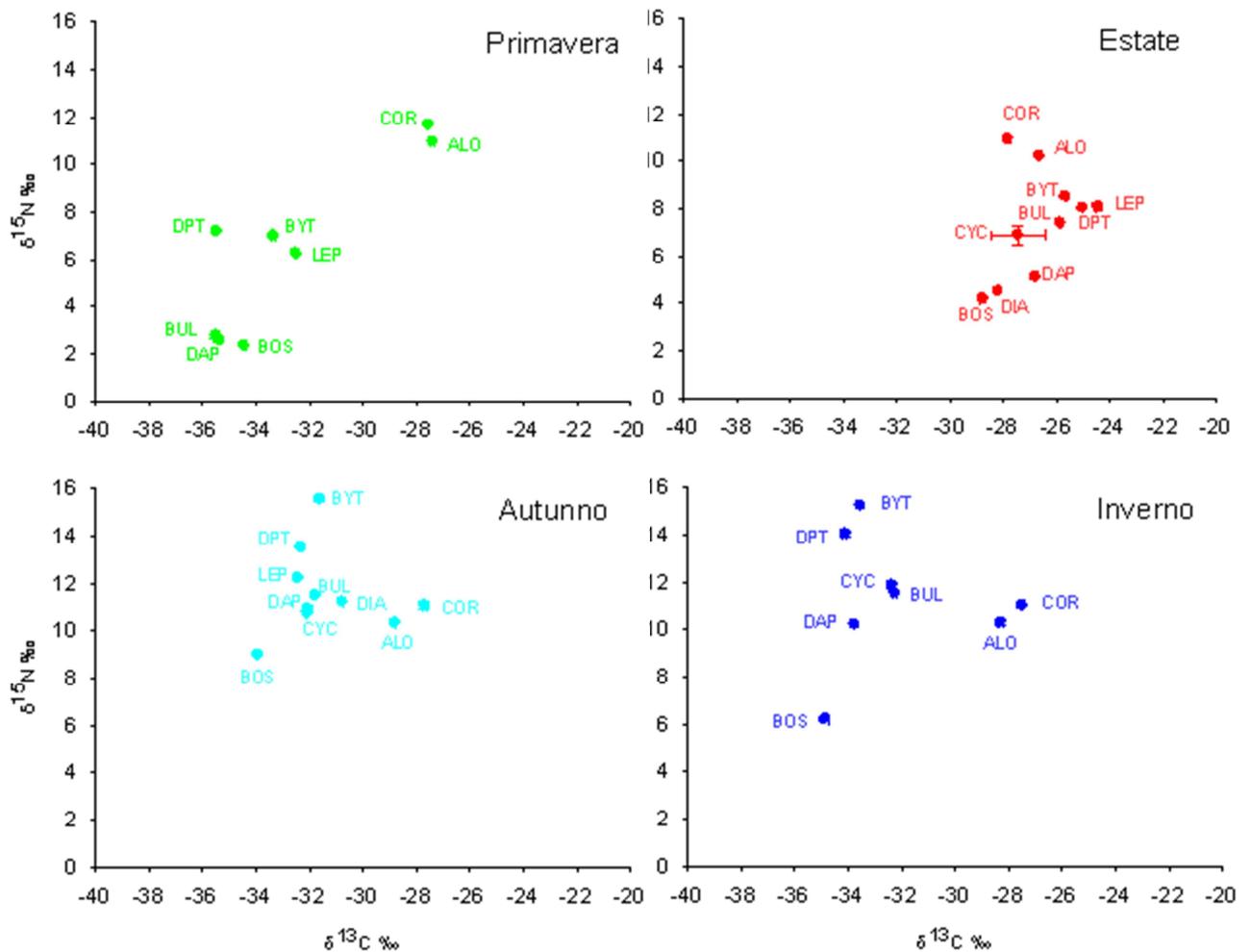


Figura 24: Grafici trofochimici relativi ai segnali isotopici rilevati per la stazione di Argegno (2013/2014) nelle diverse stagioni nei principali organismi zooplanctonici ed in due diverse specie di pesci del Lago di Como.

Nella stazione di Argegno sono state campionate anche due specie di pesci zooplanctivori, agone e coregone, per le stesse quattro stagioni di riferimento.

Come si può vedere dai grafici sopra citati e dai grafici di dettaglio riportati in seguito (figura 25), il segnale isotopico varia meno nel corso dell'anno rispetto a quello dello zooplancton. Tale variabilità è legata alla velocità di turnover metabolico dei tessuti, di conseguenza sarà più elevata in organismi più piccoli (come lo zooplancton) rispetto ad organismi più grandi (come i pesci).

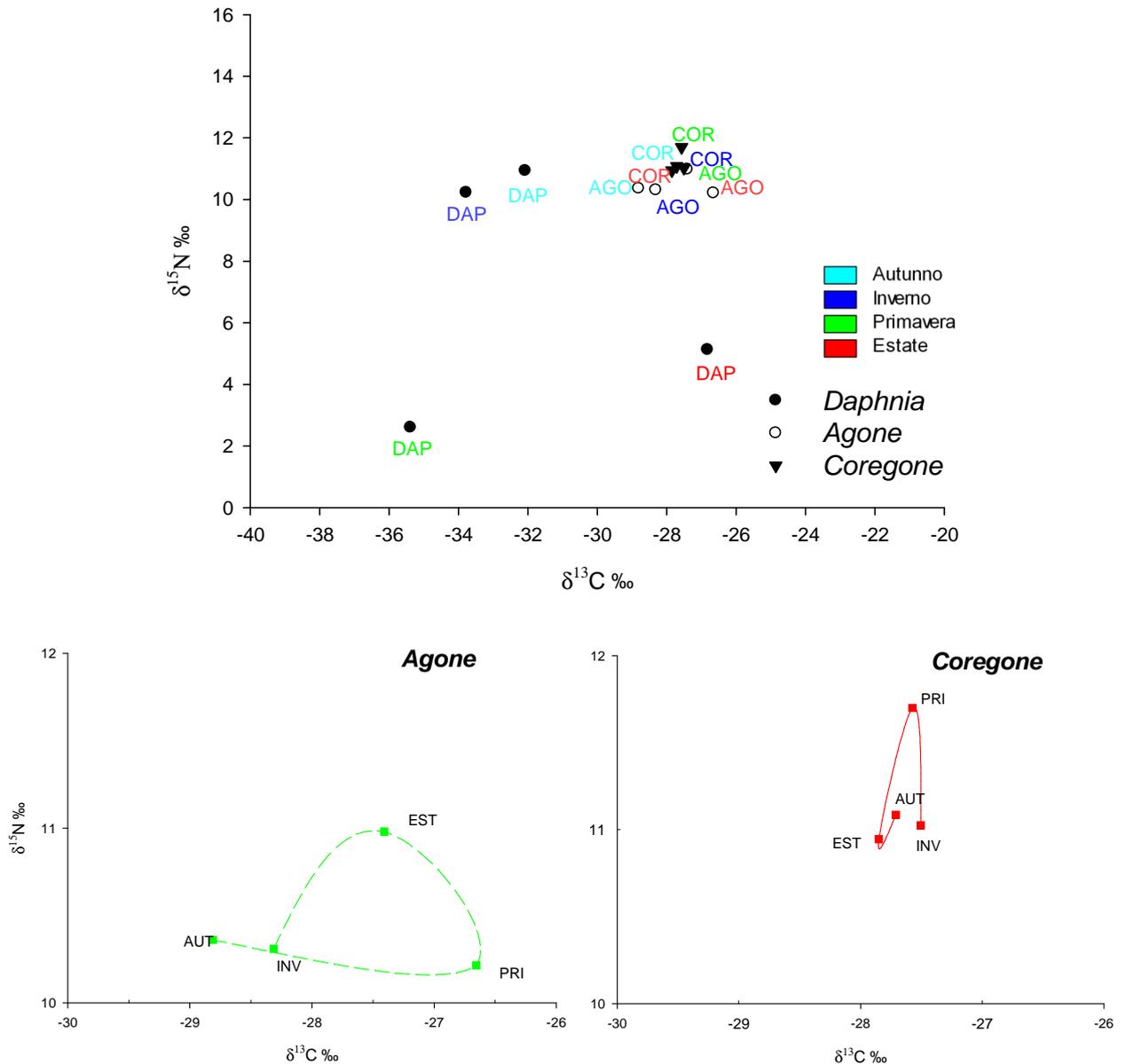


Figura 25: Grafico trofochimico relativo a *Daphnia* ed alle due specie di pesci del Lago di Como e dettaglio dei segnali isotopici per le singole specie ittiche.

In primavera ed inverno, i segnali isotopici del carbonio di agone e coregone si discostano maggiormente dai segnali dei diversi taxa zooplanctonici, suggerendo così l'utilizzo di fonti diverse rispetto a quelle pelagiche. In estate i segnali isotopici del $\delta^{13}\text{C}$ tendono ad avvicinarsi ai valori dei taxa zooplanctonici, divenuti in generale meno negativi. In questa fase quindi lo zooplancton rappresenta il costituente principale dei tessuti di questi due pesci. In autunno i valori del carbonio iniziano ad allontanarsi rispetto ai segnali dello zooplancton pelagico, i quali assumono valori più negativi.

Questi risultati mostrano come queste specie di pesci non dipendano esclusivamente da fonti pelagiche, ma possono utilizzare anche fonti litorali in dipendenza delle diverse stagioni.

Il segnale dell'azoto dei pesci in primavera ed estate raggiunge i valori massimi ($10,98 \pm 0,02$ ES per l'agone e $11,7 \pm 0,04$ ES per il coregone) mentre i valori più bassi vengono raggiunti in estate ($10,22 \pm 0,02$ ES per l'agone e $10,95 \pm 0,03$ ES per il coregone). Da notare comunque che il intervallo di variazione per l'isotopo pesante dell'azoto risulta molto limitato. Confrontando tali valori con quelli degli altri taxa pelagici zooplanctonici considerati si nota che i pesci occupano la posizione più alta solo in estate e primavera, mentre negli altri periodi sono solidali con *Daphnia* per quanto riguarda l'isotopo dell'azoto. In inverno ed in autunno, quando i pesci si spostano nel litorale, *Bythotrephes*, i diaptomidi ed i ciclopidi sono vicarianti al ruolo dei pesci, assumendo valori più elevati per l'azoto rispetto alla linea di base.

Questo fenomeno è stato registrato anche nel Lago Maggiore (Visconti et al., 2014) e in altri laghi profondi subalpini (Lehmann et al., 2004). In corrispondenza della migrazione dei pesci verso la zona pelagica in estate, i segnali isotopici dell'azoto dei taxa zooplanctonici risultano meno arricchiti, per poi tornare verso valori di arricchimento più alti in autunno.

Quando i due pesci zooplanctivori basano la loro dieta sulla rete trofica pelagica (in estate), i valori di arricchimento per l'azoto (E) delle potenziali prede (i due cladoceri predatori) diminuiscono (figura 26), mentre nelle altre stagioni si evidenzia un progressivo aumento.

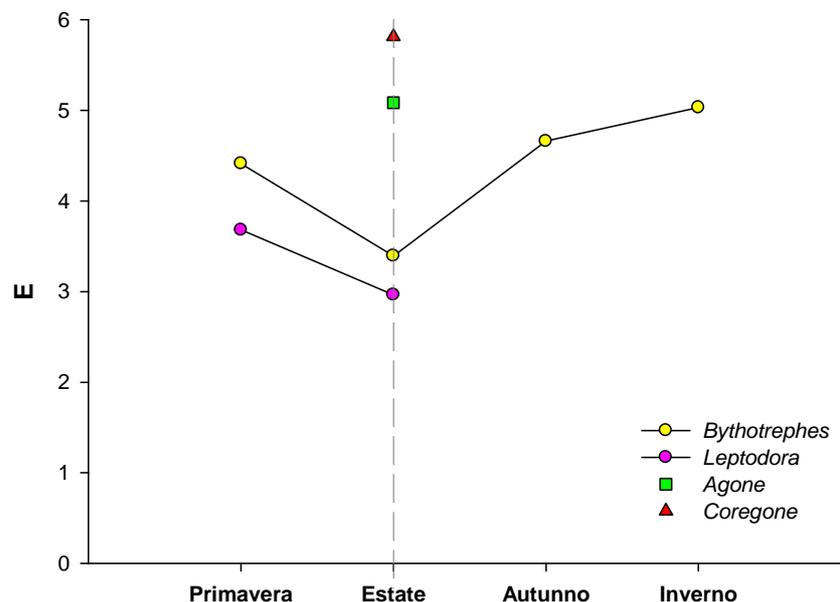


Figura 26: Arricchimento dell'isotopo ^{15}N ($E = ^{15}\text{N}$ -enrichment) dei due pesci zooplanctivori e dei cladoceri predatori *Bythotrephes* e *Leptodora* calcolato in riferimento alla linea di base pelagica (*Daphnia*).

Per ogni singolo taxon è stato calcolato il frazionamento isotopico rispetto al segnale di *Daphnia*, riportato nella tabella seguente:

Tabella 11: Valori di frazionamento isotopico del carbonio in riferimento al segnale della linea di base (in rosso sono riportati i valori dei taxa che non condividono la stessa rete alimentare). * Anziché a *Daphnia*, i seguenti valori sono stati riferiti ad *Eubosmina*.

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Bythotrephes</i>	1,1*	1,14	0,46	0,22
<i>Leptodora</i>	1,94*	2,38	-0,36	
Ciclopidi		-0,63	-0,03	1,4
Diaptomidi	-0,11	1,79	-0,25	-0,35
<i>Eubosmina</i>	0,93	-1,97	-1,87	-1,11
<i>Diaphanosoma</i>		-1,39	1,29	
Agone	7,98	0,17	3,27	5,47
Coregone	7,82	-1,03	4,37	6,28

Nella stazione di Argegno i taxa considerati sono per la maggior parte solidali a *Daphnia*. Non condividono la stessa base alimentare solamente *Leptodora* in primavera ed estate e *Bythotrephes* in primavera, poiché sono più spostati verso il litorale. Anche agone e coregone non fanno parte della stessa catena alimentare di *Daphnia*, ad eccezione del periodo estivo.

Per i taxa che condividono la stessa base alimentare è stato calcolato l'arricchimento nell'isotopo pesante dell'azoto (tabella 12) con la seguente equazione: $E = \delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{baseline}}$.

Tabella 12: Valori di arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ di diversi organismi zooplanctonici e delle due specie di pesci, rispetto a *Daphnia*.

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Bythotrephes</i>	4,66*	3,40	4,66	5,03
<i>Leptodora</i>			1,29	
Ciclopidi		1,77	-0,17	1,65
Diaptomidi	4,60	2,91	2,61	3,84
<i>Eubosmina</i>	-0,25	-0,93	-1,91	-4,00
<i>Diaphanosoma</i>		-0,61	0,30	
Agone		5,09		
Coregone		5,82		

Sono emersi valori variabili con le stagioni da un minimo di 0,17 per i ciclopidi in autunno, ad un massimo di 5,82 per il coregone in estate.

Variazioni significative nell'arricchimento dell'azoto durante l'anno, stanno a significare che tale taxon non utilizza la stessa risorsa alimentare durante l'anno oppure consuma risorse alternative con differenti segnali di $\delta^{15}\text{N}$, o ancora che non occupa la stessa posizione trofica (Perga e Gerdeaux, 2006).

Queste variazioni sono molto evidenti nei diaptomidi con valori compresi tra 2,6 e 4,6.

Da questi risultati è stata ricavata la posizione trofica di ciascun organismo (Matthews e Mazumder, 2008):

Tabella 13: Posizione trofica dei diversi organismi zooplanctonici rispetto a *Daphnia*. * Anziché a *Daphnia*, i seguenti valori sono stati riferiti ad *Eubosmina*.

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Daphnia</i>	2	2	2	2
Ciclopidi		2,7	1,9	2,6
Diaptomidi	3,8	3,1	3,0	3,5
<i>Bythotrephes</i>	3,4*	3,3	3,8	4,0
<i>Leptodora</i>			2,5	
<i>Eubosmina</i>	1,9	1,6	1,3	0,4
<i>Diaphanosoma</i>		1,8	2,1	
Agone		4,0		
Coregone		4,3		

Per la stazione di Argegno i ciclopidi occupano quasi lo stesso livello di *Daphnia* mentre i diaptomidi sono ad un livello superiore, così come i cladoceri predatori con *Bythotrephes* che riporta i valori maggiori. In estate le due specie di pesci occupano le posizioni trofiche più alte.

Quando i pesci predano lo zooplancton, *Bythotrephes* assume una posizione trofica più bassa rispetto al periodo restante, così come già evidenziato nel Lago Maggiore (Visconti et al., 2013).

Tuttavia, è evidente il ruolo di consumatore secondario da parte di *Bythotrephes* e *Leptodora*, i quali sono in grado di predare per la maggior parte *Daphnia*, ma anche le altre prede disponibili, basando tale affermazione sui segnali isotopici del carbonio con differenze inferiori a 1,9‰. In primavera, tuttavia, questi predatori si discostano da *Daphnia*, prediligendo prede di taglia più modesta, quali *Eubosmina*.

Diaphanosoma è vicariante con *Daphnia*, così come *Eubosmina* in primavera ed estate, mentre nelle altre due stagioni occupa un livello più basso.

Anche per la stazione di Argegno sono stati valutati gli intervalli di variazione dei segnali isotopici di carbonio ed azoto tra i due periodi considerati e i risultati sono mostrati in figura 27.

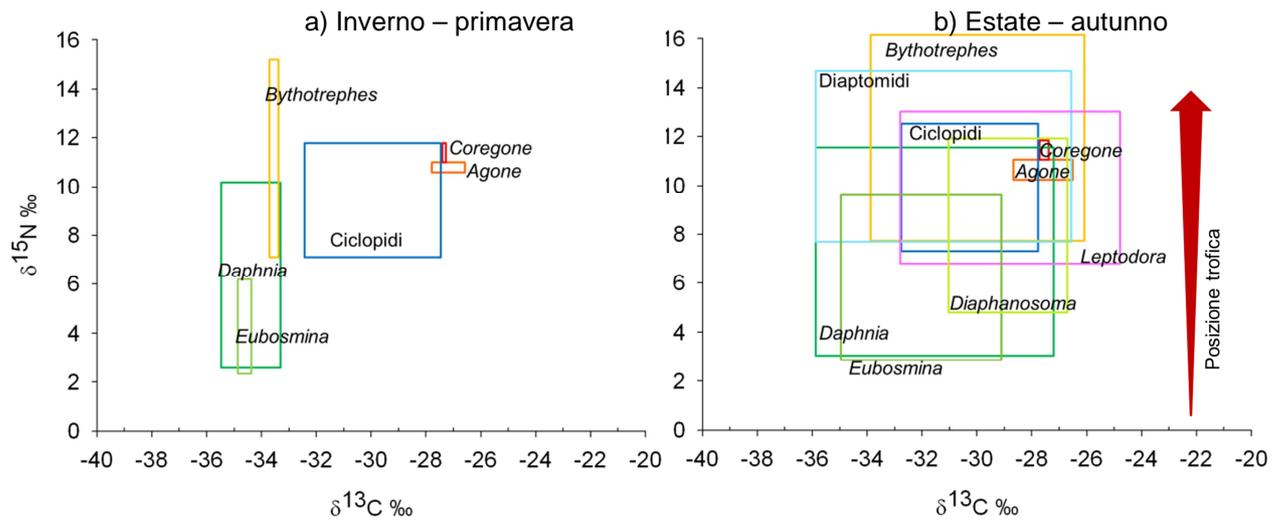


Figura 27: Variazioni stagionali dei segnali isotopici di carbonio ed azoto dei taxa considerati.

La variabilità dei segnali per ciascun taxon è differente durante il corso dell'anno: le variazioni maggiori si riscontrano per il periodo estivo – autunnale, all'aumentare delle temperature.

Daphnia presenta una variabilità minore in inverno e primavera per i segnali isotopici del carbonio, mentre la variazione per l'azoto è costante nei due periodi.

Eubosmina presenta variazioni ridotte in inverno e primavera, mentre in estate i segnali isotopici assumono intervalli maggiori in estate ed autunno. *Bythotrephes* in inverno e primavera attua una selezione nella dieta, avendo un intervallo di variazione nel segnale del carbonio trascurabile. Non è così per i segnali dell'azoto che sono compresi tra c.a. 7 e 15‰. Ciclopidi, agoni e coregoni invece sembrano avere intervalli di variazione costanti nei due periodi.

5.2.3 Confronto tra le due stazioni del Lago di Como

Confrontando i segnali isotopici delle due stazioni di campionamento, pur considerando che fanno riferimento a due anni differenti (Dervio 2011 e Argegno 2013), è evidente un andamento stagionale che si ripete nel tempo. Infatti, con il progredire della stagione e l'instaurarsi della stratificazione termica si osserva un generale innalzamento dei valori del $\delta^{13}\text{C}$ ed un minor arricchimento di $\delta^{15}\text{N}$. Tale innalzamento è dovuto alla stratificazione termica, la quale influenza il segnale isotopico del fitoplancton con un conseguente aumento del $\delta^{13}\text{C}$ a causa di una maggiore produzione primaria che porta all'esaurimento della CO_2 nell'epilimnio (Zohary et al., 1994) e ad un minore arricchimento nell'isotopo pesante dell'azoto.

Inoltre, lo stato trofico del lago in queste due stazioni, seppur di poco, differisce; il ramo di Como presenta una trofia maggiore rispetto al resto del lago.

In primavera, nella stazione di Argegno, *Daphnia* si trova a profondità maggiori rispetto a quella di Dervio, mentre in estate non si osservano differenze. Differiscono invece i ciclopidi, infatti ad Argegno sono solidali a *Daphnia* mentre a Dervio si trovano distinti a profondità maggiori e con un arricchimento maggiore in azoto.

Il comportamento dei cladoceri predatori in primavera è analogo, in estate a Dervio l'arricchimento in azoto è maggiore mentre ad Argegno maggiore è l'influenza di materiale alloctono. Queste differenze estive possono essere dovute ad una differente predazione da parte dei pesci zooplanctivori. Infatti, quando i pesci utilizzano lo zooplancton come preda, l'arricchimento in azoto diminuisce proporzionalmente alla pressione della predazione, così che reti trofiche complesse saranno proporzionalmente meno arricchite in azoto rispetto a reti trofiche più semplici (Visconti et al., 2014). Ad Argegno si è visto che nel periodo estivo i pesci considerati predano attivamente lo zooplancton, purtroppo non abbiamo informazioni per quanto riguarda Dervio, inoltre si tenga sempre presente che i campioni fanno riferimento ad anni diversi ed il grado di trofia dei due rami del lago differisce.

Confrontando l'andamento stagionale nelle due stazioni, i taxa presenti nelle varie stagioni differiscono nell'intervallo di variazione dei segnali isotopici (figura 29), tuttavia la maggior parte dei taxa sembra seguire l'andamento della linea di base. Per la stazione di Dervio i dati non sono completi per l'intero periodo considerato però si può ipotizzare un andamento analogo a quello di *Daphnia* per i cladoceri ed i diaptomidi. I ciclopidi invece, oltre ad avere un intervallo di variazione ristretto, hanno un andamento differente rispetto alla linea di base, probabilmente a causa della scelta di profondità maggiori nella colonna d'acqua (Manca et al., 2010).

Diverso è il comportamento dei ciclopidi per la stazione di Argegno, infatti sembrano ricalcare l'andamento di *Daphnia* e degli altri taxa, seppur con un intervallo di variazione inferiore.

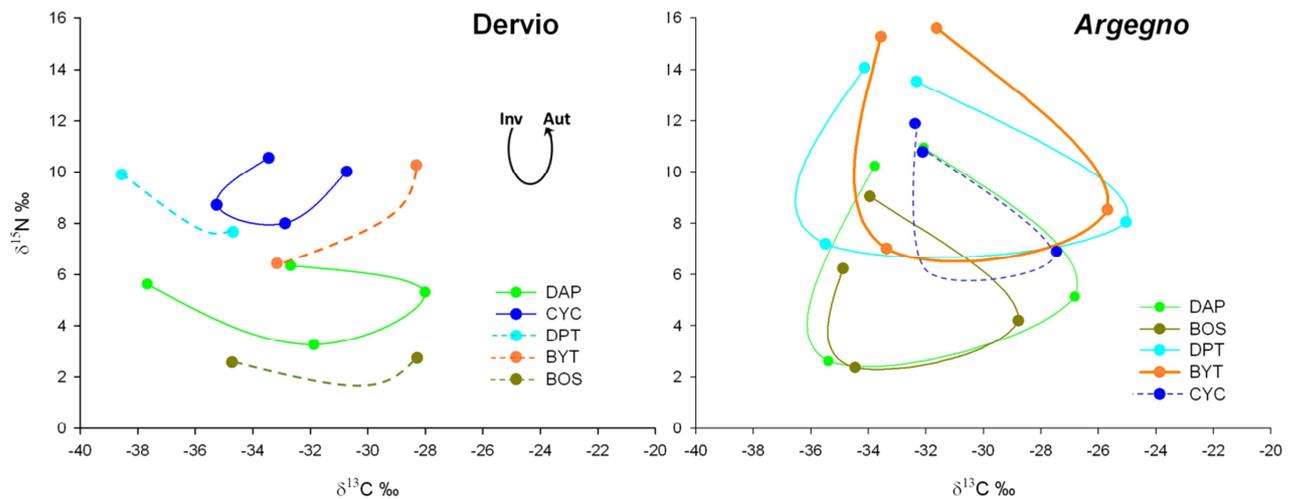


Figura 29: Confronto delle variazioni stagionali dei segnali isotopici di carbonio ed azoto per la maggior parte dei taxa riscontrati (le linee tratteggiate sono state utilizzate in caso di uno o più segnali isotopici mancanti).

Queste differenze nell'andamento stagionale possono essere dovute alle diverse condizioni ambientali delle due stazioni di campionamento, infatti Dervio è situata nell'alto lago, mentre Argegno ricade nel bacino occidentale, caratterizzato da elevate concentrazioni di fosforo, una profondità media superiore e un'influenza maggiore da parte della città di Como, oltre al fatto che i campioni siano stati raccolti in anni differenti.

6 CONCLUSIONI - SIA

L'analisi degli isotopi stabili applicata alle diverse componenti zooplanctoniche di alcuni laghi subalpini ha permesso di caratterizzare le diverse reti trofiche pelagiche di ciascuno di essi, comprendere e confermare alcuni aspetti generali. La SIA riveste un ruolo particolarmente importante nello studio degli ambienti acquatici, caratterizzati da grande variabilità temporale e spaziale della struttura biologica e fisico-chimica (de Bernardi et al 1988; Bertoni et al., 2004).

La variabilità può essere accompagnata da importanti cambiamenti stagionali delle relative posizioni assunte dalla componente zooplanctonica nella catena alimentare, e nel ruolo dei consumatori primari e secondari nel trasferimento di materia e di energia lungo le vie della rete alimentare. Misurando i segnali isotopici di carbonio ed azoto è stato possibile stimare nicchie trofiche bidimensionali e tracciare la posizione trofica e la dieta di un organismo attraverso la catena trofica.

Infatti, l'analisi degli isotopi stabili ha permesso di distinguere le principali fonti di materia organica (fitoplancton, macroalghe, materia organica alloctona) e, quindi, di individuare il ruolo trofico dei consumatori (Michener e Schell, 1994).

Il segnale isotopico dell'azoto viene utilizzato come strumento per il rilevamento delle variazioni ambientali grazie al contributo della materia organica alloctona (Rau et al., 1981;

Van Dover et al., 1984; Risk et al., 1994; Risk e Erdmann, 2000; Costanzo et al., 2001). Inoltre, il contenuto isotopico di un organismo rappresenta il numero medio di trasferimenti trofici che si verificano tra esso e la specie basale in relazione al livello trofico medio di cui si nutre.

Analizzando la firma isotopica del $\delta^{15}\text{N}$ della componente zooplanctonica e dei pesci durante le diverse stagioni, si sono quantificati per quanto possibile i cambiamenti nel livello trofico (arricchimento $\delta^{15}\text{N}$, E) ed i cambiamenti taxa specifici nelle preferenze alimentari (Phillips e Eldridge, 2006; Grey e Jones, 2001).

I risultati ottenuti dall'analisi isotopica hanno permesso di rintracciare la fonte di nutrimento per i diversi organismi in ambienti differenti e zone differenti dello stesso lago (France, 1995; Cabana e Rasmussen, 1996; Vander Zanden e Rasmussen, 1999).

Nei laghi, il $\delta^{13}\text{C}$ consente la discriminazione tra due principali fonti di energia disponibili, il litorale con la produzione di alghe adese al substrato e detrito caratterizzato da un maggior contenuto dell'isotopo pesante di carbonio (valori meno negativi), e la zona pelagica (acque profonde) con la produzione di fitoplancton caratterizzata da valori di $\delta^{13}\text{C}$ più negativi (France, 1995).

In laghi con differente trofia esiste un'alterazione nella differenza tra il contenuto di carbonio della base alimentare e quello dello zooplancton erbivoro, con una diversa quota derivante da fonti non fitoplanctoniche alla loro dieta (Grey et al., 2000).

L'analisi degli isotopi stabili, esteso ai principali laghi subalpini profondi, che rappresentano diversi gradi di trofia, ha permesso di verificare se e come la linea di base e il ruolo dei diversi taxa zooplanctonici vari a seconda dello stato trofico del lago.

I segnali isotopici di carbonio ed azoto hanno mostrato un gradiente in riferimento ai differenti stati trofici di ciascun bacino considerato. I laghi che presentano un grado di trofia maggiore generalmente presentano valori di arricchimento dell'azoto maggiori, mentre valori inferiori si riscontrano in bacini caratterizzati da oligotrofia. Tale andamento viene seguito da *Daphnia*, rappresentante della linea di base pelagica, che risulta essere più arricchita nell'isotopo pesante dell'azoto nei laghi a trofia elevata, così come dagli altri taxa zooplanctonici.

I segnali isotopici del carbonio riflettono invece il differente contenuto di carbonio della base alimentare e dello zooplancton erbivoro, permettendo di distinguere il contributo di fonti alimentari differenti alla loro dieta.

Ha consentito anche di valutare il livello di vicarianza funzionale di diversi taxa (Moss et al., 2009).

In generale, per la maggior parte dei taxa, con il progredire della stagione e l'insorgenza di stratificazione termica, vi è un aumento generale dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ e una diminuzione di $\delta^{15}\text{N}$.

La variabilità può essere accompagnata da importanti cambiamenti stagionali delle posizioni relative dei taxa zooplanctonici nella catena alimentare, e nel ruolo dei consumatori primari e secondari nel trasferimento di materia e di energia lungo le reti trofiche, ma, soprattutto, le firme isotopiche dei produttori primari sono caratterizzati dalle fluttuazioni temporali dipendenti dalla stagione, dal carbonio inorganico disciolto (DIC), dalla materia organica particolata (POM), dalla produttività delle alghe, dalla composizione in specie, dai processi metabolici (Matthews e Madzumder, 2005; Vuorio et al., 2006; Gu et al., 2006), dalla temperatura e dal riutilizzo dei nutrienti inorganici (Perga e Gerdeaux, 2006).

Attraverso l'analisi degli isotopi stabili è stato possibile caratterizzare le catene trofiche pelagiche per cinque piccoli laghi subalpini per la stagione primaverile ed estiva.

L'analisi delle reti trofiche dei laghi di piccole dimensioni ha permesso di individuare aspetti generali che solitamente vengono osservati in laghi di grandi dimensioni. In questi laghi, è risultato che i segnali isotopici di carbonio ed azoto cambiano stagionalmente, con un arricchimento maggiore per l'azoto e valori meno arricchiti per il carbonio durante l'inverno, mentre in estate l'arricchimento di azoto ed i valori di carbonio diminuiscono. Tuttavia, questo andamento stagionale non si rispecchia in tutti i laghi. Infatti, nei laghi poco profondi gli scambi tra la zona litorale e quella pelagica sembrano prevalere.

La presente indagine ha permesso inoltre di confermare come i segnali isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dei consumatori primari diminuiscano ed aumentino rispettivamente dal litorale alla zona pelagica, permettendo così di tracciare l'origine delle fonti di carbonio ed azoto che utilizzano e che il segnale isotopico della linea di base (*Daphnia*) è specifico per ogni lago e spesso *Daphnia* e *Diaphanosoma* sono vicarianti nelle due stagioni (come ad esempio nel Lago Moro e nel Lago di Mergozzo).

In alcuni casi, come si è verificato per il Lago d'Endine in estate, *Daphnia* e *Bosmina* occupano la stessa nicchia trofica, andando incontro ad una probabile competizione alimentare.

Due grandi laghi profondi subalpini a confronto: Lago di Como vs Lago Maggiore

Per l'anno di campionamento 2013/febbraio 2014 è possibile confrontare i dati fin qui presentati per la stazione di Argegno del Lago di Como con i risultati provenienti dal programma di monitoraggio *Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore* realizzate dal CNR-ISE per conto della Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Rapporto CIP AIS - Aspetti limnologici 2014).

Come per il Lago di Como, il Lago Maggiore presenta una dinamica stagionale con una tendenza verso valori meno impoveriti nell'isotopo più pesante del carbonio con il progredire del riscaldamento delle acque dall'inverno ai mesi estivi, ed un graduale ritorno alle condizioni invernali a partire dai mesi autunnali (figura 30), mentre i valori assunti per

l'isotopo dell'azoto mostrano un arricchimento nei mesi invernali rispetto a quelli primaverili ed estivi.

La variabilità dei segnali del $\delta^{13}\text{C}$ e del $\delta^{15}\text{N}$ è simile nei due laghi, con valori del $\delta^{13}\text{C}$ compresi tra $-36,98\text{‰}$ e $-26,26\text{‰}$ per la stazione di Ghiffa e $-35,5\text{‰}$ e $24,45\text{‰}$ per la stazione di Argegno, mentre i valori del $\delta^{15}\text{N}$ sono compresi tra $1,58\text{‰}$ e 16‰ a Ghiffa e tra $2,36\text{‰}$ e $15,6\text{‰}$ ad Argegno.

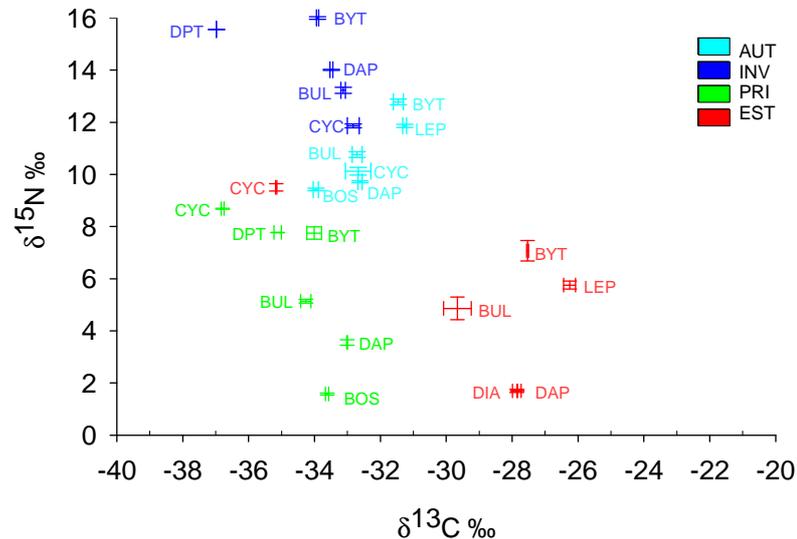


Figura 30: Variazioni stagionali per i segnali isotopici di carbonio ed azoto dei taxa zooplanctonici per la stazione di campionamento di Ghiffa del Lago Maggiore (CIP AIS, 2014).

Per il Lago Maggiore, *Daphnia*, rappresentante del segnale di base, per l'isotopo del carbonio assume valori meno negativi in estate ($-27,86\text{‰} \pm 0,13 \text{ ES}$) e più negativi in inverno ($-33,49\text{‰} \pm 0,04 \text{ ES}$) con valori intermedi nelle altre due stagioni (figura 31).

Per l'isotopo pesante dell'azoto, i valori massimi di arricchimento vengono raggiunti in autunno ed inverno, mentre il valore minimo si registra in estate. L'intervallo di variazione è molto pronunciato, paragonato anche ai valori riscontrati per il Lago di Como (variazioni pari a 7,3 per Argegno e 3,1 per Dervio), con i segnali isotopici compresi tra $14,01 (\pm 0,01\text{‰} \text{ ES})$ del periodo invernale e $1,97\text{‰} (\pm 0,06 \text{ ES})$ di quello estivo.

Tuttavia, alcuni organismi zooplanctonici, quali i cladoceri predatori, ricalcano le variazioni stagionali di *Daphnia* (figura 31), come già rilevato per il Lago di Como.

Diverso è l'andamento dei ciclopidi, i quali sembrano attuare una diversa strategia alimentare rispetto alla linea di base pelagica. Tali variazioni però devono tener conto anche del fatto che con il termine ciclopidi vengono raggruppate più specie, quindi il segnale isotopico di tali campioni è un valore mediato dei segnali di ciascuna specie ed è in funzione della presenza e relativa densità di ciascuna di esse. Tale situazione non è stata riscontrata per i campioni

del Lago di Como, dove i segnali seguono l'andamento della linea di base, e le specie presenti sono inferiori rispetto a quelle del Lago Maggiore.

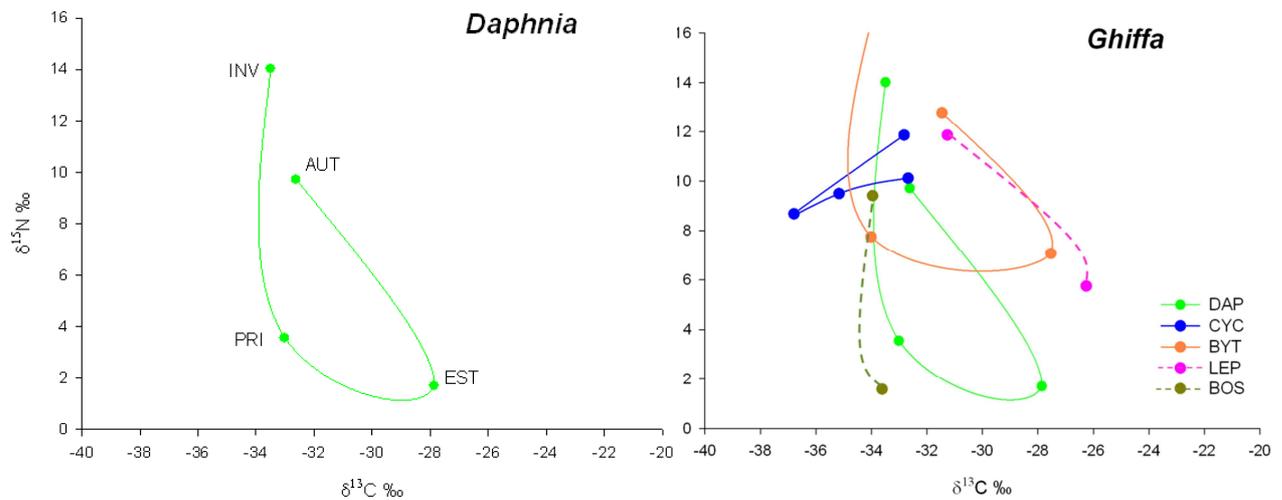


Figura 31: Grafico trofochimico con andamento stagionale dei segnali isotopici di carbonio ed azoto di *Daphnia* (a sinistra) e confronto con gli altri taxa (a destra) per la stazione di Ghiffa (CIPAIS, 2014).

Confrontando nel dettaglio i segnali isotopici stagionali dei singoli taxa per i due grandi laghi profondi, possiamo osservare le seguenti differenze: in primavera, i segnali isotopici del carbonio di *Daphnia*, *Eubosmina* e *Bythotrephes* di Ghiffa (Lago Maggiore) si attestano intorno a -33,5‰ c.a. mentre i ciclopidi ed i diatromidi assumono valori più negativi. Diverso è il comportamento per il Lago di Como, dove *Bythotrephes* e *Leptodora* si attestano intorno a valori del $\delta^{13}\text{C}$ di circa -33‰ mentre *Daphnia*, *Eubosmina* ed i diatromidi assumono valori più negativi (c.a. -35‰).

Per quanto riguarda l'isotopo pesante dell'azoto, *Eubosmina* a Ghiffa risulta meno arricchita, con un valore inferiore rispetto a quello di *Daphnia*, seguita a sua volta dai diatromidi e *Bythotrephes*, allo stesso livello, e per finire i ciclopidi. Ad Argegno in primavera *Eubosmina* assume lo stesso valore di *Daphnia*, però in tutte le altre stagioni assume sempre valori di arricchimento inferiori.

Il minore arricchimento di *Eubosmina* è spesso attribuito alla sua capacità di utilizzare cianobatteri filamentosi o comunque materiale sestonico meno arricchito in $\delta^{15}\text{N}$ (France e Schlaepfer, 2000).

In estate, i segnali isotopici dei taxa si spostano verso valori meno negativi per il carbonio mentre restano stabili i segnali dell'azoto per la stazione di Ghiffa. Ad Argegno si assiste anche ad un incremento dei segnali isotopici dell'azoto da parte dei cladoceri filtratori. Per entrambe le stazioni, è evidente la vicinanza tra *Daphnia* e *Diaphanosoma*, ovvero la capacità di taxa differenti di ricoprire ruoli analoghi nell'ecosistema. A Ghiffa, i ciclopidi si discostano dagli altri taxa, assumendo valori nettamente più negativi per il carbonio e con un

arricchimento maggiore per l'azoto. Seguono *Bythotrephes* e *Leptodora* e più in basso ancora troviamo i cladoceri filtratori.

In entrambe le stazioni, in autunno i segnali isotopici dei ciclopidi sono solidali a *Daphnia*, mentre *Eubosmina* assume un valore più negativo per il carbonio. *Bythotrephes* e *Leptodora* di Ghiffa hanno valori meno negativi mentre ad Argegno sono solidali a *Daphnia*. Per quanto riguarda l'azoto, il range di variazione è più ridotto a Ghiffa, con i cladoceri predatori al vertice, seguiti dai ciclopidi insieme a *Daphnia* ed *Eubosmina*. I segnali isotopici autunnali dell'azoto registrati per la stazione di Argegno sono molto simili a quelli riportati per la stagione invernale, mentre per il Lago Maggiore è presente una maggiore differenziazione.

In inverno risulta subito evidente l'arricchimento isotopico dell'azoto rispetto alla primavera ed all'estate ed i segnali isotopici del carbonio sono più solidali tra loro. Fanno eccezione i diaptomidi a Ghiffa con valori decisamente più negativi per il carbonio rispetto a *Daphnia*, occupando probabilmente profondità maggiori.

Confrontando invece i segnali isotopici delle due specie ittiche considerate per la stazione di Argegno con i segnali isotopici riportati da Visconti et al. (2013) per Ghiffa, possiamo osservare come nel corso dell'anno le prede utilizzate da questi ultimi varino in termini spaziali, tra la zona pelagica e quella litorale. Infatti, queste specie tendono ad essere prettamente zooplanctivore durante le stagioni di massima crescita e a spostarsi nella zona litorale quando la produttività del lago diminuisce e/o per la riproduzione (Berg e Grimaldi, 1965; Bettinetti et al., 2010; Volta et al., 2009; Visconti e Manca, 2011; Poma et al., 2014). Ad Argegno, i segnali isotopici di agone e coregone sono solidali con i segnali dei taxa pelagici in estate, in particolare predano attivamente *Bythotrephes*.

In autunno iniziano ad allontanarsi dai segnali prettamente pelagici, seppur non è esclusa una piccola quota di prede zooplanctoniche, mentre in inverno e primavera assumono valori di carbonio più arricchiti nell'isotopo pesante e ciò indica una presumibile dipendenza da fonti litorali.

Anche per il Lago Maggiore viene riportata una dipendenza da fonti pelagiche in tarda primavera ed estate con valori di $\delta^{13}\text{C}$ compresi tra -26‰ e $-29,9\text{‰}$ (Visconti et al., 2013), mentre in tardo autunno ed inverno i segnali isotopici riflettono quelli del litorale ($\delta^{13}\text{C}$ pari a c.a. -24‰).

PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS OF THE PELAGIC FOOD WEB OF LAKE COMO AND LAKE MAGGIORE

In the pelagic area of lacustrine ecosystems, zooplankton have a crucial role in transferring contaminants since they accumulate contaminants both from water and from food, and may do so much more rapidly than their predators, because of their short life span, low ability of detoxification and high capacity of assimilation (Borga et al., 2005; Bettinetti et al., 2012). Specifically, zooplankton are expected to respond much faster than their predators to fluctuations of pollutants occurring in the water column and this component may be used as an early warning tool of a possible contamination because organisms which bioaccumulate substances can be exploited as monitors of environmental contamination (Mackay and Fraser, 2000).

Through the analysis of stable isotopes I identified the trophic position of those organisms which contribute most, directly or indirectly, to the diet of zooplanktivorous fish species, which were characterized for some POPs.

Then, I focused my attention on contaminants and measure their average concentration at the different steps of the food web of Lake Como and Lake Maggiore. The attention was posed on some "old generation POPs", in particular on DDT and PCBs. For all compounds the analytical limit of detection was 0.1 ng g^{-1} of dry weight.

We provide results from Lake Como and Lake Maggiore, in which distinction between zooplankton primary and secondary consumers were obtained by applying carbon and nitrogen stable isotopes analysis, and we compared them.

The contamination are referred to the lipid content to standardize the results because it is still a function of the taxonomic composition of the sample.

The finally aim is to model the distribution of DDT residues in different trophic levels of the biota (Bettinetti et al., 2006) and to examine the seasonal trend of OC concentrations in zooplankton in order to evaluate its influence on the contamination of their potentially predators.

7 MICROINQUINANTI ORGANICI PERSISTENTI NELLO ZOOPLANCTON E NEI PESCI DEL LAGO DI COMO 2013

7.1 Variazioni stagionali nella densità di popolazione zooplanctonica del Lago di Como

Dal conteggio dei singoli taxa zooplanctonici della stazione di Argegno si è ottenuto il valore degli individui totali campionati e la composizione della popolazione al momento del campionamento (figura 32). Sono stati identificati i grandi predatori (*Bythotrephes longimanus* e *Leptodora kindtii*) ed i cladoceri di piccole dimensioni appartenenti ai generi *Daphnia*, *Bosmina* e *Diaphanosoma* (*Daphnia hyalina-galeata*, *Eubosmina coregoni*, *Diaphanosoma brachyurum*), ed i copepodi, distinguendoli tra diaptomidi e ciclopidi in fase adulta e in stadio giovanile (copepoditi).

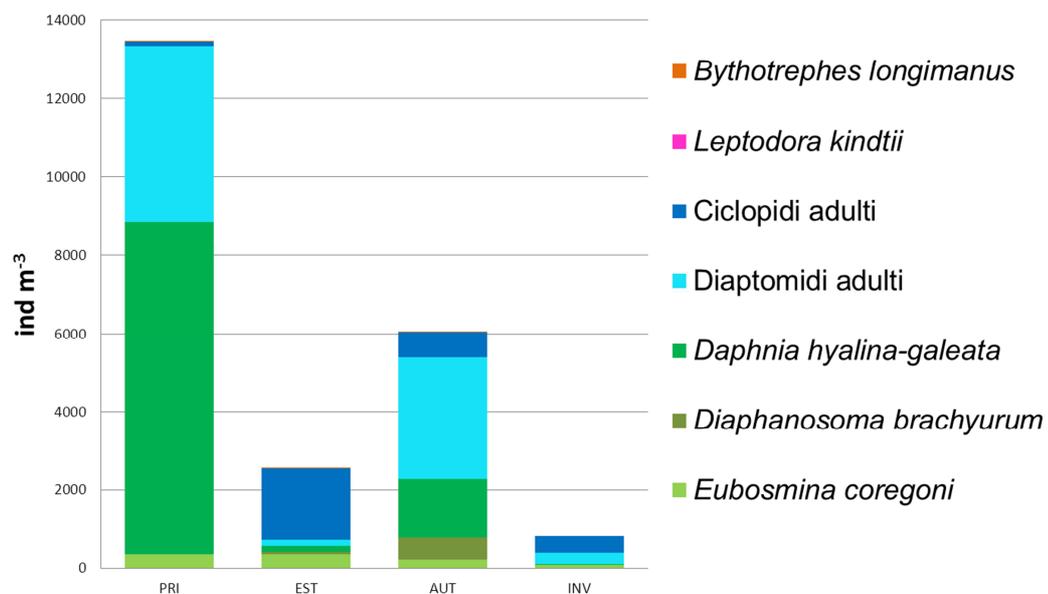


Figura 32: Composizione della popolazione zooplanctonica nelle quattro stagioni di campionamento.

La successione stagionale dei popolamenti zooplanctonici inizia in primavera con alte densità di *Daphnia hyalina – galeata* (8500 ind m⁻³) ed una buona presenza di diaptomidi. Sono presenti anche i grandi cladoceri predatori, seppur con densità molto basse. L'incremento primaverile dei cladoceri è un fenomeno abbastanza tipico dei laghi temperati (Salmaso, 2002; Garibaldi et al., 2003).

In estate il cladocero dominante è *Eubosmina coregoni* mentre tra i copepodi le densità più elevate sono dei ciclopidi (*Cyclops abyssorum* e *Mesocyclops leuckarti* – non distinte a livello di specie).

In autunno prevalgono i copepodi, i diaptomidi (*Eudiaptomus padanus*) in particolare. Tra i cladoceri prevale *Daphnia hyalina* – *galeata* con 1507 ind m⁻³, accompagnata da *Diaphanosoma brachyurum* con 554 ind m⁻³.

In inverno si assiste al declino dei popolamenti zooplanctonici con i valori minimi di densità per i cladoceri ed una netta prevalenza di copepodi.

Esaminando nel dettaglio le tre componenti dimensionali campionate (frazione $\geq 200 \mu\text{m}$, ≥ 450 e $\geq 850 \mu\text{m}$ – figura 33), l'evoluzione stagionale può essere riassunta come segue (figura 33):

in primavera si assiste ad un incremento della biomassa totale in seguito al rapido incremento di *Daphnia*, particolarmente abbondante in tutte e tre le frazioni dimensionali. Nelle prime due frazioni sono presenti anche i diaptomidi in alte percentuali, mentre sono praticamente assenti i grandi cladoceri predatori.

Durante l'estate e l'autunno si assiste alla maggior variabilità nella composizione della popolazione con la compresenza di tutti i taxa. I campioni estivi sono ben differenziati tra loro con i grandi predatori dominanti nella frazione di dimensioni maggiori.

La frazione intermedia, è dominata dai consumatori primari con *Daphnia*, *Eubosmina* e *Diaphanosoma*. Sono presenti anche i grandi predatori ed i ciclopidi ed i diaptomidi sono presenti in percentuale minore. Questi ultimi due taxa, sono prevalenti nella frazione di dimensioni inferiori, con una maggiore prevalenza di ciclopidi adulti, accompagnati da *Eubosmina*.

In autunno, si riducono notevolmente i cladoceri predatori, presenti esclusivamente nella frazione di maggiori dimensioni, mentre prevalgono i consumatori primari con una buona presenza di *Diaphanosoma*, soprattutto nella frazione intermedia. I diaptomidi sono ben rappresentati nella frazione inferiore e in parte nella frazione intermedia.

La biomassa della comunità è piuttosto bassa in inverno; nel complesso i ciclopidi sono dominanti, seguiti dai diaptomidi. *Daphnia*, tuttavia, è dominante nella frazione raccolta con la rete a maglie più larghe, mentre nelle frazioni minori è sostituita da *Eubosmina*.

L'analisi del popolamento zooplanctonico, oltre ad individuare l'andamento dei diversi taxa nel corso dell'anno, permette di capire la dinamica e le relazioni all'interno di ogni taxa e determinare così le specie più rappresentative per ogni campione.

In generale nel corso dell'anno, è presente una netta predominanza di consumatori primari (*Daphnia* in particolar modo). Fanno eccezione i campioni invernale ed estivo presi con la rete 200 μm , quello invernale della frazione $\geq 450 \mu\text{m}$, dove predominano i ciclopidi, ed il campione estivo raccolto con la rete $\geq 850 \mu\text{m}$, dove invece è costituito quasi esclusivamente dai consumatori secondari *Leptodora* e *Bythotrephes* (figura 33).

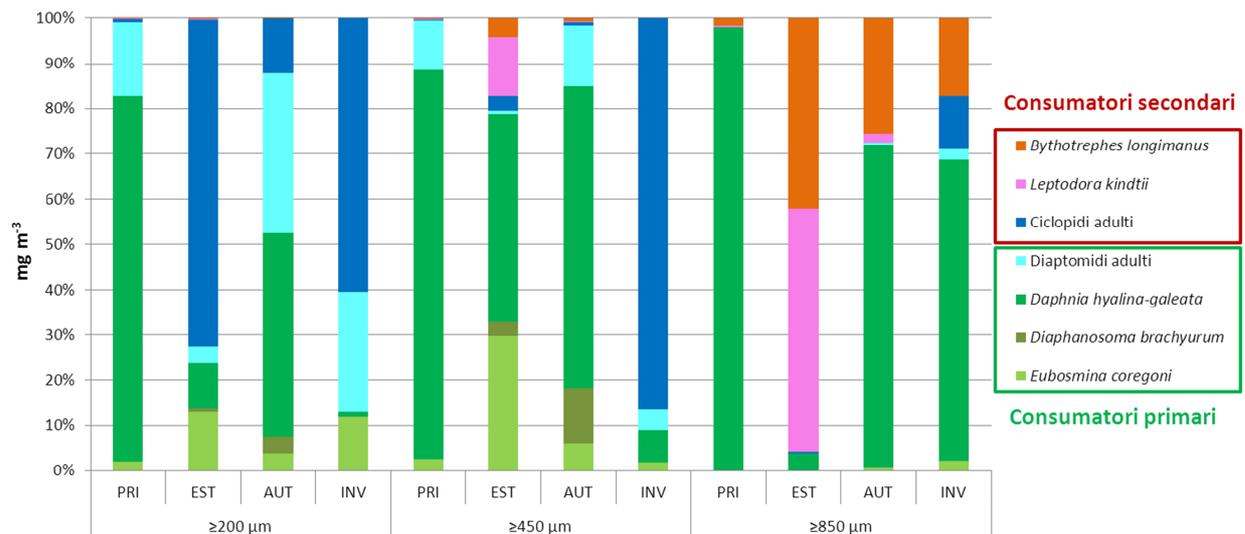


Figura 33: Composizione percentuale della biomassa totale della comunità zooplanctonica per ciascun campione, suddivisi su base dimensionale per la stazione di Argegno.

7.2 Contaminanti nello zooplancton del Lago di Como

L'attenzione è stata posta su alcuni POPs di "vecchia generazione", in particolare DDT e PCB che nonostante il divieto d'uso da lungo tempo, sono ancora presenti nell'ambiente. Nella tabella 14 sono riportate le percentuali lipidiche di ciascun campione zooplanctonico distinto dimensionalmente nelle diverse stagioni.

Tabella 14: contenuto lipidico (%) dei campioni zooplanctonici riferiti al peso secco.

	Lipidi %		
	≥200 μm	≥450 μm	≥850 μm
Primavera	14,8	13,8	12,3
Estate	6,0	7,6	12,9
Autunno	13,0	9,3	16,7
Inverno	6,7	12,1	-

Sembra evidente che il contenuto lipidico dei diversi campioni vari in funzione della composizione tassonomica di ciascuno di essi e molto probabilmente in relazione a ciò che l'animale mangia; è noto che esistano differenze nel contenuto lipidico tra Cladoceri e Copepodi, questi ultimi ad esempio hanno una concentrazione superiore rispetto ad altri taxa zooplanctonici (Grey e Jones, 1999; Kling et al, 1992; Matthews e Madzumder, 2005).

I valori più alti si registrano in primavera in corrispondenza del picco di *Daphnia*, mentre in estate si riscontrano i valori più bassi nel campione che comprende anche gli organismi di dimensioni inferiori.

La scelta delle tre frazioni dimensionali si è basata sul fatto di operare una separazione “meccanica” su base dimensionale delle diverse componenti zooplanctoniche con l’intento di ottenere gruppi omogenei di organismi. Operare una separazione a vista come per la SIA richiederebbe molto tempo a causa dell’elevata quantità di materiale da smistare, in funzione anche della composizione della comunità al momento del campionamento.

Lo scopo di tale scelta era volto a garantire una separazione tra consumatori primari e secondari; tuttavia ciò non sempre avviene, di conseguenza risulta di fondamentale importanza conoscere la composizione della popolazione. Per alcuni periodi dell’anno, però, alcuni campioni si possono ritenere monospecifici, come ad esempio in primavera quando è presente prevalentemente *Daphnia*. I risultati relativi alla determinazione del DDT ed i suoi metaboliti dei campioni zooplanctonici suddivisi nelle tre frazioni dimensionali, sono mostrati in figura 34. Da una analisi preliminare di tre sottocampioni di zooplancton è emerso che la variabilità dei contaminanti è pari a 6,4% per pp'DDE, 7,3% per pp'DDD e del 5,4% per pp'DDT, mentre per lipidi è pari a 4,7% (Bettinetti et al., 2010).

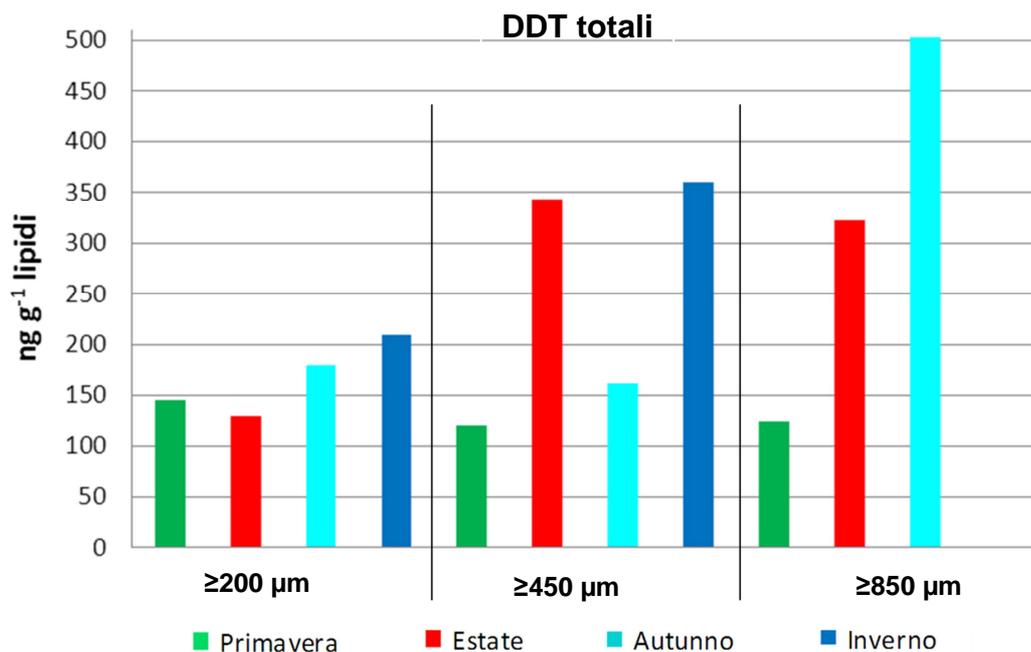


Figura 34: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como, suddivisa nelle tre frazioni dimensionali della componente zooplanctonica nel corso dell’anno.

Per la frazione $\geq 200 \mu\text{m}$ il livello di contaminazione dello zooplancton tende ad aumentare nei mesi autunno-invernali, seppur con variazioni ridotte rispetto ai mesi primaverili ed estivi. Il valore minore si registra in estate (129,5 ng/g lipidi) mentre il valore massimo in inverno (209,9 ng/g lipidi). L’incremento invernale può essere legato all’incremento in termini di biomassa dei ciclopidi, ovvero dei consumatori secondari (figura 35). Anche in estate si assiste ad un incremento notevole dei ciclopidi, tuttavia non è così per la contaminazione da

DDT. Questa contraddizione può essere legata alla plasticità alimentare dei ciclopidi, in quanto gli stadi giovanili possono comportarsi da consumatori primari (Hopp e Maier, 2005), di conseguenza non si assiste all'incremento atteso nel livello di contaminazione della componente zooplanctonica.

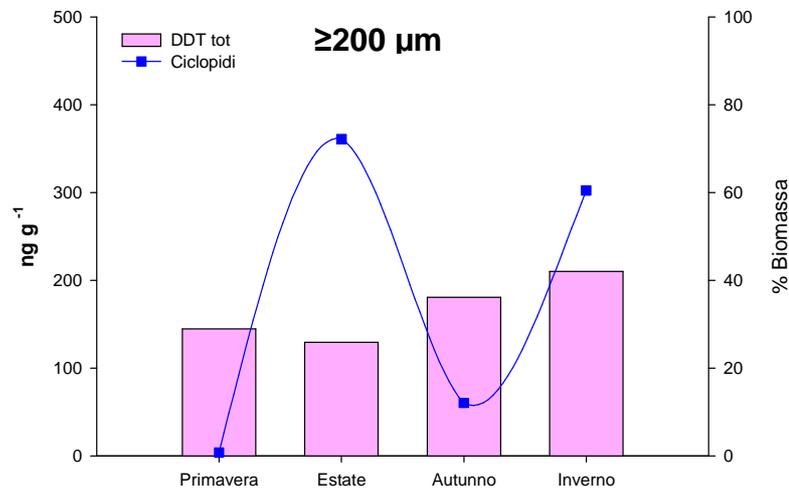
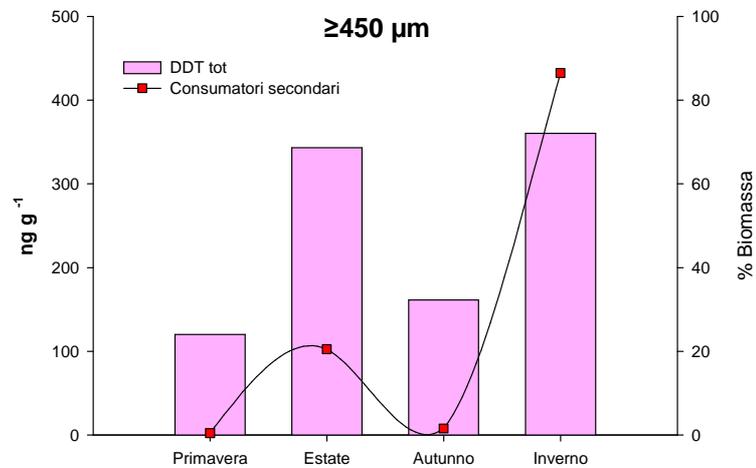


Figura 35: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como per la frazione dimensionale $\geq 200 \mu\text{m}$ e biomassa percentuale dei ciclopidi.

Nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ si registrano due picchi nei livelli di contaminazione in estate ed in inverno, con valori circa doppi rispetto alle stagioni intermedie. Come si può osservare dal grafico (figura 36a), se confrontiamo i dati relativi alla contaminazione con le percentuali di biomassa dei consumatori secondari rispetto al totale della popolazione, è possibile individuare una correlazione (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p=0,047$) tra l'aumento dei predatori e l'aumento di tali concentrazioni.

In particolare, l'incremento estivo è legato principalmente all'aumento dei cladoceri predatori, invece quello invernale alla presenza dei ciclopidi (figura 36b).

a)



b)

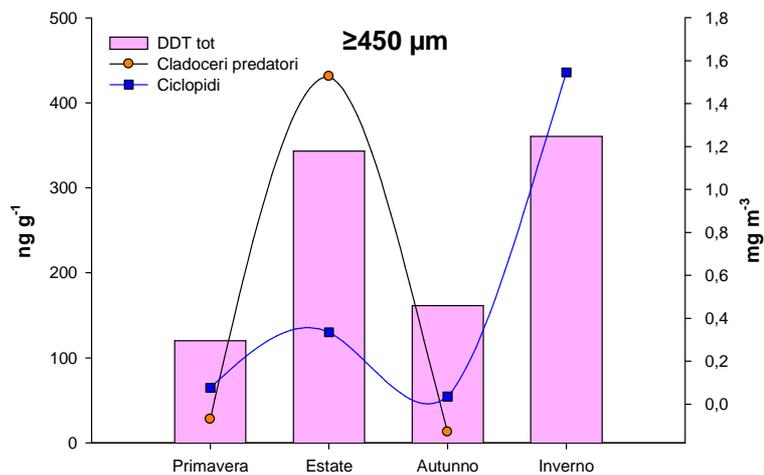


Figura 36: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como per la frazione dimensionale $\geq 450 \mu\text{m}$ e a) biomassa percentuale dei consumatori secondari; b) biomassa di cladoceri predatori e di ciclopidi.

Per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ si assiste ad un incremento graduale a partire dalla primavera, con un valore pari a 124,7 ng/g, fino all'autunno, con il valore massimo pari a 502,9 ng/g rispetto al contenuto lipidico. Non è stato possibile esaminare il campione invernale a causa dell'insufficienza del materiale raccolto durante il campionamento. Come si può osservare dalla figura 37, il livello di contaminazione cresce all'aumentare del segnale isotopico dell'azoto dell'intera popolazione zooplanctonica (bulk - Broman et al., 1999; Kidd et al., 1995).

Inoltre, le concentrazioni più alte si registrano in autunno, quando il campione è composto per buona parte (c.a. 30% della biomassa totale) dai grandi cladoceri predatori. Da sottolineare però che nonostante in estate ci siano solo quasi esclusivamente i predatori non

si assiste ad un analogo incremento probabilmente per la diversa disponibilità del contaminante in acqua.

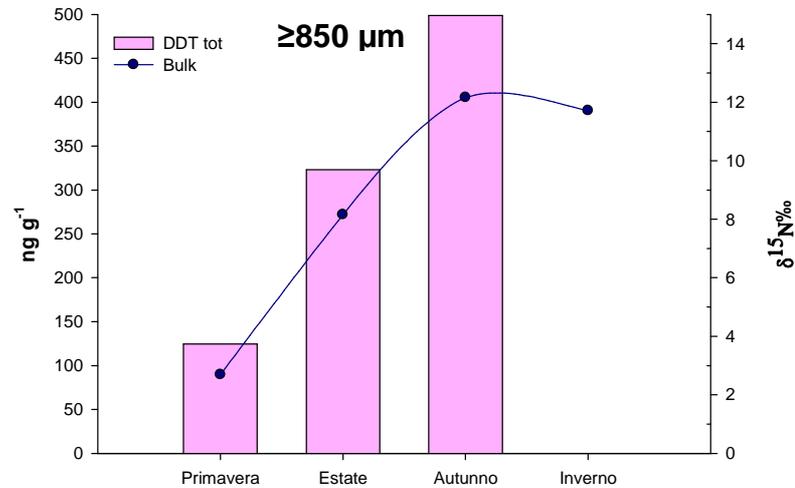


Figura 37: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como per la frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$ e segnali isotopici dell'azoto del bulk.

Il pp'DDE, metabolita del pp'DDT, è il principale inquinante accumulato nello zooplancton, seguito dall'op'DDD (figura 38).

L'op'DDE è sempre stato al di sotto del limite di rilevabilità.

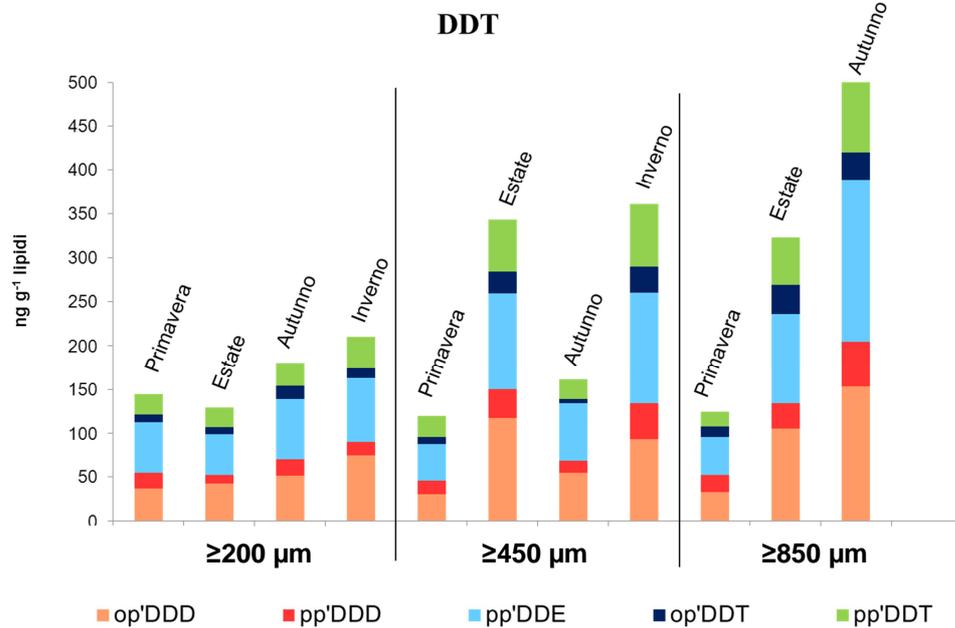


Figura 38: pp'DDT, suoi metaboliti e isomeri nelle tre frazioni zooplanctoniche del Lago di Como nel corso dell'anno.

Anche per i PCB, l'andamento generale dei livelli di contaminazione è paragonabile a quello da DDT, tuttavia risultano essere diverse le scale di riferimento, in quanto i valori sono compresi tra 175 ng/g e 7073,3 ng/g (figura 39), quindi ben superiori ai DDT in termini di concentrazione.

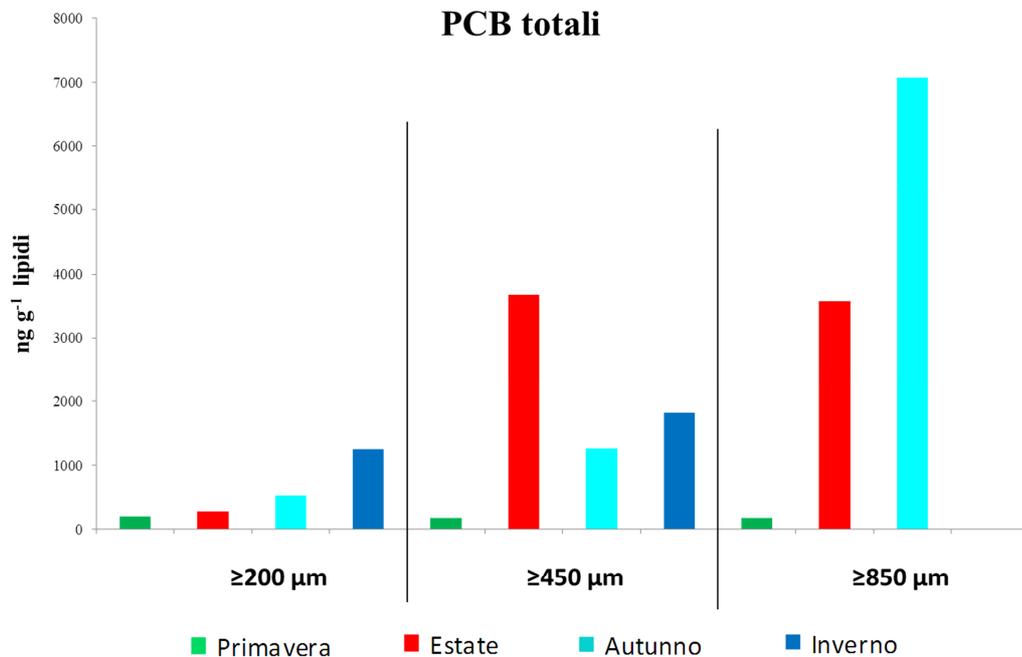


Figura 39: Contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago di Como, suddivisa nelle tre frazioni dimensionali della componente zooplanctonica nel corso dell'anno.

Nel caso dei PCB, il valore massimo di contaminazione nello zooplancton si registra in settembre nella frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ mentre i valori più bassi si riscontrano in primavera, con concentrazioni simili nelle tre frazioni dimensionali, con un leggero prevalere della frazione $200 \mu\text{m}$. La composizione tassonomica delle tre frazioni è principalmente di cladoceri filtratori, tuttavia nella frazione inferiore risultano presenti anche i diattomidi con una buona percentuale (oltre il 30%), i quali possono contribuire ad innalzare – come atteso –, seppur di poco, la contaminazione del campione in esame.

Nella frazione $\geq 200 \mu\text{m}$ è evidente un incremento costante nel livello di contaminazione dalla primavera all'inverno (figura 40). Il livello di contaminazione accresce all'aumentare del segnale isotopico dell'azoto dell'intera popolazione zooplanctonica (Broman et al., 1999; Kidd et al., 1995), ad eccezione dell'inverno dove la contaminazione aumenta ma il $\delta^{15}\text{N}$ è meno arricchito.

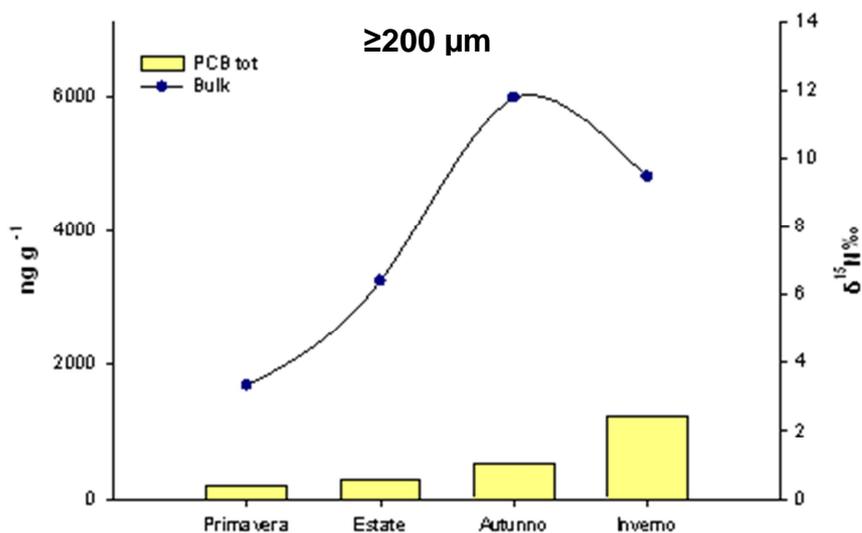


Figura 40: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como per la frazione dimensionale $\geq 200 \mu\text{m}$ e $\delta^{15}\text{N}$ della popolazione zooplanctonica.

Nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ si registra un valore di contaminazione minimo in primavera, massimo in estate e una situazione intermedia in autunno ed inverno. Anche in questo caso, l'andamento della contaminazione segue l'andamento delle densità dei consumatori secondari (figura 41a). In particolare in estate sono prevalenti i cladoceri predatori, invece in inverno contribuiscono maggiormente i ciclopidi (figura 41b).

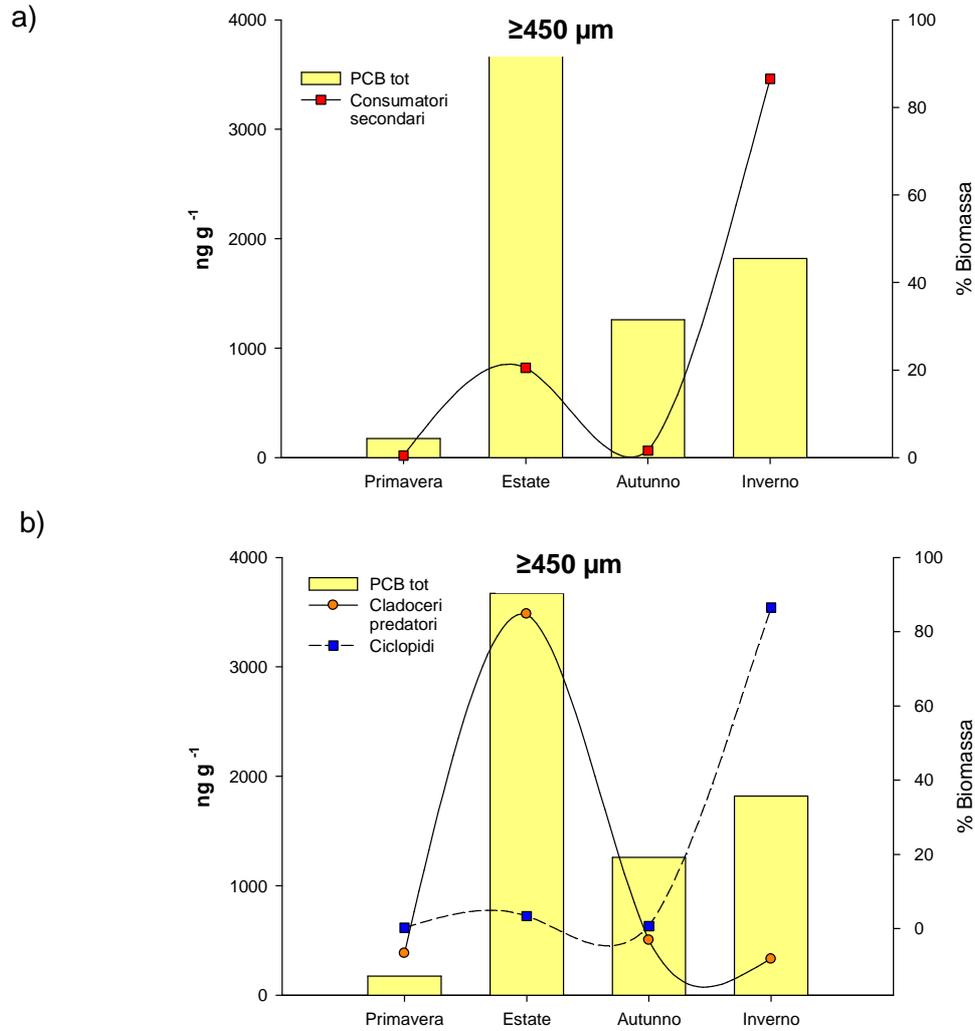


Figura 41: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como per la frazione dimensionale $\geq 450 \mu\text{m}$ e a) biomassa percentuale dei consumatori secondari; b) biomassa di cladoceri predatori e di ciclopidi.

Per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ il livello di contaminazione accresce all'aumentare del segnale isotopico dell'azoto dell'intera popolazione zooplanctonica (bulk – figura 42).

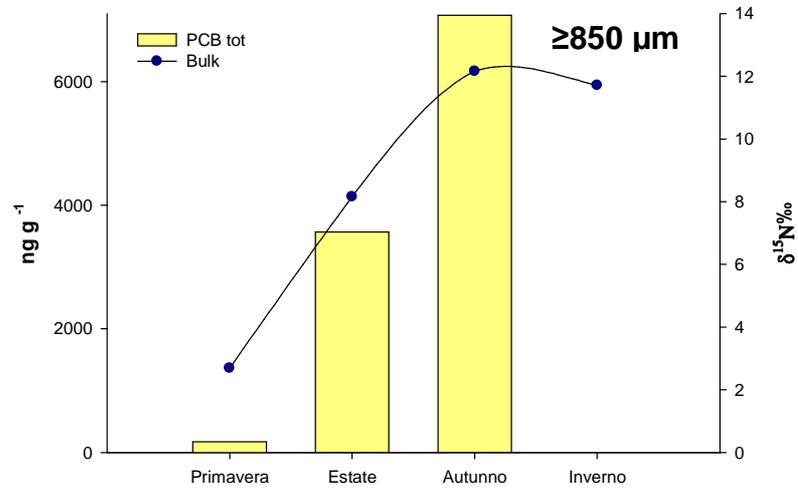


Figura 42: Contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago di Como per la frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$ e segnali isotopici dell'azoto del bulk.

Il profilo dei diversi congeneri considerati evidenzia la prevalenza dei PCB 138 e 180 in tutti i campioni. Altri PCB ben rappresentati risultano essere i PCB 153, 118 + 149 e 170.

Il trend di contaminazione è simile durante l'anno, tuttavia è rilevante il forte incremento che si verifica prevalentemente in estate ed autunno.

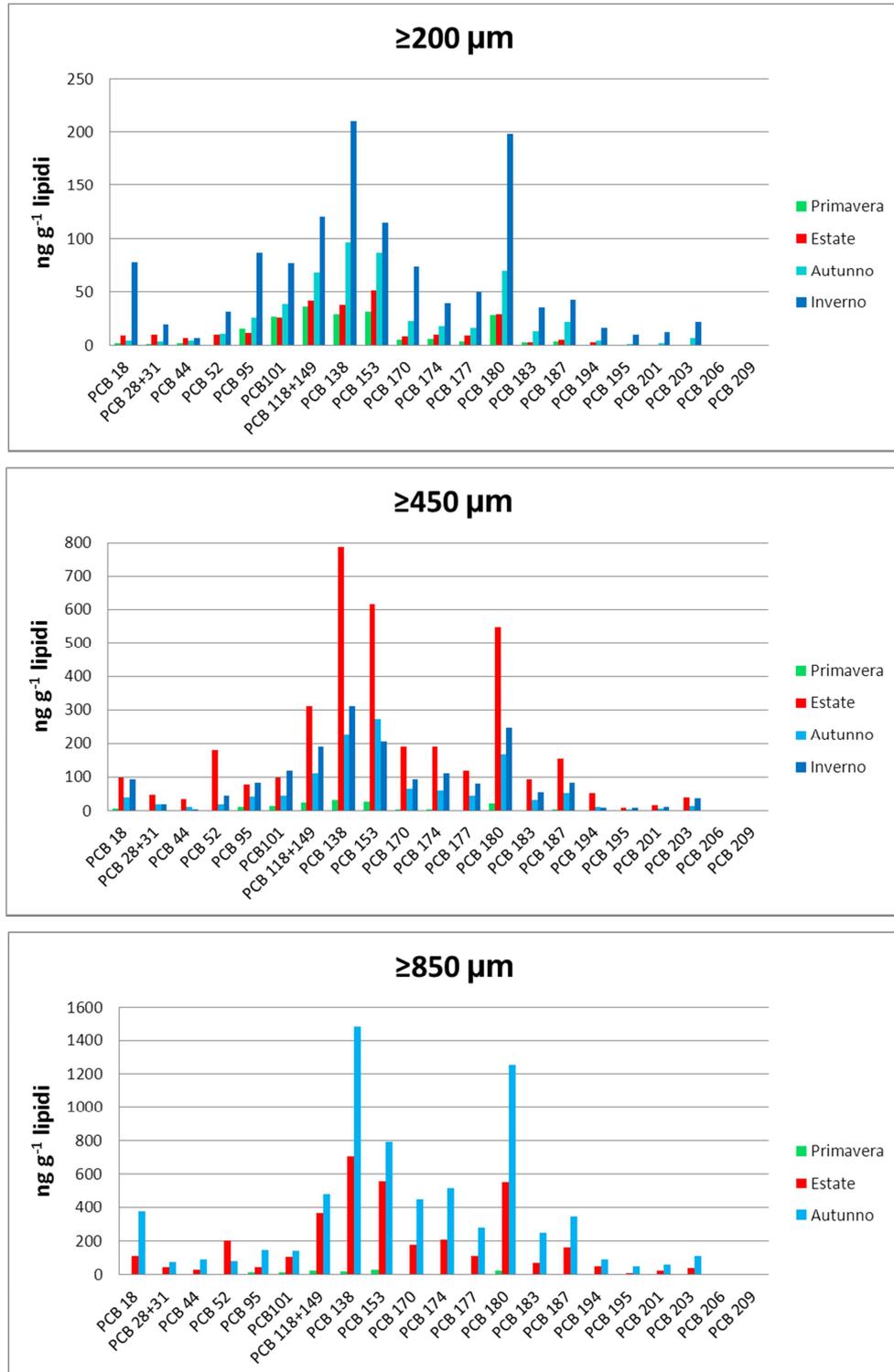


Figure 43: Singoli congeneri di PCB nello zooplancton del Lago di Como, suddivisi nelle tre frazioni dimensionali (le scale di riferimento dell'asse y sono differenti nelle tre frazioni).

7.3 Contaminanti nei pesci del Lago di Como

Le percentuali lipidiche delle due specie di pesci campionati nelle diverse stagioni è riportata nella tabella 15.

Tabella 15: contenuto lipidico (%) dei campioni di agone e coregone riferiti al peso secco e al peso fresco.

	Lipidi %			
	Agone		Coregone	
	pf	ps	pf	ps
Primavera	9,8	38,8	1,3	6,5
Estate	8,3	29	3,1	12,8
Autunno	15,5	48,5	2,7	12,1
Inverno	14,6	45,6	1,3	6,1

I coregoni presentano un contenuto lipidico particolarmente basso nel periodo invernale e primaverile mentre i valori più elevati si registrano all'inizio dell'autunno. L'agone come noto risulta essere un pesce particolarmente ricco in lipidi, con un valore minimo registrato in estate mentre i valori più elevati si riscontrano in autunno ed inverno, in accordo con i periodi riproduttivi di ciascuna specie.

L'andamento delle concentrazioni dei contaminanti nelle due specie ittiche segue trend differenti.

Per il coregone i valori massimi si registrano in primavera ed inverno e decrescono in estate ed autunno con valori molto simili, mentre per l'agone i valori massimi si registrano in primavera con un decremento nel procedere delle stagioni fino ai valori minimi dell'inverno.

Le concentrazioni totali di DDT e PCB sono in termini assoluti differenti nelle due specie (figura 44).

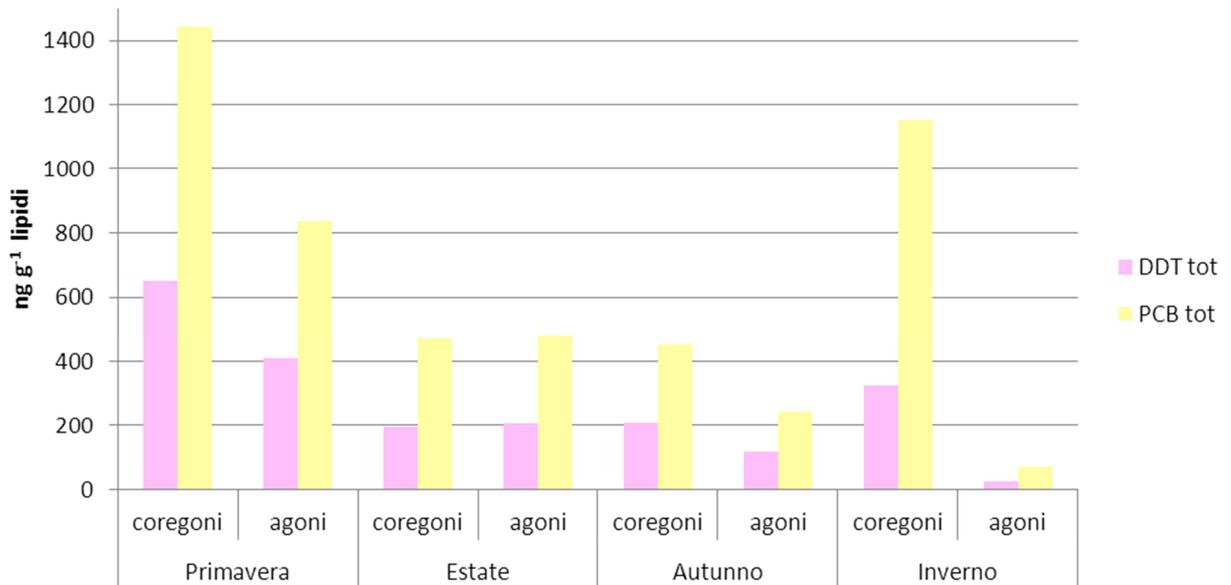


Figura 44: Livelli di contaminazione da DDT e PCB nelle due specie ittiche del Lago di Como.

Le differenze osservate tra le due specie ittiche possono essere attribuite prevalentemente al differente tenore lipidico, maggiore nell'agone rispetto al coregone; un altro fattore che può determinare tali andamenti è rappresentato dalle scelte alimentari dell'animale, in quanto durante il corso dell'anno si assiste a notevoli variazioni. Dai risultati delle analisi degli isotopi stabili, si è potuto vedere come in estate entrambe le specie ittiche considerate utilizzino lo zooplancton per alimentarsi, ma si è anche visto che non dipendono esclusivamente da fonti pelagiche. Infatti in autunno ed inverno i segnali isotopici del carbonio sembrano suggerire un consumo di fonti più strettamente litorali, dal momento che assumono valori meno negativi di $\delta^{13}\text{C}$ rispetto allo zooplancton e presumibilmente simili ai valori assunti dalle componenti del litorale. Tuttavia, tale aspetto è da approfondire ulteriormente, prevedendo un monitoraggio della zona litorale e bentonica, in modo tale da ottenere una visione complessiva dell'ecosistema "lago" e comprendere con più precisione gli spostamenti di tali specie ittiche e di conseguenza approfondire le conoscenze riguardo le abitudini alimentari. I livelli di contaminazione tuttavia sembrano non risentire dell'influenza del periodo riproduttivo (tarda primavera per l'agone, tardo autunno per il coregone). Il fattore di biomagnificazione normalizzato rispetto al livello trofico (BMF_{TL}) è stato calcolato con la seguente formula (Conder et al., 2012):

$$\text{LogBMF}_{\text{TL}} = \frac{\text{Log}_{10} (C_{\text{predatore}} / C_{\text{preda}})}{\text{TL}_{\text{predatore}} / \text{TL}_{\text{preda}}}$$

dove $C_{\text{predatore}}$ e C_{preda} sono i valori di contaminazione normalizzati rispetto al contenuto lipidico nel predatore e nella sua preda rispettivamente, e $TL_{\text{predatore}}$ e TL_{preda} sono i rispettivi livelli trofici, assumendo l'esistenza di uno stato stazionario tra la preda ed il predatore.

Tale fattore è stato calcolato esclusivamente per la stagione estiva dal momento che dalle analisi degli isotopi stabili è risultato che in tale periodo i pesci predano attivamente lo zooplancton. Inoltre, si tenga presente che tale fattore è un rapporto semplificato che non tiene conto di diversi fattori che possono influenzare i livelli di contaminazione dell'organismo considerato.

Il fattore di biomagnificazione calcolato per ciascun microinquinante nelle due specie ittiche è risultato sempre inferiore ad 1, come ad indicare un decremento nelle concentrazioni all'aumentare della posizione trofica (Fisk et al., 2001; Arnot e Gobas, 2006), diversamente da quanto atteso, ovvero un aumento delle concentrazioni lungo la rete trofica. Dal momento che lo zooplancton ha un tasso di assimilazione ed un turnover dei tessuti veloce, verosimilmente lo si può considerare in equilibrio con le concentrazioni di contaminanti presenti nel mezzo acquoso. Di conseguenza, dato che i pesci in estate predano tale componente, ci si aspetta concentrazioni almeno paragonabili a quelle dello zooplancton, nonostante il fatto che il segnale integrato dal tessuto del pesce riflette c.a. i due mesi precedenti (Tieszen et al., 1983). Tuttavia, da studi precedenti, risulta che i pesci non riescano a raggiungere una condizione di equilibrio con il cibo o l'acqua perché eliminano i contaminanti attraverso le branchie molto più velocemente rispetto a ciò che accumulano attraverso il cibo (Hendriks, 1995).

In ogni caso, tale anomalia in parte può essere spiegata in relazione alle abitudini riproduttive/alimentari di tali specie. Infatti, in estate l'agone è in fase riproduttiva e riduce il tasso di alimentazione (Berg e Grimaldi, 1965), di conseguenza anche l'accumulo dei microinquinanti organici risulta essere inferiore all'atteso, tuttavia in autunno ed inverno i livelli di contaminazione risultano essere inferiori, probabilmente a causa dell'utilizzo di risorse alimentari diverse dallo zooplancton.

Il coregone in estate presenta i valori più bassi di contaminazione rispetto alle altre stagioni. Tale fenomeno non sembra essere influenzato dal periodo riproduttivo, in quanto si verifica in inverno. Tuttavia è necessario approfondire le conoscenze riguardo alle scelte alimentari di tale specie ed ai cicli fisiologici per poter trarre delle conclusioni.

La normativa italiana (O.M. 18/7/1990) prevede, per il consumo umano, limiti di edibilità che vengono qui impiegati come indicatori di rischio ambientale. Ad esempio, è previsto che le concentrazioni di DDT non possano superare 100 ng g^{-1} rispetto al peso fresco per i pesci con una percentuale di grassi compresa tra 5 e 20%.

Nello specifico, nessuno dei campioni analizzati di agone e coregone del Lago di Como supera i limiti previsti per il consumo umano.

8 MICROINQUINANTI ORGANICI PERSISTENTI NELLO ZOOPLANCTON DEL LAGO MAGGIORE 2013

8.1 Variazioni stagionali nella densità di popolazione zooplanctonica del Lago Maggiore

Dal conteggio dei singoli taxa zooplanctonici della stazione di Ghiffa si è ricavata la densità totale degli organismi campionati e la composizione della comunità al momento del campionamento; tali dati sono riportati in figura 45 (CIPAIS, 2014). Sono stati identificati i grandi predatori (*Bythotrephes longimanus* e *Leptodora kindtii*) ed i cladoceri di piccole dimensioni appartenenti ai generi *Daphnia*, *Bosmina* e *Diaphanosoma* (*Daphnia hyalina-galeata*, *Bosmina longirostris*, *Eubosmina longispina*, *Diaphanosoma brachyurum*), ed i copepodi, con la sola distinzione tra diaptomidi e ciclopidi.

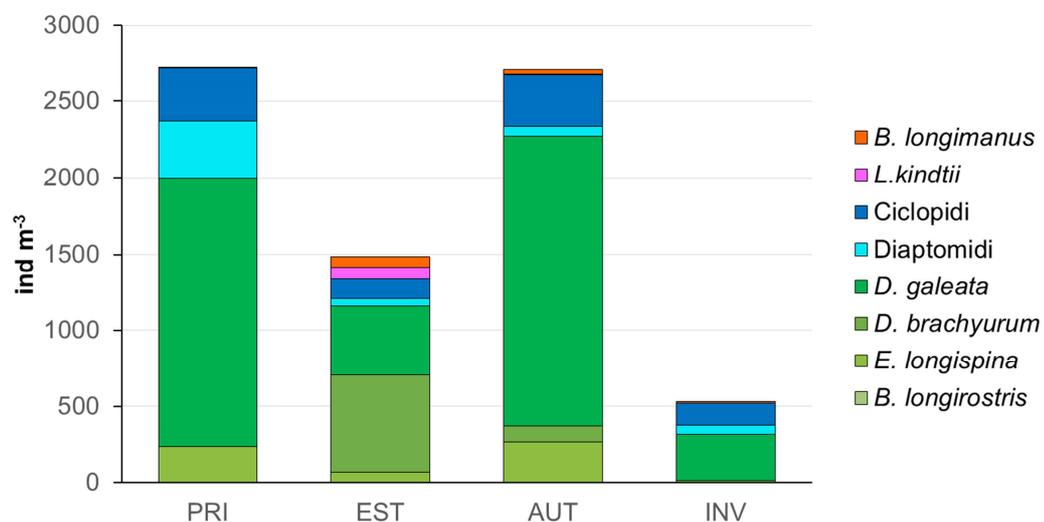


Figura 45: Composizione della popolazione zooplanctonica nelle quattro stagioni di campionamento a Ghiffa (CIPAIS, 2014).

La successione stagionale dei popolamenti zooplanctonici ha visto un picco primaverile con alte densità di *Daphnia hyalina – galeata*, ed una buona presenza di diaptomidi e ciclopidi. Tale situazione si è ripresentata in autunno, con alte densità di *Daphnia hyalina – galeata* e ciclopidi; i diaptomidi sono presenti ma con densità inferiore mentre sono presenti i cladoceri predatori con *Bythotrephes longimanus*.

In estate prevale *Diaphanosoma brachyurum*, insieme a *Daphnia hyalina – galeata*. Sono presenti anche i ciclopidi, seppur dimezzati rispetto alla primavera, ed i diaptomidi con densità limitate.

In estate ed autunno sono presenti anche i cladoceri predatori.

In inverno, la densità totale si riduce notevolmente, risultando presenti principalmente *Daphnia hyalina – galeata*, i ciclopidi e qualche specie di diaptomide e *Bythotrephes longimanus*.

Esaminando nel dettaglio le due componenti dimensionali campionate (frazione ≥ 450 e ≥ 850 μm – figura 46), si nota un incremento in primavera della biomassa totale dovuto al rapido incremento di *Daphnia*, particolarmente abbondante in tutte e due le frazioni dimensionali. Nella frazione di dimensioni inferiori sono presenti anche i ciclopidi ed i diaptomidi con buone percentuali di presenza, mentre sono praticamente assenti i grandi cladoceri predatori.

In tutti i campioni si nota la netta prevalenza di *Daphnia* ad esclusione di quelli estivi dove per la frazione ≥ 450 μm rappresenta il 35% c.a. della biomassa totale, mentre nella frazione ≥ 850 μm non supera il 40% della biomassa totale.

Nei campioni della frazione ≥ 450 μm sono ben rappresentati anche i ciclopidi, mentre per i campioni di dimensioni maggiori le percentuali maggiori, dopo *Daphnia*, sono assunte dai cladoceri predatori, soprattutto nel periodo estivo-autunnale.

Anche per la stazione di Ghiffa, il campione estivo presenta la maggior variabilità nella composizione della popolazione con la presenza di tutti i taxa considerati.

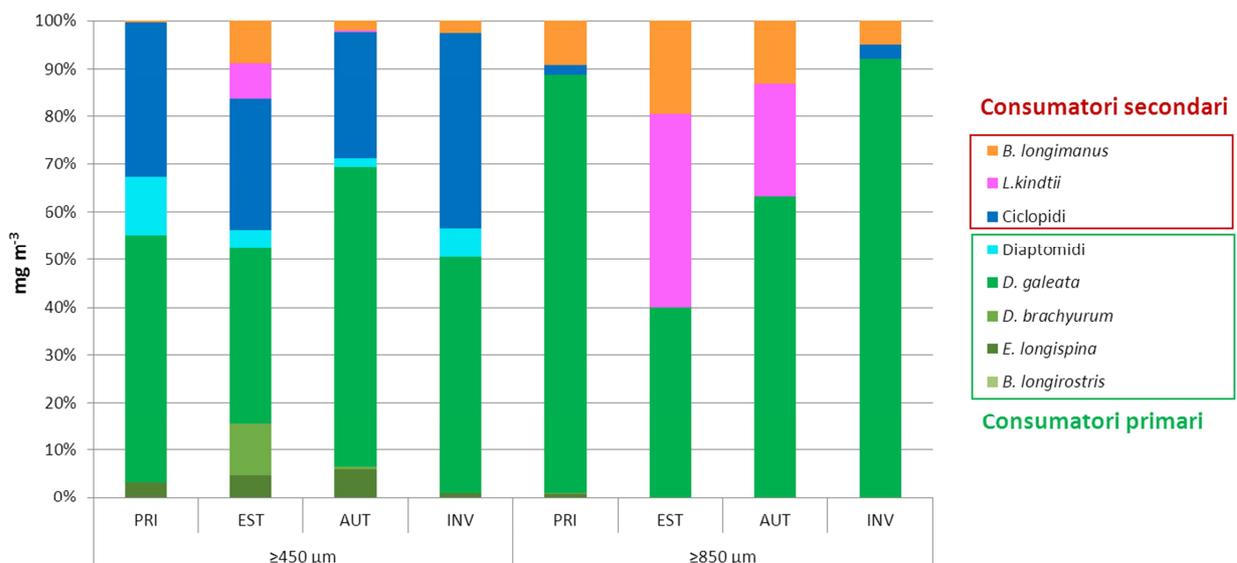


Figura 46: Composizione percentuale della biomassa totale della comunità zooplanctonica per ciascun campione, suddivisi su base dimensionale per la stazione di Ghiffa (CIPAIS, 2014).

8.2 Contaminanti nello zooplancton del Lago Maggiore

Il contenuto lipidico per ciascuna frazione del Lago Maggiore nel corso dell'anno è riportato in tabella 16.

Tabella 16: contenuto lipidico (%) dei campioni zooplanctonici riferiti al peso secco.

	Lipidi %	
	≥450 µm	≥850 µm
Primavera	13,3	12,3
Estate	11,9	8
Autunno	11	7,4
Inverno	11,2	8,1

Per la frazione ≥450 µm il contenuto lipidico non varia molto durante le diverse stagioni, il valore massimo viene raggiunto in primavera mentre quello minimo in autunno. Anche per la frazione ≥850 µm l'andamento è simile, con il valore massimo in corrispondenza dell'aumento di biomassa di *Daphnia*.

In figura 47 sono riportati i risultati relativi alla determinazione del DDT ed i suoi metaboliti dei campioni zooplanctonici suddivisi nelle due frazioni dimensionali.

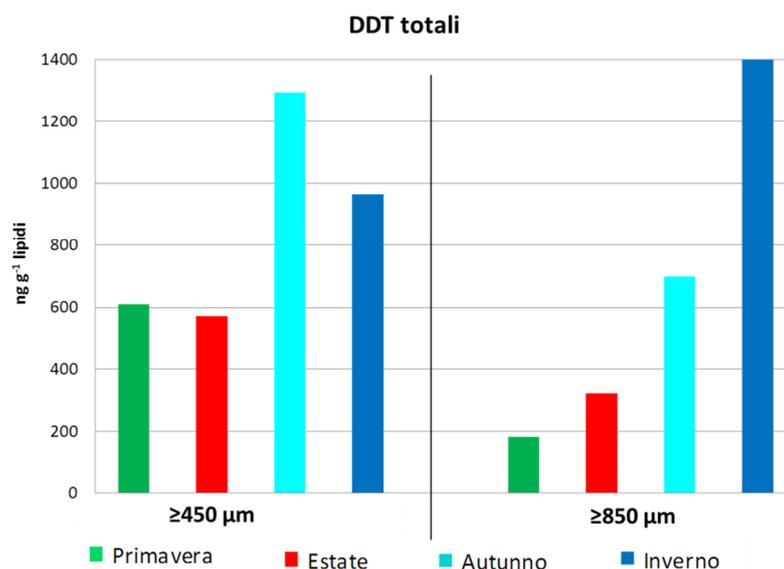


Figura 47: Contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago Maggiore, suddivisa nelle due frazioni dimensionali della componente zooplanctonica nel corso dell'anno.

La concentrazione massima si riscontra nel campione autunnale per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ e in quello invernale per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$. Le concentrazioni più basse si riscontrano in primavera ed estate per entrambe le frazioni.

I livelli di contaminazione aumentano all'aumentare del segnale $\delta^{15}\text{N}$ per entrambe le frazioni dimensionali considerate (figura 48 e 49).

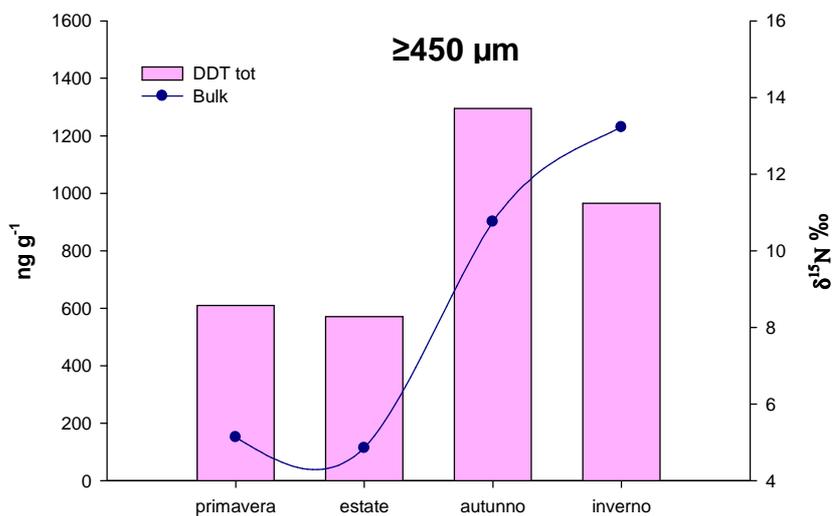


Figura 48: Contaminazione da DDT nello zooplancton del Lago Maggiore per la frazione dimensionale $\geq 450 \mu\text{m}$ e segnali isotopici dell'azoto del bulk.

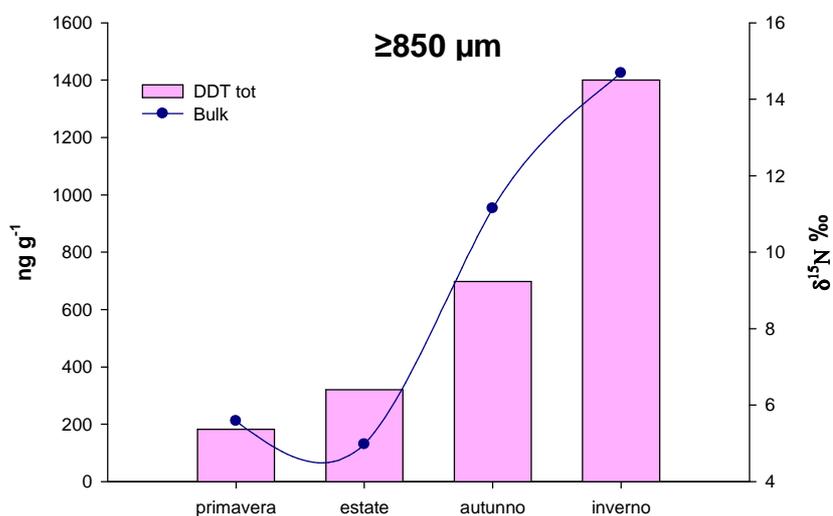


Figura 49: Contaminazione da DDT nello zooplancton del Lago Maggiore per la frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$ e segnali isotopici dell'azoto del bulk.

Il metabolita presente con concentrazioni maggiori risulta essere il pp'DDE, seguito dal pp'DDD (figura 50). In estate, per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ si può tuttavia notare un incremento

del pp'DDT a discapito di pp'DDE e pp'DDD, mentre per la frazione maggiore è evidente un incremento costante di tutti i metaboliti con il procedere della stagione.

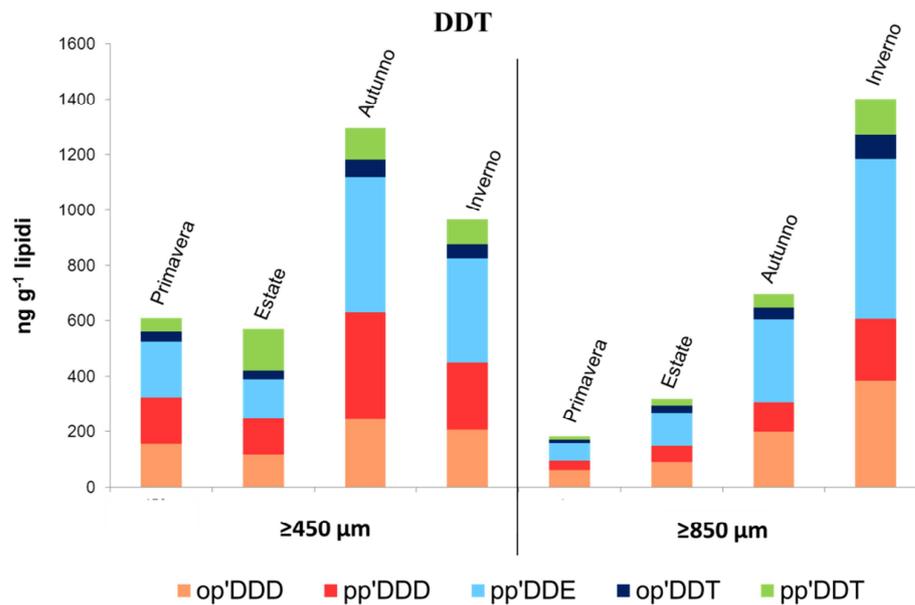


Figura 50: pp'DDT, suoi metaboliti e isomeri nelle due frazioni zooplanctoniche nel Lago Maggiore nel corso dell'anno.

Le concentrazioni degli isomeri op' permangono ancora non trascurabili se confrontati al passato (soprattutto l'op'DDD) e confermano l'origine industriale della contaminazione dal momento che la produzione di pp'DDT prevede la formazione dell'isomero op'DDT (in misura del 15-25%), che può essere convertito nel suolo e nei sedimenti nei metaboliti op'DDD e op'DDE (CIPAIS, 2014).

Per i PCB totali si assiste ad un incremento nelle concentrazioni con il procedere delle stagioni, tuttavia le variazioni maggiori si presentano nella frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ con un valore minimo primaverile pari a $102,5 \text{ ng g}^{-1}$ ed un valore massimo invernale pari a $3731,8 \text{ ng g}^{-1}$, mentre per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ i livelli di contaminazione sono compresi tra $244,4 \text{ ng g}^{-1}$ del periodo estivo e $1173,4 \text{ ng g}^{-1}$ dell'inverno (figura 51).

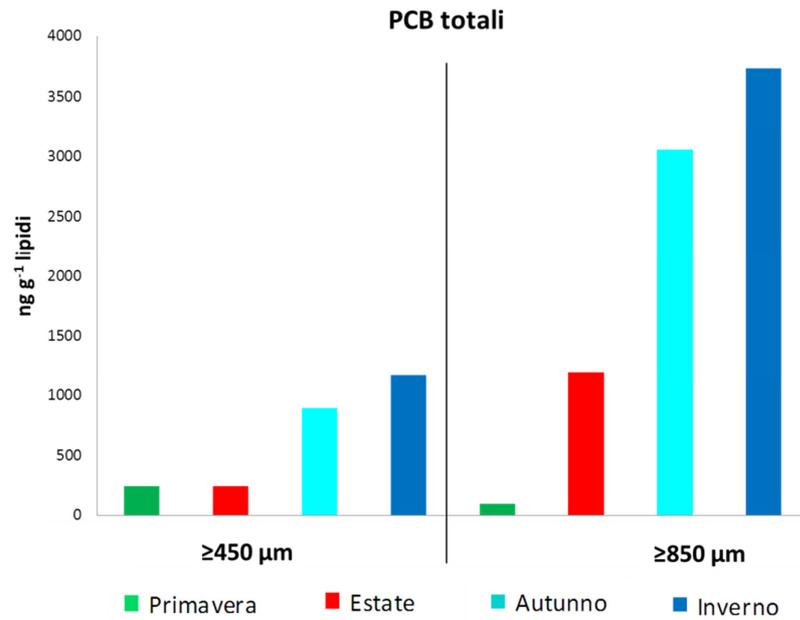


Figura 51: Contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago Maggiore, suddivisa nelle due frazioni dimensionali della componente zooplanctonica nel corso dell'anno.

Nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ è evidente un incremento costante nel livello di contaminazione dalla primavera all'inverno ed il livello di contaminazione accresce all'aumentare del segnale isotopico dell'azoto dell'intera popolazione zooplanctonica (figura 52 - Broman et al., 1999; Kidd et al., 1997).

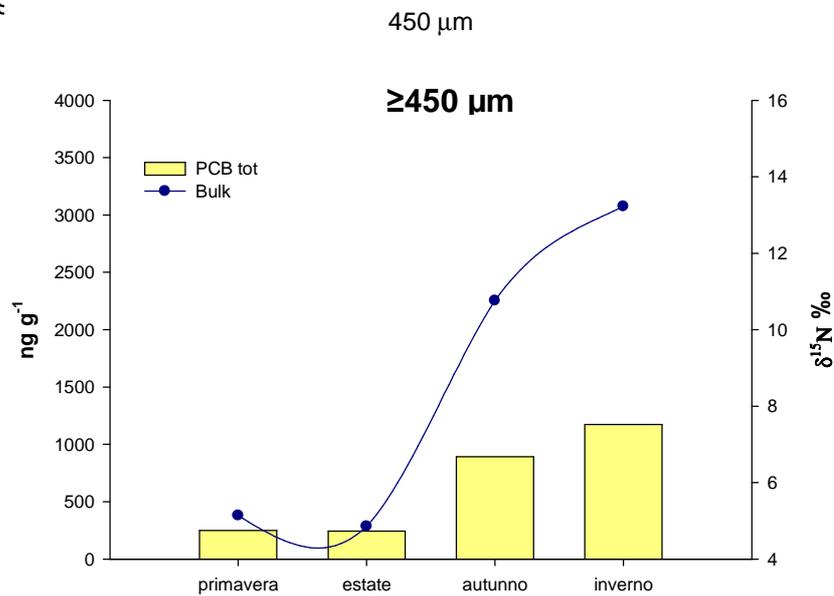


Figura 52: Contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago Maggiore per la frazione dimensionale $\geq 450 \mu\text{m}$ e segnali isotopici dell'azoto del bulk.

Analogamente, si riscontra lo stesso andamento per la frazione maggiore con valori di contaminazione nettamente superiori (figura 53).

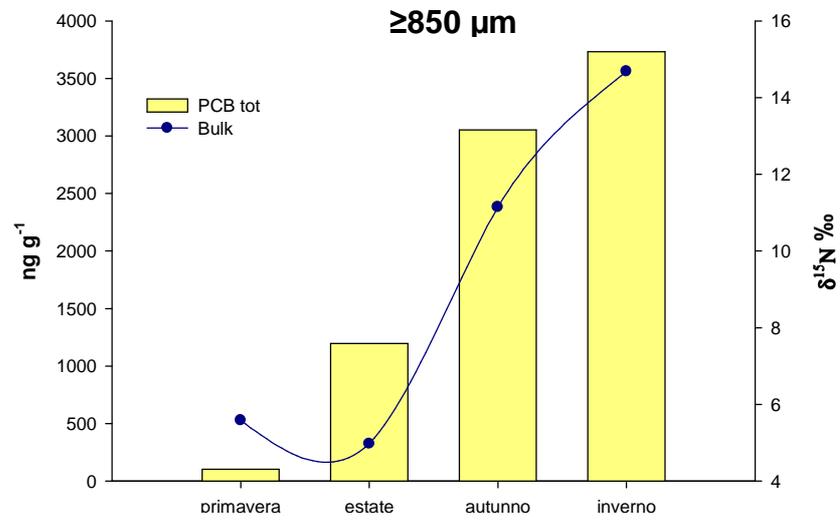


Figura 53: Contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago Maggiore per la frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$ e segnali isotopici dell'azoto del bulk.

I profili dei diversi congeneri sono simili in entrambe le frazioni dimensionali nonostante le concentrazioni dei singoli congeneri siano generalmente più alte nella frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ (figura 54). Si evidenzia la prevalenza dei PCB 153, 138 e 180 in tutti i campioni.

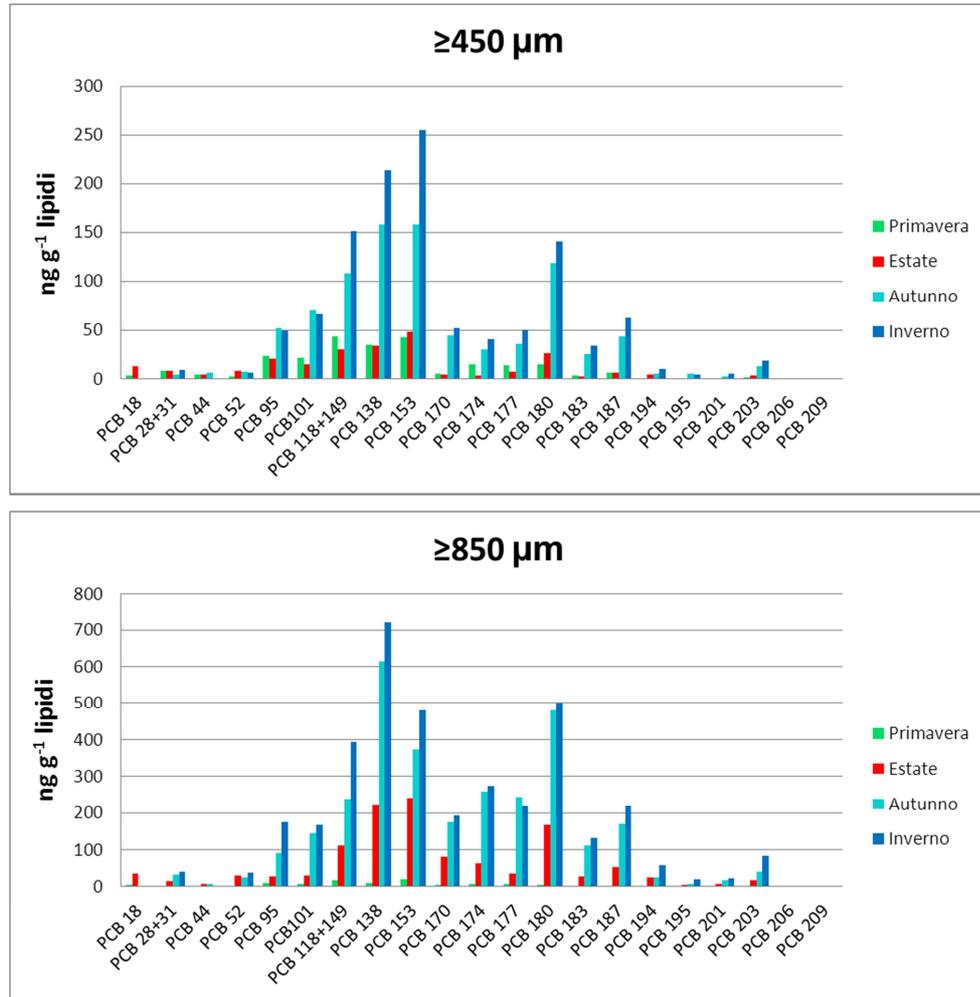


Figure 54: Singoli congeneri di PCB nello zooplancton del Lago Maggiore, suddivisi nelle due frazioni dimensionali (le scale di riferimento dell'asse y sono differenti nelle due frazioni).

9 CONTAMINAZIONE DELLO ZOOPLANCTON DEL LAGO DI COMO E DEL LAGO MAGGIORE

Negli ultimi quindici anni, il Lago Maggiore è stato interessato da un monitoraggio continuo del pp'DDT, dei suoi isomeri e metaboliti nell'ambito del progetto CIP AIS (Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere), volto ad individuare il livello di contaminazione dei diversi livelli trofici del lago perlopiù in zona pelagica.

A partire da marzo 2003 a gennaio 2009 sono stati prelevati campioni d'acqua nella stazione di Ghiffa (in corrispondenza del punto più profondo del Lago Maggiore) per valutare le concentrazioni dei DDT disciolti in acqua e legati al particolato. Dalle indagini è emerso in modo chiaro che l'analisi della frazione acquosa seppur utile, può sottovalutare la reale contaminazione totale poiché la distribuzione dei contaminanti può essere diversa lungo la colonna d'acqua e le concentrazioni sono talvolta inferiori o vicino al limite di rilevabilità a causa della forte tendenza di tali inquinanti ad associarsi alla materia organica in fase acquosa (Bettinetti et al., 2010).

Dal 2008, l'attenzione è stata quindi posta anche alla componente zooplanctonica e continuata sui pesci pelagici (agone e coregone) perché i livelli di contaminazione, registrati a partire dagli anni '90, hanno determinato gravi minacce sia per i predatori che per le attività di pesca (Bettinetti et al., 2005). Inoltre, applicando i modelli bioenergetici (Connolly e Pedersen, 1988; Thomann, 1989) a partire dalle concentrazioni di DDT in acqua come dati di input, ci si rese conto che le concentrazioni misurate nei pesci erano più alte del previsto (Bettinetti et al., 2010). Altro fattore osservato è stato che le concentrazioni dei principali contaminanti indagati nei pesci risultavano inferiori rispetto ai valori registrati nello zooplancton, situazione anomala perché in contrasto con i fondamenti teorici di bioaccumulo lungo le catene trofiche, che prevedono un aumento dal basso verso l'alto della rete trofica; di conseguenza i pesci zooplanctofagi dovrebbero essere molto più contaminati rispetto alla loro preda, ovvero lo zooplancton.

Queste osservazioni hanno permesso di affermare che non sia stata ancora raggiunta una condizione di stato stazionario per il Lago Maggiore e l'applicazione di tali modelli per la rete trofica pelagica dà risultati contraddittori (Bettinetti et al., 2010).

Il Lago di Como insieme ad un altro lago profondo sud alpino, il Lago d'Iseo è stato oggetto di una campagna di monitoraggio che ha coinvolto *Dreissena polymorpha*, un mollusco bivalve filtratore del litorale, e l'agone (*Alosa fallax lacustris*), pesce tipicamente pelagico, al fine di testare l'influenza delle fonti di inquinamento secondarie, mettendo in luce un inaspettato picco di contaminazione da DDT in entrambe le specie nel 2005 (Bettinetti et al., 2008).

Il repentino e inaspettato aumento delle concentrazioni di DDT e dei suoi metaboliti nel biota si ritiene sia una conseguenza della fusione dei ghiacciai che avevano intrappolato i contaminanti nel periodo d'uso (dagli anni '50 agli anni '70) come risultato del riscaldamento climatico (Bettinetti et al., 2008). Il DDT era stato utilizzato in prossimità dei laghi per il trattamento della frutta nelle valli circostanti ed è stato rilasciato negli ultimi anni in seguito alla fusione del ghiaccio durante il recente ritiro dei ghiacciai. L'evoluzione della contaminazione a partire dagli anni '90 fino ai tempi recenti è stata ricostruita dalle analisi di sedimenti raccolti in una zona di deposizione indisturbata del lago d'Iseo, a sostegno del recente inquinamento da DDT di origine glaciale (Bettinetti et al., 2011). Un analogo studio in corso per la determinazione della contaminazione dei sedimenti del Lago di Como sembrerebbe confermare questa ipotesi.

Uno studio del 2011 ha messo in luce la presenza di POPs nelle acque di superficie, nei sedimenti e nel biota (plancton e pesci) dal Lago di Como con concentrazioni di DDT comprese 0,04 to 4,25 $\mu\text{g g}^{-1}$ rispetto al contenuto lipidico e concentrazioni tra 0,25 e 40,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ per i PCB (Villa et al., 2011). Viene sottolineata l'importanza della biomagnificazione nella rete trofica del Lago di Como e dell'area di foraggiamento come parametro per l'esposizione. Dal confronto dei dati relativi al Lago di Como e al Lago Maggiore si nota subito una differenza nelle concentrazioni di DDT totali tra i due grandi laghi profondi.

Il Lago Maggiore risulta essere nettamente più contaminato da DDT e dai suoi metaboliti per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$, con valori compresi tra 570,7 ng g^{-1} lip. e 1295 ng g^{-1} lip. (figura 55). Inoltre anche l'andamento della contaminazione durante l'anno è diverso nei due laghi dal momento che nel Lago di Como è presente un picco estivo ed uno invernale mentre nel Lago Maggiore la contaminazione aumenta nettamente a partire dall'autunno verso l'inverno.

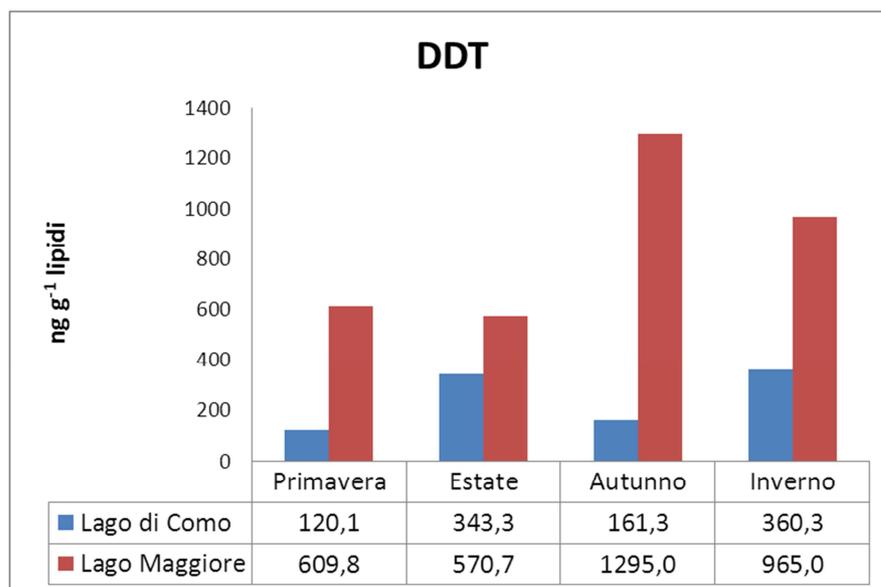


Figura 55: Confronto dei livelli di contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como e del Lago Maggiore per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ nel corso dell'anno.

Per la frazione di zooplancton di maggiori dimensioni ($\geq 850 \mu\text{m}$), le differenze nei livelli di contaminazione da DDT si riducono (figura 56). Il Lago Maggiore risulta ancora debolmente più contaminato in primavera ed autunno, mentre in estate le concentrazioni sono paragonabili.

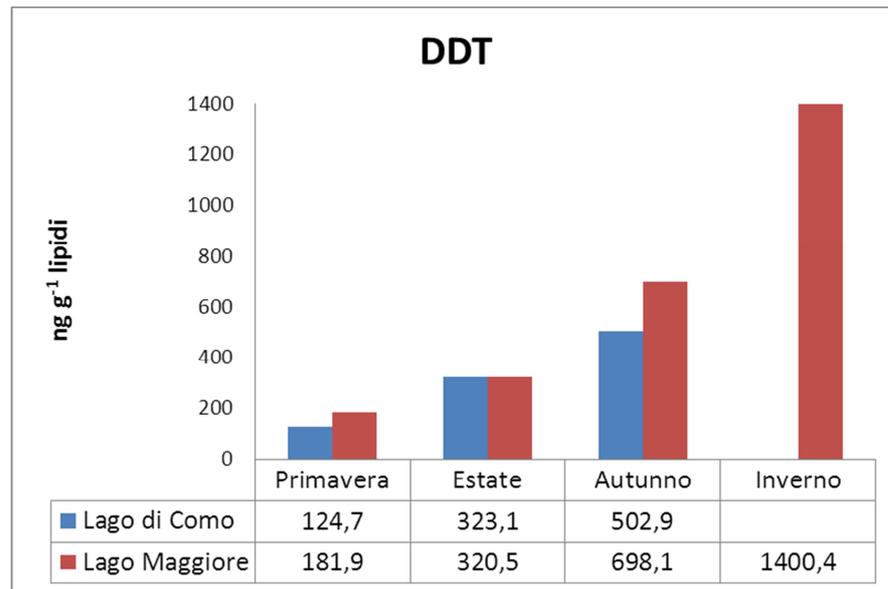


Figura 56: Confronto dei livelli di contaminazione da pp'DDT e dai suoi metaboliti nello zooplancton del Lago di Como e del Lago Maggiore per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ nel corso dell'anno.

Le differenze di concentrazione sembrano ascrivibili alle diverse fonti di provenienza del DDT nei due bacini. La contaminazione nel Lago Maggiore è legata ad una fonte puntiforme da parte dell'impianto industriale di Pieve Vergonte che ha messo in circolo concentrazioni particolarmente elevate di DDT che permangono ancora elevate a quasi 20 anni dalla chiusura dell'impianto. La presenza di DDT nel Lago di Como nonostante il suo divieto d'uso degli anni '70 sembra essere dovuta a fonti più lontane e diffuse; la causa di tale inquinamento non è dovuta ad una fonte puntiforme di rilascio di DDT ma si ritiene che provenga dalla fusione dei ghiacciai, come risultato del riscaldamento climatico, i quali hanno intrappolato al loro interno queste sostanze e le hanno veicolate così verso il Lago di Como (Bettinetti et al., 2008), dove ricircolano a livello di bacino.

I due laghi differiscono anche per la contaminazione da PCB, presenti con concentrazioni maggiori nei campioni del Lago di Como, con valori compresi tra 175 e 7073,3 ng g^{-1} l., mentre per il Lago Maggiore le concentrazioni oscillano tra 102,5 e 3052,4 ng g^{-1} l.. Anche in questo caso le differenze possono essere individuate conoscendo la storia e l'evoluzione del territorio circostante i due bacini. Geograficamente il Lago di Como risente "prima" e in misura maggiore della zona industriale di produzione di PCB, la Caffaro (Brescia – in prossimità del Lago d'Isèo) e della stessa zona industriale della città di Como; il Lago

Maggiore risente evidentemente meno in quanto più lontano da questa ingente fonte puntiforme e probabilmente le fonti locali sono di minore impatto.

Per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ i campioni del Lago di Como presentano valori superiori rispetto al Lago Maggiore dall'estate all'inverno, con un picco elevato di contaminazione in estate, mentre in primavera è maggiore il livello di contaminazione del Lago Maggiore (figura 57).

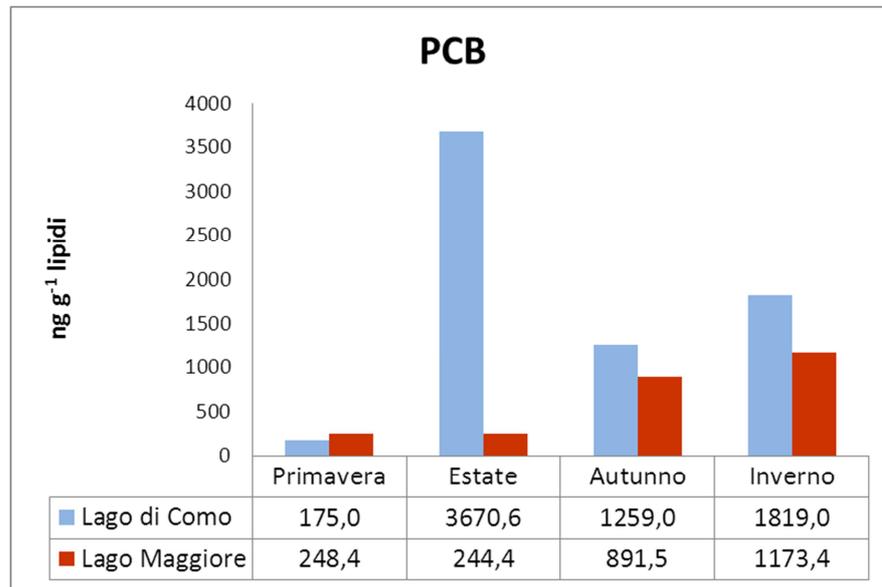


Figura 57: Confronto dei livelli di contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago di Como e del Lago Maggiore per la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ nel corso dell'anno.

Per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ i campioni del Lago di Como presentano concentrazioni maggiori di PCB presentando un incremento con il procedere delle stagioni, con valori anche doppi rispetto al Lago Maggiore (figura 58).

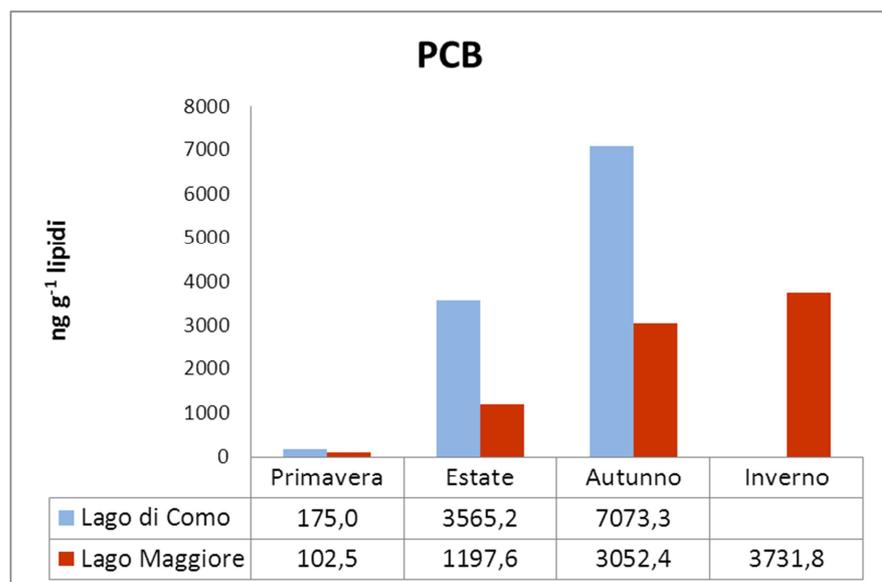


Figura 58: Confronto dei livelli di contaminazione da PCB nello zooplancton del Lago di Como e del Lago Maggiore per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ nel corso dell'anno.

A sostegno del fatto che la presenza di PCB a livello di bacino sia legata alla storia del territorio circostante, oltre che alla vicinanza della fonte di produzione di tali sostanze, possiamo confrontare l'andamento dei livelli di contaminazione dei laghi di Como e Maggiore con i dati riportati in Bettinetti et al. (2012)* per il Lago d'Iseo riguardanti il PCB 138 (tabella 17).

Tabella 17: Concentrazioni di PCB 138 dello zooplancton di tre grandi laghi profondi.

		PCB 138 – zooplancton (ng g ⁻¹ lipidi)	
		Estate	Autunno
Lago Maggiore - 2013	Rete ≥450 µm	33,9	157,8
Lago di Como - 2013	Rete ≥200 µm	37,7	96,7
Lago d'Iseo* - 2009	Rete ≥200 µm	170	200,6
Lago d'Iseo* - 2010	Rete ≥200 µm	94,4	104,3

Dai risultati emersi, per l'estate si osserva un trend di diminuzione della concentrazione del PCB 138 dal Lago d'Iseo verso il Lago Maggiore. In autunno il Lago d'Iseo presenta valori maggiori rispetto al Lago di Como, così non è per il Lago Maggiore che presenta un valore pari a 157,8 ng g⁻¹ lipidi. Tale differenza però può essere dovuta al fatto che le concentrazioni del Lago Maggiore fanno riferimento a campioni di zooplancton raccolti con retino con una maglia maggiore rispetto a quelli dell'Iseo, di conseguenza tali dati non possono essere confrontati poiché la componente zooplanctonica di ciascuno di essa può differire.

10 CONCLUSIONI

La presente tesi di dottorato rappresenta un contributo per chiarire alcuni aspetti relativi alla distribuzione ed al bioaccumulo dei microinquinanti organici persistenti lungo la rete trofica pelagica, dopo aver analizzato e discusso le differenti componenti della rete trofica pelagica attraverso l'analisi degli isotopi stabili di due grandi laghi profondi subalpini, il Lago di Como ed il Lago Maggiore.

Per prima cosa, è stata caratterizzata dal punto di vista funzionale la componente zooplanctonica dal momento che sono ancora scarsi gli studi e rimane ancora molto da esplorare sul ruolo dello zooplancton nel processo di biomagnificazione. Gli ecotossicologi spesso considerano lo zooplancton come un insieme di organismi composto esclusivamente da consumatori primari che controllano la comunità fitoplanctonica. In realtà questo gruppo di organismi è molto complesso con differenze specie-specifiche nel ciclo vitale, nelle dimensioni e nelle abitudini alimentari, così come si è potuto vedere da questo progetto di ricerca.

Attraverso l'analisi degli isotopi stabili è stato possibile identificare alcuni aspetti generali già riscontrati in altri laghi con caratteristiche morfometriche simili. Innanzi tutto è stata registrata una forte variabilità stagionale nei segnali isotopici del carbonio con valori più negativi in inverno e meno negativi in estate, sia per un grande lago profondo come il Lago di Como, ma anche nei cinque piccoli laghi subalpini considerati. Tali variazioni stagionali sono dipendenti dalla temperatura media della colonna d'acqua ed alle conseguenti ripercussioni sulla componente fitoplanctonica. Anche i segnali isotopici dell'azoto mostrano un andamento stagionale con valori di arricchimento dell'isotopo pesante maggiore nei mesi freddi, mentre in estate presentano un arricchimento minore.

La variabilità può essere accompagnata anche da importanti cambiamenti stagionali delle posizioni dei taxa zooplanctonici nella catena alimentare, e nel ruolo dei consumatori primari e secondari nel trasferimento di materia e di energia lungo la rete trofica oltre al fatto che i consumatori primari risentono fortemente delle fluttuazioni temporali dei produttori primari influenzati a loro volta dalle variazioni del carbonio inorganico disciolto, dalla materia organica particellata, dalla produttività delle alghe, dalla composizione in specie e dai processi metabolici (Matthews e Madzumder, 2005; Vuorio et al., 2006; Gu et al., 2006), oltre che da temperature e dal ciclo dei nutrienti inorganici (Perga e Gerdeaux, 2006).

Durante il corso dell'anno si assiste a spostamenti più o meno marcati nella colonna d'acqua. Come abbiamo visto, i ciclopidi e *Eubosmina* spesso prediligono acque più profonde, mentre i diaptomidi ed i cladoceri predatori in alcuni casi risentono maggiormente dell'apporto da parte del litorale.

Inoltre, si è potuto vedere come la dipendenza da fonti alimentari non pelagiche sia maggiore nei bacini caratterizzati da profondità e ampiezza minori, dove si assiste a vere e proprie migrazioni orizzontali dei taxa considerati (i.e. Lago di Comabbio e Lago d'Endine). Tuttavia, l'apporto di materiale alloctono ha un impatto anche nei grandi laghi profondi, evidente soprattutto nelle due specie ittiche pelagiche considerate nel presente progetto. Si è potuto osservare come queste due specie non dipendano esclusivamente da fonti pelagiche, ma utilizzano anche fonti di diversa origine.

Il fingerprint isotopico, nonostante queste variazioni stagionali, è risultato essere univoco per ciascun lago, senza alcuna sovrapposizione dei segnali isotopici sia della linea di base rappresentata da *Daphnia* che dei singoli taxa considerati.

La firma isotopica dell'azoto è influenzata dalla trofia del lago, infatti i laghi che presentano un grado di trofia maggiore generalmente presentano valori di arricchimento dell'azoto maggiori, mentre valori inferiori si riscontrano in bacini caratterizzati da minore. Tale andamento è seguito da *Daphnia*, rappresentante della linea di base pelagica, che risulta essere più arricchita nell'isotopo pesante dell'azoto nei laghi a trofia elevata, così come dagli altri taxa zooplanctonici. Per ogni singolo taxa è stata calcolata la posizione trofica e le variazioni nel corso dell'anno, sempre in riferimento a *Daphnia*, ed individuati i ruoli occupati. Per quanto concerne i segnali isotopici del $\delta^{15}\text{N}$, è stato possibile notare che le reti trofiche complesse siano proporzionalmente meno arricchite in azoto rispetto a reti trofiche più semplici. Inoltre, in corrispondenza di una predazione diretta da parte dei pesci zooplanctofagi sulla componente zooplanctonica si assiste ad una diminuzione dei valori di arricchimento per l'azoto delle potenziali prede (ad esempio, i due cladoceri predatori), le quali in assenza dei pesci assumono valori di arricchimento maggiori, occupando una posizione trofica comparabile a quella dei pesci e quindi in grado di competere con i giovani pesci per le risorse alimentari.

Altro fattore interessante che è emerso in modo chiaro grazie allo studio di ambienti differenti è che gli intervalli di variazione dei segnali isotopici sono differenti in laghi diversi.

L'analisi degli isotopi stabili si è rivelato essere un utile strumento in ambito ecotossicologico per aiutare a spiegare la variabilità delle concentrazioni dei contaminanti, comprendendo la possibile esposizione alimentare e la biomagnificazione nelle popolazioni animali, in quanto la dieta è una delle principali vie di esposizione ai contaminanti per gli animali (Thomann et al., 1984; Hall et al., 1997). Rilevante importanza assume ora la componente zooplanctonica per il trasferimento dei contaminanti, in quanto è l'anello di congiunzione con il comparto ittico.

Gli organismi zooplanctonici con cicli vitali particolarmente rapidi, scarsa capacità di detossificazione e forte capacità di assimilazione, sono risultati essere più contaminati dei loro predatori sia per il Lago di Como che per il Lago Maggiore. Si conferma quindi il suggerimento di utilizzare questo gruppo di organismi come bioindicatore precoce di una possibile contaminazione della zona pelagica dei laghi, con l'accortezza di tenere in considerazione la complessità di tale componente e specificando quindi la componente di organismi di consumatori primari e quella dei secondari. La scelta del frazionamento dimensionale si è rivelata importante per rappresentare al meglio l'intera comunità del popolamento zooplanctonico per ciascun lago, a seconda delle dimensioni e delle specie presenti.

L'attenzione è stata posta sui contaminanti organici persistenti "di vecchia generazione", DDT e PCB in particolare, i quali, a causa della loro elevata liposolubilità, tendono ad accumularsi nella frazione lipidica, a livello cellulare e muscolare e vengono trasferiti lungo le catene alimentari. Gli andamenti delle concentrazioni dei microinquinanti organici dello zooplancton del Lago di Como e del Lago Maggiore sono stati messi in relazione alla composizione della popolazione, soprattutto alla presenza dei consumatori secondari, ed ai segnali isotopici dell'azoto al variare delle stagioni. L'incremento della concentrazione dei contaminanti dei predatori rispetto alle prede valutate grazie all'analisi degli isotopi stabili stagionalmente ha evidenziato che nelle due specie ittiche del Lago di Como considerate il fenomeno della biomagnificazione, diversamente da quanto atteso, sembra non presentarsi per il periodo estivo, ovvero quando questi pesci basano la loro dieta sullo zooplancton. Per questo è necessario approfondire ulteriormente le conoscenze riguardo le abitudini alimentari di queste specie ittiche per decifrare i meccanismi in atto.

Bibliografia

- Ambrosetti W., Barbanti L., Mosello R., Pugnetti A.; 1992. Limnological studies on the deep southern Alpine lakes Maggiore, Lugano, Como, Iseo and Garda. In Guilizzoni P., Tartari G., Giussani G. (Eds); 1992. Limnology in Italy. Mem. Ist. ital. Idrobiol., 50: 117-146.
- Arnot J.A., Gobas F.A.P.C.; 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. Environ. Rev. 14(4):257–97.
- Auer B.; 1988. Über den einfluss von *Leptodora kindtii* auf das zooplankton des Neusiedlersees-beutefang und eliminations raten. Biol. Forschungs. Burgenland-Berichte, 68, 19-26.
- Banas D., Voltaire Y., Danger M., Thomas M., Oliveira-Ribeiro C.A., Roche H., Ledore Y.; 2009. Can we use stable isotopes for ecotoxicological studies? Effect of DDT on isotopic fractionation in *Perca fluviatilis*. Chemosphere 76, 734e739.
- Barron M.G.; 1990. Bioconcentration. Environmental Science and Technology 24, 1612-1618.
- Begon H., Harper J. L., Townsend C. R.; 1989. Ecologia: individui, popolazioni, comunità. Editore Zanichelli, Bologna.
- Berg D.J., Garton D.W.; 1988. Seasonal abundance of the exotic predatory cladoceran, *Bythotrephes cederstroemi*, in western Lake Erie. J. Great Lakes Res. 14:479-488.
- Berg A., Grimaldi E.; 1965. Biologia delle due forme di Coregone (*Coregonus* sp.) del Lago Maggiore. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia 18:25-196.
- Bertoni R., Piscia R., Calmieri C.; 2004. Horizontal heterogeneity of seston, organic carbon and picoplankton in the photic zone of Lago Maggiore, Northern Italy. J. Limnol. 63, pp. 244–249.
- Bettinetti R, Croce V, Galassi S (2005) Ecological risk assessment for the recent case of DDT pollution in Lake Maggiore (Northern Italy). Water Air Soil Pollut 152:385–399.
- Bettinetti R., Croce V., Galassi S., Volta P.; 2006. pp'DDT and pp'/DDE accumulation in a food chain of Lake Maggiore (Northern Italy): testing steady-state condition. Environ. Sci. Pollut. Res. 13 (1), 59–66.
- Bettinetti R., Quadroni S., Galassi S., Bacchetta R., Bonardi L., Vailati G.; 2008. Is meltwater from Alpine glaciers a secondary DDT source for lakes? Chemosphere 73: 1027-1031.
- Bettinetti R., Galassi S., Guzzella L., Quadroni S., Volta P.; 2010. The role of zooplankton in DDT biomagnification in a pelagic food web of Lake Maggiore (Northern Italy). Environ. Sci. Pollut. Res. 17 (9), 1508–1518.
- Bettinetti R., Galassi S., Guilizzoni P., Quadroni S.; 2011. Sediment analysis to support the recent glacial origin of DDT pollution in Lake Iseo (Northern Italy). Chemosphere 85, 163–169.
- Bettinetti R., Quadroni S., Manca M., Piscia R., Volta P., Gazzella L., Roscioli C., Galassi S.; 2012. Seasonal fluctuation of DDTs and PCB in zooplankton and fish of Lake Maggiore (Northern Italy). Chemosphere, 88 (3), 344-351.
- Bettinetti R., Garibaldi L., Leoni B., Quadroni S., Galassi S., 2012. Zooplankton as an early warning system of persistent organic pollutants contamination in a deep lake (lake Iseo, Northern Italy). J. Limnol. 71(2), 335-338.
- Bettinetti R., Manca M.; 2014. Understanding the role of zooplankton in transfer of pollutants through trophic food webs. In Zooplankton: Species Diversity, Distribution and Seasonal Dynamics, Editors: Nova Publisher.

-
- Binelli A., Galassi S., Provini A.; 1999. Factors affecting the use of *Dreissena polymorpha* as a bioindicator: the PCB pollution in Lake Como (N.Italy). *Water Air and Soil Pollution* 125 (1-4): 19-32.
- Binelli A., Provini A., 2003. DDT is still a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. *Chemosphere* 52(4): 717-723.
- Binelli A., Provini A.; 2003. The PCB pollution of Lake Iseo (N Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere* 53:143-51
- Borgå K., Gabrielsen G.W., Skaare J.U.; 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution* 113, 187e198.
- Borgå K., Fisk A.T., Hoekstra P.F., Muir D.C.G.; 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in arctic marine food webs. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (10): 2367–2385.
- Borgå K., Fisk A.T., Hargrave B., Hoekstra P.F., Swackhamer D., Muir D.C.G.; 2005. Bioaccumulation factors for PCBs revisited. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4523–4532.
- Broman D.C., Naf C., Rolff C., Zebuhr Y., Fry B., Hobbie J.; 1992. Using ratios of stable nitrogen isotopes to estimate bioaccumulation and flux of polychlorinated dibenzo-pdioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in two food chains from the northern Baltic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 331–345.
- Broman D., Di Guardo A., Calamari D.; 1999 Food chain accumulation of DDT and some of its metabolites in fish from Lake Maggiore (Italy) after an accidental release evaluated by the use of stable isotopes and other biotic parameters. *Organohal. Comp.*, 43, 45-48.
- Browman H., Kruse S., O'Brien W.J.; 1989. Foraging behavior of the predaceous cladoceran, *Leptodora kindtii*, and escape responses of their prey. *Journal of Plankton Research* 11, 1075-1088.
- Brooks J.L., Dodson S.I.; 1965. Predation, body size, and composition of the plankton. *Science* 150: 28-35.
- Burns C. W.; 1968. Direct observation of mechanisms regulating feeding behavior of *Daphnia* in lake water. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 53: 83-100.
- Cabana G., Rasmussen J.B.; 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 10844-10847, *Ecology*.
- Campfens J., Mackay D.; 1997. Fugacity-Based Model of PCB Bioaccumulation in Complex Aquatic Food Webs. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31 (2), pp 577–583.
- 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). *J. Limnol.*, 71(1): 84-94.
- Cattaneo A., Manca M., Rasmussen J.B.; 2004. Peculiarities in the stable isotope composition of organisms from an alpine lake. *Aquat. Sci.*, 66: 440-445.
- CIP AIS - C.N.R.-I.S.E. Sede di Verbania. 2014. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma triennale 2013-2015. Campagna 2013. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 98 pp.
- CIP AIS - C.N.R.-I.S.E. Sede di Verbania. 2014. Indagini su ddt e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma triennale 2013-2015. Campagna 2013. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 105 pp.
-

-
- CIP AIS - C.N.R.-I.S.E. Sede di Verbania. 2013. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 2008-2012. Campagna 2012 e rapporto quinquennale. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 133 pp.
- CIP AIS - CNR-ISE Sede di Verbania. 2012. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 2008-2012. Campagna 2011. A cura di R. Bertoni. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 88 pp.
- CIP AIS - C.N.R.-I.S.E. Sede di Verbania. 2010. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 2008-2012. Campagna 2009. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 135 pp.
- CIP AIS - 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.): 116 pp.
- CIP AIS. 2009. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema Lago Maggiore. Rapporto annuale 2008. Ed. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere. 85 pp.
- CIP AIS. 2003. Monitoraggio della presenza del DDT e di altri contaminanti nell'ecosistema Lago Maggiore. Rapporto annuale aprile 2002 – marzo 2003. Ed. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere. 68 pp.
- Conder J.M., Gobas F.A.P.C., Borgå K., Muir D.C.G., Powell D.E.; 2012. Use of trophic magnification factors and related measures to characterize bioaccumulation potential of chemicals. *Integr Environ Assess Manag* 8(1):85–97.
- Connolly J.P., Pedersen C.J.; 1988. A thermodynamic based evaluation of organic chemical accumulation in aquatic organisms. *Environ Sci Technol* 22(1):99-103
- Costanzo S.D., O'Donohue M.J., Dennison W.C., Loneraoan N.R., Thomas M.; 2001. A new approach for detecting and mapping sewage impacts. *Marine Pollution Bulletin* 42:149-156.
- de Bernardi R.; 1974. The dynamics of a population of *Daphnia hyaline* Leydig in Lago Maggiore, Northern Italy. *Mem Ist. Ital. Idrobiol.*, 31: 221-243.
- de Bernardi R., Soldavini E.; 1977. Seasonal dynamics of the zooplankton community in Lago di Mergozzo. *Mem. 1st. Ital. Idrobiol.* 34:137-154.
- de Bernardi R., Manca M., Giussani G.; 1988. Dinamica di popolazione e distribuzione verticale di cladoceri planctonici del Lago Maggiore in relazione a parametri ambientali. *Verh. int. ver. Limnol.* 23, 530-534.
- Deegan L.A., Garritt R.H.; 1997. Evidence for spatial variability in estuarine food webs. *Mar Ecol Prog Ser.* 147: 31-47.
- De Mott W.R.; 1986. The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia*, 69 - 3, pp 334-340.
- DeMott, W. R.; Kerfoot, W. C.; 1982. Competition among cladocerans: nature of the interaction between *Daphnia* and *Bosmina*. *Ecology* 63: 1949-1966.
- DeNiro, M. J., Epstein, S.; 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42:495-506.
- DeNiro M. J., Epstein S.; 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45:341-51.
- Ferguson A.J.D., Thompson J.M., Reynolds C.S.; 1982. Structure and dynamics of zooplankton communities maintained in closed systems, with special reference to the algal food supply. *J. Plankton Res.* 4: 523-543.
-

-
- Finlay J.C., Kendall C.; 2007. Stable isotope tracing of temporal and spatial variability in organic matter sources to freshwater ecosystems. In: Michener R., Lajtha K., 2007. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science. Blackwell Publishing Ltd - second edition.
- France R.; 1995. Critical examination of stable isotope analysis as a means for tracing carbon pathways in stream ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 651-656.
- France R.L., Peters R.H.; 1997. Ecosystem differences in the trophic enrichment of ^{13}C in food webs. *Can J Fish Aquat Sci* 54:1255–1258.
- France R.L.; 2000. Comparing $\delta^{13}\text{C}$ among littoral foodwebs using lake DOC. *Aquatic Ecology* 34 (4): 445-448
- France R.L., Schlaepfer M.A.; 2000. ^{13}C and ^{15}N depletion in components of a foodweb from an ephemeral boreal wetland compared to boreal lakes: putative evidence for microbial processes. *Hydrobiologia* 439 (1-3): 1-6.
- Fisk A.T., Hobson K.A., Norstrom R.J.; 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya food web. *Environmental Science and Technology* 35, 732e738.
- Garibaldi L., Anzani A., Marieni A., Leoni B., Mosello R., 2003. Studies on the phytoplankton of the deep subalpine Lake Iseo. *J. Limnol.*, 62(2): 177-189.
- Garton, D.W., Berg D. J., Fletcher R.J.; 1990. Thermal tolerances of the predatory cladocerans *Bythotrephes cederstroemi* and *Leptodora kindtii*: Relationship to seasonal abundance in Western Lake Erie. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 47 : 731- 738.
- Galassi S., Bettinetti R, Quadroni S., Manca M., Piscia R., Guzzella L., Poma G., Roscioli C.; 2012. Contaminanti nello zooplancton. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore, Rapporto CIP AIS, 5-16.
- Geller W., Müller H.; 1985. Seasonal variability in the relationship between body-length and individual dry weight as related to food abundance and clutch size in two coexisting *Daphnia* species. *Journal of Plankton Research*, 7: 1–18.
- Giussani G.; 1974. Planctofagia selettiva del coregone "bondella" (*Coregonus sp.*) del Lago Maggiore. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 31: 181-203. Translated in English by FBA, Translation Series TR 122.
- Gliwicz Z.M.; 1969. Studies on the feeding of pelagic zooplankton in lakes with varying trophic level. *Ekol. Pol.* A 17: 663-708.
- Gliwicz Z.M., Stibor H.; 1993. Egg predation by copepods in *Daphnia* brood cavities. *Oecologia (Berlin)*. 95. 295-298.
- Gliwicz Z.M., Lampert W.; 1994. Clutch-size variability in *Daphnia*: Body-size related effects of egg predation by cyclopoid copepods. *Limnol. Oceanogr.* 39(3), 479-485.
- Goering J., Alexander V., Haubensack N.; 1990. Seasonal variability of stable carbon and nitrogen isotope ratios of organisms in a North Pacific Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* Volume 30, Issue 3, Pages 239-260.
- Gobas F.A.P.C.; 1993. A model for predicting the bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in aquatic food webs: application to Lake Ontario. *Ecol. Modelling* 69:1-17
- Gobas F.A.P.C., Morrison H.A.; 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: Handbook of property estimation methods for chemicals: environmental and health sciences. Boethling R.S. and Mackay D., Lewis Publishers, New York, 189-231
-

- Grey J., Jones R.I., Sleep D.; 2000. Stable isotope analysis of the origins of zooplankton carbon in lakes of differing trophic state. *Oecologia* 123:232–240.
- Grey J., Jones R.I.; 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. *Limnol. Oceanogr.*, 46(3): 505–513.
- Gruppo di Lavoro Lago di Como. 2006. Progetto PLINIUS. Criticità e azioni per il recupero della qualità delle acque del Lario. Centro Volta Como. 216 pp.
- Gu B., Chapman A.D., Schelske C.L.; 2006. Factors controlling seasonal variations in stable isotope composition of particulate organic matter in a soft water eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.*, 51(6): 2837-2848.
- Hall B. D., Bodaly R. A., Fudge R. J. P., Rudd J.W.M., Rosenberg D. M., 1997. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water Air Soil Pollut.* 100, 13-24.
- Hendriks A.J.; 1995. Modelling non-equilibrium concentrations of microcontaminants in organisms: comparative kinetics as a function of species size and octanol-water partitioning. *Chemosphere* 30(2): 265-292.
- Hesslein R.H., Capel M.J., Fox D.E., Hallard K. A.; 1991. Stable Isotopes of Sulfur, Carbon, and Nitrogen as Indicators of Trophic Level and Fish Migration in the Lower Mackenzie River Basin, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(11), 2258-2265.
- Hesslein R. H., Hallard K. A., Ramlal P.; 1993. Replacement of Sulfur, Carbon, and Nitrogen in Tissue of Growing Broad Whitefish (*Coregonus nasus*) in Response to a Change in Diet Traced by $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1993, 50(10), 2071-2076.
- Hobson K.A., Welch H.E.; 1992. Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series* 84 (1), 9-18.
- Hobson K.A., Fisk A., Karnovsky N., Holst M., Gagnon J.-M., Fortier M.; 2002. A stable isotope ($d^{13}\text{C}$, $d^{15}\text{N}$) model for the North Water Polynya foodweb: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep Sea Res.* 49, 5131–5150.
- Hoekstra P.F., O'Hara T.M., Fisk A.T., Borga K., Solomon K.R., Muir D.C.G.; 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort–Chukchi Seas. *Environmental Pollution* 124, 509–522.
- Hoffman David J., Barnett A. Rattner, G. Allen Burton, Jr., John Cairns, Jr.; 2003. *Handbook of Ecotoxicology*. Second Edition. Lewis Publishers.
- Hopp U., Maier G.; 2005. Implication of the feeding limb morphology for herbivorous feeding in some freshwater cyclopoid copepods. *Freshwater Biology*, 50: 742-747.
- Hrbaek J.; 1962. Species composition and the amount of zooplankton in relation to the fish stock. *Rozpr. Cesk. Akad. Ved* 72 (10): 116.
- IRSA. 1984. *Catasto dei laghi italiani*. Vol. 1 - Italia settentrionale, parte 1 e 2. Quaderni IRSA, 72: 974 pp.
- Jackson LJ, Carpenter SR, Manchester-Neesvig J, Stow CA; 2001. PCB congeners in Lake Michigan coho (*Oncorhynchus kisutch*) and Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. *Environ Sci Technol* 35:856–62.
- Jardine T. D., Kidd K. A., Fisk A.T.; 2006. Applications, considerations, and sources of uncertainty when using stable isotope analysis in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7501–7511.
- Jennings S., Renones O., Marales-Nin B., Polunin N.V.C., Moranta J., Coll J.; 1997. Spatial variation in the ^{15}N and ^{13}C stable isotope composition of plants, invertebrates and fishes on Mediterranean reefs: implications for the study of trophic pathways. *Marine Ecology – Progress Series* 146: 109-116.

- Jones R.I., Grey J., Quarmby C., Sleep D.; 1998. An assessment using stable isotopes of the importance of allochthonous organic carbon sources to the pelagic food web in Loch Ness. *Proc R Soc Lond B* 265:105–111.
- Kallenborn R.; 2006. Persistent organic pollutants (POPs) as environmental risk factors in remote high-altitude ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63 (1), 100-107.
- Kerfoot, W. C., 1980. Commentary : transparency, body size and prey conspicuousness. In Kerfoot W. C. (ed.), *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. The Univ. Press of New England, Hanover, New Hampshire: 609-617.
- Kidd K.A., Schindler D.W., Hesslein R.H., Muir D.C.G.; 1995. Correlation between stable nitrogen isotope ratios and concentrations of organochlorines in biota from a freshwater food web. *The Science of the Total Environment* 160/161, 381-390.
- Kline Jr., T.C., 1999. Temporal and spatial variability of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in pelagic biota of Prince William Sound, Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56 (Suppl. 1), 94–117.
- Kling G.W., Fry B., O'Brien W.J.; 1992. Stable isotopes and planktonic trophic structure in Arctic lakes. *Ecology* 73:561–566.
- Lajtha K., Marshall J.D.; 1994. Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. In: Lajtha K, Michener RH(eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell, Oxford, pp 1–21
- Larsson P., Andersson A., Broman D., Nordback J., Lundberg E.; 2000. Persistent organic pollutants (POPs) in pelagic systems. *Ambio* 29:202-209
- Lehman J.T., Caceres C.E.; 1993. Food-web responses to species invasion by a predatory invertebrate: *Bythotrephes* in Lake Michigan. *Limnology and Oceanography*, 38, 879-891.
- Lehmann M.F., Bernasconi S.M., McKenzie J.A.; 2004. Seasonal variation of the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of particulate and dissolved carbon and nitrogen in Lake Lugano: Constraints on biogeochemical cycling in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.*, 49(2): 415-429.
- Lehman J.T., Branstrator D.K.; 1995. A model for growth, development, and diet selection by the invertebrate predator *Bythotrephes cederstroemi*. *Journal of Great Lakes Research*, 21, 610-619.
- MacDonald R. W., Barrie L.A., Bidleman T.F., Diamond M.L., Gregor D.J., Semkin R.G., Strachan W.M.J., Li Y.F., Wania F., Alaee M., Alexeeva L.B., Backus S.M., Bailey R., Bewers J.M., Gobeil C., Halsall C.J., Harner T., Hoff J.T., Jantunen L.M.M, Lockhart W.L., Mackiay D., Muir D.C.G., Pudykiewicz J., Reimer K.J., Smith J.N., Stern G.A., Schroeder W.H, Wagemann R., Bunker M.B.; 2000. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* 2000, 254, 93–234.
- Mackay, D. and A. Fraser; 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110: 375-391.
- Manca M., Galli Tognola A.; 1993. Seasonal changes in morphology of *Daphnia hyalina* Leydig in Lago Maggiore. *Hydrobiologia*, 264: 159-167.
- 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. *Limnol. Oceanogr.*, 40(4), 834-838.
- Manca M., Comoli P.; 2000. Biomass estimates of freshwater zooplankton from length-carbon regression equations. *J. Limnol.* 59, 15–18.
- Manchester-Neesvig JB, Valters K, Sonzogni WC. Comparison of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in Lake Michigan salmonids. *Environ Sci Technol.* 35:1072–7.

- Marchetti, R., R. Barone, S. Calvo, A. Lugliè, L. Naselli Flores and N. Sechi. 1992. Studies on Italian reservoirs. In: P. Guillizoni, G. Tartari and G. Giussani (Eds). Limnology in Italy. Mem. Ist. ital. Idrobiol., 50: 337-363.
- Marguillier S., van der Velde G., Dehairs F., Hemminga M.A., Rajagopal S.; 1997. Trophic relationships in an interlinked mangrove-seagrass ecosystem as traced by ^{13}C and ^{15}N . Mar Ecol Prog Ser 151: 115-121.
- 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., A. Mazumder; 2005. Temporal variation in body composition (C:N) helps explain seasonal patterns of zooplankton $\delta^{13}\text{C}$. Freshwat. Biol., 50: 502–515.
- Matthews B., A. Mazumder; 2008. Detecting trophic-level variation in consumer assemblages. Freshwater Biology 53 (10): 1942–1953.
- McCauley E.; 1984. The estimation of abundance and biomass of zooplankton samples. In: A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. IBP Handbook 17, pp. 228–265.
- McIntyre, J.K., Beauchamp, D.A., 2007. Age and trophic position dominate bioaccumulation of mercury and organochlorines in the food web of Lake Washington. Sci. Total Environ. 372, 571–584.
- Michener R.H., Schell D.M.;1994. Stable isotope ratios as tracers in marine and aquatic food webs. In: Lajtha K, Michener RH (eds) Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell, Oxford, pp. 138±157.
- Minagawa M., Wada E.; 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. Geochim. Cosmochim. Acta 48: 1135–1140.
- Moss B.; 2008. The Water Framework Directive: total environment or political compromise. Science of the Total Environment 400, 32-41.
- Moss B., Hering D., Green A.J., Aidoud A., Becares E., Beklioglu M., Bennion H., Boix D., Brucet S., Carvalho L., Clement B., Davidson T., Declerck S., Dobson M., Van Donk E., Dudley B., Feuchtmayr H., Friberg N., Grenouillet G., Hillebrand H., Hobaek A., Irvine K., Jeppesen E., Johnson R., Jones I., Kernan M., Lauridsen T.L., Manca M., Meerhoff M., Olafsson J., Ormerod S., Papastergiadou E., Penning W.E., Ptacnik R., Quintana X., Sandin L., Seferlis M., Simpon G., Triga C.,Verdonschot P., Verschoor A.M., Weyhenmeyer G. A.; 2009. Climate change and the future of freshwater biodiversity in Europe: a primer for policy makers. Freshwater Reviews 2:103–130.
- Muirhead J., Sprules W.G.; 2003. Reaction distance of *Bythotrephes longimanus*, encounter rate and index of prey risk for Harp Lake, Ontario. Freshwater Biology, 48, 135–146.
- Najjiln-Eiurley C.M., Duncan A.; 1976. A comparison of daphnid gut particles with sestonic particles present in two Thames Valley reservoirs throughout 1970 and 1971. Freshwater Biol. 6: 109-123.
- Nordström M., Aarnio K., Bonsdorff E.; 2009. Temporal variability of a benthic food web: patterns and processes in a low-diversity system. Mar Ecol Prog Ser Vol. 378: 13–26.
- Pace M.L., Cole J.J., Carpenter S.R., Kitchell J.F., Hodgson J.R., Van de Bogert M.C., Bade D.L., Kritzberg E.S., Bastviken D.; 2004. Whole-lake carbon- 13 additions reveal terrestrial support of aquatic food webs. Nature 427:240–243.
- Pel R., Hoogveld H., Floris V.; 2003. Using the hidden isotopic heterogeneity in phyto- and zooplankton to unmask disparity in trophic carbon transfer. Limnol. Oceanogr., 48 (6): 2200-2207
- Perga M.E., Gerdaux D.; 2006. Seasonal variability in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the zooplankton taxa in two alpine lakes. Actaocologica 30:69-77.
- Peterson B.J., Fry B.; 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. Attn.R ev.E col.S yst.1 9871. 8:293-320.

- Phillips D. L., Eldridge P. M.; 2006. Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. *Oecologia*, 147, 195-203
- Poma G., Volta P., Roscioli C., Bettinetti R., Guzzella L.; 2014. Concentrations and trophic interactions of novel brominated flame retardants, HBCD, and PBDEs in zooplankton and fish from Lake Maggiore (Northern Italy). *Science of the total Environment* 481, 401-408.
- Post D.M., Pace M.L., Hairstone N.G. Jr; 2000. Ecosystem size determines foodchain length in lakes. *Nature*, 405: 1047-1049.
- Post D.M.; 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3): 703-718.
- Quadroni S., 2010. POP bioaccumulation in aquatic trophic webs. PhD thesis in Environmental Sciences. University of Insubria.
- Rapporto OLL - Osservatorio dei Laghi Lombardi; 2004. Qualità delle acque lacustri in Lombardia - 1° R apporto OLL 2004. Regione Lombardia, ARPA Lombardia, Fondazione Lombardia per l'Ambiente e IRSA/CNR.
- Rau G.H., Sweeney R.E., Kaplan I.R., Mearns A.J., Young D.R.; 1981. Differences in animal ^{13}C , ^{15}N and D abundance between polluted and an unpolluted coastal site: Likely indicators of sewage uptake by a marine food web. *Estuarine Coast Shelf Sci* 13:701–707.
- Rau G.H., Takahashi T., des Marais D.J.; 1989. Latitudinal variations in plankton ^{13}C : implications for CO_2 and productivity in past oceans. *Nature* 341: 516-518.
- Rau GH, Takahashi T, des Marais DJ, Repeta DJ, and Martin JH. 1992. The relationship between ^{13}C of organic matter and $[\text{CO}_2(\text{aq})]$ in ocean surface water: data from a JGOFS site in the northeast Atlantic Ocean and a model. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56: 1413-1419.
- Richman S., Bohon S.A, Robbjns S.E.; 1980. Grazing interactions among freshwater calanoid copepods. *Am. Sot. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp.* 3: 219-233. New England.
- Regione Lombardia – D. G. Reti e Servizi di Pubblica Utilità – U. O. Regolazione del Mercato e Programmazione; 2006. Programma di Tutela e Uso delle Acque – Allegato 16. Stato di qualità ed evoluzione trofica dei laghi. Pp.249.
- Riera P., Richard P.; 1996. Isotopic determination of food sources of *Crassostrea gigas* along a trophic gradient in the estuarine bay of Marennes-Oleron. *Estuar Coast Shelf Sci* 42:347-360.
- Riera P., Richard P.; 1997. Temporal variation of $\delta^{13}\text{C}$ in particulate organic matter and oyster *Crassostrea gigas* in Marennes-Oleron Bay (France): effect of freshwater inflow. *Mar Ecol Prog Ser* 147:105.115.
- Risk M.J., Sammarco P.W., Schwarcz H.P.; 1994. Cross-continental shelf trends in $\delta^{13}\text{C}$ in coral on the Great Barrier Reef. *Mar Ecol Prog Ser* 106: 121-130.
- Risk M.J., Erdmann M.V.; 2000. Isotopic composition of nitrogen in Stomatopod (Crustacea) tissues as an indicator of human sewage impacts on Indonesian coral reefs. *Marine Pollution Bulletin*. 40: 50-58.
- Rounick J.S., Winterbourn M. J.; 1986. Stable carbon isotopes and carbon flow in ecosystems. *BioScience* 36:171–177.
- Salmaso N.; 2002. Ecological patterns of phytoplankton assemblages in Lake Garda: seasonal, spatial and historical features. *Journal of Limnology*, 61: 95-115.
- Salmaso N., Morabito G., Buzzi F., Garibaldi L., Simona M., Mosello R.; 2006: Phytoplankton as an indicator of the water quality of the deep lakes south of the Alps. *Hydrobiologia* 563: 167–187.

- Strickler J.R.; 1982. Calanoid copepods, feeding currents, and the role of gravity. *Science* 218, 158-160.
- Suter, G. W., II. 1993. *Ecological risk assessment*. Lewis Publ. Co., Boca Raton, Fl. 538 pp.
- Tieszen L.L., Boutton T.W., Tesdahl K.G., Slade N.A.; 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*. 57, 32– 37.
- Thomann R.V., Connolly J.P.; 1984. Model of PCB in the Lake Michigan lake trout food chain. *Environ. Sci. Technol* 18, 65-71.
- Thomann R.V.; 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23:699-707
- UNEP, Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs), UNEP, Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs)<http://chm.pops.int/>, 2010.
- Vander Zanden M.J., Rasmussen J.B.; 1999. Primary consumer $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80, 1395-1404.
- Villa S., Bizzotto E.C., Vighi M.; 2011. Persistent organic pollutant in a fish community of a sub-alpine lake. *Environ. Pollut.* 159, 932–939.
- 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. *J. Limnol.* 70 (2), 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. *The global journal of science frontier research*, 13 no 9-d.
- Visconti A., Volta P., Fadda A., Di Guardo A., Manca M.; 2014. Seasonality, littoral vs. pelagic carbon sources and stepwise ^{15}N -enrichment of pelagic food web in a deep subalpine lake: the role of planktivorous fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71(3): 436-446.
- Visconti A.; 2012. Trophic diversity and carbon sources fueling the pelagic food web on a deep, subalpine lake: the role of seasonality studied with stable isotope analysis. PhD thesis in Environmental Sciences. University of Insubria.
- Vizzini S., Mazzola A.; 2002. Stable carbon and nitrogen ratios in the sand smelt from a Mediterranean coastal area: feeding habits and effect of season and size on feeding strategy. *J. Fish Biol* 60:1498–1510.
- Vizzini S., Mazzola A.; 2003. Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal lagoon. *Marine Biology*. 142: 1009–1018.
- Volta P., Tremolada P., Neri M.C., Giussani G., Galassi S.; 2009. Age-dependent bioaccumulation of organochlorine compounds in fish and their selective biotransformation in top predators from Lake Maggiore (Italy). *Water Air Soil Pollut.* 197(1-4):193-209.
- Vuorio K., M. Meili, J. Sarvala; 2006. Taxon-specific variation in the stable isotopic signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of lake phytoplankton. *Freshwat. Biol.*, 51: 807-822.
- Wada, E. 2009. Stable $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope ratios in aquatic ecosystems. *Proc. Jpn Acad.*, ser B, 85: 98-107.
- Walters D.M., Fritz K.M., Johnson B.R., Lazorchak J.M., McCormico F.H.; 2008. Influence of trophic position and spatial location on polychlorinated biphenyl (PCB) bioaccumulation in a stream food web. *Environmental Science & Technology* 42, 2316e2322.
- Walters D.M., Mills M.A., Cade B.S., Burkard L.P.; 2011. Trophic magnification of PCBs and its relationship to the octanol–water partition coefficient. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3917–3924.

- Williamson, Butler N.M.; 1986. Predation on rotifers by the suspension-feeding calanoid copepod *Diaptomus pallidus*. *Limnol. Oceanogr.* 31: 393-402.
- WHO; 1979. DDT and its derivatives, vol. 9. Geneva World Health Organisation.
- Woodland R. J., Rodríguez M.A., Magnan P., Glémet H., Cabana G.; 2012. Incorporating temporally dynamic baselines in isotopic mixing models. *Ecology*, 93, 131–144.
- Yoshioka T., Wada E., Hayashi H.; 1994. A stable isotope study on seasonal food web dynamics in a eutrophic lake. *Ecology* 75: 835-846.
- Zaret T.M.; 1980. Predation and freshwater communities. New Haven: Yale University Press: 187pp.
- Zieman J. C., Macko S. A., Mills A.L.; 1984. Role of seagrasses and mangroves in estuarine food webs: temporal and spatial changes in stable isotope composition and amino acid content during decomposition. *Bulletin of Marine Science*, 35(3): 38-392.
- 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. *Limnol. Oceanogr.*, 39(5): 1030-1043.