

Applicazione di tecniche isotopiche per lo studio ed il monitoraggio delle reti trofiche marine





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Applicazione di tecniche isotopiche per lo studio ed il monitoraggio delle reti trofiche marine

**QUADERNI
LABORATORIO**

9/2025

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, QUADERNI Laboratorio 9/2025
ISBN 978-88-448-1247-8

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina: Alessia Marinelli - Ufficio Grafica ISPRA

Foto di copertina: campionamento fitoplancton – Dr. Luisa Patrolecco (CNR-ISP)

Coordinamento pubblicazione online:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

Marzo 2025

Autori

Daniela Berto (ISPRA), Federico Rampazzo (ISPRA), Claudia Gion (ISPRA), Malgorzata Marcelina Formalewicz (ISPRA), Seta Noventa (ISPRA), Sasa Raicevich (ISPRA), Emanuela Spada (ISPRA), Patrizia Borrello (ISPRA), Maila Severini (ISPRA), Roberta De Angelis (ISPRA), Nicoletta Calace (ISPRA)

Si ringraziano per le attività di campionamento

ARPA Friuli-Venezia Giulia: Alenka Goruppi, Maria Facilone

ARPA Veneto: Sara Ancona, Andrea Bartenor. Daniel Fassina, Angela Zampieri

ARPAE Emilia-Romagna: Margherita Benzi, Emanuela Fiori, Monica Raccagni, Cristina Mazziotti

ARPA Molise: Antonietta Cioffi, Concetta Tamburro

ARPA Marche: Gianluca De Grandis, Federico Biondi. Domenicantonio Iannolo

ARTA Abruzzo: Cristina Ingarao, Emanuela Scamosci.

ARPA Puglia: Maria Rosaria Vadrucci, Stefania D'Arpa, Eugenio Daversa, Giuseppe Alfonso

ARPA Basilicata: Teresa Trabace, Annunziata Marraudino

ARPA Calabria: Laura Pirrera, Francesco Megna

ARPA Sicilia: Alessandro Aglialoro, Francesca Galfo, Eleonora Macaluso, Pietro Vitale

ARPA Campania: Rosario Carbone, Andrea Celentano, Fabrizio D'Apice, Dario Monaco, Ciro Pignalosa, Anna Montanino, Silvestro Lubrano Lavadera, Salvatore De Filippo, Filippo Lanci, Maria Grazia Aquila

ARPA Lazio: Andrea Bonifazi, Riccardo Caprioli, Salvatore De Bonis, Emiliano Savini

ARPA Toscana: Enrico Cecchi, Ilaria Dalle Mura, Cecilia Mancusi, Giacomo Marino
Andrea Nicastro, Michela Ria

ARPA Liguria: Alessandro Dagnino, Marco Luigi Fravega, Federico Gaino, Valentina Giussani, Paolo Moretto, Veronica Parodi, Claudia Riccio

ARPA Sardegna: Donatella Decandia, Paolo Fiori, Valeria Manca, Stefano Muredda
Andrea Zedde, Antonio Giovanni Mocci, Maryam Motavalian

Prefazione

Grazie alla sua versatilità, l'analisi degli isotopi stabili ha rivoluzionato numerosi settori scientifici e applicativi, tra cui la geologia, l'idrologia, le scienze ambientali, la sicurezza alimentare, lo studio del patrimonio artistico e la diagnostica medica. In particolare, in ambito marino, questa tecnica di analisi si configura come potente strumento per indagare le reti trofiche e fornire un prezioso supporto per una gestione mirata delle risorse marine. L'analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto fornisce informazioni cruciali sulle interazioni tra le specie e sui loro livelli trofici. Inoltre, questa tecnica è utile nell'attuazione delle politiche dell'Unione Europea concernenti l'ambiente marino, quali la Direttiva Nitrati (91/676/CEE), la Direttiva Acque Reflue (2024/3019/CE), la Direttiva Quadro sulle Acque (2000/60/CE) ed in particolare, la Direttiva Quadro sulla Strategia Marina (2008/56/CE o Marine Strategy Framework Directive - MSFD), volta alla protezione e conservazione della biodiversità e degli ecosistemi marini.

Il descrittore 4 della Direttiva Quadro sulla Strategia Marina, denominato "Reti trofiche marine" infatti richiede che *"tutti gli elementi della rete trofica marina, nella misura in cui siano noti, siano presenti con normale abbondanza e diversità e con livelli in grado di assicurare l'abbondanza a lungo termine delle specie e la conservazione della loro piena capacità riproduttiva"*.

In questo ambito, secondo gli standard metodologici della Unione Europea, è necessario valutare lo stato delle diverse gilde trofiche (raggruppamenti di specie aventi simile posizionamento trofico); l'utilizzo degli isotopi stabili permette di identificare in modo più efficace e sperimentale il ruolo trofico delle singole specie. In questo documento si presentano i risultati di alcune applicazioni preliminari delle analisi isotopiche nel contesto di uno studio sperimentale incentrato sulla parte bassa della rete trofica marina, finalizzato alla comprensione delle relazioni tra le pressioni ambientali e i relativi impatti sui primi livelli trofici.

Gli autori

INDICE

1	Introduzione	5
1.1	Rete trofica marina	6
1.2	Applicazioni isotopiche	9
1.2.1	Definizione del livello trofico	12
2	Materiali e metodi	15
2.1	Campionamento	15
2.1.1	Seston	19
2.1.2	Zooplancton	19
2.2	L'analisi degli isotopi stabili (SIA)	20
2.3	Modelli bayesiani	21
3	Risultati e discussione	23
3.1	Caratterizzazione isotopica del seston e dello zooplancton	25
3.2	Modelli concettuali	31
3.2.1	Apporzionamento isotopico del seston e mesozooplancton	36
4	Classificazione ed abbondanza del fito e zooplancton	40
4.1	Fitoplancton	40
4.2	Zooplancton	44
5	Conclusioni	49
6	Bibliografia	51

1 Introduzione

Le tecniche isotopiche, sviluppate all'inizio degli anni '80 in Francia, hanno trovato ampia applicazione in tutti i settori della ricerca scientifica. Attualmente, stanno vivendo una notevole espansione grazie all'introduzione di strumenti altamente sofisticati. Questa metodologia d'indagine si rivela versatile e innovativa, con applicazioni che spaziano dagli studi geologici e idrogeologici a tematiche ambientali e alla valutazione dei diversi tipi di inquinamento. Inoltre, si applica anche nell'individuazione di sofisticazioni alimentari, salvaguardia del patrimonio artistico e diagnostica medica.

L'analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto può avere un'applicazione pratica nell'attuazione delle politiche della Unione Europea, come ad esempio la Direttiva Nitrati (Direttiva 91/676/CEE), la Direttiva sulle Acque Reflue (Direttiva 91/271/CEE), la Direttiva Quadro sulle Acque (WFD, Direttiva 2000/60/CE) e la Direttiva Quadro sulla Strategia Marina (MSFD, Direttiva 2008/56/CE).

In particolare, nell'ambito della MSFD, il descrittore 4 prevede che "tutti gli elementi della rete trofica marina siano presenti in quantità e diversità normali, con livelli in grado di assicurare l'abbondanza a lungo termine delle specie e la conservazione della loro piena capacità riproduttiva."

In questo contesto, l'utilizzo degli isotopi stabili può facilitare la comprensione e la gestione degli ecosistemi marini attraverso la valutazione della complessità delle reti trofiche e della loro struttura e funzionamento.

Le applicazioni isotopiche consentono di:

- definire i gruppi funzionali di specie aventi caratteristiche trofiche affini negli ecosistemi marini mediante la loro caratterizzazione isotopica, essenziale per comprendere le interazioni tra specie diverse e come queste interazioni influenzino la salute dell'ecosistema;
- caratterizzare il livello trofico fornendo informazioni sul posizionamento delle specie nella rete trofica. Le specie di livello trofico superiore tendono ad avere rapporti isotopici distintivi rispetto a quelle di livello inferiore. Tale informazione aiuta a raggruppare le specie in gruppi trofici omogenei, facilitando così l'analisi delle dinamiche ecologiche;
- valutare i cambiamenti di dieta degli organismi nel tempo, nello spazio e con la crescita. Alcune specie, ad esempio, possono cambiare le loro abitudini alimentari man mano che crescono, e queste variazioni possono essere tracciate attraverso i rapporti isotopici.

In questo contesto, è stato effettuato uno studio sperimentale focalizzato sulla bassa rete trofica marina, con particolare attenzione al seston, ovvero il materiale organico

e inorganico sospeso nell'acqua. Uno degli obiettivi dello studio è quello di caratterizzare i livelli trofici più bassi della rete trofica e di esplorare le relazioni tra le pressioni ambientali e gli impatti su questi elementi della rete trofica.

Le principali fasi del progetto hanno incluso:

- la raccolta di campioni di seston (20-200 μm) e di meso-zooplankton (>200 μm) per studiarne i rapporti isotopici;
- l'analisi preliminare dei dati isotopici al fine di ipotizzare le interazioni trofiche;
- l'elaborazione dei dati mediante l'applicazione dei modelli bayesiani di mixing isotopico per stimare quali-quantitativamente i contributi alla dieta delle fonti individuate;
- la valutazione dei risultati e delle possibili applicazioni delle conoscenze acquisite per l'implementazione delle politiche europee in ambito marino.

Le indagini sulla parte bassa della rete trofica offrono l'opportunità di colmare alcune lacune conoscitive riguardanti gli aspetti trofici di gruppi chiave nei mari italiani, fornendo indicazioni sulle interazioni e le modalità di alimentazione delle specie nel loro habitat naturale.

I dati raccolti possono essere impiegati per sviluppare modelli ecologici più precisi e complessi, in grado di prevedere le risposte degli ecosistemi marini a diversi fattori di pressione, quali ad esempio inquinamento, cambiamento climatico e attività di pesca.

I risultati ottenuti potranno inoltre supportare la definizione di strumenti di gestione che contemplino elementi di struttura e funzionamento delle reti trofiche, con il fine della salvaguardia della salute degli ecosistemi marini, ed assicurando che le politiche ambientali si basino su solide evidenze scientifiche.

In sintesi, l'integrazione delle tecniche isotopiche nell'analisi delle reti trofiche marine rappresenta un approccio innovativo e uno strumento potente per migliorare la comprensione degli ecosistemi marini. Le informazioni ottenute non solo aiutano a caratterizzare i gruppi funzionali da un punto di vista ecologico e a monitorare le variazioni nella dieta ma, sono anche fondamentali per definire gli strumenti di gestione e di protezione ambientale, contribuendo così ad un uso sostenibile delle risorse marine.

1.1 Rete trofica marina

In ecologia si parla di rete trofica marina riferendosi all'insieme delle relazioni alimentari (ovvero trofiche) tra gli organismi presenti in un ecosistema marino (Fig 1.1, Tab 1.1).

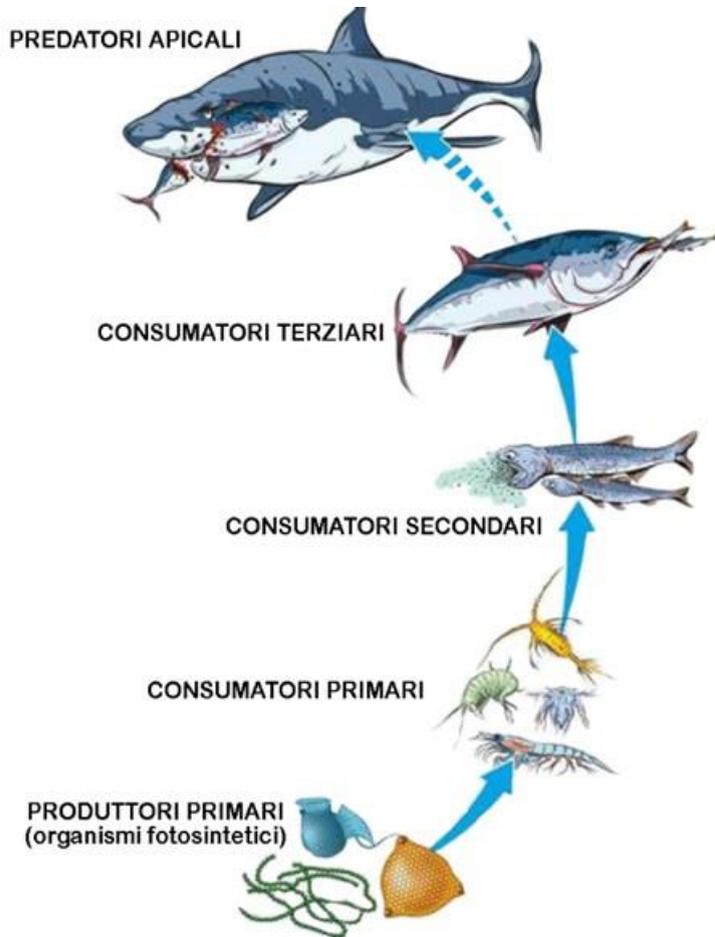
La rete trofica può essere rappresentata in modo semplificato considerando una serie di "livelli trofici", a partire dai **produttori primari**, che trasformano l'energia solare in biomassa attraverso la fotosintesi, e rappresentano la parte più bassa della rete trofica. Nell'ecosistema marino i produttori primari sono il fitoplancton, le piante acquatiche, le alghe ed alcuni batteri fotosintetici ed il loro livello trofico è associato al valore 1.

Questi produttori sono predati dai cosiddetti **consumatori primari**, come lo zooplancton e altri organismi erbivori, cui si associa il livello trofico pari a 2, che a loro volta vengono predati dai **consumatori secondari**, livello trofico pari a 3, e **terziari**, tra cui pesci carnivori, cefalopodi e altri predatori di medio livello (meso predatori).

Al vertice della rete trofica si trovano i **predatori apicali**, come squali, grandi pesci pelagici (es. tonni) e mammiferi marini, che non hanno predatori naturali, che possono presentare il livello trofico maggiore di 5.

Uno dei principi su cui si basa la rete trofica marina si basa sull'approccio semplicistico «pesce grande mangia pesce piccolo».

Fig 1.1 – Rappresentazione schematica di una rete trofica marina



Tab 1.1 – Classificazione del plancton

SESTON	FITOPLANCTON	ZOOPLANCTON
Il seston comprende l'insieme delle particelle viventi (bioseston) e non viventi (abioseston) sospese in acqua.	Il fitoplancton è composto dagli organismi autotrofi, cioè da quegli organismi in grado di sintetizzare la sostanza organica a partire dalle sostanze inorganiche disciolte, utilizzando la radiazione solare come fonte di energia. Il fitoplancton contribuisce quindi in modo indispensabile al ciclo globale del carbonio fungendo da fondamento primario delle reti trofiche marine. I costituenti maggiori del fitoplancton in ambiente marino sono diatomee, cianobatteri e dinoflagellati.	Lo zooplancton è l'insieme dei piccoli animali che fluttuano nella corrente. Questa categoria di animali include il krill, i piccoli gamberetti, le meduse, i cirripedi, i molluschi e le larve di alcuni pesci. Essi si cibano esclusivamente di organismi autotrofi come il fitoplancton, alghe e microrganismi. Sono quindi nel secondo livello della rete trofica e rappresentano il substrato alimentare per i livelli più alti.

1.2 Applicazioni isotopiche

Negli ultimi decenni lo studio degli isotopi stabili ha permesso di acquisire una comprensione più approfondita della posizione trofica e delle dinamiche alimentari degli organismi marini fornendo nuove evidenze sui substrati alimentari utilizzati dai produttori primari e dai diversi organismi fino ai livelli più alti delle reti trofiche, rappresentati dai predatori marini apicali.

Attraverso l'analisi degli isotopi stabili, è possibile tracciare il trasferimento di energia e nutrienti lungo le reti trofiche, facendo luce sul flusso di materia ed energia all'interno degli ecosistemi acquatici marini (Fry, 2006).

Le informazioni che si possono ottenere dai rapporti tra gli isotopi stabili del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) e dell'azoto ($\delta^{15}\text{N}$) (Fig 1.2a, b) si rivelano particolarmente preziose anche per comprendere le relazioni alimentari e le strutture trofiche delle comunità di fitoplancton e zooplancton, consentendo di dettagliare i primi due livelli trofici che stanno alla base delle reti trofiche degli ecosistemi marini e di rivelare le complesse dinamiche del trasferimento di energia (Post, 2002).

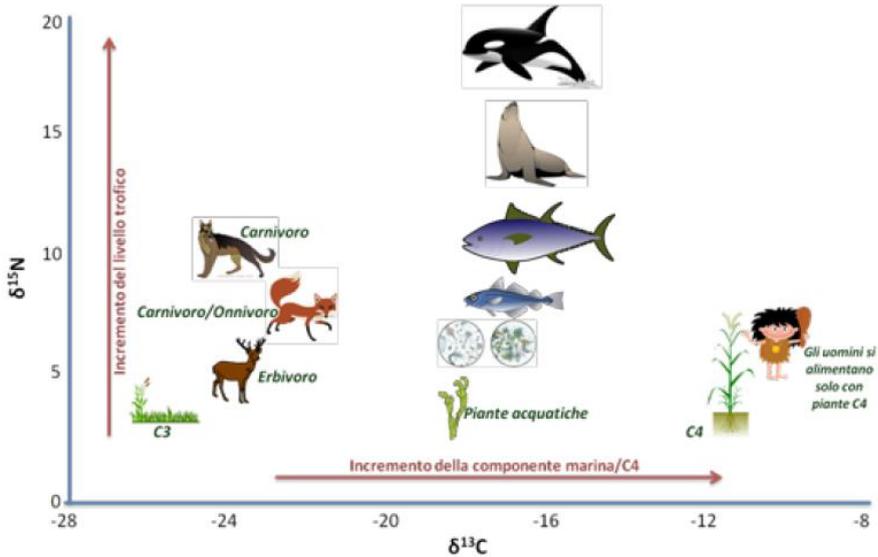
Fattori ambientali, quali ad esempio il tipo di sostanza organica disponibile, la quantità di nutrienti, i cambiamenti climatici, influiscono sulla fisiologia del fitoplancton e zooplancton e sulle loro interazioni lungo la rete trofica. Ad esempio, è stato dimostrato che l'incremento dell'immissione di nutrienti da attività agricole e/o industriali può influenzare la composizione e le dinamiche trofiche, producendo

variazioni dei valori isotopici caratteristici del primo livello trofico e variazioni dei fattori di arricchimento isotopico nei livelli successivi. La firma isotopica degli organismi del primo livello trofico riflette l'impronta isotopica delle diverse fonti di carbonio e azoto utilizzate come substrato per la crescita. Il primo livello della rete trofica risulterà, pertanto, fortemente influenzato dai diversi apporti, sia autoctoni che alloctoni di questi due macronutrienti (Post, 2002). Proseguendo lungo la rete trofica si registra un incremento dell'isotopo pesante rispetto a quello leggero, ad esempio ^{15}N e ^{13}C rispettivamente per azoto e carbonio (quindi un graduale incremento dei valori dei rapporti isotopici $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$), caratteristico dei rapporti "preda-predatore". Tale incremento viene detto "fattore di arricchimento" e viene normalmente quantificato in 3.4 ‰ per il $\delta^{15}\text{N}$ e in un range tra 0 e 1 ‰ per il $\delta^{13}\text{C}$, nel passaggio da un livello trofico al successivo (Post, 2002). L'arricchimento nei tessuti dell'isotopo pesante è dovuto al fatto che l'isotopo leggero risulta essere coinvolto preferenzialmente nelle reazioni biochimiche.

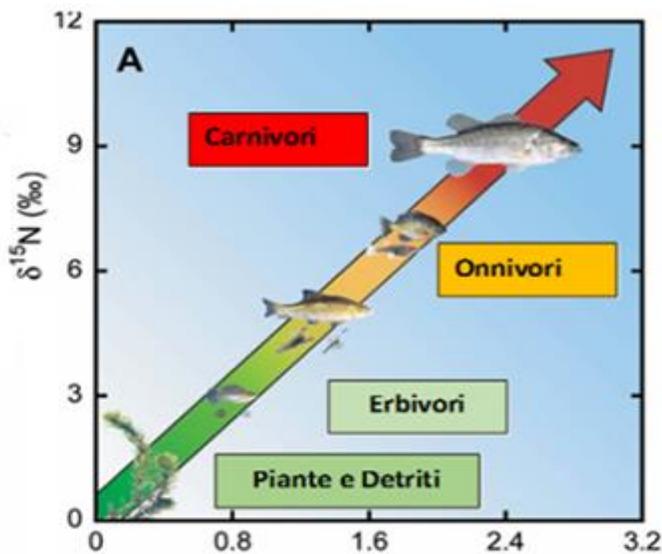
Nel caso del $\delta^{13}\text{C}$, le variazioni nella composizione isotopica possono aiutare la quantificazione delle differenti fonti di cibo in quanto sono nettamente distinguibili le fonti naturali (carbonio fotosintetico è a sua volta distinguibile dal carbonio derivante da mineralizzazione della componente organica) dalle fonti di origine antropica come, ad esempio, input di reflui civili trattati, che a loro volta possono essere differenziati dai reflui non trattati.

Fig 1.2 – a) Variazioni dei valori dei rapporti tra gli isotopi stabili del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) e dell'azoto ($\delta^{15}\text{N}$) in diversi organismi della rete trofica terrestre e marina. – b) Variazioni dei valori dei rapporti tra gli isotopi stabili dell'azoto $\delta^{15}\text{N}$ in relazione al fattore di arricchimento lungo la rete trofica marina (da Berto et al., 2018, 2018bis)

a)



b)



Ciò che avviene quindi in un ecosistema è la somma di complesse reazioni chimiche mediate da organismi viventi con diversa funzione e da fattori chimico-fisici. L'analisi isotopica permette di risolvere la complessità di tale sistema tenendo in considerazione il cosiddetto "frazionamento isotopico" basato sulla variazione dei rapporti isotopici tra reagenti e prodotti in una reazione metabolica. Il frazionamento isotopico che caratterizza i processi metabolici consente la comprensione delle sequenze di reazione implicate nella fisiologia degli organismi vegetali e della funzione e posizione di organismi animali nella rete trofica.

1.2.1 Definizione del livello trofico

Il livello trofico rappresenta la posizione degli organismi all'interno delle reti trofiche. I livelli trofici dovrebbero essere generalmente codificati con una successione di numeri interi che però talvolta si complica in quanto gli organismi possono utilizzare come fonte di cibo livelli trofici differenti. Per stimare il livello trofico di un organismo con una buona approssimazione, oltre alla determinazione della sua impronta isotopica, va pertanto analizzata l'impronta isotopica dei produttori primari e/o dei consumatori primari, a cui rispettivamente sono assegnati i livelli trofici 1 e 2.

Il calcolo per la stima del livello trofico di un consumatore secondario utilizza le misure del $\delta^{15}\text{N}$, seguendo l'equazione di seguito riportata (McCutchan et al., 2003; Post, 2002):

$$\text{TL} = \lambda + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore secondario}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{base}}) / \Delta n$$

dove TL è il livello trofico, λ è la posizione trofica dell'organismo utilizzata per stimare $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ (ad esempio, $\lambda=1$ per i produttori primari, $\lambda=2$ per i produttori secondari), $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore secondario}}$ viene misurato direttamente e Δn è l'arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ per livello trofico, normalmente assunto in 3.4 ‰.

Quando si confrontano gli ecosistemi, i valori $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ di un organismo da soli forniscono poche informazioni sulla sua posizione trofica assoluta o sulla fonte ultima di carbonio. Questo perché vi sono notevoli differenze tra gli ecosistemi nei valori di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ della base delle fonti alimentari ($\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{base}}$) da cui gli organismi traggono azoto e carbonio. Di conseguenza senza stime adeguate di $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ e $\delta^{13}\text{C}_{\text{base}}$ in ciascun sistema, non è possibile determinare se la variazione di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ di un organismo rifletta cambiamenti nella struttura della rete trofica e nel flusso di carbonio e azoto, o semplicemente una variazione dei valori di base.

Utilizzo degli isotopi stabili nel monitoraggio delle sostanze pericolose nel biota secondo le raccomandazioni della Commissione Europea (Decisione 32/2014 e D.lgs 172/2015)

La **Decisione 32/2014** della Commissione Europea e il **D.lgs 172/2015** sono documenti legati alla gestione e monitoraggio delle sostanze pericolose nell'ambiente, in particolare nel biota, che hanno l'obiettivo di garantire la protezione degli ecosistemi e della salute umana. Mentre la Decisione 32/2014 stabilisce le linee guida per il monitoraggio delle sostanze chimiche nell'ambiente, il D.Lgs. 172/2015 integra queste linee guida nell'ordinamento giuridico italiano, adattandole alle specificità del contesto nazionale.

Principali aspetti della Decisione 32/2014:

- definizione degli **standard di qualità ambientale (SQA)** per le sostanze chimiche prioritarie;
- definizione dei **livelli trofici (TL)** da monitorare nel biota per applicare gli SQA, con particolare attenzione alla rete trofica pelagica;
- raccomandazioni per correggere gli **SQA** nel biota in funzione dei livelli trofici delle specie campionate e della normalizzazione dei dati in base al contenuto lipidico o al peso secco degli organismi;
- indicazioni su come applicare gli **SQA** nel biota in relazione ai diversi livelli trofici, utilizzando, per esempio, **Trophic Magnification Factors (TMF)** per misurare la **biomagnificazione** delle sostanze chimiche.

La determinazione del **TL** tramite l'analisi degli isotopi stabili consente di ottenere un livello di dettaglio superiore rispetto alle informazioni fornite dalla banca dati FISHBase, soprattutto quando si considerano reti trofiche specifiche (Wan et al. 2007; Nfon et al. 2008; Takeuchi et al., 2009). Pertanto, questa metodologia può essere utilizzata in modo efficace per valutare il **bioaccumulo** e la **biomagnificazione** delle sostanze chimiche lungo le diverse reti trofiche.

Il **TMF** è strettamente legato agli **SQA**, poiché il suo valore indica il rischio di **biomagnificazione** di una sostanza lungo la catena alimentare. Se una sostanza chimica ha un **TMF elevato**, significa che la concentrazione della sostanza aumenta significativamente nei predatori apicali, rendendola più pericolosa per le specie a livelli trofici superiori.

Il **TMF** è calcolato come segue:

$$TMF = C_{\text{predatore}} / C_{\text{preda}}$$

Dove:

- **C_{predatore}** è la concentrazione della sostanza chimica nel predatore (specie a livello trofico superiore).

- C_{preda} è la concentrazione della sostanza chimica nella preda (specie a livello trofico inferiore).

Di conseguenza, gli **SQA** nel biota devono tener conto di questo fenomeno. Ad esempio, se una sostanza ha un alto **TMF**, potrebbe essere necessario fissare un valore più basso per **SQA** nel biota, per proteggere gli organismi che si trovano ai vertici della catena alimentare, come i predatori marini o gli uccelli acquatici. Al contrario, se il **TMF** è basso, potrebbe essere sufficiente un livello di protezione meno stringente.

Per convertire gli **SQA_{biota}** in **SQA_{biota,x}** "equivalente protettivi", rendendoli applicabili a diversi livelli trofici, per le reti trofiche pelagiche sia di acque dolci che marine, si utilizza l'equazione di seguito riportata:

$$SQA_{biota,x} = SQA_{biota} / TMF^{(4-TL(x))}$$

dove **x** è il taxon di biota monitorato per il quale deve essere stabilito un **SQA_{biota,x}** equivalentemente protettivo, e **SQA_{biota}** è il valore SQA esistente e consolidato.

Quando si considerano i contaminanti nei pesci, nell'ottica del consumo umano, si stima ragionevolmente che i pesci a livello trofico 4 siano le specie principalmente consumate dall'uomo.

Nel presente lavoro viene effettuata la caratterizzazione isotopica dei primi livelli della rete trofica, seston e zooplancton, nelle tre sottoregioni considerate nell'ambito della Strategia Marina: Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS) con lo scopo di definire in via preliminare sia le baseline isotopiche da utilizzare per la stima dei livelli trofici degli organismi che compongono le reti trofiche, che per valutare il contributo percentuale delle diverse fonti autoctone ed alloctone di macronutrienti (carbonio ed azoto) alla composizione del seston e dello zooplancton.

Le attività di monitoraggio si sono svolte nell'ambito dell'Accordo Quadro sulla Strategia Marina (MSFD, Marine Strategy Framework Directive, Direttiva 2008/56/CE) relativamente al Descrittore 4 (D4-02), al fine di caratterizzare la firma isotopica di specie marine e della baseline isotopica nella rete trofica finalizzata alla assegnazione delle specie alle diverse giilde trofiche.

2 Materiali e metodi

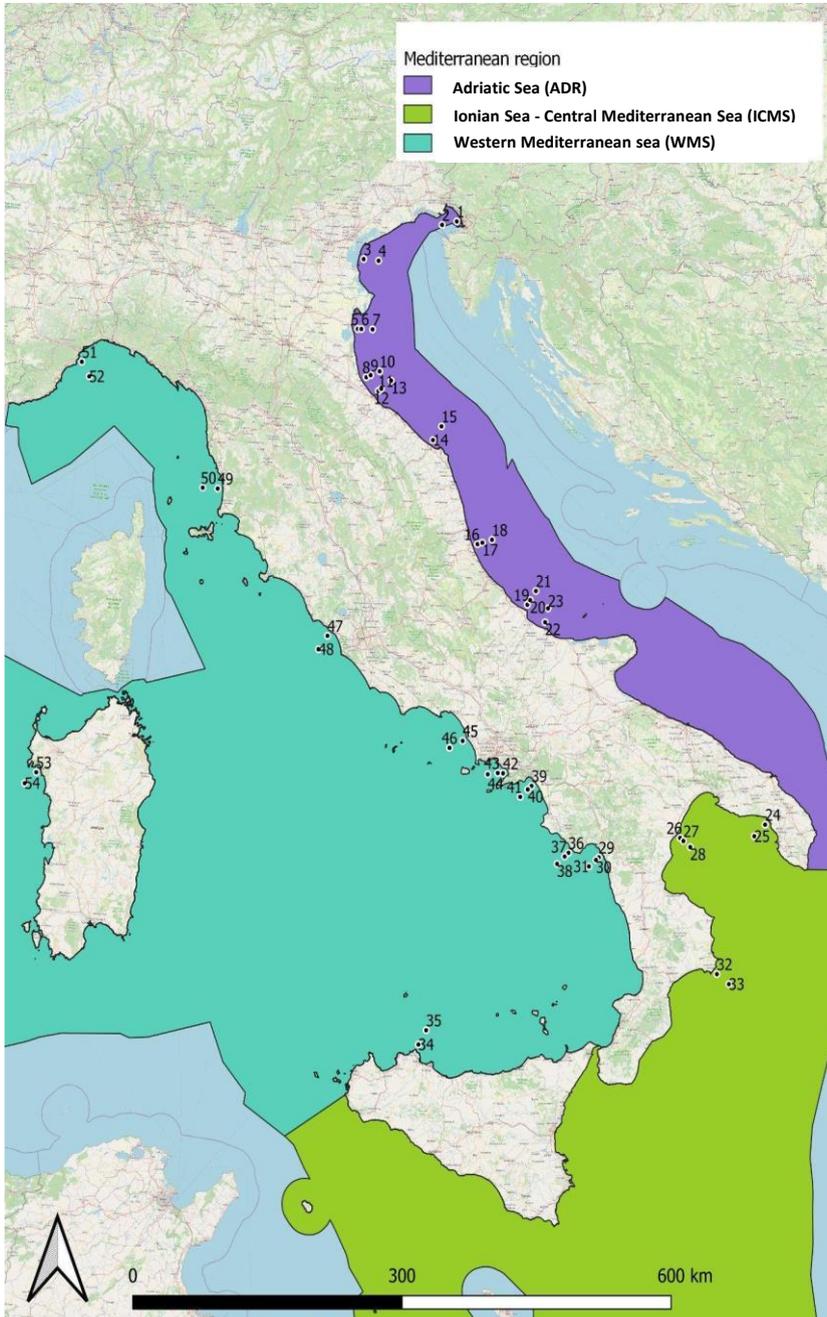
2.1 Campionamento

Il campionamento del seston e dello zooplancton è stato effettuato dalle Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA) nelle tre sottoregioni considerate nell'ambito della MSFD: ADR, ICMS e WMS quest'ultimo inteso principalmente come Mar Tirreno per Italia. I prelievi dei campioni sono stati effettuati a 3, 6 e 12 miglia nautiche dalla costa, in quattro periodi stagionali (Tab 2.1) nel corso dell'anno 2021. Nella Figura 2.1 sono riportate le tre sottoregioni e le differenti stazioni di campionamento.

In Fig 2.2 viene riportato il numero di determinazioni analitiche isotopiche effettuate per $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ per le matrici seston e zooplancton nelle diverse sottoregioni e stagioni.

Il numero di determinazioni analitiche nelle sottoregioni ADR e WMS (Fig 2.2) è considerato sufficiente al fine di ottenere delle elaborazioni statistiche preliminari sufficientemente robuste per identificare pattern generali, mentre la numerosità per la sottoregione ICMS non è stata ritenuta sufficiente. Tuttavia, le elaborazioni dei dati isotopici presentate in questo quaderno sono da considerarsi preliminari, infatti sono in fase di ulteriore integrazione in tutte le sottoregioni, ed in particolare per ICMS, nell'ambito del ciclo di monitoraggi MSFD 2024-2026, nel sottoprogramma D04-02.

Fig 2.1 – Distribuzione geografica delle stazioni di campionamento nelle tre sottoregioni considerate: Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)

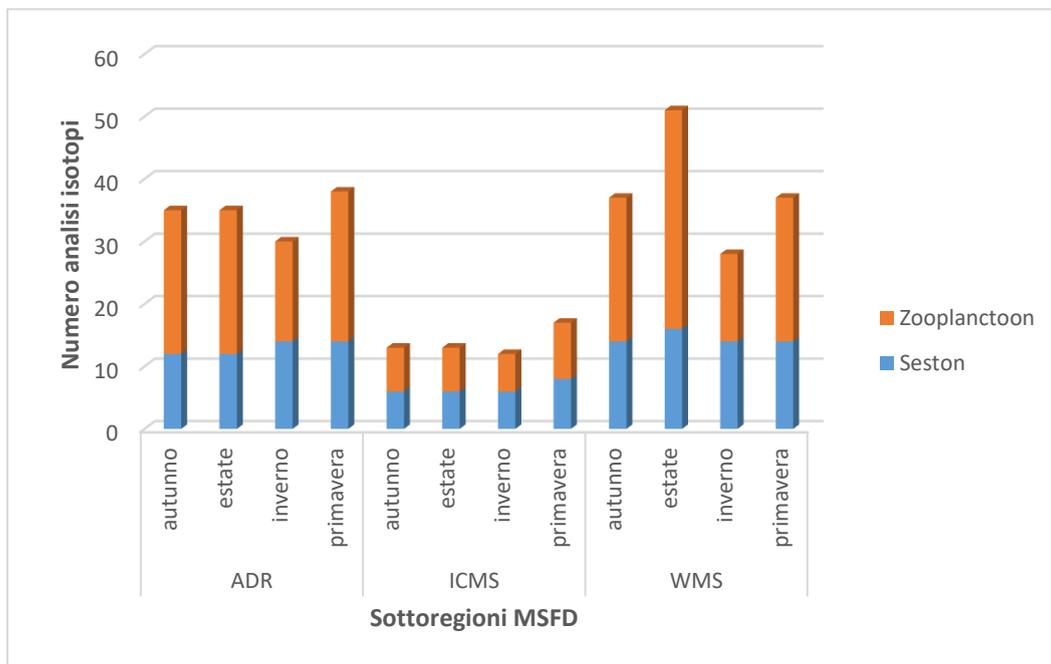


Tab 2.1 – Dettagli stazioni di campionamento: numero identificativo della stazione riportato sulla mappa in figura 2.1 (n), codice stazione (NationalStationID), regione, sottoregione MSFD

n	Codice stazione (NationalStationID)	Regione	Sottoregioni MSFD
1	ITA06SMTS1	Friuli Venezia Giulia	ADR
2	ITA06SMTS3	Friuli Venezia Giulia	ADR
3	50530	Veneto	ADR
4	70530	Veneto	ADR
5	604	Emilia-Romagna	ADR
6	1004	Emilia-Romagna	ADR
7	2004	Emilia-Romagna	ADR
8	614	Emilia-Romagna	ADR
9	1014	Emilia-Romagna	ADR
10	2014	Emilia-Romagna	ADR
11	617	Emilia-Romagna	ADR
12	1017	Emilia-Romagna	ADR
13	2017	Emilia-Romagna	ADR
14	1E_MS_ES_3	Marche	ADR
15	1E_MS_ES_12	Marche	ADR
16	1_ABR_GU04	Abruzzo	ADR
17	1_ABR_GU05	Abruzzo	ADR
18	1_ABR_GU06	Abruzzo	ADR
19	1_ABR_VA13	Abruzzo	ADR
20	1_ABR_VA14	Abruzzo	ADR
21	1_ABR_VA15	Abruzzo	ADR
22	R14001_B2_6KM	Molise	ADR
23	R14001_B2_20KM	Molise	ADR
24	8PC02bis	Puglia	ICMS
25	8PC04	Puglia	ICMS
26	M1_SINNI_1	Basilicata	ICMS
27	M1_SINNI_2	Basilicata	ICMS
28	M1_SINNI_3	Basilicata	ICMS
29	M1_MARATEA_1	Basilicata	WMS
30	M1_MARATEA_2	Basilicata	WMS
31	M1_MARATEA_3	Basilicata	WMS
32	M1T2A	Calabria	ICMS
33	M1T2C	Calabria	ICMS
34	CGM1A	Sicilia	WMS
35	CGM1C	Sicilia	WMS
36	M1CL3	Campania	WMS
37	M1CL6	Campania	WMS
38	M1CL12	Campania	WMS

39	M1GS3	Campania	WMS
40	M1GS6	Campania	WMS
41	M1GS12	Campania	WMS
42	M1GN3	Campania	WMS
43	M1GN6	Campania	WMS
44	M1GN12	Campania	WMS
45	M1FV3	Campania	WMS
46	M1FV12	Campania	WMS
47	IT_m1rm03_3	Lazio	WMS
48	IT_m1rm03_12	Lazio	WMS
49	SMR_CCE_WA1	Toscana	WMS
50	SMR_CCE_WA5	Toscana	WMS
51	VAD030	Liguria	WMS
52	VAD120	Liguria	WMS
53	0192-MS01200_TR03	Sardegna	WMS
54	0192-MS01200_TR12	Sardegna	WMS

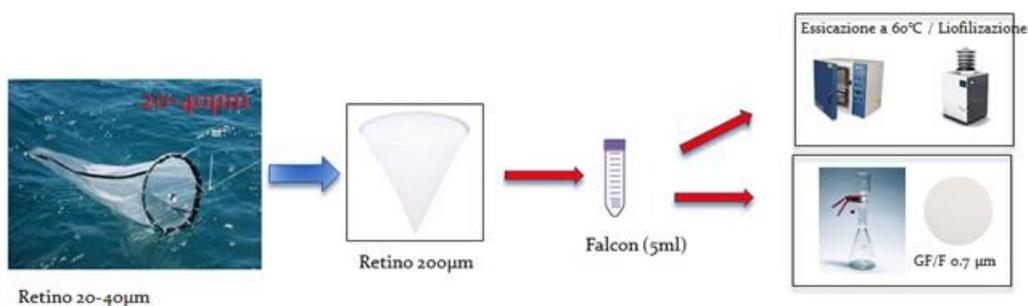
Fig 2.2 – Rappresentazione grafica della numerosità delle determinazioni analitiche isotopiche ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) nelle matrici seston (blu) e zooplancton (arancione) suddivise per bacino e stagione. Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)



2.1.1 Seston

Il campionamento del seston è stato effettuato preferenzialmente nella zona fotica ed in corrispondenza del picco massimo di fluorescenza, mediante un retino con vuoto di maglia di 20-40 μm . Il campione è stato poi separato dalla componente zooplanctonica mediante filtrazione su retino con vuoto di maglia 200 μm , quindi refrigerato e trasportato in laboratorio. La quantità di campione necessario per l'analisi è circa 5 ml. In laboratorio il campione refrigerato è stato essiccato in stufa termostatica a 60 °C, o liofilizzato previo congelamento. Nei casi in cui non è stato possibile effettuare l'essiccazione/ liofilizzazione, il campione è stato conservato a -20 °C e successivamente filtrato su filtri GF/F pretrattati a 450 °C (Fig 2.3).

Fig 2.3 – Schema di campionamento e trattamento del campione di seston



I campioni, a prescindere dal tipo di pretrattamento a cui sono stati sottoposti, sono stati conservati a -20 °C fino alla spedizione presso i laboratori ISPRA della sede di Chioggia, dove sono state effettuate le analisi isotopiche.

Il campione raccolto rappresenta il seston ovvero una miscela di fitoplancton, microzooplancton e detrito di classe dimensionale 20-200 μm . Il contributo percentuale della componente fitoplanctonica al seston può variare in relazione ai cambiamenti di temperatura e disponibilità di nutrienti che ne influenzano i bloom. Pertanto, la determinazione della concentrazione della clorofilla-a effettuata contestualmente all'indagine isotopica supporta la stima della componente fitoplanctonica.

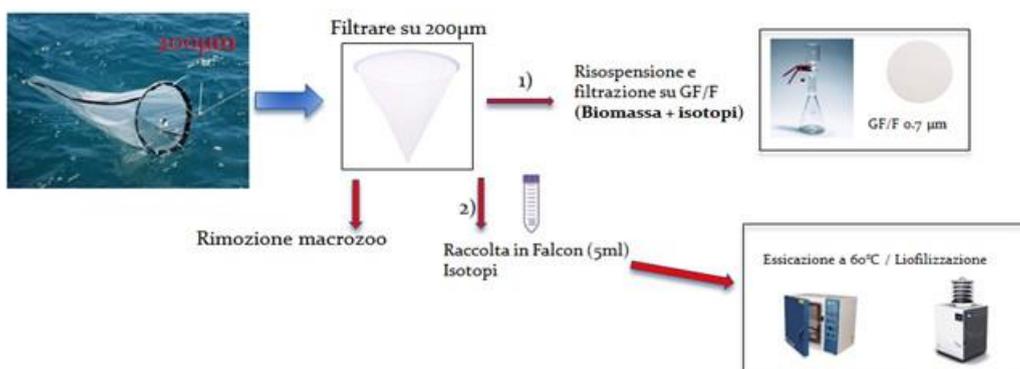
2.1.2 Zooplancton

Lo zooplancton è stato campionato mediante l'utilizzo di un apposito retino con vuoto di maglia di 200 μm , trainato in superficie a bassa velocità o lungo un profilo verticale dalla profondità massima di 100 m. Prioritariamente è stata separata la componente macro-zooplanctonica (ctenofori, meduse, etc.) dal resto del campione, mediante eliminazione manuale.

I campioni destinati alla determinazione della biomassa, oltre che degli isotopi stabili, sono stati purificati mediante risospensione per 24 ore in acqua di mare filtrata, in frigorifero, e quindi filtrati su membrana GF/F pretrattata a 450 °C.

I campioni destinati alle indagini isotopiche, per i quali invece non era prevista l'analisi della biomassa, sono stati raccolti in provette Falcon (5 ml), refrigerati durante il trasporto, ed essiccati in laboratorio in stufa termostatica a 60 °C o liofilizzati (Fig 2.4).

Fig 2.4 – Schema di campionamento e trattamento del campione di zooplancton

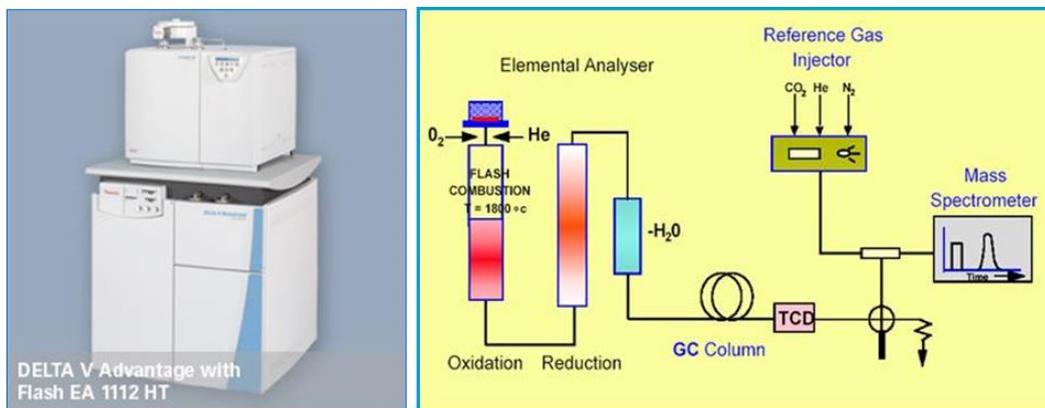


I campioni, dopo l'essiccazione/ liofilizzazione, sono stati conservati a -20° C fino alla spedizione presso il laboratorio ISPRA, sede di Chioggia, dove sono state effettuate le analisi isotopiche.

2.2 L'analisi degli isotopi stabili (SIA)

L'analisi degli isotopi stabili (SIA) è stata effettuata mediante lo spettrometro di massa per i rapporti isotopici Delta V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Brema, Germania), abbinato all'analizzatore CHN Flash 2000 incl. MAS200R (Thermo Fisher Scientific, Brema, Germania) (Fig 2.5), nel quale viene introdotta una piccola quantità (0,2 mg) di campione liofilizzato in una capsula di stagno.

Fig 2.5 – Strumentazione utilizzata per l'analisi isotopica (a sinistra) e schema del funzionamento del metodo strumentale (a destra)



Standard isotopici quali saccarosio IAEA-CH-6 (International Atomic Energy Agency, Austria) e acido L-glutammico NIST RM 8574 (National Institute of Standards and Technology, MA, USA) sono stati utilizzati ai fini di garantire la qualità del dato analitico. La precisione analitica delle misurazioni sia per $\delta^{13}\text{C}$ che per $\delta^{15}\text{N}$ è stata dello 0,2 ‰.

Il rapporto degli isotopi stabili è espresso come delta (δ):

$$\delta = [(R_{\text{campione}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$$

dove δ è il rapporto isotopico del campione rispetto agli standard (standard internazionale: Vienna Pee Dee Belemnite per carbonio e azoto atmosferico per azoto); R_{campione} e R_{standard} sono rapporti tra l'isotopo pesante e leggero rispettivamente nel campione e nello standard.

Questo numero viene poi moltiplicato per 1000 in modo che δ sia espresso in unità di parti per mille (‰).

2.3 Modelli bayesiani

Negli ultimi anni, nello studio degli isotopi stabili, sono stati sviluppati diversi modelli di miscelamento (detto anche mixing) isotopico la cui applicazione è basata sulla risoluzione di un sistema di equazioni lineari indeterminato mediante l'utilizzo di tecniche di statistica Bayesiana avanzata (Parnell et al., 2010). Tra i vari strumenti in grado di sviluppare tali modelli si annovera il SIMMR (Stable Isotope Mixing Models

in R, si veda il relativo box di approfondimento), un pacchetto del software R che è in grado di restituire i valori dei contributi proporzionali delle potenziali fonti ad una miscela. Esso sfrutta i modelli MCMC (Markov Chain Monte Carlo) ed è in grado di fornire stime robuste delle incertezze associate alle distribuzioni dei contenuti isotopici ottenute per ciascuna fonte. In genere la distribuzione dei contributi è rappresentata da diversi percentili.

Mediante SIMMR è possibile stimare le proporzioni di diverse fonti che contribuiscono alla dieta di un organismo, sfruttando le firme isotopiche ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Il metodo si basa sul fatto che le diverse fonti di cibo presentano profili isotopici distintivi, i quali vengono trasferiti nei tessuti dell'organismo consumatore. SIMMR permette di quantificare questi apporti anche in sistemi complessi, dove possono esserci sovrapposizioni isotopiche tra le fonti.

Il pacchetto SIMMR (così come il precedente SIAR) è in grado di stimare il contributo delle diverse fonti alimentari tenendo conto della varianza dei domini isotopici delle sorgenti e di elaborare i fattori di frazionamento isotopico che possono influenzare i domini delle sorgenti nel mixing. Maggiori sono le differenze tra le impronte isotopiche delle fonti, minore è l'incertezza associata al calcolo dei singoli contributi.

3 Risultati e discussione

Nell'ambito delle attività di monitoraggio le Agenzie hanno acquisito, oltre ai campioni delle matrici biologiche citate, dati relativi a temperatura, salinità, clorofilla e nutrienti azotati disciolti. L'analisi di tali parametri raccolti in tutte le stazioni delle sottoregioni MSFD risulta a supporto dell'interpretazione delle analisi isotopiche. I risultati più significativi sono riportati nel box di approfondimento "Parametri ambientali a supporto".

SIMMR (Stable Isotope Mixing Models in R)

Il metodo SIMMR (Stable Isotope Mixing Models in R) è un metodo statistico che permette di stimare le proporzioni con cui diverse fonti contribuiscono alla dieta di un organismo. Si basa sull'analisi delle firme isotopiche, come quelle di carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) e azoto ($\delta^{15}\text{N}$), che differiscono tra le varie fonti alimentari e vengono trasferite nei tessuti dell'organismo consumatore. Grazie a queste differenze isotopiche, SIMMR può identificare e quantificare i contributi alimentari anche in casi complessi, dove i profili isotopici delle fonti tendono a sovrapporsi.

Principali fasi per l'applicazione dei modelli SIMMR:

Raccolta Dati Isotopici: vengono raccolti dati isotopici sia per l'organismo di interesse (ad esempio, un pesce o un uccello marino) sia per le potenziali fonti di cibo, e questi valori sono poi inseriti nel modello SIMMR come dati di input.

Calibrazione del Modello: il modello utilizza algoritmi bayesiani per stimare le proporzioni delle fonti alimentari nella dieta di un organismo, considerando i "fattori di discriminazione trofica." Questi fattori rappresentano le differenze isotopiche che si verificano tra l'assunzione della fonte e la sua deposizione nei tessuti, e sono essenziali per ottenere stime accurate. Se i fattori di discriminazione non sono noti, è consigliabile usare stime approssimative da studi su specie simili, infatti la loro mancanza aumenta l'incertezza e riduce la precisione del modello che si basa sull'assunzione implicita che la variazione isotopica sia trascurabile o simile a quella osservata in organismi simili.

Analisi dei Risultati: il modello produce una distribuzione probabilistica per le percentuali di contributo alla dieta di ogni fonte, fornendo intervalli di confidenza e distribuzioni che descrivono la gamma di contributi possibili. SIMMR, quindi, non fornisce un singolo valore fisso ma, una serie di stime probabili.

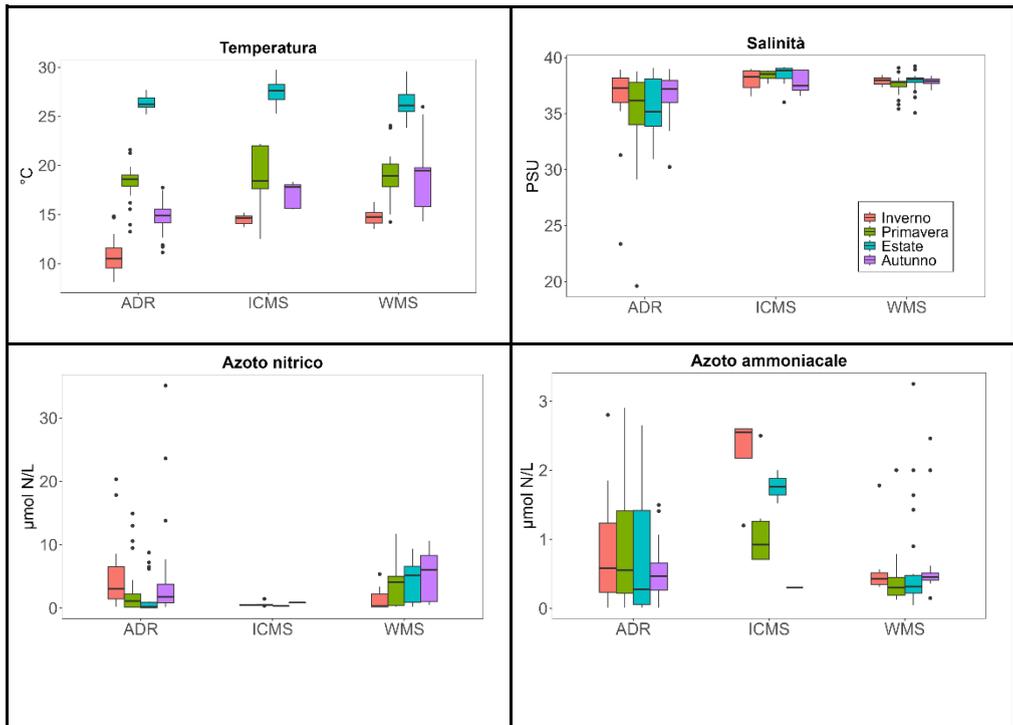
Visualizzazione dei Dati: i risultati ottenuti possono essere visualizzati con grafici intuitivi come diagrammi a barre, boxplot o curve di densità. Questi grafici facilitano l'interpretazione dei risultati, e consentono di visualizzare l'incertezza e la variabilità nei contributi delle fonti nella dieta dell'organismo.

SIMMR è uno strumento potente per ecologi e biologi poiché gestisce dati complessi e incertezze isotopiche in modo accessibile e preciso, rendendolo adatto per analisi dettagliate delle reti trofiche marine e dei cicli biogeochimici.

Parametri ambientali a supporto

In tutte le sottoregioni MSFD, i dati di temperatura e salinità presentano i tipici valori stagionali. I dati di salinità in Adriatico (ADR), come atteso, hanno mostrato una variabilità maggiore rispetto alle altre sottoregioni (range registrato: 19,6 – 39,6 PSU), generalmente attribuita alla conformazione confinata del bacino e all'influenza dei fiumi che sfociano nella parte settentrionale. Le maggiori concentrazioni di clorofilla-a, associabili a bloom fitoplanctonici, sono state registrate in Adriatico nella stagione invernale (16,3 µg/l). Relativamente ai nutrienti azotati, non si evidenziano particolari andamenti se non valori tipici stagionali.

I parametri chimico-fisici registrati nelle diverse stagioni mediante sonda multiparametrica (temperatura e salinità, concentrazioni dei nutrienti azotati in campioni d'acqua superficiale) sono riportati nei boxplot, che riportano anche la mediana (linea orizzontale), il primo e il terzo quartile (box), i valori minimo e massimo (baffi), e gli outliers (punti). I dati inferiori al LOQ sono stati sostituiti con il valore del LOQ stesso. Adriatico (ADR), mar Ionio e Adriatico Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS).

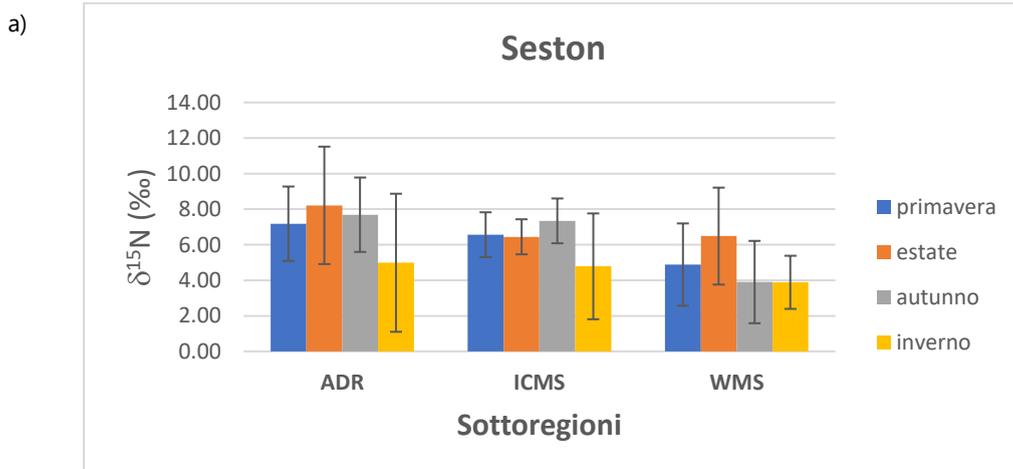


3.1 Caratterizzazione isotopica del seston e dello zooplancton

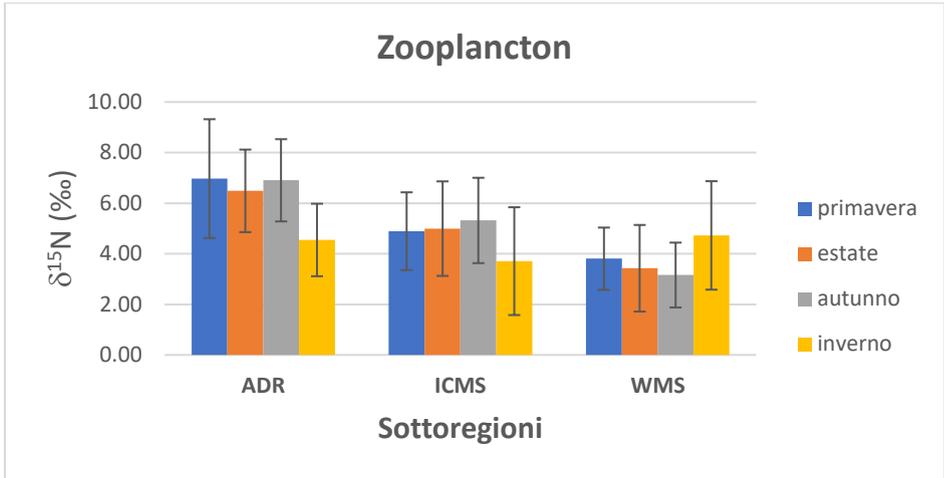
Nella fig 3.1a sono riportati i valori medi stagionali $\delta^{15}\text{N}$ del seston nelle tre sottoregioni MSFD. I valori, distribuiti in un range compreso tra 3,90 ‰ e 8,22 ‰ evidenziano un'elevata variabilità. I valori di $\delta^{15}\text{N}$ tendono ad essere più elevati nel periodo estivo-autunnale rispetto a quello invernale, probabilmente a causa dell'apporto di azoto nitrico derivante dai fertilizzanti e/o di azoto ammoniacale immesso da scarichi urbani non trattati. Inoltre, non possono essere esclusi processi di trasformazione delle forme azotate che possono avvenire nell'acqua. Tipici esempi sono il processo di evaporazione dell'ammoniaca che provoca un incremento del $\delta^{15}\text{N}$ residuale nella matrice acquosa, ed il fenomeno di denitrificazione che anch'esso induce un arricchimento del $\delta^{15}\text{N}$ residuale.

Un simile andamento si osserva anche per i campioni di zooplancton (Fig 3.1b), ad eccezione della sottoregione WMS in cui nella stagione invernale sono stati determinati i valori più elevati del rapporto isotopico. Nel complesso i valori di $\delta^{15}\text{N}$ per lo zooplancton sono compresi in un range tra 3,16 ‰ e 6,97 ‰, dunque caratterizzati da una variabilità inferiore a quella determinata per i campioni di seston. I valori medi più elevati sono stati determinati in Adriatico in tutte le stagioni.

Fig 3.1 – Valori isotopici medi stagionali e relative deviazioni standard di $\delta^{15}\text{N}$ nei campioni di seston (a) e zooplancton (b) per ciascuna sottoregione, nelle diverse stagioni. Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS).



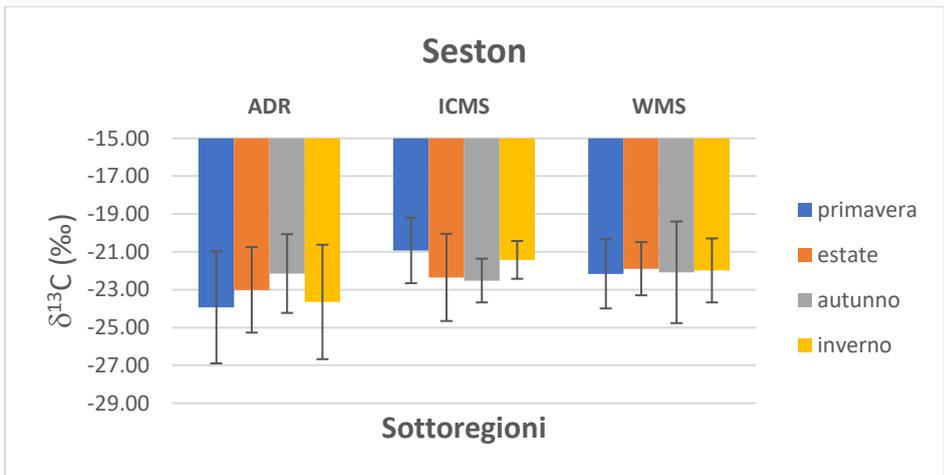
b)



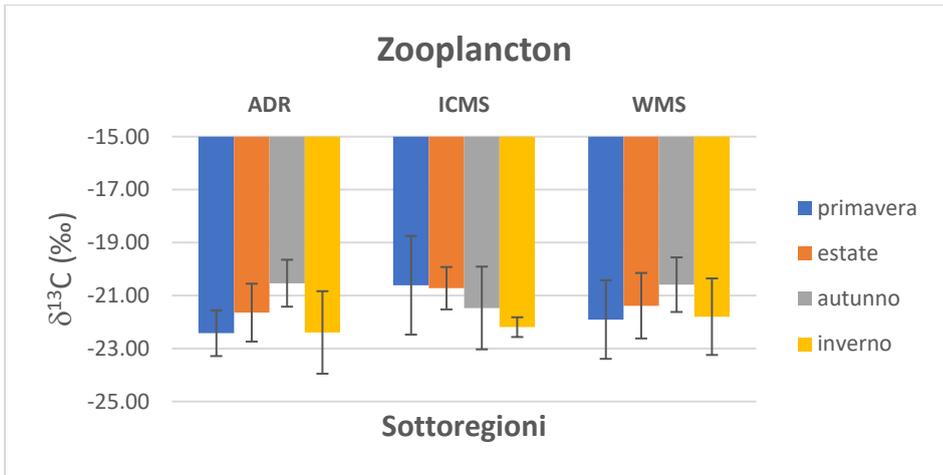
In Fig 3.2a sono riportati i valori medi stagionali con le relative deviazioni standard di $\delta^{13}\text{C}$ nei campioni di seston determinati nelle diverse sottoregioni. I valori variano in un range compreso tra $-20,93 \text{ ‰}$ e $-23,94 \text{ ‰}$.

Fig 3.2 – Valori isotopici medi stagionali e relative deviazioni standard di $\delta^{13}\text{C}$ nei campioni di seston (a) e zooplancton (b) per ciascun bacino, nelle diverse stagioni. Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)

a)



b)



I valori per l'Adriatico tendono ad essere mediamente più negativi, probabilmente in funzione del maggior contributo di apporti terrigeni derivanti dai maggiori tributari fluviali. Sempre per la sottoregione ADR si osserva inoltre un trend dalla primavera all'autunno con valori medi che tendono gradualmente a diventare meno negativi, per poi tornare a decrescere in inverno.

La variabilità dei segnali isotopici del seston dipende infatti sia da fattori abiotici sia da fattori biotici. Tra i fattori abiotici sono incluse la componente organica detritica che entra nell'ecosistema e la temperatura dell'acqua, che controlla la solubilità della CO₂ e di conseguenza il frazionamento degli isotopi di carbonio durante l'assorbimento del fitoplancton (Rau et al., 1989). La stratificazione termica della colonna d'acqua influenza l'attività cellulare, l'assimilazione e la competizione per i nutrienti e per la luce, la velocità di diffusione di CO₂ e HCO₃⁻ e, di conseguenza la composizione specifica della comunità fitoplanctonica (Zohary et al., 1994).

Tra i fattori biotici va rilevato come le diverse specie fitoplanctoniche abbiano un diverso frazionamento del carbonio che porta a segnali diversi di δ¹³C. Inoltre, le fonti non fitoplanctoniche, ovvero batteri, protozoi e particellato organico sospeso, sono importanti fonti di carbonio soprattutto durante l'inverno, quando quelle fitoplanctoniche sono scarse.

Per quanto riguarda lo zooplancton (figura 3.2 b), i valori di δ¹³C variano in un range compreso tra -20,53 ‰ e -22,42 ‰. Nella sottoregione ICMS si osserva un trend con valori via via più negativi dalla primavera all'inverno, mentre per ADR e WMS presentano un andamento opposto, con valori via via meno negativi dalla primavera all'autunno, che tendono poi a decrescere in inverno, come già osservato per il seston adriatico. I segnali di δ¹³C nei consumatori primari zooplanctonici riflettono la loro dieta, per cui seguono le fluttuazioni stagionali, che dipendono soprattutto dal

particellato organico alloctono nei periodi invernali e dal fitoplancton in quelli tardo primaverili ed estivi (Matthews e Mazumder, 2005; Perga e Gerdeaux, 2006).

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

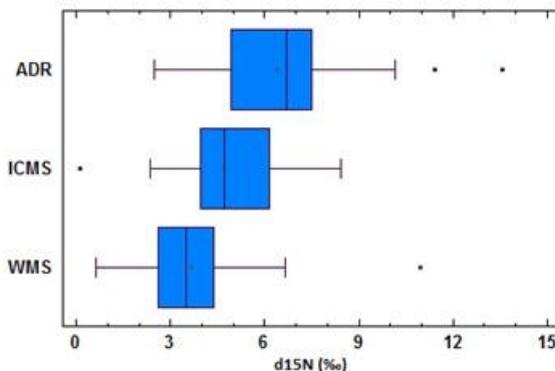
Elaborazioni statistiche $\delta^{15}\text{N}$ nel seston e nello zooplancton

Nel caso del $\delta^{15}\text{N}$ nel seston sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra ADR e WMS, mentre ICMS risulta confrontabile, probabilmente a causa di una parziale sovrapposizione dell'insieme dei dati ottenuti, con entrambe le sottoregioni ADR e WMS. Le distribuzioni del $\delta^{15}\text{N}$ non seguono una distribuzione gaussiana nel caso di ADR e WMS e pertanto è stato possibile effettuare unicamente test non parametrici, quali test di Kruskal-Wallis e di Mood.

Il test di Kruskal-Wallis verifica l'ipotesi nulla che le mediane dei valori osservati nelle tre sottoregioni siano uguali. I dati di ciascuna sottoregione vengono prima classificati dal più piccolo al più grande e quindi parametrizzati con ranghi. Ad un livello di confidenza del 95% sono state determinate differenze statisticamente significative tra ADR (rango medio 78,2) e WMS (rango medio 50,2) mentre ICMS (rango medio 74,7) è risultato confrontabile con ADR e diverso da WMS.

Il test di Mood verifica anch'esso l'ipotesi che le mediane di tutti e 3 i sottoregioni siano uguali. Si basa sulla conta del numero di osservazioni in ciascun insieme di dati (sottoregioni) da entrambi i lati della gran mediana, che è 5,69 ‰. Ad un livello di confidenza del 95,0% sono state determinate differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le mediane ADR (6,65 ‰) e WMS (4,63 ‰) mentre la mediana ICMS (6,44 ‰) non presenta una differenza significativa con nessuna delle altre due sottoregioni.

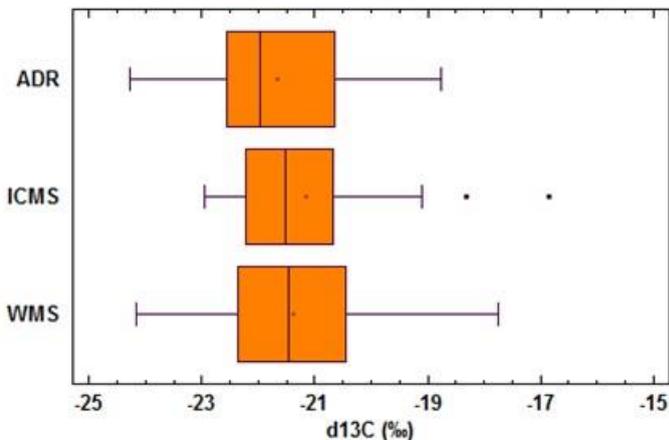
Anche nel caso dello zooplancton le distribuzioni del $\delta^{15}\text{N}$ non seguono distribuzioni normali e pertanto sono stati effettuati test statistici non parametrici. Il confronto delle mediane ha evidenziato differenze statisticamente significative tra tutte e tre le sottoregioni con un ordine decrescente: ADR (6,77 ‰) > ICMS (4,70 ‰) > WMS (3,49 ‰).



Elaborazioni statistiche del $\delta^{13}\text{C}$ nel seston e nello zooplancton

Nel caso del $\delta^{13}\text{C}$ per il seston si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra ADR e WMS, mentre ICMS risulta confrontabile con ADR e differente da WMS. Le distribuzioni del $\delta^{13}\text{C}$ seguono tutte la distribuzione gaussiana e pertanto è possibile effettuare test parametrici. In particolare, per valutare se le medie dei valori delle tre sottoregioni fossero uguali (ipotesi nulla) o differissero tra loro (ipotesi alternativa) è stato applicato il test della differenza minima significativa (LSD) di Fisher. Con questo metodo, c'è un rischio del 5,0 % di considerare differenti due medie quando invece non lo sono. I risultati ottenuti dall'applicazione del test LSD di Fisher hanno evidenziato differenze significative tra ADR (-23,21 ‰) e WMS (-22,03 ‰); mentre ICMS (-21,67 ‰) risulta confrontabile con WMS e differente da ADR.

Nel caso dello zooplancton le distribuzioni del $\delta^{13}\text{C}$ non seguono distribuzioni normali e pertanto sono stati effettuati test statistici non parametrici. Il confronto delle mediane ha evidenziato l'assenza di differenze statisticamente significative tra le tre sottoregioni ADR, ICMS e WMS. Le mediane sono rispettivamente -21,97 ‰, -21,52 ‰ e -21,50 ‰.



Per meglio caratterizzare la componente organica è stato analizzato anche il rapporto molare C/N sia nel seston che nello zooplancton.

I valori del rapporto C/N per il seston variano in un range compreso tra 9,4 e 24,1. I valori medi più elevati si osservano in primavera-inverno per il bacino ADR ed in autunno-inverno per ICMS. I valori risultano piuttosto disomogenei tra le varie stagioni e caratterizzati da elevate dispersioni attorno ai valori medi, suggerendo la presenza di sostanza organica di origine mista. Tali andamenti risultano coerenti con la natura dei campioni di seston, data da un mix di fitoplancton e detrito. I valori medi, sempre superiori al valore di Redfield (6,6) tipico del fitoplancton, suggeriscono un contributo non trascurabile della componente detritica. Infatti, valori di C/N compresi tra 6 e 10 sono generalmente considerati indicativi per il fitoplancton (Brzezinski, 1985; Montagnes et al., 1994), mentre valori superiori a 12 sono tipici di una sostanza organica terrestre e/o detritica (Faganeli et al., 1988; Thornton e McManus, 1994). I valori più bassi di questo rapporto possono invece suggerire anche una maggiore presenza di biomassa batterica (Obernosterer e Herndl, 1995 e autori ivi citati).

I valori per lo zooplancton variano invece in un range compreso tra 4,7 e 7,3, con valori molto più omogenei a livello sia delle diverse sottoregioni che delle stagioni. I valori più vicini al rapporto di Redfield (6,6) solitamente tipici del fitoplancton, suggeriscono come i campioni di zooplancton siano effettivamente molto più rappresentativi della componente planctonica rispetto ai campioni di seston, e si possano quindi assumere come rappresentativi del secondo anello della rete trofica in tutte e tre le sottoregioni analizzate.

3.2 Modelli concettuali

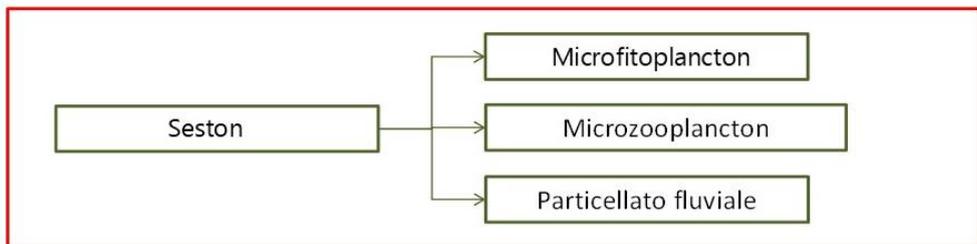
Per stimare il contributo percentuale delle diverse fonti di cibo al mesozooplancton ($> 200 \mu\text{m}$) è necessario definire il modello concettuale alla base della dieta, avendo l'accortezza di considerare anche l'incertezza legata al campionamento della matrice investigata. Proprio per questo sono state quindi definite le fonti primarie per il seston ed il mesozooplancton.

Il seston rappresenta il primo livello della rete trofica marina ma, esso è caratterizzato da un'elevata variabilità in funzione del tipo di campionamento che viene effettuato. Nell'ambito dello studio condotto si è scelto di campionare la frazione di seston caratterizzata da un vaglio dimensionale compreso tra 200 e $20 \mu\text{m}$, al quale si attribuisce un'origine prevalentemente biotica e si pensa sia caratterizzato dalla presenza di microzooplancton e microfitorplancton. Ciononostante, la presenza di materiale detritico di natura minerale che non si riesce ad eliminare completamente in fase di campionamento può determinare un bias nei dati non trascurabile. Inoltre, considerando la morfologia del territorio e la presenza di un elevato numero di reticoli idrografici sfocianti in mare si è ritenuto di dover considerare anche apporti non trascurabili di natura fluviale. Sulla base di queste considerazioni si è proceduto

stimando dapprima la composizione della matrice seston e successivamente applicando la stima dei contributi alla dieta del mesozooplancton.

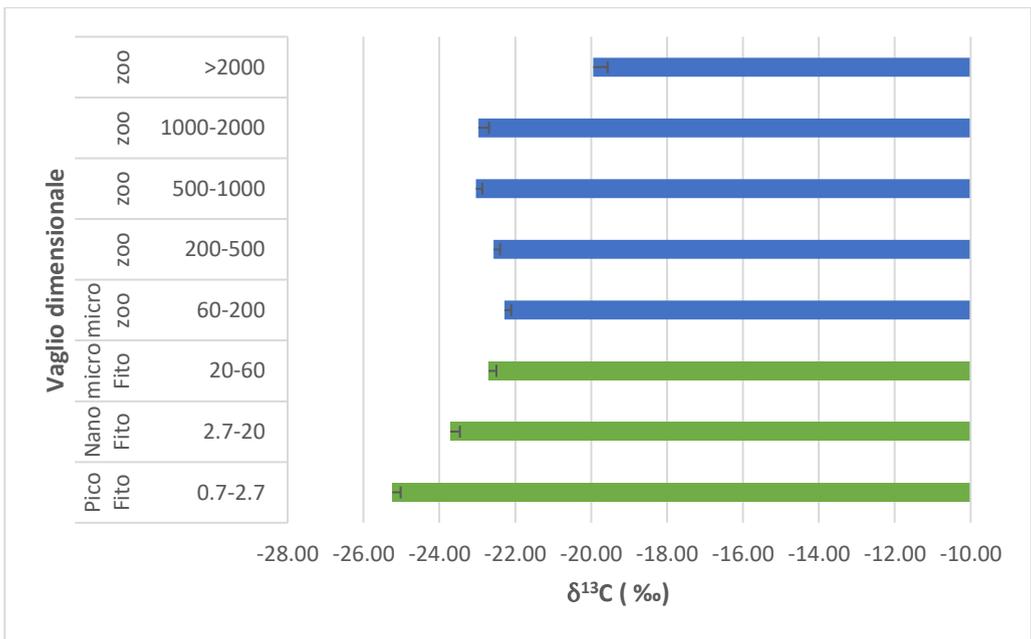
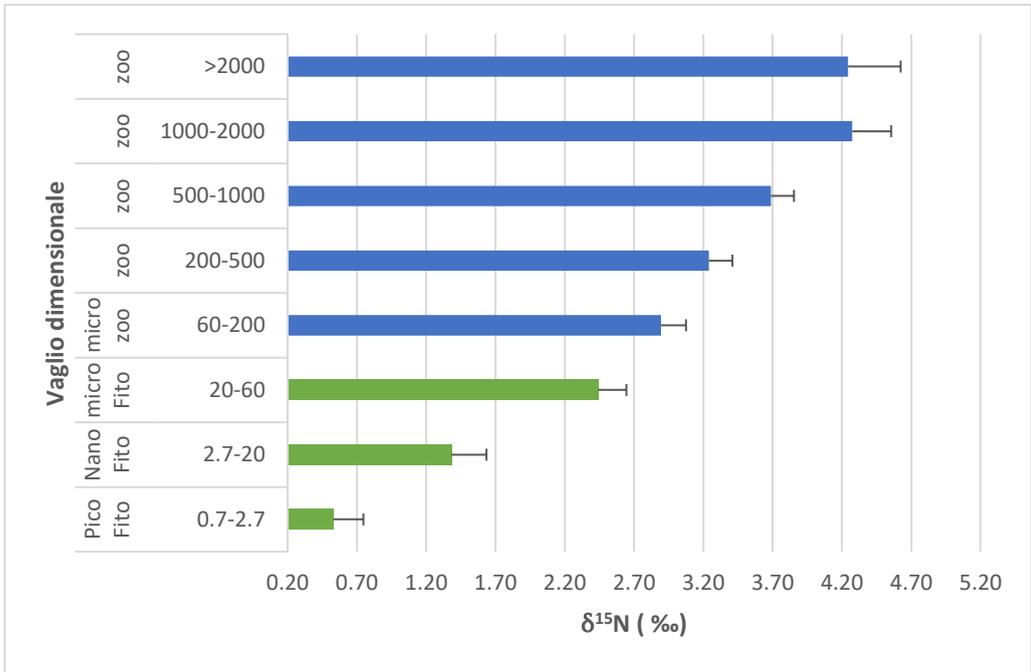
Relativamente al seston, si è scelto di costruire il modello concettuale sulla base del frazionamento dimensionale (tenendo in considerazione che l'utilizzo del retino a maglia 20 μm obbliga a trascurare le frazioni relative al piko e nanofitoplancton), prendendo in considerazione la potenziale presenza di microzooplancton e microfitoplancton e di detriti fluviali utilizzando come importa isotopica il POM fluviale (Fig 3.3).

Fig 3.3 – Modello concettuale dei potenziali contributi al seston



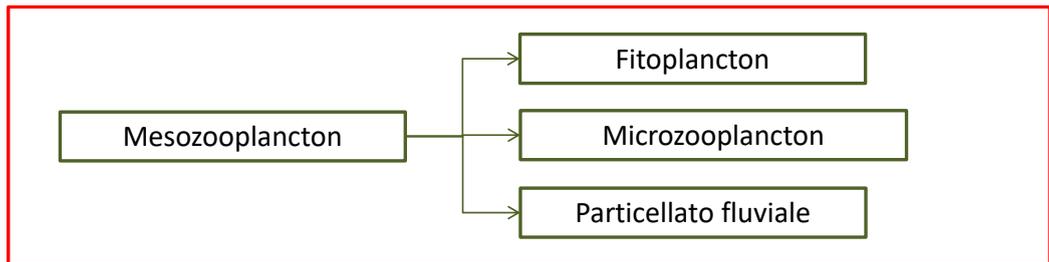
Tesán-Onrubia e collaboratori (2023) hanno studiato le variazioni isotopiche sia del carbonio che dell'azoto in funzione del vaglio dimensionale nella bassa rete trofica, partendo dal picofitoplancton (0,7-2,7 μm) fino a macrozooplancton (> 2000 μm) nel Mediterraneo. Lo studio ha evidenziato che nel caso del carbonio non si registrano variazioni significative, mentre per l'azoto si registra un incremento pari a 1 ‰ proporzionale al vaglio dimensionale fino al microfitoplancton per poi passare ad un incremento pari a 2 ‰ da microzooplancton a macrozooplancton (Fig 3.4).

Fig 3.4 – Valori del $\delta^{15}\text{N}$ (alto) e $\delta^{13}\text{C}$ (basso) in relazione al diverso vaglio dimensionale come descritto da Tesán-Onrubia e collaboratori (2023)



Nel caso della componente mesozooplanctonica, le fonti di substrato trofico identificate sono il fitoplancton, la cui impronta isotopica è definita come valore medio tra le differenti classi dimensionali, la frazione microzooplanctonica e il particolato fluviale (Fig 3.5).

Fig 3.5 – Modello concettuale dei potenziali contributi allo mesozooplancton



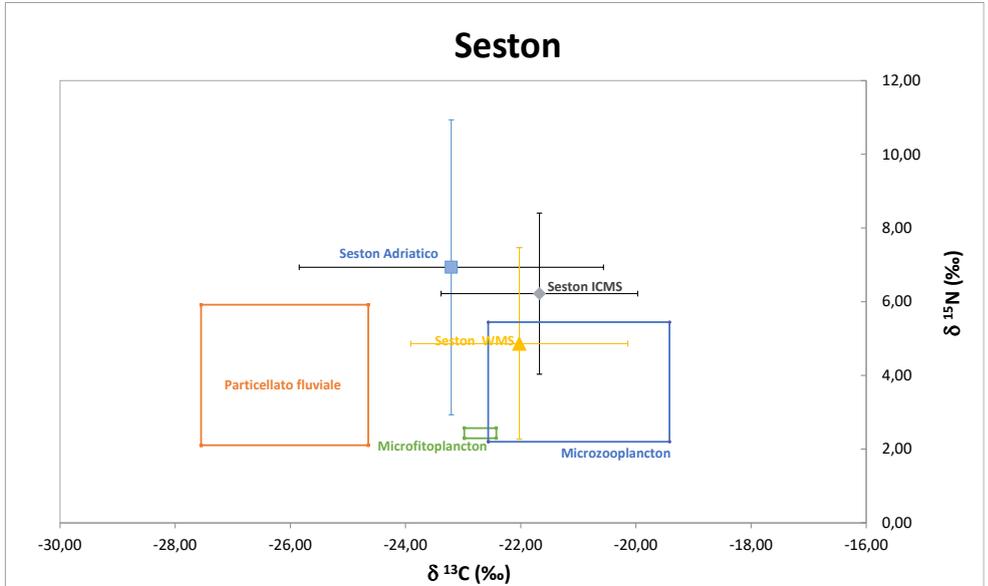
Per comprendere la robustezza dei modelli concettuali, i dati isotopici relativi alle varie fonti e quelli relativi ai campioni analizzati sono stati rappresentati graficamente in plot bidimensionali $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$.

Il plot riferito ai campioni di seston e zooplancton (Fig 3.6 a, b) evidenzia una buona approssimazione del modello concettuale; i dati isotopici caratterizzanti i campioni di tutte e tre le sottoregioni MSFD cadono in una regione intermedia tra le aree di caratterizzazione delle diverse fonti. Le impronte isotopiche delle fonti sono state costruite sia con dati di letteratura (Tesán-Onrubia et al., 2023) che con misure sperimentali effettuate presso il laboratorio ISPRA di Chioggia. In particolare, i valori delle differenti classi dimensionali del fitoplancton e del microzooplancton sono stati estrapolati dalla pubblicazione di Tesán-Onrubia et al. (2023) mediante l'applicazione del tool gratuito di estrazione di dati da immagini scaricabile da <https://plotdigitizer.com/app>.

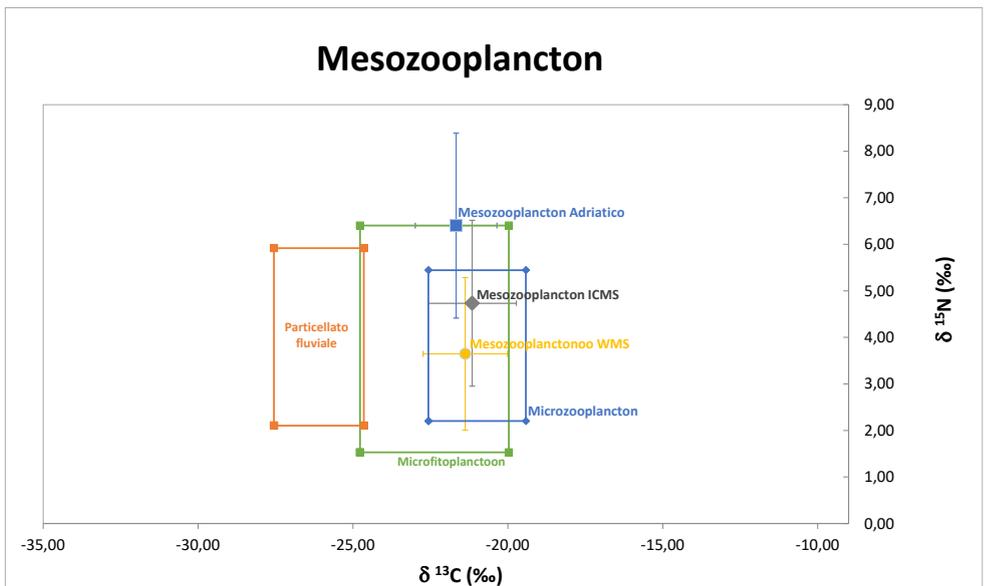
Il plot b di Fig 3.6, riferito ai campioni di mesozooplancton, evidenzia anch'esso una buona approssimazione del modello concettuale. Come si può evincere dal grafico, la regione isotopica caratterizzante il fitoplancton ed il microzooplancton è parzialmente sovrapposta.

Fig 3.6 – Distribuzione dei valori medi e relative deviazioni standard dei valori di seston (a) e mesozooplankton (b) nelle diverse sottoregioni, nel plot bidimensionale $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ sono riportati i poligoni indicanti i valori isotopici di riferimento per le principali fonti identificate nel modello concettuale. Adriatico, Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)

a)



b)



3.2.1 Apporzionamento isotopico del seston e mesozooplancton

L'elaborazione dei dati isotopici è stata effettuata mediante l'applicazione del modello SIMMR in R valutando il contributo percentuale delle tre componenti per il seston (Fig 3.7) e delle tre fonti di cibo per il mesozooplancton (Fig 3.8) individuate dai rispettivi modelli concettuali illustrati precedentemente (v. sezione 3.2). Nel caso del mesozooplancton si è deciso di utilizzare l'impronta isotopica del fitoplancton totale in quanto le singole classi dimensionali non hanno evidenziato un peso statisticamente significativo come contributo alla dieta del mesozooplancton.

Come si evince, la distribuzione percentuale dei vari contributi è differente per le diverse sottoregioni; per quanto riguarda ICMS sono state effettuate le elaborazioni ma, come già evidenziato in precedenza, la numerosità campionaria non è stata ritenuta sufficiente ai fini dell'elaborazione statistica.

I risultati ottenuti evidenziano che le componenti di substrato trofico significative del seston, nel caso della sottoregione ADR, sono in uguale percentuale quella microzooplanctonica ed il particolato fluviale. Tale risultato era piuttosto prevedibile dato che le zone dell'alto e medio Adriatico sono interessate da ingenti apporti fluviali. Nel caso delle sottoregioni WMS e ICMS, invece, il seston è risultato prevalentemente composto da microzooplancton.

La bassa percentuale della componente microfitorplanctonica a favore dell'elevata presenza di microzooplancton nel seston fa ipotizzare che la componente eterotrofa sia in grado di utilizzare rapidamente la componente autotrofa, considerando le percentuali relative, tanto è che la ripartizione come massa risulta sbilanciata verso la microzooplanctonica.

I risultati ottenuti dall'analisi delle fonti di cibo del mesozooplancton (Fig 3.8) evidenziano il microzooplancton come principale substrato trofico. Tale risultato sottolinea l'importanza del microzooplancton come primo anello della bassa rete trofica nel contesto studiato.

Fig 3.7 – Distribuzione del 25esimo e 75esimo percentile dei vari contributi al seston per le diverse sottoregioni MSFD, Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)



Fig 3.8 – Distribuzione del 25esimo e 75esimo percentile dei vari contributi al mesozooplankton per le diverse sottoregioni MSFD, Adriatico (ADR), Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)



Analizzando i risultati ottenuti per le due matrici investigate, emerge chiaramente l'importanza di approfondire l'analisi dei livelli più bassi, concentrandosi sulle classi

dimensionali del fitoplancton in relazione alle fonti di nutrimento per il microzooplancton.

Inoltre, da studi di letteratura (Gonzales et al., 2020), è stato evidenziato come il fitoplancton non venga direttamente predato dallo zooplancton erbivoro, quanto piuttosto utilizzato come substrato trofico dai batteri. Pertanto, ai fini della valutazione e comprensione dei fenomeni che avvengono nella bassa rete trofica diventa molto importante definire i fattori di discriminazione trofica delle classi fitoplanctoniche in relazione all'utilizzo, anche parziale, da parte della biomassa microbica.

4 Classificazione ed abbondanza del fito e zooplancton

L'ambiente costiero è uno dei sistemi naturali più dinamici, dove i processi chimici, fisici e biologici interagiscono a diverse scale spaziali e temporali (Walsh, 1988, 1991; Gattuso *et al.*, 1998; Ducklow e McCallister, 2005; Muller-Karger *et al.*, 2005). Circa il 40% della popolazione mondiale vive in zone di transizione terra-mare (Seibert *et al.*, 2020), con elevata pressione antropica.

Al fine della valutazione dello stato dell'ambiente marino (sensu MSFD; Oesterwind *et al.*, 2016) è necessario distinguere gli impatti antropici dalle fluttuazioni naturali. Nel monitoraggio ai sensi della Direttiva Quadro Strategia per l'Ambiente Marino (MSFD), per l'anno 2021, nelle tre sottoregioni marine (Mar Adriatico, Mar Ionio e Mediterraneo Centrale, Mar Mediterraneo Occidentale) e nelle stazioni di interesse per la determinazione isotopica del plancton (Descrittore 4), sono state eseguite anche le analisi di abbondanza per il fitoplancton e lo zooplancton (Descrittore 1 - Habitat pelagici), i cui risultati vengono di seguito riportati allo scopo di caratterizzare le componenti oggetto di questo studio isotopico.

4.1 Fitoplancton

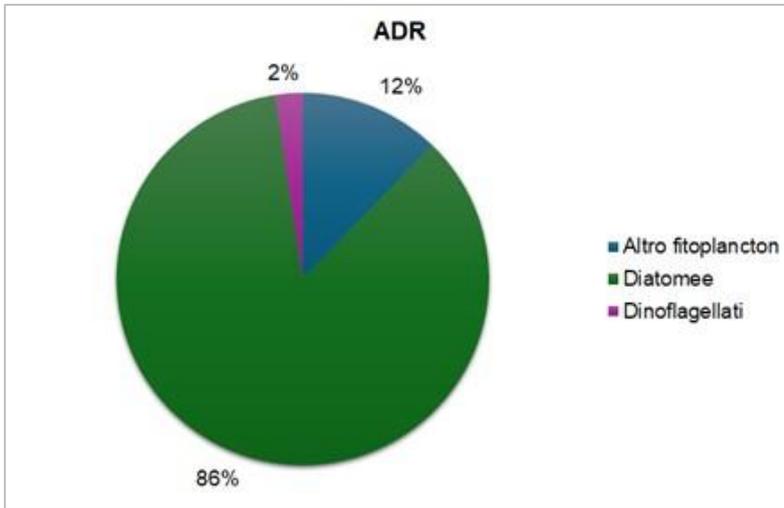
Il fitoplancton, rappresentato da un insieme di organismi autotrofi, di microalghe unicellulari, che costituiscono il primo anello della rete alimentare marina, è molto sensibile al mutamento delle variabili ambientali, risultando capace di rispondere, in tempi molto rapidi, a diversi tipi di stress antropico.

Il fitoplancton è composto da numerose specie e gruppi tassonomici tutti caratterizzati da dimensioni microscopiche, molto diversi tra loro, come diatomee, dinoflagellati, crisoficee, coccolitoforidi, euglenoidi, silicoflagellati, criptoficee.

Di seguito si riportano i risultati delle abbondanze dei principali gruppi tassonomici riscontrati nelle tre sottoregioni marine considerate, nell'ambito del monitoraggio dell'Habitat Pelagico previsto dalla Strategia Marina. In particolare, è stata fatta l'analisi tassonomica sia per definire una linea di base nella presenza delle abbondanze dei vari gruppi tassonomici caratteristici di ciascuna sottoregione, sia per un'analisi riferita alla stagionalità di una determinata abbondanza per gruppo tassonomico.

In riferimento alla caratterizzazione tassonomica, nella regione ADR (vedi fig 4.1), si nota che le diatomee rappresentano il gruppo preponderante rispetto a dinoflagellati e ad altri taxa inclusi nella categoria "altro fitoplancton".

Fig 4.1 – Composizione del fitoplancton nella sottoregione ADR, Anno 2021



Al contrario, nel mar Ionio e Mediterraneo Centrale (vedi Fig 4.2) nessun gruppo è preponderante. Le diatomee rappresentano oltre un quarto (28 %) della popolazione fitoplanctonica totale considerata in questa sottoregione mentre il rapporto dinoflagellati/diatomee è di circa 1:3.

Fig 4.2 – Composizione del fitoplancton nel Mar Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS), Anno 2021

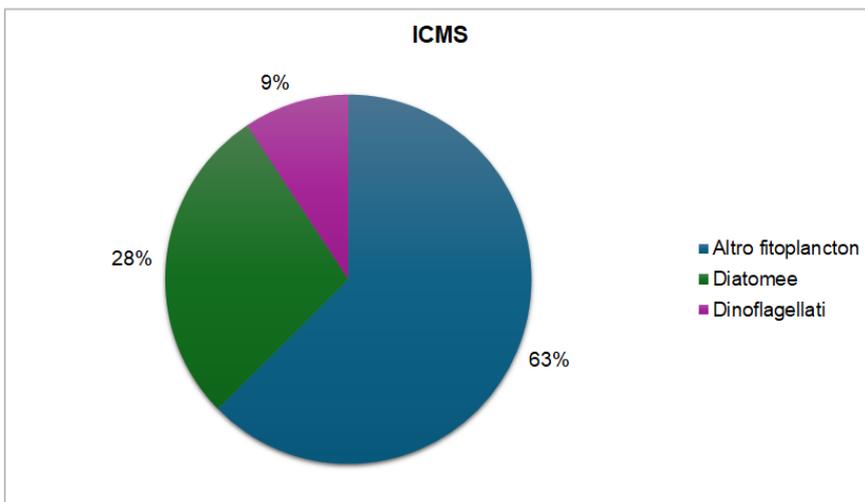


Fig 4.3 – Composizione del fitoplancton nel Mar Mediterraneo Occidentale (WMS). Anno 2021

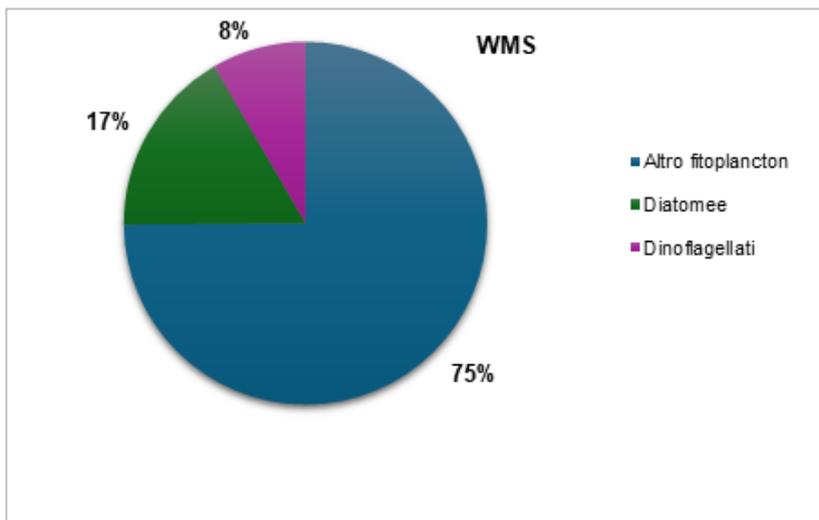
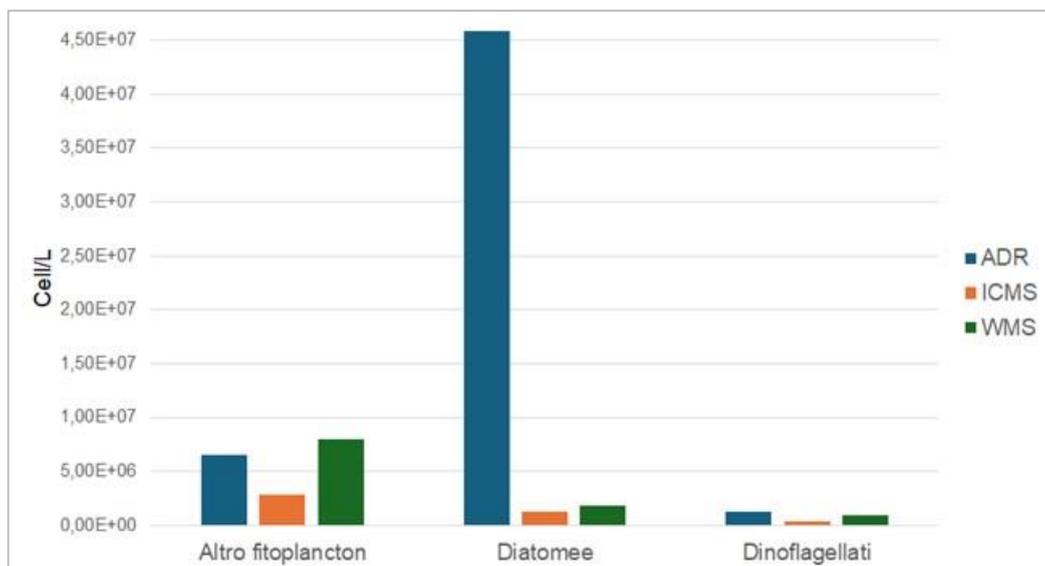


Fig 4.4 – Abbondanza (cellule/litro) dei gruppi del fitoplancton nelle diverse sottoregioni MSFD, Anno 2021

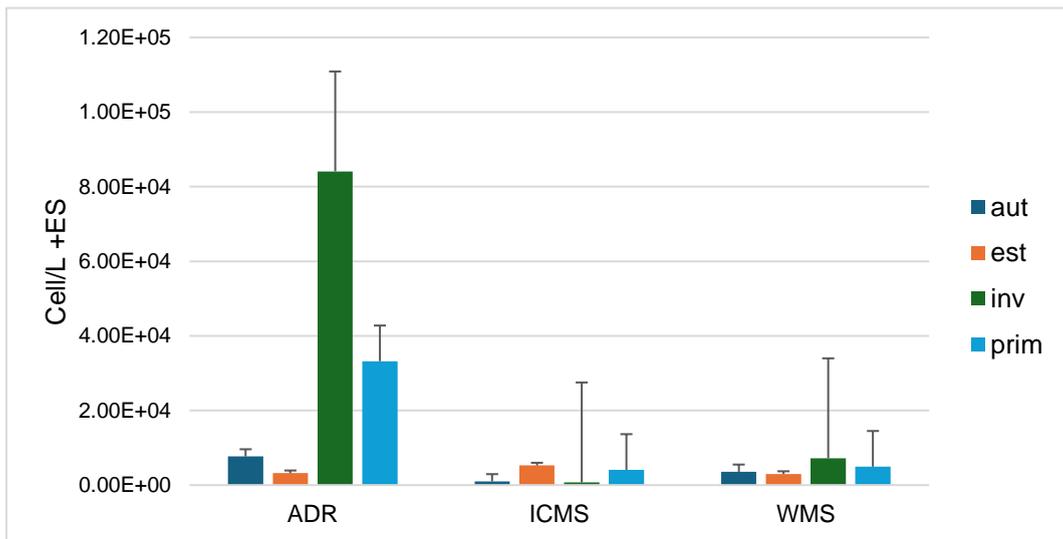


La crescita del fitoplancton e il relativo aumento di biomassa (fioriture) sono controllati da una serie di fattori quali disponibilità di energia luminosa e dall'apporto di nutrienti (Cloern, 1996; Lévy *et al.*, 1998). Nelle acque costiere, le forzanti ambientali (ad esempio, vento, pioggia, fiumi, onde e maree) presentano la massima variabilità ed influenzano la successione dei produttori primari negli ambienti marini (Margalef, 1978), la crescita del fitoplancton dipende strettamente da questa variabilità (Franks e Walstad, 1997), che rende estremamente difficile la comprensione delle dinamiche del fitoplancton.

Le fluttuazioni dei parametri fisici come temperatura, salinità, turbolenza, quantità di luce e disponibilità di nutrienti (soprattutto azoto e fosforo) influenzano la stagionalità e la distribuzione del fitoplancton nelle diverse sottoregioni. Per tale motivo, la concentrazione di fitoplancton nelle acque segue forti variazioni stagionali e, talvolta, può oscillare in modo ampio anche su scale spaziali e temporali molto ristrette. Generalmente, si ha un aumento delle concentrazioni di fitoplancton in primavera o in estate per la presenza di alte temperature e maggiore irraggiamento solare.

Di seguito si riportano le variazioni stagionali riscontrate per il fitoplancton nelle sottoregioni MSFD considerate (Fig. 4.5).

Fig 4.5 – Andamento stagionale delle abbondanze fitoplanctoniche (cellule/litro) nelle tre sottoregioni MSFD.



4.2 Zooplancton

Lo zooplancton rappresenta la componente eterotrofa del plancton e comprende una grande varietà di organismi appartenenti a diversi taxa, alcuni dei quali trascorrono nel plancton tutta la durata del loro ciclo vitale (oloplancton), mentre altri solo una parte di esso (meroplancton).

Lo zooplancton riveste un ruolo ecologico fondamentale nella funzionalità degli ecosistemi marini, essendo un importante costituente delle reti trofiche, in grado di metabolizzare l'energia prodotta dai livelli trofici basali e di trasferirla ai livelli trofici superiori, pertanto, rappresenta un elemento centrale ai fini della valutazione della qualità delle acque marine. Lo zooplancton, in base alle dimensioni dei suoi organismi si divide in microzooplancton (20-200 μm), mesozooplancton (tra 0,2 e 20 mm) e macrozooplancton (con individui che possono superare anche il metro). Nei mari italiani, i gruppi più rappresentativi come numero di specie sono i Copepodi e i Cladoceri (Phylum Artropoda, Classe Crostacei). Le specie appartenenti ai restanti gruppi, in questo studio vengono raggruppate e classificate come "altro zooplancton" e pertanto la loro percentuale, intesa come numero di specie, è più elevata rispetto a quella dei Copepodi e Cladoceri. Molti studi sul mesozooplancton neritico, condotti lungo le coste del Mediterraneo, indicano il gruppo dei Copepodi come la frazione più importante del popolamento per gran parte dell'anno, seguiti dai Cladoceri.

Di seguito si riportano i risultati del campionamento nelle tre sottoregioni MSFD per lo zooplancton eseguito nell'anno 2021. In particolare, i risultati mostrano abbondanze maggiori di Copepodi nelle tre sottoregioni MSFD, per il Mediterraneo Occidentale e Ionio (vedi Fig 4.7 e Fig 4.8) con percentuali che raggiungono il 75%, invece nel Mar Adriatico (Fig 4.6) l'ordine dei Copepodi raggiunge il 57% seguito dal 41% dei Cladoceri.

Fig 4.6 – Composizione dello zooplancton nel Mar Adriatico (ADR). Anno 2021

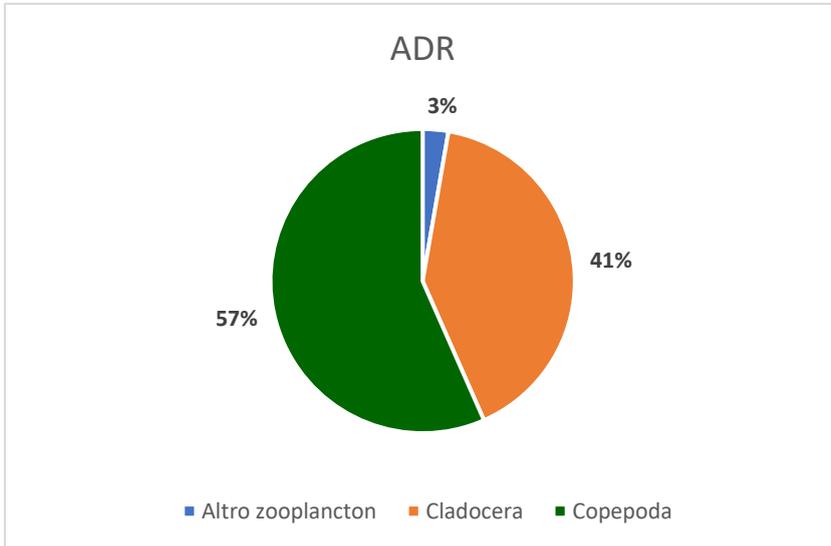


Fig 4.7 – Composizione dello zooplancton nel Mar Ionio e Mediterraneo Centrale (ICMS). Anno 2021

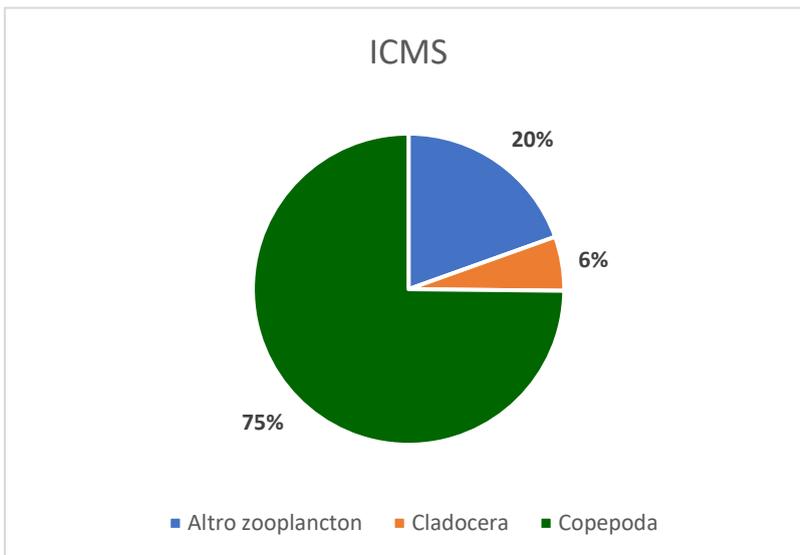


Fig 4.8 – Composizione dello zooplancton nel Mediterraneo Occidentale (WMS). Anno 2021

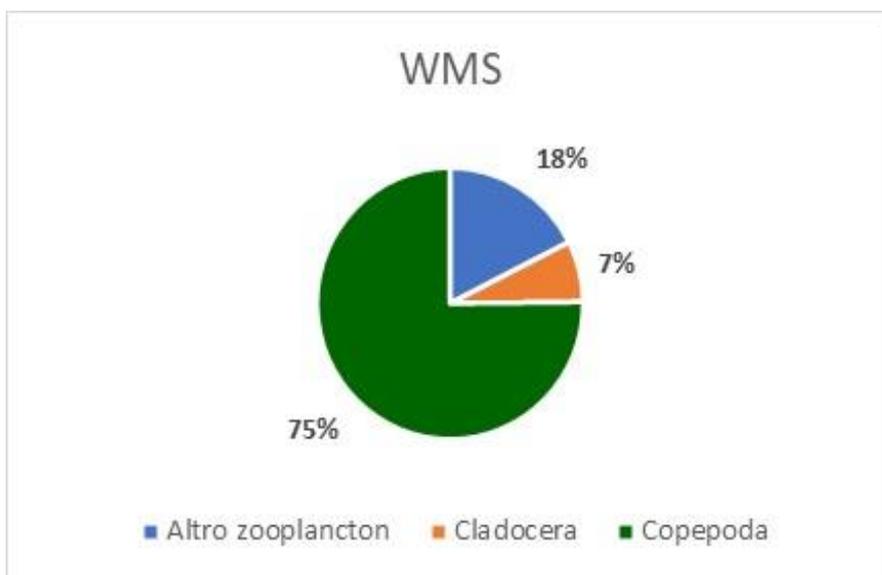
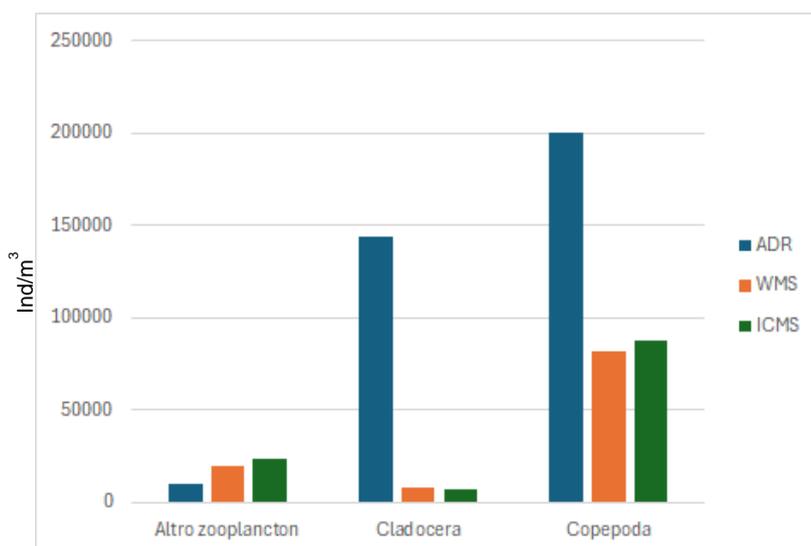
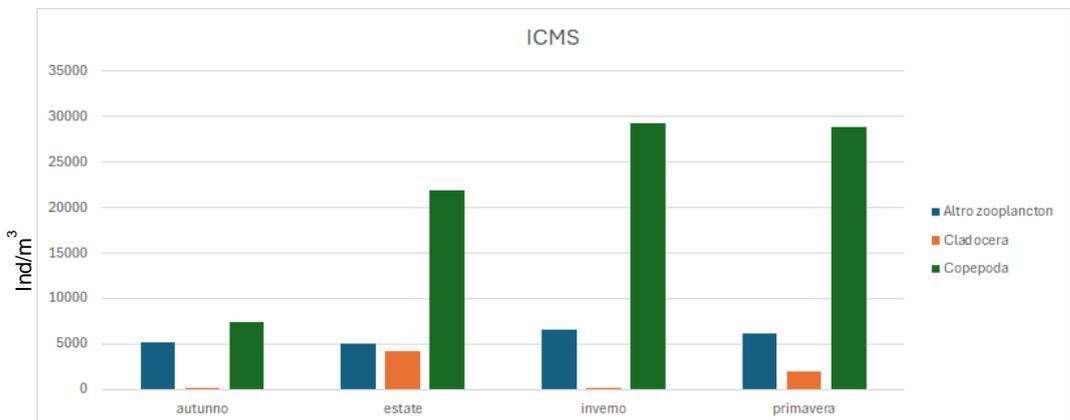
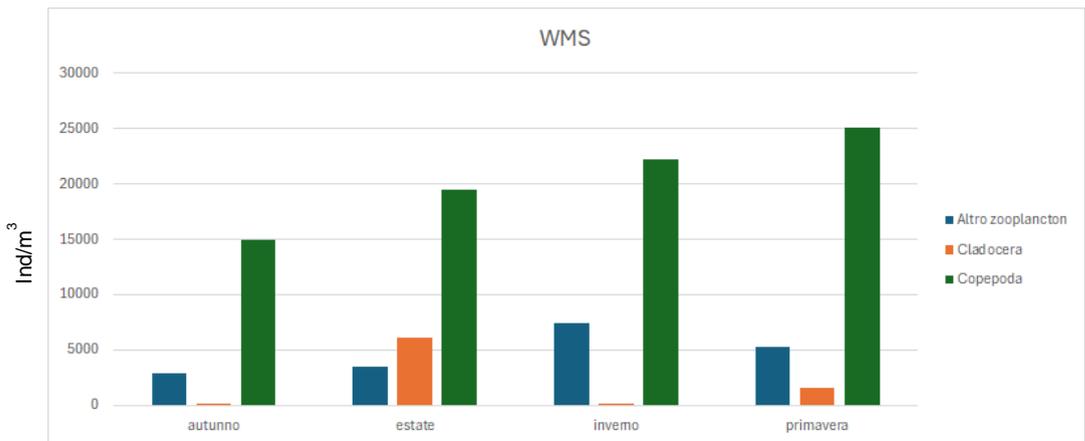
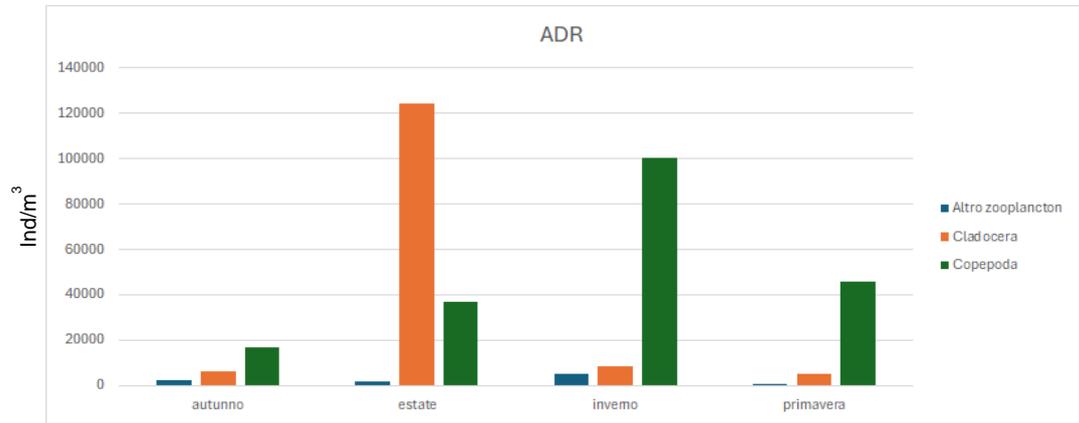


Fig 4.9 – Confronto delle abbondanze (individui /m³) dei tre gruppi di zooplancton nelle tre sottoregioni MSFD



Un lavoro di revisione condotto da Kovalev et al. nel 2003 su dati decennali di composizione e abbondanza dello zooplancton nel Bacino del Mediterraneo, ha evidenziato che nelle aree non costiere il ciclo stagionale delle abbondanze zooplanctoniche è caratterizzato da un solo picco massimo che si presenta in primavera o in estate, mentre nelle regioni costiere si distinguono da due a tre picchi (primavera, estate e autunno), in funzione dei diversi range di variazione della temperatura dell'acqua e delle abbondanze fitoplanctoniche. Il fenomeno della stagionalità è importante per riconoscere e definire le composizioni locali del popolamento sulle quali le forzanti ambientali agisce da filtro. Esempi classici di variazioni annuali del popolamento zooplanctonico neritico mostrano un aumento di abbondanza e di biomassa in estate e autunno, seguito da un forte decremento invernale (Mazzocchi e Ribera d'Alcalà, 1995; Siokou-Frangou, 1996). Mentre i Copepodi presentano le abbondanze più importanti per gran parte dell'anno, i Cladoceri presentano una marcata stagionalità, con caratteristico massimo estivo. Tali dati di letteratura vengono confermati anche dalle fluttuazioni stagionali dello zooplancton relativa al monitoraggio del 2021 nelle sottoregioni MSFD considerate (Fig. 4.10). Per il Mar Adriatico si osserva un picco significativo di presenza dei Cladoceri in estate, rispetto agli altri mari. Per quanto riguarda i Copepodi, pur essendo presenti tutto l'anno, in Adriatico, le abbondanze sono più variabili. Infatti, nelle altre due sottoregioni, la presenza dei Copepodi è elevata durante tutto l'anno in particolare nel periodo invernale-primaverile.

Fig 4.10 – Andamento stagionale delle abbondanze zooplanctoniche nelle tre sottoregioni MSFD, Adriatico (ADR), mar Ionio e Adriatico Centrale (ICMS); Mediterraneo Occidentale (WMS)



5 Conclusioni

Gli organismi costituenti il fito e lo zooplancton, sono importanti per gli studi isotopici in ambienti marini, poiché risultano essere particolarmente sensibili ai processi fisici e alle fonti di nutrienti, inoltre, costituendo la parte bassa della rete trofica, le loro variazioni determinano cambiamenti anche nei livelli superiori della stessa.

In questo contesto lo zooplancton svolge un ruolo chiave negli ecosistemi pelagici collegando i produttori primari ai livelli trofici più elevati. Comprendere quindi come i rapporti degli isotopi stabili di carbonio e azoto nello zooplancton rispondano alle diverse forzanti ambientali risulta importante per poter poi analizzare le relazioni trofiche tra i componenti della rete trofica e definire le baseline isotopiche per la definizione del livello trofico degli organismi dei livelli superiori (Guerra Araújo Abrantes de Figueiredo et al., 2020).

Infatti, lo zooplancton generalmente mostra una selettività alimentare che ne determina una composizione isotopica difficile da confrontare direttamente con i valori di seston, il quale, comprende una miscela di organismi viventi e componente detritica in proporzione altamente variabile, e tra questi costituenti solo pochi possono essere selettivamente utilizzati dallo zooplancton come substrato alimentare, come ad esempio fonti alimentari arricchite in ^{13}C (ad esempio diatomee) (Guerra Araújo Abrantes de Figueiredo et al., 2020).

Dai modelli concettuali elaborati, è stato possibile stimare le fonti costituenti il seston e mediante l'applicazione di modelli bayesiani di miscelamento isotopico è stato possibile stimarne quantitativamente il diverso contributo, evidenziando come in Adriatico prevalgano le fonti terrestri (veicolate dal particolato fluviale) ed il microzooplancton, mentre nelle altre due sottoregioni MSFD predomina la sola componente microzooplanctonica.

Il contributo proporzionale alla dieta del mesozooplancton ha evidenziato l'uso preferenziale del microzooplancton in tutte le sottoregioni.

Alla luce dei risultati ottenuti dall'analisi isotopica e dall'applicazione dei modelli bayesiani si può quindi ritenere sufficientemente robusta la scelta della componente mesozooplanctonica quale baseline per la definizione dei livelli trofici.

La corretta stima del $\delta^{15}\text{N}_{\text{base}}$ rappresenta infatti uno degli elementi più importanti nell'utilizzo degli isotopi per lo studio delle reti trofiche. Infatti sebbene ogni baseline isotopica sia necessariamente caratterizzata da variazioni spaziali e temporali tra la baseline stessa ed il consumatore secondario d'interesse, una buona baseline deve (1) integrare le variazioni dei valori isotopici su una scala temporale vicina a quella del consumatore secondario di interesse, (2) coprire lo stesso periodo di tempo del campionamento del consumatore secondario di interesse (vale a dire, essere raccolti nello stesso anno) e (3) comprendere la variabilità spaziale che contribuisce alla firma isotopica del consumatore secondario di interesse.

Ottenere la baseline isotopica richiesta per stimare la posizione trofica è uno dei problemi più difficili nell'applicazione delle tecniche isotopiche per gli studi sulla rete trofica in più sistemi.

Le baseline isotopiche stimate con questo studio dovranno necessariamente essere confermate con ulteriori monitoraggi ed approfondimenti, anche in relazione al ruolo della componente procariotica che rimane tuttora da indagare.

In questo quaderno si riporta una breve descrizione della distribuzione qualitativa e quantitativa del fitoplancton e del mesozooplancton. Le principali evidenze mostrano che nel Mar Adriatico le diatomee predominano, mentre nel Mar Ionio e Mediterraneo Centrale diatomee e dinoflagellati hanno abbondanze simili, con diatomee che costituiscono il 28% del fitoplancton. Nel Mediterraneo Occidentale, le diatomee sono meno abbondanti rispetto alle altre aree. Le fioriture di fitoplancton dipendono dalla disponibilità di luce, nutrienti e dalla variabilità di parametri fisici come temperatura e salinità, con picchi di concentrazione generalmente in primavera ed estate. Per lo zooplancton, i dati di abbondanza nel Mediterraneo indicano che nelle aree offshore si osserva un picco stagionale in primavera o estate, mentre nelle aree costiere si hanno due o tre picchi, influenzati da temperatura e fitoplancton. I Copepodi e i Cladoceri sono tra i gruppi più abbondanti nel Mediterraneo ma, mentre nel Mar Tirreno e nello Ionio i Copepodi sono presenti tutto l'anno, per l'Adriatico prevalgono in tutte le stagioni ad eccezione dell'estate nella quale i Cladoceri sono i più rappresentati.

6 Bibliografia

Berto D., Calace N., Rampazzo F., Saccomandi F. Isotopes: from theory to practice (Quaderni) Laboratorio 2/bis/2018; ISBN: 978-88-448-0948-5

Berto D., Calace N., Saccomandi F. Isotopi dalla teoria alla pratica. Report Number Laboratory (Quaderni) Laboratorio 2/2018, ISBN: 978-88-448-0873-0

Brzezinski M.A., 1985. The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology*, 21, 347-357. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00347.x>

Cloern J.E., 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Reviews of Geophysics*, Vol. 34 (2), 127-168. <https://doi:10.1029/96RG00986>

Commissione Europea, 2014. Directorate-General for Environment, Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) – Guidance document No. 32 On biota monitoring (the implementation of EQS biota) under the Water Framework Directive. Publications Office, 2014

Seibert D., Zorzo C. F., Borba F. H., de Souza R. M., Quesada H. B., Bergamasco R., Baptista A. T., Inticher J. J., 2020 Occurrence, statutory guideline values and removal of contaminants of emerging concern by Electrochemical Advanced Oxidation Processes: A review, *Science of The Total Environment*, 748,141527, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141527>

Decreto Legislativo 13 ottobre 2015, n. 172, Attuazione della direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque. (15G00186) (GU Serie Generale n.250 del 27-10-2015)

Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. https://www.mase.gov.it/sites/default/files/archivio/normativa/direttiva_2000_60_ce.pdf <https://data.europa.eu/doi/10.2779/707397>

Direttiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 giugno 2008 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino (Direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0056>

Direttiva del Consiglio del 12 dicembre 1991, relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole (91/676/CEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A31991L0676&from=EN>

Direttiva del Consiglio del 21 maggio 1991 concernente il trattamento delle acque reflue urbane (91/271/CEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31991L0271>

Ducklow H.W., McCallister S.L., 2005. The biogeochemistry of carbon dioxide in the coastal oceans, in: Robinson, A.R. et al. The global coastal ocean: Multiscale interdisciplinary processes. The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas, Vol. 13, 269-315. Harvard University Press: Cambridge. ISBN 0-674-01526-6

Faganeli J., Malej A., Pezdič J., Malačič V., 1988. C:N:P ratios and stable C isotopic ratios as indicators of sources of organic matter in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Oceanologica Acta* Vol. 11, 377-382

Franks P.J.S., Walstad L.J., 1997. Phytoplankton patches at fronts: A model of formation and response to wind events. *Journal of Marine Research*, Vol. 55, 1-29

Fry, B., 2006. Stable isotope ecology. Springer Ed., New York, 324 pp

Gattuso, J.P., Frankignoulle M., Wollast R., 1998. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, Vol. 29, 405-434. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.405>

Gonzalez, A., Germain, R.M., Srivastava, D.S., Filotas, E., Dee, L.E., Gravel, D., Thompson, P.L., Isbell, F., Wang, S., Kéfi, S., Montoya, J., Zelnik, Y.R. and Loreau, M. (2020), Scaling-

up biodiversity-ecosystem functioning research. *Ecol Lett*, 23: 757-776. <https://doi.org/10.1111/ele.13456>

Grey J., Jones R.I., Sleep D., 2001. Seasonal changes in the importance of the source of organic matter to the diet of zooplankton in Loch Ness, as indicated by stable isotope analysis, *Limnology and Oceanography*, 3, 505-513 <https://doi:10.4319/lo.2001.46.3.0505>

Guerra Araújo Abrantes de Figueiredo G., Schwamborn R., Bertrand A., Munaron J.M., Le Loc'h F., 2020. Body size and stable isotope composition of zooplankton in the western tropical Atlantic. *Journal of Marine Systems*, Vol. 212, 103449. ISSN 0924-7963

Karlsson J., Jonsson A., Meili M., Jansson M., 2003. Control of zooplankton dependence on allochthonous organic carbon in humic and clear-water lakes in northern Sweden. *Limnology and Oceanography*, 1, 269-276, <https://doi:10.4319/lo.2003.48.1.0269>

Kovalev A.V., Mazzocchi M.G., Kideyş A.E.; Toklu B., Skryabin V.A., 2003. Seasonal Changes in the Composition and Abundance of Zooplankton in the Seas of the Mediterranean Basin. *Turkish Journal of Zoology*, Vol. 27: No. 3, Article 6. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol27/iss3/6>

Lévy M., Mémary L., Andre J.M., 1998. Simulation of primary production and export fluxes in the Northwestern Mediterranean Sea. *Journal of Marine Research*, 56, 197–238. https://elischolar.library.yale.edu/journal_of_marine_research/2268

Margalef R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*. Vol. 1 (4). 493-509 <https://archimer.ifremer.fr/doc/00123/23403/>

Matthews B., Mazumder A., 2005. Temporal variation in body composition (C:N) helps explain seasonal patterns of zooplankton $\delta^{13}\text{C}$. *Freshwater Biology*, 50, 502-515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01336.x>

Mazzocchi M.G., Ribera D'Alcalà M., 1995. Recurrent patterns in zooplankton structure and succession in a variable coastal environment. *ICES Journal of Marine Science*, Vol. 52, Iss. 3-4, 679–691. [https://doi.org/10.1016/1054-3139\(95\)80081-6](https://doi.org/10.1016/1054-3139(95)80081-6)

McCutchan J.H., Lewis W.M., Kendall C., McGrath C.C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, Vol.102, Iss. 2, 378-390. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12098.x>

Montagnes David J.S., Berges John A., Harrison Paul J., Taylor F.J. R., (1994). Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton, *Limnology and Oceanography*, 39. <https://doi:10.4319/lo.1994.39.5.1044>

Muller-Karger F.E., Varela R., Thunell R., Luerssen R., Hu C., Walsh J.J. (2005), The importance of continental margins in the global carbon cycle. *Geophysical Research Letters*, Vol. 32, L01602. <https://doi:10.1029/2004GL021346>

Nfon E., Cousins I.T., Broman D., 2008. Biomagnification of organic pollutants in benthic and pelagic marine food chains from the Baltic Sea. *Science of The Total Environment*, Vol. 397, Iss. 1–3, 190-204. ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.029>

Obernosterer I., Herndl G.J., 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 116, 247-257.

Oesterwind D., Rau A., Zaiko A., 2016. Drivers and pressures – Untangling the terms commonly used in marine science and policy. *Journal of Environmental Management* Vol. 181, 8-15. ISSN 0301-4797. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.058>

Parnell A.C., Inger R., Bearhop S., Jackson A.L., 2010. Source Partitioning Using Stable Isotopes: Coping with Too Much Variation. *PLoS ONE* 5(3): e9672. <https://doi:10.1371/journal.pone.0009672>

Perga M.E., Gerdeaux D., 2006. Seasonal variability in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the zooplankton taxa in two alpine lakes. *Acta Oecologica*, Vol. 30, Iss. 1, 69-77. ISSN 1146-609X. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.01.007>

Post D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* Vol. 83, Iss. 3, 703-718. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[0703:USITET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[0703:USITET]2.0.CO;2)

Rau G., Takahashi T., Marais D., 1989. Latitudinal variations in plankton $\delta^{13}\text{C}$: implications for CO_2 and productivity in past oceans. *Nature* 341, 516–518. <https://doi.org/10.1038/341516a0>

Siokou-Frangou I., 1996. Zooplankton annual cycle in a Mediterranean coastal area. *Journal of Plankton Research*, Vol. 18, Iss. 2, 203–223. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.2.203>

Takeuchi I., Miyoshi N., Mizukawa K., Takada H., Ikemoto T., Omori K., Tsuchiya K., 2009. Biomagnification profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols and polychlorinated biphenyls in Tokyo Bay elucidated by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope ratios as guides to trophic web structure. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 58, Iss. 5, 663-671. ISSN 0025-326X. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.12.022>

Tesán-Onrubia J.A., Tedetti M., Carlotti F., Tenaille M., Guilloux L., Pagano M., Lebreton B., Gaël Guillou, Fierro-González P., Guigue C., Chifflet S., Garcia T., Boudriga I., Belhassen M., Zouari A.B., Bănaru D., 2023. Spatial variations of biochemical content and stable isotope ratios of size-fractionated plankton in the Mediterranean Sea (MERITE-HIPPOCAMPE campaign). *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 189, 114787. ISSN 0025-326X. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114787>

Thornton S.F., McManus J., 1994. Application of Organic Carbon and Nitrogen Stable Isotope and C/N Ratios as Source Indicators of Organic Matter Provenance in Estuarine Systems: Evidence from the Tay Estuary, Scotland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 38, Iss. 3, 219-233. ISSN 0272-7714. <https://doi.org/10.1006/ecss.1994.1015>

Walsh J.J., 1988. *On the Nature of Continental Shelves*. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. ISBN 0-12-733775-X

Walsh J.J., 1991. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. *Nature* 350, 53–55. <https://doi.org/10.1038/350053a0>

Wan Y., Jin X., Hu J., Jin F., 2007. Trophic Dilution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in a Marine Food Web from Bohai Bay, North China. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 41, Iss. 9, 3109–3114. <https://doi.org/10.1021/es062594x>

Zohary T., Erez J., Gophen M., Berma-Frank I., Stiller M., 1994. Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret. *Limnology and Oceanography*, 39, 1030-1043. [https://doi: 10.4319/lo.1994.39.5.1030](https://doi:10.4319/lo.1994.39.5.1030)

QUADERNI
LABORATORIO

9/2025