

Verso un approccio funzionale allo studio della diversità: risultati di una prima indagine sullo zooplancton e la rete trofica pelagica del Lago Maggiore attraverso analisi d'isotopi stabili di carbonio e azoto*

Anna Visconti, Amedeo Fadda, Rossana Caroni, Igor Cerutti, Pietro Volta, Marina Manca

CNR ISE Largo Tonolli 50 28922 Verbania (VB)

* Lavoro realizzato con il contributo della Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere nell'ambito delle ricerche sugli aspetti limnologici del Lago Maggiore, Campagna 2008.

Riassunto

In ambito internazionale si va sempre più affermando la necessità di studiare in chiave funzionale gli ecosistemi, primi fra tutti quelli d'acqua dolce. Questi ultimi infatti dovrebbero essere tra gli ambienti maggiormente influenzati dai mutamenti globali e dall'invasione di specie aliene. L'impatto di questi grandi cambiamenti sulla biodiversità e sul funzionamento degli ambienti dulcacquicoli non può prescindere da una caratterizzazione degli organismi mirante alla definizione delle fonti da essi utilizzate e del loro ruolo trofico nell'ecosistema. In quest'ottica è stato condotto nel 2008 uno studio sul pelago del Lago Maggiore, uno dei laghi maggiormente studiati in Europa. Scopo dell'indagine era quello di caratterizzare le variazioni stagionali nelle fonti di carbonio e nel ruolo trofico di organismi pelagici, sì da mettere in luce eventuali contributi del litorale alla produzione secondaria pelagica e le vie principali del trasferimento di materia ed energia dai produttori primari ai consumatori secondari, fino ai pesci planctivori. Campioni raccolti in diversi momenti stagionali da tre stazioni sono stati analizzati al fine di identificarne i *fingerprint* isotopici di carbonio e azoto. I risultati ottenuti confermano quanto osservato nel Lago Lemano, suggerendo l'esistenza di meccanismi comuni ai laghi profondi subalpini relativamente alle variazioni stagionali del *fingerprint* del carbonio e un ruolo trofico dei cladoceri molto simile. Il ruolo di fonti litorali di carbonio non sembra trascurabile: il *fingerprint* dei pesci zooplanctivori è risultato infatti molto vicino a quello del litorale in alcuni momenti dell'anno. Inoltre, i dati ottenuti relativamente ai copepodi sembrano suggerire per essi un ruolo di carrier del carbonio litorale verso il pelago. Ulteriori studi attualmente in corso consentiranno di approfondire questi due aspetti emersi da questa prima indagine.

PAROLE CHIAVE: diversità funzionale / fingerprint isotopico / zooplancton / seston / pesci

Towards a functional approach of diversity: preliminary results of a first study on the Lake Maggiore pelagic trophic web using stable carbon and nitrogen isotopes

The need of functional studies in freshwater ecology is increasing at international level. Freshwater ecosystems are considered among the most affected by climate change and alien species invasions. In order to evaluate the impact of these factors on biodiversity and ecosystem functioning it is important to define the organism's trophic position in the ecosystem and their food sources. For this purpose we have carried out a study on the pelagic web in Lake Maggiore, one of the most studied lakes in Europe. The main aim of the study was the evaluation of seasonal variations in carbon sources and the trophic position of the pelagic organisms. Additionally, it was intended to investigate the possible contribution from the littoral zone to secondary pelagic production and to identify the energy flow from primary producers up to planktivorous fish. Stable isotopes analysis of carbon and nitrogen were used from lake samples taken in different seasons and at three different sites. Our results are comparable with studies conducted in Lake Lemman, suggesting that subalpine deep lakes have similar seasonal variations in carbon and nitrogen fingerprints. Input from the littoral zone appeared to be significant, as the planktivorous fish fingerprint was occasionally very close to littoral values. Moreover, our results seem to suggest that zooplankton copepods could be carbon 'carriers' from the littoral to the pelagic zone. Further ongoing studies will allow us to better understand the processes observed in this preliminary study.

KEY WORDS: functional diversity / isotopes fingerprint / zooplankton / seston / fish

INTRODUZIONE

Aspetti generali e delle tecniche di analisi degli isotopi stabili

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

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

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

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

Il secondo *fingerprint* comunemente accettato è rappresentato dalla memoria immagazzinata nel cervello: man mano che cresce, un animale accumula memorie differenti nelle diverse circostanze. Oggigiorno, l’elasticità delle trasmissioni sinaptiche è considerata come una possibile chiave dei meccanismi della memoria del cervello, e

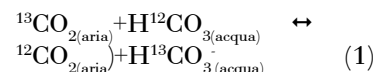
molto vi è ancora da scoprire relativamente ai dettagli con i quali tali processi avvengono.

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

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

Il frazionamento isotopico può essere suddiviso in due categorie. La prima categoria è quella delle reazioni di equilibrio di scambio isotopico, la più rappresentativa della quali è la reazione di scambio che consente di mantenere il

rapporto isotopico del carbonio nell’atmosfera costante quasi su tutto il pianeta:



La seconda categoria è il cosiddetto effetto isotopico cinetico, che può aver luogo in quasi tutte le reazioni biologiche, in dipendenza dal meccanismo di reazione. In generale, la molecola isotopica a più basso peso molecolare ha una costante di velocità di reazione più grande rispetto a quella della molecola più pesante. Il grado di frazionamento dipende dalle caratteristiche proprie dell’enzima interessato nella reazione. Ad esempio, è noto che la denitrificazione ha un fattore di frazionamento grande, fino a 1,04 (4%), mentre la fissazione biologica dell’N₂ ha un fattore di frazionamento piccolo, di 1,002 (0,2%). Il fattore di frazionamento di una data reazione in due specie differenti è in generale della stessa grandezza se i siti enzimatici sono simili. Di conseguenza, il rapporto ¹⁵N/¹⁴N della biosfera nel suo insieme è leggermente maggiore di quello dell’azoto atmosferico. D’altro canto, si osserva un fattore di frazionamento isotopico grande –di 1,03 (3%)– nella carbossilazione delle piante C₃, e questo risulta in un rapporto ¹³C/¹²C più basso nella biosfera nel suo insieme rispetto all’HCO₃ delle acque.

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

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

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

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

Naturalmente:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{HCO}_3^-)_{\text{(acqua)}} = 0,0\text{‰}$$

$$\text{e } \delta^{15}\text{N}(\text{N}_{2\text{(aria)}}) = 0,0\text{‰}.$$

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

In generale, le leggi empiriche che governano l'impiego degli isotopi stabili di carbonio e azoto nelle analisi ecosistemiche sono le seguenti:

1. Negli organismi vegetali, il $\delta^{13}\text{C}$ è determinato dalla dinamica della fissazione di CO_2 durante la fotosintesi. Le piante C_3 e C_4 e i vegetali terrestri presentano differenti contenuti in ^{13}C , e risultano a loro volta differire dal fitoplancton. Quest'ultimo a sua volta differisce dal fitobentos.

2. Il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ di un organismo animale è molto prossimo a quello della sua dieta.

3. In una gran varietà di invertebrati e vertebrati nel passaggio da preda a predatore si osserva un arricchimento in ^{15}N .

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

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{(animale)}}(\text{‰}) = (1,0 \sim 2,0)(\text{TL} - 1) \quad (4)$$

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})_{\text{(animale)}} = 3,3(\text{TL} - 1) + \delta^{15}\text{N}_{\text{(alghe)}} \quad (5);$$

nelle quali TL indica il livello trofico (TL alghe=1).

5. un aumento di ^{15}N in un ecosistema è causato dall'evaporazione dell' NH_3 e dalla denitrificazione ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$).

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

Gli isotopi stabili sono uno strumento efficiente per rivelare la diversità e la complessità della rete trofica zooplanctonica dei laghi (POST, 2002). Gli organismi zooplanctonici utilizzano fonti di carbonio autoctono, attraverso il grazing del fitoplancton, dei batteri e di altri organismi che dipendono dalla produzione fitoplanctonica. I batteri dipendono anche dal pool del carbonio organico disciolto prodotto attraverso molte altre fonti, ivi inclusi il fitoplancton, il perifiton, le macrofite e il carbonio alloctono. Gli studi sugli isotopi stabili sono stati utilizzati per distinguere tra fonti fitoplanctoniche e

non-fitoplanctoniche di carbonio (bentoniche, litorali e alloctone) in diversi ecosistemi lacustri, dimostrando che il grado di dipendenza dello zooplancton da fonti non fitoplanctoniche dipende dal grado di trofia, dalla stagione, e dal rapporto N/P (KARLSSON *et al.*, 2003).

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

Con questo studio ci si è proposti di:

- dare una prima caratterizzazione del segnale isotopico di car-

bonio e azoto e del suo propagarsi lungo la rete trofica pelagica del Lago Maggiore, dalla base alimentare fino ai pesci, nei quattro momenti stagionali. Come evidenziato nella parte introduttiva, l'intervallo di valori del $\delta^{13}\text{C}$ lacustre ne riflette principalmente la tipologia e dunque, nel caso del Maggiore, ci si attende che esso sia raffrontabile a quello di altri laghi profondi subalpini. Il $\delta^{15}\text{N}$ dei laghi è invece principalmente legato allo stato trofico e tende ad innalzarsi in acque di scarico urbano (CABANA e RASMUSSEN, 1996); il termine di paragone, nel caso del Maggiore, dovrebbe essere dunque quello di ambienti oligotrofici;

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

MATERIALI E METODI

È questo il primo studio sul Lago Maggiore di questo tipo, inteso a dare una prima caratterizzazione della linea di base (pelagica, litorale, ed eventualmente del Fiume Toce), e del propagarsi del segnale isotopico lungo la catena alimentare dallo zooplancton fino ai pesci. Pertanto, il campionamento è stato previsto, oltreché nella stazione pelagica al largo di Ghiffa, corrispondente al punto di massima profondità del lago, da sempre utilizzata per rappresentare il

pelago lacustre, anche in altri due siti, scelti in quanto indicativi, stando ai risultati di precedenti studi, dell'influenza del Fiume Toce (Stazione denominata "Baveno"; latitudine $45^{\circ}54'28''\text{N}$; longitudine $8^{\circ}31'44''\text{E}$) e dell'ambiente litorale (Stazione denominata "Lesà"; latitudine $45^{\circ}49'70''\text{N}$; longitudine $8^{\circ}34'70''\text{E}$), rispettivamente. I campionamenti sono stati effettuati con cadenza all'incirca mensile e i dati ottenuti raggruppati in modo tale da rappresentare, secondo quanto previsto dal progetto, i quattro momenti stagionali. Campioni d'acqua sono stati raccolti dalle tre stazioni entro i primi 50 m (lo strato usualmente campionato per lo zooplancton) per la determinazione del segnale isotopico del materiale sestonico ($<76\ \mu\text{m}$) e per la misura dell'abbondanza e della biomassa del fitoplancton (misure di clorofilla *a* e biovolume). A ogni data di campionamento organismi appartenenti ai diversi taxa zooplanctonici venivano raccolti in quantità sufficienti a consentire analisi del segnale isotopico. Per la descrizione dettagliata dei metodi di preparazione dei campioni si veda MANCA *et al.* (1994 e 1997). Nel contempo, campioni quantitativi prelevati con le usuali metodiche servivano a determinare la densità di popolazione e la biomassa zooplanctonica nei quattro differenti momenti e nelle tre diverse stazioni. Venivano inoltre misurate la temperatura dello strato d'acqua campionato mediante termometro termistore e la trasparenza delle acque mediante Disco di Secchi. Al termine della campagna d'indagine sono stati inoltre prelevati campioni dal litorale (perifiton e anfipodi), utili a caratterizzarne il segnale isotopico, in tre diverse stazioni situate lungo l'asse maggiore del lago.

Onde ottenere campioni adat-

ti a garantire risultati attendibili delle analisi strumentali è stato necessario prelevare, di volta in volta, e per ogni replica, un numero d'individui compreso tra un minimo di 40 e un massimo di 500, in dipendenza dalla taglia individuale. I dati che qui verranno presentati, dunque, sono rappresentativi, nel loro complesso, di circa 13000 individui zooplanctonici.

I campioni relativi a tre diverse specie ittiche (coregone lavarello, agone, gardon) sono stati ottenuti mediante trattamento di campioni di muscolo prelevati dalla regione dorsale compresa tra il capo e l'inizio della pinna dorsale di cinque individui per ogni data di campionamento, prelevati, nelle quattro diverse stagioni, con reti branchiali in zona pelagica (coregone lavarello, *Coregonus lavaretus* e agone, *Alosa fallax lacustris*) e litorale (gardon, *Rutilus rutilus*) nella regione centrale del Lago Maggiore, all'incirca nelle vicinanze dell'abitato di Ghiffa. Dei singoli pesci è stata misurata la taglia (lunghezza totale e peso totale) e determinata l'età mediante lettura delle scaglie con la finalità di costituire campioni di taglia ed età il più possibile omogenea per limitare la variabilità del segnale isotopico legata a possibili differenti abitudini trofiche.

I campioni e gli standard sono stati pesati in capsulini di stagno e caricati in analizzatore elementare (Vario EL III) interfacciato con uno spettrometro di massa per il rapporto isotopico (G. G. Hatch Isotope Laboratories, University of Ottawa, Faculty of Science, Ottawa, Canada). I campioni e gli standard sono stati combusti a circa 1800°C (combustione di Dumas) e i prodotti gassosi risultanti trasportati in elio attraverso colonne di ossido-riduzione ottimizzate per CO_2 e N_2 . I gas venivano separati mediante colonne di assorbimento a purifica-

zione e cattura, inviate all'interfaccia (Conflo II) e all'IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer della Delta XP Plus Advantage). La precisione analitica delle analisi è stata basata su uno standard interno (C-55, acido glutamico, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ = 3,98 e -28,53, rispettivamente) con precisione analitica solitamente inferiore allo 0,2 ‰.

I valori di $\delta^{15}\text{N}$ sono riferiti all' N_2 dell'aria e normalizzati con standard interni calibrati all'International standard IAEA-N1 (+0,4‰), IAEA-N2 (+20,3‰), USGS-40 (-4,52‰) e USGS-41 (47,57‰). I valori di $\delta^{13}\text{C}$ sono riferiti alla PDB e normalizzati con standard interni calibrati presso l'International standard IAEA-CH-6 (-10,4‰), NBS-22 (-29,91‰), USGS-40 (-26,24‰) e USGS-41 (37,76‰). La deviazione standard dei valori relativi alle analisi di ^{13}C e ^{15}N nei campioni di seston, zooplankton e pesci, è risultata, rispettivamente pari a 0,05 e 0,12; 0,12 e 0,06; 0,12 e 0,06.

Così come suggerito da studi analoghi effettuati in precedenza in laghi simili (ad esempio, il Lago Lemano; PERGA e GERDAUX, 2006), i dati relativi alla composizione isotopica del materiale sestonico sono stati confrontati con quelli ottenuti per *Daphnia*, sì da verificare la possibilità di utilizzare la composizione isotopica di quest'ultima come tracciante della linea di base pelagica, in virtù del suo comportamento alimentare non selettivo nelle diverse stagioni. A tal fine, i valori del $\delta^{13}\text{C}$ e del $\delta^{15}\text{N}$ del seston (frazione $\leq 76 \mu\text{m}$ entro lo strato 0-50 m) sono stati confrontati con quelli misurati alle stesse date di campionamento e nelle medesime stazioni, in *Daphnia*. La validità di *Daphnia* come integratore del segnale isotopico del carbonio pelagico è stata anche saggiata attraverso il confronto con il rapporto isotopico misurato in *Dreissena*

polymorpha a conclusione della campagna di rilevamenti. Molluschi bivalvi di questo genere sono infatti spesso utilizzati come integratori e indicatori della linea di base pelagica (POST, 2002).

I diversi taxa zooplanctonici presi in esame nel corso dell'anno comprendevano, oltre a *Daphnia*, anche i copepodi, con distinzione in diaptomidi e ciclopidi, e i cladoceri di grosse dimensioni *Leptodora kindtii* e *Bythotrephes longimanus*. I segnali isotopici dei diversi taxa nelle diverse stazioni e nei diversi periodi dell'anno sono stati analizzati e comparati con quelli ottenuti per *Daphnia*. Alla base di tale approccio vi sono due importanti assunzioni:

- 1) qualora un dato taxon sia supportato dalla linea di base pelagica, il suo $\delta^{13}\text{C}$ sarà simile a quello di *Daphnia*, il che significa che la varianza residua sarà minore o uguale a quella dell'arricchimento atteso per livello trofico (cfr. materiali e metodi, equazione 4);
- 2) qualora il $\delta^{13}\text{C}$ di un taxon zooplanctonico risulti statisticamente diverso da quello di *Daphnia* e/o

la varianza residua maggiore di quella attesa, è possibile ipotizzare che vi siano fonti multiple di alimentazione della comunità zooplanctonica;

3) le modificazioni nelle posizioni trofiche relative dei taxa zooplanctonici sono ottenute a partire dalla comparazione tra il loro $\delta^{15}\text{N}$ e quello di *Daphnia*. Se un dato taxon occupa la stessa posizione trofica (relativamente a quella di *Daphnia*) lungo l'arco dell'anno, allora la differenza $\Delta\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{taxon}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Daphnia}}$ dovrebbe rimanere costante, e presentare una variabilità minore di quella determinata dall'arricchimento per livello trofico (cfr. materiali e metodi, equazione 5). Variazioni importanti nel ΔN nel corso dell'anno potrebbero indicare sia che il taxon non utilizza sempre le medesime fonti primarie, e che pertanto utilizza fonti alternative a segnale isotopico differente, ovvero che non occupa la stessa posizione trofica durante tutto l'arco dell'anno.

Le relazioni tra i taxa e la

Tab. I. Risultati del test Kruskal-Wallis per il confronto dei dati relativi ai segnali isotopici ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) e del rapporto C/N dei diversi campioni di materiale prelevato dalle tre stazioni (Ghiffa, Baveno e Lesa). N= numero di campioni; P= livello di significatività. NS = non significativo

		N	P	risultato
<i>Daphnia</i>	$\delta^{13}\text{C}$	14	0,85	NS
	$\delta^{15}\text{N}$	13	0,21	NS
	C/N	10	0,39	NS
<i>Leptodora</i>	$\delta^{13}\text{C}$	12	0,73	NS
	$\delta^{15}\text{N}$	10	0,73	NS
	C/N	10	0,76	NS
<i>Bythotrephes</i>	$\delta^{13}\text{C}$	20	0,61	NS
	$\delta^{15}\text{N}$	17	0,95	NS
	C/N	14	0,40	NS
Seston 0-20m	$\delta^{13}\text{C}$	11	0,90	NS
	$\delta^{15}\text{N}$	11	0,39	NS
	C/N	8	0,08	NS
Seston 25-50m	$\delta^{13}\text{C}$	12	0,87	NS
	$\delta^{15}\text{N}$	12	0,78	NS
	C/N	9	0,84	NS

linea di base sono state investigate mediante regressioni lineari. La significatività delle differenze rispetto al valore 1 dei coefficienti angolari delle rette di regressione è stata testata mediante t-test. I valori della variabilità residua, ottenuti mediante modello ANOVA sono stati comparati a quelli previsti per il frazionamento trofico di ^{13}C e ^{15}N (deviazione standard = 1,3 e 1,0‰, rispettivamente).

RISULTATI

Confronto tra le diverse stazioni del pelago lacustre

I dati relativi al segnale isotopico dei campioni raccolti nelle tre stazioni (Chiffa, Baveno e Lesa) sono stati testati statisticamente (test Kruskal-Wallis non parametrico, one way) al fine di verificare se, e in che misura, le differenze osservate fossero statisticamente significative. I risultati, riportati in tabella I, dimostrano chiaramente come le differenze osservate tra i diversi siti campionati non siano statisticamente significative.

Interessanti differenze tra il segnale isotopico del carbonio del materiale sestonico dei primi 20 m e quello dello strato più profondo (25-50m) sono state osservate relativamente alla stazione di Baveno e a seguito di intense precipitazioni, con valori più negativi nella zona più profonda. Esse potrebbero essere indicative dell'influenza di un apporto di materiale dal Fiume Toce, in accordo con quanto osservato in studi precedenti (AMBROSETTI *et al.*, 1980; DE BERNARDI *et al.*, 1988).

Tuttavia, nel loro complesso, le variazioni tra le diverse stazioni non sono risultate statisticamente significative (test Kruskal-Wallis per raffronto multiplo; $H(1, N=23) = 3,185606$ $p=0,074$).

Anche le differenze tra il $\delta^{13}\text{C}$

del seston dello strato più superficiale e quelle dello strato più profondo nelle tre stazioni sono risultate non significative dal punto di vista statistico. Tale dato può essere spiegato a partire dall'analisi del contributo dei diversi gruppi alla biomassa totale (Fig. 1): quando legate al fitoplancton, le differenze nel segnale isotopico possono essere in linea generale relazio-

nabili non tanto alla maggiore o minore biomassa raggiunta, quanto a importanti modificazioni nella struttura del popolamento, in particolare modo nella geometria degli organismi presenti (POPP *et al.*, 1998). I dati riportati nei grafici in figura 1 dimostrano come i gruppi dominanti siano sostanzialmente gli stessi nei due strati d'acqua considerati, mentre differenze anche impor-

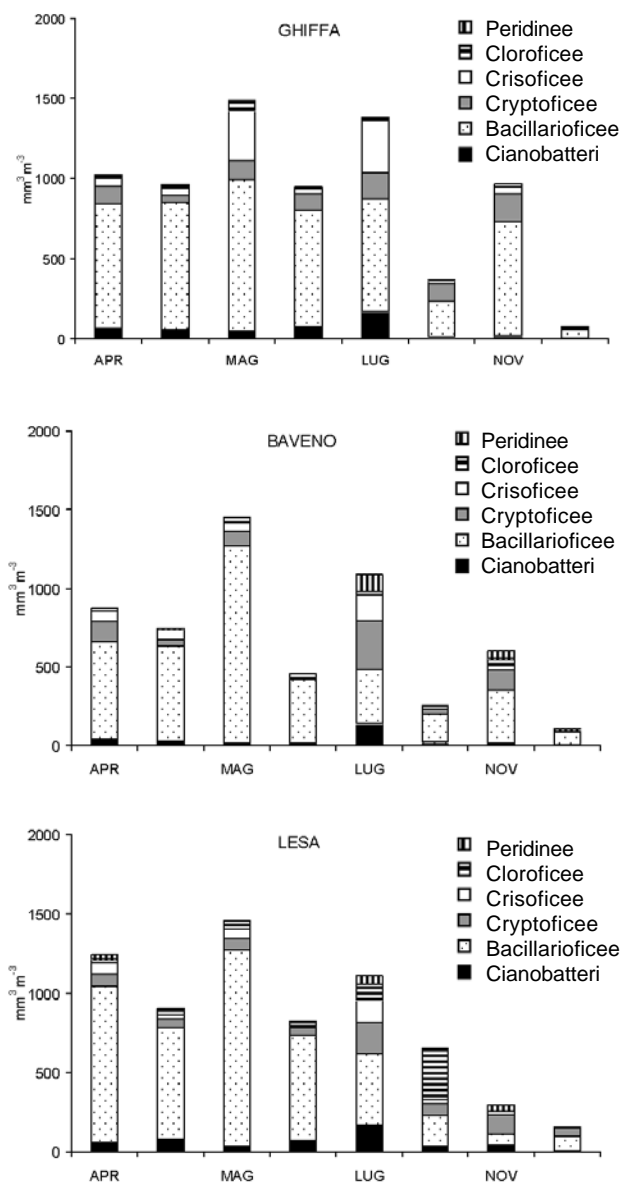


Fig. 1. Biovolume fitoplanctonico misurato nelle tre stazioni del Lago Maggiore in diversi periodi dell'anno e nei due diversi strati (epilimnico e ipolimnio) campionati per le analisi degli isotopi stabili di carbonio e azoto.

tanti sono state osservate, com'è logico attendersi, nei valori complessivi di biomassa raggiunti, soprattutto nelle fasi di maggiore sviluppo, primaverile estivo e autunnale, del popolamento. Le differenze di biomassa sono risultate rilevabili anche dalla comparazione dei valori di clorofilla *a* nei due strati campionati (test di Wilcoxon; $p=0,008$; $N=18$).

I risultati delle analisi relative al segnale isotopico del carbonio nei quattro periodi dell'anno e per le diverse componenti prese in esame sono riassunti nel grafico in figura 2. La scala del $\delta^{13}C$ comprende valori rappresentativi dell'ambiente litorale (meno negativi) e di quello pelagico, di laghi profondi, quali il Maggiore. Organismi bentonici e di acque profonde presentano generalmente valori del $\delta^{13}C$ più bassi rispetto a quelli del pelago (CATTANEO *et al.*, 2004). Il grafico può dunque essere letto, dall'alto verso il basso, come una graduale transizione dal litorale alle zone più profonde del lago.

Il segnale isotopico del carbonio delle acque pelagiche è rappresentato, nel grafico in figura, dai punti corrispondenti a *Daphnia*. Filtrando non selettivamente il materiale sestonico, questo cladocero

rappresenta nel Maggiore, così come in laghi ad esso assimilabili per tipologia e livello di produttività, un indicatore della cosiddetta linea di base pelagica (PERGA e GERDEAUX, 2006). Effettivamente, in linea generale, il segnale isotopico del $\delta^{13}C$ di *Daphnia* misurato nel corso del 2008 ha riflettuto fedelmente quello del materiale sestonico ($r = 0,86$; $p < 0,01$; $N=13$). Secondo le assunzioni sulle quali si basa il principio del metodo degli isotopi stabili, organismi che rispecchiano il segnale isotopico del carbonio di *Daphnia* sono ad essa relazionabili in termini di fonte alimentare, e dunque definibili come tipicamente legati al pelago. La conferma dell'idoneità di *Daphnia* a rappresentare il segnale pelagico è anche emersa dai risultati delle misure effettuate a conclusione del lavoro di monitoraggio su *Dreissena polymorpha*, il mollusco bivalve generalmente utilizzato come integratore della linea di base del pelago ($\delta^{13}C$ medio = $-35,14$, $N=72$; $SE=0,28\text{‰}$).

I dati del Lago Maggiore rappresentati in figura 2 dimostrano chiaramente come il segnale isotopico del $\delta^{13}C$ di cladoceri zooplanctonici, quali *Bythotrephes* e *Leptodora*, e dei ciclopidi (*Cyclops abyss-*

sorum e *Mesocyclops leuckarti*), ben si adatti a una situazione tipica dell'ambiente pelagico. In altre parole, i valori del $\delta^{13}C$ dei tessuti di questi organismi sono del tutto assimilabili a quelli componenti *Daphnia*. Così come osservato nel Lago Lemano, in particolare, la correlazione tra i valori del $\delta^{13}C$ di *Daphnia* e quelli di *Bythotrephes* è risultata molto elevata ($r = 0,89$) e statisticamente altamente significativa ($p < 0,001$; $N=18$). La pendenza della retta di regressione ottenuta dai dati di $\delta^{13}C$ relativi ai due taxa non è risultata significativamente diversa da 1 e il valore dell'intercetta non diverso da 0.

Il grafico in figura 2 mostra anche molto bene come il segnale isotopico del carbonio dei diversi componenti del sistema cambi al variare delle stagioni, muovendosi verso valori meno negativi durante le stagioni calde per ritornare, in autunno, verso valori più negativi, che preludono a quelli del periodo invernale. Le variazioni stagionali nel segnale isotopico pelagico del carbonio sono risultate in accordo con le variazioni nella temperatura media ambientale (Fig. 3). La correlazione fra le due variabili su tutti i dati ($N=12$) è alta ($r=0,74$) e statisticamente significativa ($p < 0,05$). La spiccata stagionalità osservata nel Lago Maggiore ricalca molto bene quella riportata per laghi simili, ad esempio per il Lemano. Di tutta una serie di variabili fisiche, chimiche e biologiche prese in esame, solamente la temperatura ambientale, espressa come la media delle temperature entro lo strato d'acqua campionato, è risultata correlata in modo statisticamente significativo con il segnale isotopico del $\delta^{13}C$ della linea di base pelagica (PERGA e GERDEAUX, 2006).

Dal grafico in figura 2 emerge anche, e piuttosto chiaramente, come il $\delta^{13}C$ dei copepodi diaptomi-

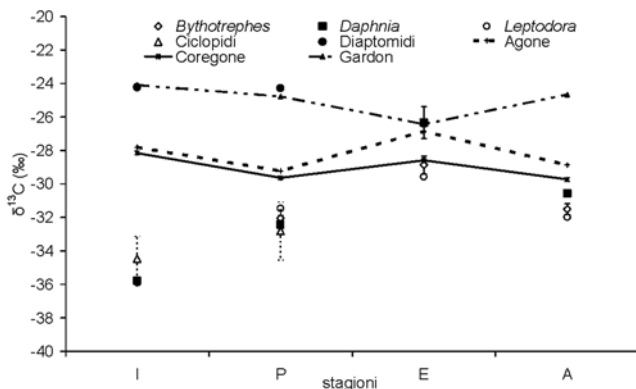


Fig. 2. Valori del rapporto isotopico del carbonio ($\delta^{13}C\text{‰}$) ottenuti nel corso del 2008 da diversi taxa componenti lo zooplancton pelagico del Lago Maggiore e in tre diverse specie di pesci. Le barre verticali rappresentano l'errore standard calcolato sulle repliche dei campioni.

di (della specie *Eudiaptomus padanus*) si discosti nettamente da quello misurato negli altri taxa zooplanctonici. In particolare, questi organismi prelevati in acque pelagiche sono risultati occupare, nel grafico relativo al segnale isotopico del carbonio, una posizione che ne suggerisce una dipendenza da fonti alimentari di origine litorale. Come evidenziato in precedenza, valori del $\delta^{13}\text{C}$ relativamente alti (meno negativi rispetto a quelli del segnale pelagico) caratterizzano gli organismi di ambiente litorale. Il riferimento litorale, per il Lago Maggiore, è rappresentato dal segnale isotopico del carbonio da noi misurato nel perifiton e in anfipodi bentonici prelevati in zona litorale, in occasione di una serie di prelievi in tre diverse stazioni lungo l'asse principale del lago ($\delta^{13}\text{C} = -24,41\text{‰}$, valore medio $\pm 0,028$). I dati relativi ai diaptomidi del Lago Maggiore sembrano inoltre suggerire come, contrariamente a quanto rilevato per gli altri taxa zooplanctonici esaminati, il segnale isotopico del carbonio in questi organismi tenda a mantenersi più stabile nel tempo. Questi due aspetti emersi dall'attività di monitoraggio del 2008 saranno, con tutta probabilità oggetto d'indagine più approfondita nel prossimo futuro.

Molto interessante risulta, sempre nel grafico in figura 2, l'analisi del segnale isotopico del carbonio nelle tre differenti specie di pesci da noi prese in esame. In aggiunta all'agone, specie ittica autoctona, e del coregone, specie alloctona ma da tempo acclimatata con successo, si è ritenuto opportuno analizzare anche il gardon, specie che, di recente, è stata protagonista di una vera e propria invasione nelle acque del Lago Maggiore (VOLTA e JEPSEN, 2008). Risulta evidente il carattere litorale del segnale isotopico del gardon, particolarmente in

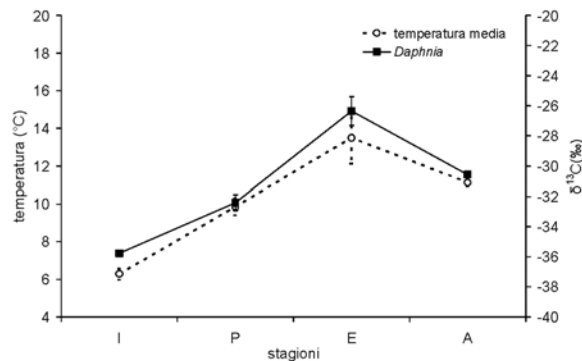


Fig. 3. Variazioni stagionali del segnale isotopico pelagico del carbonio e della temperatura nelle tre stazioni nello strato d'acqua campionato (0-50m) (valori medi \pm Errore Standard).

inverno e primavera, quando i valori sono molto simili a quelli misurati nei diaptomidi del lago, e anche coerenti con il segnale litorale del perifiton e degli anfipodi. Nella stagione estiva, il segnale isotopico del gardon si avvicina molto a quello di *Daphnia*, suggerendo un importante cambiamento nell'alimentazione e il passaggio da fonti litorali a fonti pelagiche di supporto alimentare. Se per le specie pelagiche, quali coregone e agone, è sostanzialmente corretto affermare che non vi possano essere sostanziali differenze nel regime alimentare in relazione alla taglia e all'età, altrettanto non è lecito supporre per il gardon. Tale specie è onnivora e opportunistica e, almeno oltralpe, mostra una spiccata plasticità nella dieta in relazione al periodo stagionale e alla taglia. I pesci considerati in queste analisi erano soggetti adulti di 3 o 4 anni. I risultati dunque, benché di assoluta rilevanza scientifica, risultano limitati a una o due classi di età e non esaustivi per la caratterizzazione della specie e del suo ruolo trofico nell'ecosistema lacustre. Una più approfondita indagine potrebbe essere condotta in futuro per definire con maggior dettaglio questi elementi, possibilmente corroborata dalla stima del contenuto alimentare.

L'analisi del grafico in figura

2 mostra inoltre come il segnale isotopico dei pesci sia, in generale, meno variabile nel corso dell'anno di quello dello zooplancton. Tale risultato conferma come la variabilità sia principalmente legata alla velocità di turnover metabolico e dunque tenda a essere più elevata negli organismi più piccoli rispetto a quelli di taglia maggiore. Soprattutto in inverno, i segnali isotopici del carbonio di agone e coregone si discostano in maniera significativa da quelli della linea di base pelagica, e dei diversi taxa zooplanctonici ad essa relazionati, suggerendo come fonti diverse da quelle pelagiche possano costituire una componente importante dei tessuti di queste due specie di pesci durante la stagione iniziale dell'anno. In estate, i valori del $\delta^{13}\text{C}$ di coregone e agone tendono a incontrare quelli, divenuti meno negativi, della linea di base pelagica, rappresentata da *Daphnia*, e degli organismi da essa dipendenti (cladoceri predatori): in questa fase, lo zooplancton d'acqua libere rappresenta il costituente principale dei tessuti di queste due specie di pesci.

Il pattern stagionale, sostanzialmente invertito nel caso del gardon, potrebbe anche riflettere modificazioni nella linea di base litorale, governata da fattori ambientali diversi rispetto a quella pelagica.

Indagini ulteriori sull'ambiente litorale dovrebbero servire a chiarire questo punto, ancora poco discusso in letteratura.

I dati relativi al $\delta^{15}\text{N}$ di diverse taxa zooplanctonici sono risultati coerenti con un quadro generale di frazionamento trofico; l'arricchimento nell'isotopo più pesante in *Daphnia* rispetto al seston ($\leq 76\mu\text{m}$, pool 0-50m, valori del $\delta^{15}\text{N}$ compresi tra 3,5 e 5,5 ‰) è risultato compreso tra 2 e 3 (valore medio = 2,58), con valori più bassi in estate e più elevati in primavera); *Bythotrephes* è risultato in media arricchito di circa il 3,6 ‰ rispetto a *Daphnia*, con valori invernali più elevati (4,56 ‰) rispetto a quelli estivi (2,59 in media). Le differenze stagionali potrebbero rispecchiare una dipendenza del ruolo trofico di questo predatore invertebrato dalla sua taglia corporea, confermando la possibilità che individui più grossi possano esercitare un'azione di predazione paragonabile a quella dei pesci planctivori (MANCA *et al.*, 2000, MANCA *et al.*, 2008; MANCA e DE MOTT, 2009). I valori del $\delta^{15}\text{N}$ di *Leptodora* e dei ciclopidi si collocano entro un intervallo del 2,8-2,9 ‰ superiore a quelli di *Daphnia*.

Delle tre diverse specie di pesci, l'agone è risultato quella a minor livello di frazionamento del $\delta^{15}\text{N}$, con valori mediamente molto simili a quelli dei predatori invertebrati (2,84 in media, con un intervallo compreso tra 3,6 in inverno, e 2,1 in primavera). I massimi livelli di frazionamento dell'azoto sono stati riscontrati nei coregoni, con valori di $\delta^{15}\text{N}$ intorno al 12 ‰ in inverno e del 10-11 ‰ in primavera e estate, rispettivamente. Durante il periodo invernale e primaverile, il gardon sembra occupare un posto intermedio tra i coregoni e i predatori zooplanctonici, con valori di $\delta^{15}\text{N}$ abbastanza stabili, di 8,8-8,9 ‰ e lievemente più bassi (8,3‰) in estate.

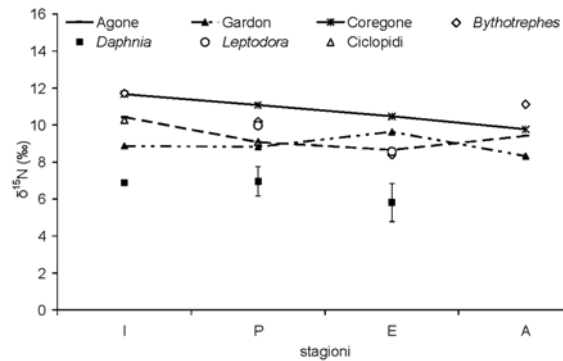


Fig. 4. Valori isotopici del $\delta^{15}\text{N}$ misurati nel corso dell'anno in diverse componenti dello zooplancton, e in tre diverse specie di pesci del Lago Maggiore.

CONCLUSIONI

I principali risultati di questo studio preliminare sono riassumibili nei seguenti punti:

- il segnale isotopico della linea di base pelagica del carbonio del Lago Maggiore, ben rappresentato da *Daphnia* (confermato dal buon accordo con *Dreissena* e con i dati relativi al seston della frazione dimensionale $\leq 76\mu\text{m}$ nello strato 0-50 m) è del tutto raffrontabile a quello misurato in laghi della stessa tipologia del Lago Maggiore;
- nel corso dell'anno, la linea di base del carbonio pelagico si sposta da valori di $\delta^{13}\text{C}$ più alti (meno negativi) a valori più bassi (più negativi), e le variazioni osservate sono correlate con la temperatura ambientale;
- alcuni organismi zooplanctonici, quali i cladoceri predatori *Bythotrephes longimanus* e *Leptodora kindtii* e i ciclopidi adulti (delle specie *Cyclops abyssorum* e *Mesocyclops leuckarti*) ricalcano fedelmente le variazioni stagionali nella linea di base pelagica; questo risultato sta a indicare una dipendenza dalle stesse fonti alimentari utilizzate da *Daphnia*;
- i diaptomidi adulti pelagici recano un segnale isotopico del carbonio molto diverso da quello tipico del pelago, ma caratteristico dell'ambiente litorale; quest'ultimo, rilevato su perifiton e anfipodi con

una precisione molto buona, è pari a quello riportato per laghi a tipologia simile; i diaptomidi adulti del lago (della specie *Eudiatomus padanus*) sono di fatto interpretabili come carrier per il rifornimento di fonti non pelagiche alla produzione secondaria del pelago;

- nelle tre stazioni prese in esame, indicate in studi pregressi come rappresentative dell'impatto del Fiume Toce e dell'ambiente litorale, il segnale isotopico di carbonio e azoto delle diverse componenti da noi analizzate non presenta differenze significative. Evidentemente, le variazioni locali non sono tali da influenzare in maniera significativa la composizione isotopica della linea di base e il suo propagarsi lungo la rete trofica pelagica;
- il segnale isotopico del carbonio dei pesci, in generale meno variabile di quello degli zooplanctonti, indica una loro dipendenza alimentare, oltretutto da fonti pelagiche, anche da fonti litorali, in dipendenza dalla stagione. Delle tre specie, è il gardon quella maggiormente legata al litorale del lago.

Sviluppi futuri

L'esperienza maturata consente di tracciare alcune linee di pianificazione dell'attività futura, anche in un'ottica di ottimizzazione del rapporto costi/benefici. Nel prossi-

mo futuro si cercherà di estendere le analisi anche a quei taxa zooplanctonici per i quali non è stato possibile ottenere materiale sufficiente a causa del loro basso peso individuale. In particolare, è auspicabile ottenere i segnali isotopici di *Bosmina* e *Diaphanosoma*, estremamente inte-

ressanti sia per l'individuazione di fonti non pelagiche nella dieta, sia per valutarne il ruolo trofico. Si prevede anche di migliorare le conoscenze relative ai segnali isotopici degli apporti di materiale alloctono attraverso il campionamento di invertebrati acquatici (anfipodi e lar-

ve di ditteri chironomidi) provenienti dal Fiume Toce e di organismi zooplanctonici prelevati anche in prossimità della Foce del Torrente San Bernardino. Questo, al fine di meglio caratterizzare i segnali isotopici non pelagici e la loro variabilità spaziale.

Bibliografia

- AMBROSETTI W., BARBANTI L., DE BERNARDI R., LIBERA V., 1980. Alcune risposte limnologiche ad un evento meteorologico eccezionale: il nubifragio del 7 Agosto 1978 nel bacino del Lago Maggiore. *Atti 3° Congresso A.I.O.L.*: 389-406.
- CABANA G., RASMUSSEN J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Ecology* **93**: 10844-10847.
- 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.
- COLE M.L., VALIELA I., KROEGER K.D., TOMASKY G. L., CEBRIAN J., WIGAND C., MCKINNEY R.A., GRADY S.P., DA SILVA M.H.C., 2004. Assessment of a $\delta^{15}\text{N}$ isotopic method to indicate anthropogenic eutrophication in aquatic ecosystem. *J. Environ. Qual.* **33**: 124-132.
- 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.
- KARLSSON J., JONSSON A., MEILI M., JANS-SON M., 2003. Control of zooplankton dependence on allochthonous organic carbon in humic and clear-water lakes in northern Sweden. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 269-276.
- LAKE J.L., MCKINNEY R.A., OSTERMAN F.A., PRUELL R.J., KIDDON J., RYBA S.A., LIBBY A.D., 2001. Stable nitrogen isotopes as indicators of anthropogenic activities in small freshwater system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**: 870-878.
- LEHMANN M.F., BERNASCONI S., MCKENZIE., BARBIERI A., SIMONA M., VERONESI M., 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**: 415-429.
- MANCA M., SPAGNUOLO T., COMOLI P., 1994. Variations in carbon and nitrogen content with body length of *Daphnia hyalina-galeata* s.l. from laboratory and field observations. *Journal of Plankton Research*, **16** (10): 1303-1314.
- MANCA M., COMOLI P., SPAGNUOLO T., 1997. Length-specific carbon content of the *Daphnia* population in a large Italian subalpine lake, Lago Maggiore (Northern Italy): the importance of seasonality. *Aquat. Sci.* **59**: 48-56.
- MANCA M., RAMONI C., COMOLI P., 2000. The decline of *Daphnia hyalina galeata* in Lago Maggiore: a comparison of the population dynamics before and after oligotrophication. *Aquat. Sci.* **62**: 142-153.
- MANCA M., DE MOTT W.R., 2009. Response of the invertebrate predator *Bythotrephes* to a climate-linked increase in the duration of a refuge from fish predation. *Limnol. Oceanogr.* **54**(4): 2506-2512.
- MANCA M., VIJVERBERG J., POLISHCHUK L.V., VORONOV D.A., 2008. *Daphnia* body size and population dynamics under predation by invertebrate and fish predators in Lago Maggiore: an approach based on contribution analysis. *J. Limnol.*, **67**(1): 15-21.
- MATTHEWS B., MAZUMDER A., 2003. Compositional and inter-lake variability of zooplankton affect baseline stable isotope signatures. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1977-1987.
- 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.
- 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*, **30**: 69-77.
- POPP B.N., LAWS E.A., BIDIGARE R.R., DORE J.E., HANSON K.L., WAKEHAM S.G., 1998. Effect of phytoplankton cell geometry on carbon isotopic fractionation. *Geochimica e Cosmochimica Acta*, **62**: 69-77.
- POST D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: Models methods, and assumptions. *Ecology* **83**: 703-718.
- POST D.M., PACE M.L., HAIRSTON N.G., 2000. Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature* **405**: 1047-1049.
- VOLTA P., JEPSEN N., 2008. The recent invasion of *Rutilus rutilus* (L.) (Pisces: Cyprinidae) in a large South-Alpine lake: Lago Maggiore. *J. Limnol.* **67**: 163-170.
- 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.