

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”**

**SCUOLA DI DOTTORATO “SCIENZE DELLA TERRA”**

**“Giuseppe De Lorenzo”**

**Dottorato in Scienze ed Ingegneria del Mare**

**in consorzio con**

**SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI  
UNIVERSITÀ “PARTHENOPE” NAPOLI**

**in convenzione con**

**ISTITUTO PER L’AMBIENTE MARINO COSTIERO – C.N.R.  
STAZIONE ZOOLOGICA “ANTON DOHRN”**

**XXII ciclo**

Tesi di Dottorato

**“Interazioni trofiche e predazione interna al  
microzooplancton”**

Candidato:

Dott. ssa Gayantonia Franzé

Tutor:

Prof. Maurizio Ribera d’Alcalà

Co-Tutor:

Dott.ssa Monica Modigh

Il Coordinatore del Dottorato: Prof. Alberto Incoronato

**ANNO 2009**

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>2. OBIETTIVI</b>	<b>5</b>
<b>3. CONTESTO GENERALE</b>	<b>7</b>
3.1 Il plancton	7
3.2 Il microzooplancton	8
3.3 Il Circuito microbico	13
3.4 Esperimenti di grazing	16
3.5 Impatto sul ciclo del carbonio	20
<b>4. AREA DI STUDIO</b>	<b>23</b>
4.1 St. LTER-MC	25
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	<b>27</b>
5.1 Campionamento alla St.LTER-MC	27
5.2 Esperimenti di predazione interna	29
5.3 Analisi di clorofilla	31
5.4 Analisi del microzooplancton	32
5.5 Elaborazioni	33
5.6 Calcoli di produzione	35
5.7 Analisi statistiche	37
<b>6. RISULTATI</b>	<b>39</b>
6.1 Messa a punto del metodo	39
6.2 Esperimenti di predazione interna	44
6.2.1 Condizioni ambientali	44
6.2.2 Rispetto degli assunti	45
6.2.3 Stime dei tassi di crescita del microzooplancton	47
6.2.3.1 Dipendenza dalla Chl <sub>a</sub> e dalla T°	47
6.2.3.2 Tassi di crescita apparente	52

6.2.4 Stima di predazione interna	55
6.2.5 Tassi di crescita potenziale	60
6.2.6 Tassi di crescita di singole specie	63
6.3 Ciclo annuale del microzooplancton alla St. LTER-MC	70
6.3.1 Abbondanza e biomassa	70
6.3.2 Comparto microzooplanctonico	72
6.3.3 Distribuzione verticale del microzooplancton	77
6.4 Produzione del microzooplancton nello stato superficiale	80
6.4.1 Contributo dei tre gruppi microzooplanctonici alla produzione superficiale	85
6.5 Produzione del microzooplancton lungo la colonna d'acqua	88
6.5.1 Contributo dei tre gruppi microzooplanctonici alla produzione sulla colonna d'acqua	91
<b>7. DISCUSSIONE</b>	<b>94</b>
7.1 Messa a punto del metodo	100
7.2 Tassi di crescita	104
7.2.1 Dipendenza dalla T°	109
7.2.2 Tasso di crescita di singole specie	114
7.2.3 <i>Myrionecta rubra</i>	117
7.3 Produzione e predazione	119
<b>8. CONCLUSIONI</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>131</b>

## 1. INTRODUZIONE

Il sistema pelagico marino è un insieme estremamente complesso e nonostante negli ultimi vent'anni gli studi in merito si siano moltiplicati, le conoscenze attuali sulle dinamiche trofiche che lo caratterizzano sono ancora insufficienti. È oggi largamente riconosciuto il ruolo fondamentale che gli organismi microbici svolgono in tutti i più importanti cicli biogeochimici del pianeta (Sherr&Sherr 2002), quali quello del carbonio, dell'azoto e dello zolfo.

L'attività umana sta causando cambiamenti macroscopici in tutti i sistemi acquatici come ad esempio il surriscaldamento delle acque superficiali e l'acidificazione dell'oceano (Feely *et al.* 2006; Doney *et al.* 2009a). Non è ancora possibile immaginare, però, quali saranno le conseguenze che tali cambiamenti climatici avranno sul mondo microbico, caratterizzato fino ad oggi da una notevole stabilità, e quali potranno essere i *feedback* sul clima stesso (Daufresne *et al.* 2009).

A differenza di ciò che accade nell'ecosistema terrestre, dove l'anidride carbonica atmosferica viene assorbita e immagazzinata per lunghi periodi di tempo in biomassa vegetale (foreste), in quello marino i tempi compresi tra l'assimilazione e la reintroduzione di CO<sub>2</sub> in atmosfera attraverso la respirazione sono brevissimi. Il fitoplancton, responsabile della metà del carbonio organico prodotto per via fotosintetica a livello globale, è consumato in tempi assai rapidi,

così che il carbonio organico da un lato viene trasformato in biomassa di consumatori e dall'altro viene re-immesso in atmosfera attraverso la respirazione di tutti gli organismi vegetali e animali coinvolti nel processo.

Per riuscire a determinare l'ammontare del carbonio organico in mare, e la parte di questo che viene poi rilasciato nuovamente come CO<sub>2</sub>, è necessario studiare e comprendere le dinamiche che sono alla base dei trasferimenti di energia e materia nell'ecosistema marino.

Il fitoplancton marino è costituito in gran parte da procarioti di dimensioni estremamente piccole,  $\leq 1\mu\text{m}$  di diametro. Nonostante alle cellule sono responsabili della maggior parte della fotosintesi marina la loro scoperta risale a soli trent'anni fa (Waterbury *et al.* 1979). Nel (1983) Azam *et al.* proposero l'introduzione del concetto di circuito microbico per descrivere il trasferimento di energia e materia che dai procarioti passa attraverso i flagellati fino ad arrivare al microzooplancton, in particolare ciliati e dinoflagellati. Negli ultimi decenni numerosi studi hanno individuato gli organismi microzooplanctonici quali principali consumatori del fitoplancton sia in mare aperto (Verity *et al.* 1993; Landry *et al.* 1997; Landry *et al.* 1998; Quevedo&Anadon 2001; Liu *et al.* 2002), che in acque costiere (Gallegos *et al.* 1996). Una recente revisione di centinaia di studi, condotti nei più diversi ecosistemi marini, ha rivelato che in media il 67% della produzione fitoplanctonica giornaliera è predata dal microzooplancton (Sherr&Sherr 2002; Calbet&Landry 2004; Landry&Calbet 2004). Un così forte controllo è dovuto essenzialmente a tempi di riproduzione simili tra prede e predatori che fanno sì che i protozoi microzooplanctonici possano seguire rapidamente l'aumento della concentrazione fitoplanctonica. A loro volta i protisti rappresentano una importante risorsa per il mesozooplancton. È noto che i

copepodi, maggiori rappresentanti del mesozooplankton, predano preferenzialmente i ciliati essendo questi una importante fonte di carbonio e, in particolare, di azoto (Stoecker&Sanders 1985; Sherr *et al.* 1986; Gifford 1991; Kleppel 1993; Broglio *et al.* 2004). Da qui il ruolo fondamentale giocato dal microzooplankton nella catena alimentare pelagica, quale elemento di passaggio, per materia e energia, tra il comparto microbico e la classica catena alimentare. Occasionalmente i copepodi sono in grado di ridurre l'abbondanza delle specie microzooplantoniche più numerose (Dolan&Gallegos 2001), ma data la grande differenza numerica fra protisti e copepodi, in genere di tre ordini di grandezza, il mesozooplankton non sembra in grado di esercitare un controllo sul popolamento microzooplantonico (Broglio *et al.* 2004).

L'ipotesi di una predazione interna al microzooplankton "protozoan control protozoan" fu formulata da Paffenhöfer (1998), sulla base delle anticipazioni fornite da Nielsen & Kiorbøe (1994) nel loro studio sulle interazioni tra micro- e meso-zooplankton. Dati i rapidi tempi di rigenerazione e l'elevata abbondanza che caratterizza il microzooplankton, un controllo efficace potrebbe essere esercitato solo da predatori con numeri e tempi di riproduzione simili, ovvero da altri protozoi. Qualora la produzione microzooplantonica venisse riciclata all'interno del comparto invece che essere predata dal mesozooplankton, la maggiore parte del carbonio organico verrebbe consumata nella respirazione, ritornando in atmosfera sotto forma di CO<sub>2</sub>. In questo modo la biomassa microzooplantonica disponibile per i livelli trofici superiori, e quindi anche per la pompa biologica, sarebbe estremamente ridotta.

Ad oggi l'ipotesi che gli stessi protozoi siano i principali predatori dei protozoi è largamente accettata dalla comunità scientifica (per es. (Gifford 1985;

Sherr *et al.* 1988; Verity *et al.* 1992; Jeong 1999; Batten *et al.* 2001; Carrias *et al.* 2001; Gaul&Antia 2001; Modigh&Franzé 2009) ma mancano dati sperimentali a causa delle difficoltà nel mettere a punto un protocollo sperimentale che consenta di determinare sia l'ammontare della produzione microzooplanctonica che il suo destino.

## 2. OBIETTIVI

Riuscire ad ottenere dati sperimentali del controllo esercitato dagli stessi protozoi sul comparto microzooplanctonico è l'idea base di questo lavoro di dottorato. Ci siamo posti pertanto due obiettivi :

- 1) elaborare un protocollo sperimentale per poter misurare i reali tassi di crescita che caratterizzano il comparto microzooplanctonico in condizioni il più possibile simili a quelle presenti in situ, così da determinare la produzione;
- 2) stimare il tasso di predazione esercitata dai protozoi sugli altri protozoi, per poter stabilire l'ammontare della produzione microzooplanctonica riciclata all'interno del comparto e quella disponibile, invece, per i livelli trofici superiori.

Se il microzooplancton è controllato soprattutto da una predazione interna al comparto, allora la mortalità dei protozoi sarà direttamente correlata alla concentrazione degli altri protozoi in quanto potenziali predatori.

I campioni utilizzati per gli esperimenti sono stati raccolti in una stazione nel Golfo di Napoli, dal 1984 sito di studio del sistema pelagico da parte dei ricercatori della Stazione Zoologica Anton Dohrn. Contemporaneamente alla conduzione degli esperimenti sono stati analizzati, quali-quantitativamente,



campioni microzooplanctonici raccolti sulla stessa stazione di campionamento, sia a 0 metri che lungo tutta la colonna d'acqua. La caratterizzazione superficiale la si è ottenuta grazie a campioni raccolti ogni settimana per i tre anni della ricerca, mentre quella di profondità utilizzando campioni raccolti in diverse stagioni. È stato possibile in questo modo applicare i risultati sperimentali al sito di campionamento, riuscendo a calcolare la produzione microzooplanctonica stagionale e annuale presente e riciclata, nonché il suo impatto sul ciclo del carbonio.

## 3. CONTESTO GENERALE

### 3.1 Il plancton

Il termine plancton deriva dal greco *πλαγκτος* (vagabondo) e indica tutti gli organismi che vivono sospesi fluttuando nelle acque. Il plancton comprende sia organismi vegetali (il fitoplancton) che organismi animali (lo zooplancton).

Il plancton è presente in tutti gli ambienti acquatici. La sua distribuzione e abbondanza varia a seconda del periodo dell'anno, in dipendenza della disponibilità di luce e di nutrienti per gli organismi autotrofi e in relazione alla presenza di risorse alimentari per il comparto eterotrofo. Il plancton si presenta come un insieme complesso ed eterogeneo e, per questo motivo, si è resa necessaria l'adozione di diversi criteri di classificazione. La classificazione maggiormente utilizzata è quella formalizzata da (Sieburth *et al.* 1978) basata sulle classi dimensionali degli organismi marini. La suddivisione relativa agli organismi eterotrofi è riportata nella tabella I.

Frazione	Organismi	Dimensioni
Picoplancton	Batteri Piccoli flagellati	0.2-2 $\mu\text{m}$
Nanoplancton	Flagellati eterotrofi Flagellati mixotrofi Piccoli ciliati	2-20 $\mu\text{m}$
Microplancton	Ciliati– Dinoflagellati Foraminiferi– Radiolari Rotiferi - Nauplii	20-200 $\mu\text{m}$
Mesoplancton	Copepodi - Cladoceri Stadi larvali ecc	>200 $\mu\text{m}$

Tab I Classificazione degli organismi eterotrofi secondo Sieburth *et al.* (1978)

### 3.2 Il microzooplancton

In accordo con la classificazione di Sieburth *et al.* (1978), il microzooplancton è costituito da organismi di taglia compresa tra i 20 e i 200 $\mu\text{m}$ . Fanno parte di tale comparto molti protisti, quali ciliati, dinoflagellati, radiolari e foraminiferi, così come piccoli metazoi, in particolare nauplii, copepoditi e alcune larve meroplanctoniche.

Gli organismi microzooplanctonici hanno sviluppato una serie di adattamenti grazie ai quali hanno potuto occupare ambienti molto diversi tra loro diventando una componente ubiquitaria del plancton marino. Il microzooplancton si trova in tutti gli ambienti marini (dalle pozze d'acqua nella zona intertidale al mare aperto

fino agli abissi oceanici), nei laghi, fiumi e in qualsiasi altro ambiente con un certo grado di umidità. Anche da un punto di vista climatico tali organismi sono ubiquitari: essi occupano nicchie ecologiche nell'oceano Artico (Sherr *et al.* 2009), nell'Antartico (Caron *et al.* 2000) così come in tutti gli ambienti compresi tra questi e i tropici (Calbet&Landry 2004; Berninger&Wickham 2005; First&Lavrentyev 2007). In particolare, ciliati e dinoflagellati rappresentano la componente più consistente di tutto il comparto. In acque costiere raggiungono abbondanze comprese tra  $10^3$  e  $10^5$  cellule  $L^{-1}$ , mentre i metazoi (nauplii e rotiferi) sono molto meno abbondanti, generalmente  $10^0$ - $10^2$  individui  $L^{-1}$ . Anche considerando il comparto in termini di biomassa, il maggior contributo è fornito dai protozoi, mentre i microcrocstacei solo sporadicamente rappresentano una frazione consistente del popolamento.

I protozoi, pur essendo organismi unicellulari, sono caratterizzati da una elevata variabilità e complessità a livello strutturale, dimensionale e funzionale. Tra ciliati e dinoflagellati molte sono le cellule nude, prive cioè di strutture cellulari rigide, dalla forma sferica, ovale allungata, ellissoidale, cilindrica o conica. Le cellule nude costituiscono la maggioranza del comparto e la loro identificazione risulta estremamente difficile proprio in relazione all'assenza di strutture che circondano le cellule. Solo con l'affermarsi di tecniche di istologia e di genetica si sono compiuti passi in avanti nella classificazione di queste forme.

Tuttavia, diversi dinoflagellati e ciliati sono circondati da strutture rigide costituite o da placche di cellulosa, come nel caso dei dinoflagellati tecati, o da secrezione proteiche o mucopolisaccaridiche, incluse la chitina, come le loriche dei tintinnidi (Corlis 1979; Lee *et al.* 2000). Tali strutture sono generalmente arricchite da ornamenti di vario genere. La presenza di corni, striature,

fenestrature, dentelli, spirali e molto altro ancora, costituisce un elemento fondamentale nella determinazione tassonomica di questi organismi. Non è un caso, infatti, che i protisti definiti fino a livello di specie facciano capo, generalmente, ai tintinnidi o ai dinoflagellati tecati.

Un'altra caratteristica estremamente variabile dei protozoi è la dimensione cellulare. Benché la classificazione ufficiale racchiuda il microzooplancton tra i 20 e i 200  $\mu\text{m}$ , molti ciliati e dinoflagellati sono contraddistinti da dimensioni al di sotto o al di sopra di tale *range*. Tra le cellule nude ci sono forme di 7 $\mu\text{m}$  in *Equivalent Spherical Diameter* (ESD), come ad esempio i *Balanion* tra i ciliati e le *Heterocapsa* tra i dinoflagellati, mentre tra i tintinnidi o i dinoflagellati tecati molte specie sono di dimensioni >400 $\mu\text{m}$  ESD. (Fig.1)

Le diverse modalità trofiche che possono essere ricondotte agli organismi microzooplanctonici rappresentano un ulteriore elemento di complessità. Il diverso trofismo è dato:

- 1) dalla grande varietà di prede cui possono rivolgersi, dai batteri fino al microplancton;
- 2) dalle numerose modalità con cui le prede vengono catturate (filtrazione, fagocitosi, myzocitosi ecc.);
- 3) dalle differenti modalità attraverso le quali possono soddisfare il proprio fabbisogno energetico quali l'eterotrofia o diverse forme di mixotrofia (Sherr&Sherr 2007; Kirchman 2008). I protozoi eterotrofi si nutrono esclusivamente tramite la cattura delle proprie prede, gli organismi mixotrofi, invece, oltre che attraverso la predazione, hanno la possibilità di incamerare energia attraverso l'attività fotosintetica di alghe simbionti o di cloroplasti

prelevati proprio dalle prede algali (McManus&Fuhrman 1986; Gustafson *et al.* 2000).

Tale varietà e complessità ha consentito ai protisti di occupare tutti gli *habitat* acquatici e di assolvere al ruolo di anello di congiunzione tra il comparto microbico e i livelli trofici superiori veicolando materia ed energia all'interno dell'ecosistema.



Fig.1 Dall'alto a sinistra: *Stentropiella stenstripii*, *Codonellopsis orthoceras*, *Strenosemella nivalisi*, *Climacocylis scalaria*, *Rhabdonella spiralis*, *Dictyocysta mitra*, *Strobilidium* sp., *Gimnodinium* sp., *Protoperidinium* sp, *strobilidium* sp.

### 3.3 Il Circuito microbico

“Il fitoplancton di mare aperto è predato quasi alla stessa velocità alla quale è prodotto, quindi, effettivamente, tutta la produzione delle microalghe passa attraverso gli erbivori” (Steel 1974). L’interesse della comunità scientifica verso il mondo microbico si è accresciuto negli anni Settanta quando, grazie allo sviluppo di nuove tecniche di campionamento e di analisi, si scoprì che i microorganismi non solo rappresentavano una parte importante della biomassa a mare ma che, grazie ai loro alti tassi metabolici, erano in grado di accrescersi molto rapidamente e di veicolare grandissime quantità di energia e materia all’interno del sistema pelagico. Il modello piramidale della classica catena alimentare, alla cui base vi era fitoplancton consumato dallo zooplancton, e in special modo microcrostacei, che a loro volta servivano da risorsa energetica per pesci e mammiferi, fu formulato da (Pomeroy 1974).

Negli anni Ottanta tale modello venne messo in discussione con l’introduzione del concetto di circuito microbico (Azam *et al.* 1983), utilizzato per descrivere il ruolo fondamentale dei microorganismi nella re-mineralizzazione dei nutrienti essenziali (fosforo e azoto). Una volta scoperta l’esistenza e l’importanza della frazione microbica del sistema pelagico, si comprese anche che un fitoplancton di dimensioni così ridotte non potesse essere efficacemente utilizzato dai copepodi. Come elemento di congiunzione tra il comparto microbico e lo zooplancton, si pensò ai protisti erbivori che presentavano dimensioni simili a quelle del fitoplancton e allo stesso tempo rappresentavano un’importante componente della dieta dei microcrostacei (Fig.2).



Il termine circuito microbico fu coniato per descrivere il percorso trofico attraverso il quale la materia organica disciolta (DOM) è reintrodotta nella rete trofica grazie all'assimilazione batterica. I batteri sono consumati principalmente da protisti, flagellati e ciliati, che a loro volta sono preda di organismi acquatici di maggiori dimensioni (microcrocstacei).

La materia organica disciolta presente nell'ambiente marino proviene da diverse fonti quali il rilascio da parte dei produttori primari, la lisi batterica dovuta ai batteriofagi, l'escrezione da parte dello zooplancton. La maggior parte del DOM è disponibile esclusivamente per i batteri i quali, però, convertendola in biomassa batterica la rendono nuovamente disponibile per i batterivori e, successivamente, per i consumatori dei batterivori. Si è calcolato che tra il 30 e il 60% della produzione fitoplanctonica nel sistema marino venga processato, direttamente o indirettamente, dai batteri, con un'efficienza pari al 50% (Azam *et al.* 1983; Del Giorgio *et al.* 1997).

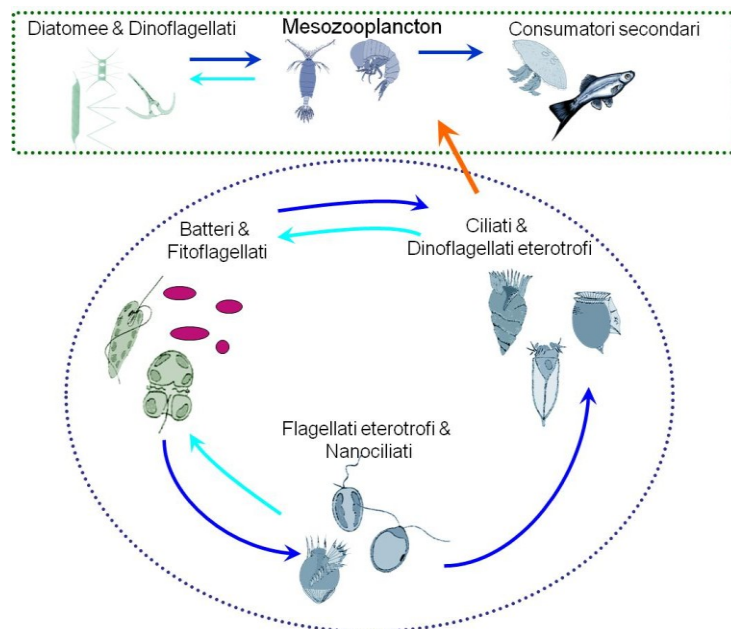


Fig.2 Rappresentazione schematica del circuito microbico.

La conversione di materia organica morta in biomassa batterica fa sì che i batteri ed i loro predatori costituiscano un importante meccanismo per il ritorno di parte della materia organica entrata nel circuito del detrito all'interno della classica catena fitoplancton-zooplancton-pesci (Azam *et al.* 1983), rappresentando una risorsa aggiuntiva di energia disponibile per i livelli trofici superiori e di nutrienti demineralizzati per il fitoplancton.

Dato che i microbi si trovano alla base della catena alimentare pelagica di molti sistemi acquatici, l'ammontare di produzione riciclata all'interno del circuito microbico e di quella disponibile per i livelli trofici superiori ha un profondo impatto su molti dei processi a mare, come la produttività della pesca e la quantità di carbonio che sedimenta sul fondo oceanico.

Il microzooplancton occupa una posizione chiave nella rete alimentare marina come consumatore della produzione primaria (Calbet&Landry 2004), intermediario tra produttori primari e copepodi (Gifford 1991; Calbet&Saiz 2005), e come componente fondamentale del circuito microbico (Azam *et al.* 1983; Sherr&Sherr 2002; 2007).

I protozoi, oltre ad essere i principali consumatori di batteri, ne favoriscono l'attività mediante le loro escrezioni, accelerano i tassi di decomposizione della materia organica e consumano direttamente fitoplancton. In ambienti oligotrofici i protozoi consumano tra il 75 e il 100% della produzione primaria giornaliera (Calbet&Landry 2004). In ambienti più produttivi, invece, dominati da cellule  $>2\mu\text{m}$ , fino al 20% della produzione primaria netta viene incanalata attraverso il DOM e il *microbial loop* (Rassoulzadegan 2008).

Se a questa visione del sistema pelagico va ad aggiungersi l'ipotesi che gli organismi microzooplanctonici siano predati principalmente da altri protozoi e

non dal mesozooplankton, l'assetto e i bilanci dei flussi di materia ed energia caratterizzanti l'ecosistema marino andrebbero rivisti. L'aumento di livelli trofici nel circuito microbico fa sì che la produzione generata e consumata all'interno del comparto sia in gran parte "persa" nei numerosi passaggi (trofici). Ciò si traduce in un aumento nell'emissione di CO<sub>2</sub>, dovuta alla respirazione e in una diminuzione nell'efficienza di trasferimento di carbonio verso i livelli trofici superiori.

Se il riciclo della produzione microzooplanctonica all'interno del comparto si basasse, ad esempio, sulla presenza di tre livelli trofici interni, si è calcolato che la produzione primaria respirata arriverebbe fino al 59% (Landry&Calbet 2004).

### 3.4 Esperimenti di grazing (pascolo)

Il ruolo che il microzooplankton assume nella catena alimentare pelagica è stato ampiamente studiato con centinaia di esperimenti condotti secondo il metodo delle diluizioni seriali (Landry&Hassett 1982; Landry 1993). Una recente *review* (Calbet&Landry 2004) fornisce una valutazione dell'entità della predazione del microzooplankton sul popolamento fitoplanctonico in diversi ecosistemi marini.

In acque oligotrofiche, tropicali e subtropicali, il microzooplankton consuma, in media, il 75% della produzione primaria e circa la metà della biomassa fitoplanctonica (Calbet&Landry 2004). La restante produzione è predata in gran parte dal mesozooplankton (Calbet 2001). La forte predazione da parte del microzooplankton in questi ambienti non stupisce in quanto in ambienti

oligotrofici la produzione è essenzialmente riciclata e il circuito microbico è sostenuto principalmente da nutrienti rigenerati. È evidente quindi che, in sistemi basati sul riciclo, vi sia una dominanza del comparto microbico. In questi sistemi la produzione esportata verso i livelli trofici superiori è di conseguenza molto limitata.

Una significativa pressione da pascolo del microzooplancton è stata riscontrata anche in ambienti marini temperati. Si è calcolato che il 60% della produzione primaria giornaliera e circa il 50% della biomassa fitoplanctonica vengano consumati dai protisti. Lo stesso discorso è valido per le acque antartiche dove, però, la percentuale di biomassa predata è minore (20%) (Calbet&Landry 2004).

Gli ambienti altamente produttivi, quali estuari e zone di *up-welling*, sono sostenuti dalla regolare immissione di nutrienti “nuovi”. Ciò fa sì che questi ambienti siano tradizionalmente considerati dominati dalla classica catena alimentare (diatomee-copepodi-pesci). Il dato che ci fornisce la *review* di (Calbet&Landry 2004) indica, invece, che anche in ambienti caratterizzati da elevate concentrazioni di clorofilla, il 60% della produzione primaria giornaliera è consumato dal microzooplancton e solo il 10% dal mesozooplancton. Sebbene l'impatto da grazing del mesozooplancton sia estremamente variabile, questo valore risulta essere molto lontano dalla visione classica dei sistemi eutrofici (Calbet *et al.* 2008).

Questi dati evidenziano l'importanza degli organismi microzooplanctonici come consumatori di produzione primaria in tutti gli ecosistemi marini. I risultati di tali ricerche possono anche aiutarci a comprendere meglio quali sono le dinamiche che caratterizzano il microzooplancton.

Nonostante l'elevato tasso di consumo di produzione primaria da parte dei protozoi, in molti lavori presenti in letteratura il comparto microzooplanctonico, dopo le 24 ore di incubazione all'interno del campione naturale, non presenta significative variazioni né in abbondanza né in biomassa. L'apparente stabilità del popolamento non può essere attribuita né a una limitazione da risorse alimentari, essendo stati aggiunti nutrienti che favoriscono la crescita del fitoplancton, né alla predazione da parte del mesozooplancton, dato che la frazione superiore ai 200 $\mu\text{m}$  è stata eliminata con il processo di setacciamento.

Per spiegare la stabilità del popolamento microzooplanctonico in condizioni naturali si ipotizza la predazione dei protozoi sui protozoi. Tale ipotesi è supportata anche da osservazioni effettuate al microscopio ottico (Fig. 3)

Esperimenti mirati che ci consentano di comprendere le dinamiche trofiche e di controllo all'interno del microzooplancton, e di conseguenza il ruolo che questo assume rispetto al ciclo del carbonio, sono l'obiettivo principale di questa ricerca.

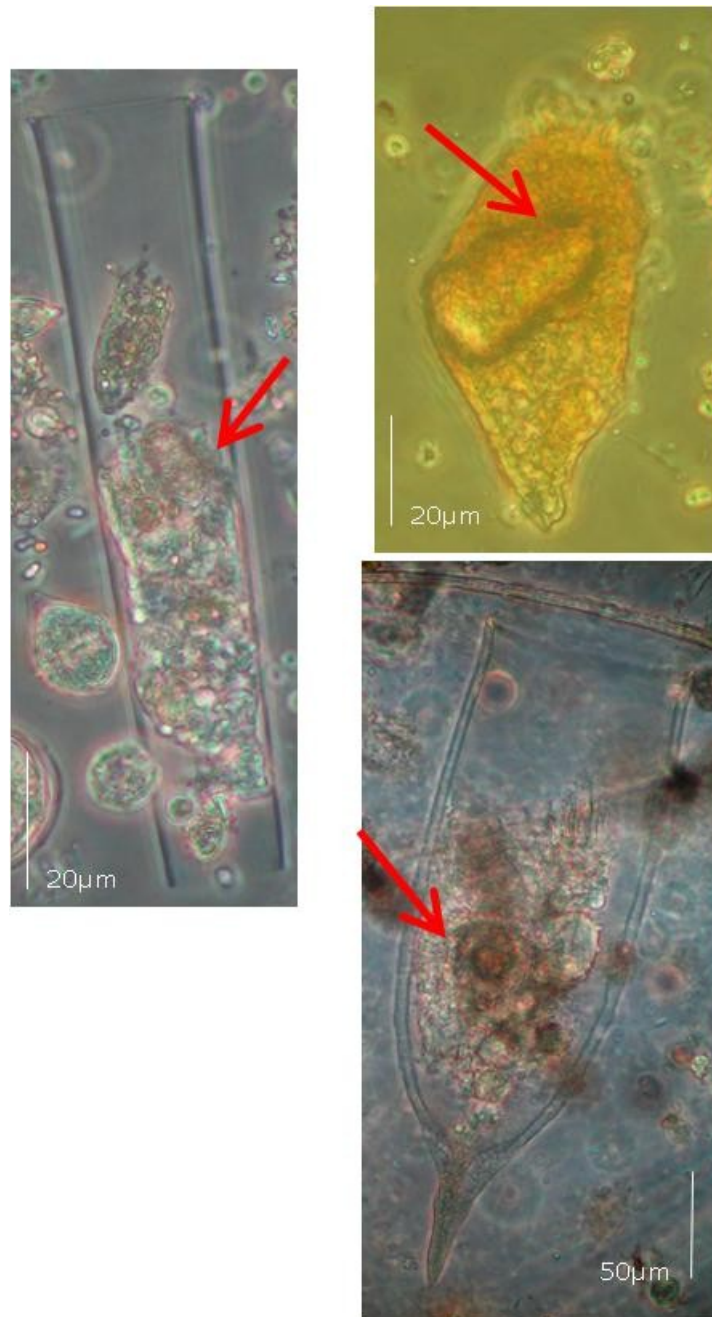


Fig. 3 Fotografie al microscopio ottico di tre specie di ciliati in cui è evidente la predazione protozoi su protozoi. Le frecce rosse indicano la presenza di una preda all'interno dei vacuoli.

### 3.5 Impatto sul ciclo del carbonio

Il ciclo del carbonio è il ciclo biogeochimico attraverso il quale il carbonio, in tutte le sue forme, viene scambiato tra biosfera terrestre, litosfera, atmosfera e oceani. È uno dei cicli fondamentali per la terra e consente al carbonio di essere riciclato e riutilizzato nuovamente da tutti gli organismi. Le dinamiche che sono alla base dell'interscambio tra i quattro comparti sopra citati sono legate a processi chimici, fisici, geologici e biologici.

Gli oceani rappresentano la maggiore riserva di carbonio della terra ed è solo in minima parte disponibile per gli scambi con l'atmosfera. Il carbonio presente negli strati più profondi dell'oceano, infatti, diviene nuovamente disponibile solo dopo lunghi periodi di tempo. Gli oceani contengono circa 36.000 miliardi di tonnellate di carbonio, in gran parte sotto forma di ione bicarbonato. Si è calcolato che il carbonio disciolto nelle acque marine è venti volte maggiore rispetto a quello presente sulla terra (Zimov *et al.* 2006) il rilascio del 1-2% del carbonio immagazzinato negli oceani raddoppierebbe il valore della CO<sub>2</sub> atmosferica.

Mentre le piante terrestri assorbono CO<sub>2</sub> direttamente dall'atmosfera, gli organismi marini utilizzano l'anidride carbonica disciolta nell'acqua di mare la cui concentrazione dipende dai processi che avvengono nell'interfaccia aria-mare. Il tasso di trasferimento della CO<sub>2</sub> attraverso la superficie del mare e il trasporto del carbonio nelle masse d'acqua sono fortemente influenzati da fenomeni fisici e biologici. In generale, gli oceani rappresentano una trappola per l'anidride carbonica che viene rimossa dagli strati superficiali sia attraverso gli organismi

(pompa biologica), che attraverso un processo di solubilizzazione e trasporto verticale (pompa fisica).

La pompa biologica rappresenta l'insieme di tutti i processi responsabili della trasformazione del carbonio inorganico disciolto in carbonio organico mediante la fotosintesi, del passaggio e della trasformazione del carbonio organico all'interno della rete alimentare, del suo trasporto e decantazione lungo la colonna d'acqua (Longhurst 1991; Ducklow *et al.* 2001). La pompa biologica può sottrarre dallo strato superficiale dell'oceano quantità significative di CO<sub>2</sub> atmosferica sotto forma di carbonio organico (Honjo 2004). Il risultato finale di questi processi è il trasporto del carbonio verso gli strati più profondi dell'oceano e l'abbassamento della pCO<sub>2</sub> delle acque superficiali.

La catena alimentare classica è caratterizzata da un numero limitato di passaggi trofici e il bilancio tra assorbimento e rilascio dell'CO<sub>2</sub> è a favore del primo. La produzione che si origina dalle grandi diatomee e che è veicolata attraverso una catena alimentare breve, è più efficacemente trasferita ai livelli trofici superiori della catena pelagica (Ryther 1969) o esportata dalla zona eutrofica come *faecal pellets* dei consumatori o come aggregati di cellule (Turner&Graneli 1992). Al contrario la produzione generata e consumata all'interno della comunità microbica è in gran parte "persa" nei numerosi trasferimenti trofici sotto forma di CO<sub>2</sub> respirata. Maggiore è il numero di trasferimenti trofici, maggiore è il consumo di carbonio organico in respirazione. In presenza di 2 o 3 livelli trofici all'interno del comparto microzooplanctonico, la respirazione microzooplanctonica risulterebbe pari rispettivamente al 46% o al 59% della produzione primaria (Calbet&Landry 2004). Lo stesso livello di respirazione è ascritto anche alla componente batterica (50-90% della produzione



primaria (Rivkin&Legendre 2001). Considerando il contributo alla respirazione dei protozoi e dei batteri, ognuno dei quali supera nettamente la metà della produzione primaria misurata, è importante ricordare che il metodo del  $C_{14}$  non consente di misurare tutto il carbonio fissato, ma che parte di questo è consumato durante l'incubazione (Laws *et al.* 2000).

La prevalenza nel sistema oceanico della classica catena alimentare o del circuito microbico risulta in un differente bilancio tra l'assorbimento e il rilascio di  $CO_2$ . Riuscire a determinare le dinamiche trofiche presenti nel microzooplancton significa avere un quadro più preciso delle implicazioni che tale comparto ha sul ciclo del carbonio e sui flussi biogeochimici. Inoltre, trattandosi della base della catena alimentare pelagica, piccole variazioni in questo bilancio possono avere potenziali ripercussioni su tutto il sistema e, in ultima analisi, anche sulla produzione di pesce (e.g. (Strom 2007).

## 4. AREA DI STUDIO

Il Golfo di Napoli si apre sul Mar Tirreno con un orientamento Sud-Ovest ed è delimitato dalla Penisola Sorrentina a Sud-Est, e da Capo Miseno a Nord-Ovest (Fig. 4). Rappresenta una delle più profonde baie (170 m in media) del Mediterraneo e copre un'area di circa 870 Km<sup>2</sup>. Gli apporti fluviali sono limitati ed intermittenti per cui la salinità raramente scende al di sotto di 37,5 ppt.



Fig.4 Area di studio

La piattaforma continentale poco estesa, la profondità del bacino e la presenza dei due canyon sottomarini dell'Ammontatura e del Trogolo di Procida, che arrivano fino ai margini della scarpata, determinano una particolare

associazione tra le acque profonde esterne al golfo e quelle più propriamente costiere. È possibile distinguere due sistemi: uno eutrofico, tipicamente costiero, e l'altro oligotrofico, simile, per le sue caratteristiche, alle acque di largo del Mar Tirreno. Il primo caratterizza la costa orientale e quella a nord-est ed è fortemente influenzato da apporti da terra (discariche urbane e industriali), provenienti da un'area fortemente sovrappopolata. In più, la costa nord è a volte influenzata dalle acque dolci del fiume Volturno e da quelle di scolo di Cuma, mentre il fiume Sarno, fortemente inquinato, sfocia nella parte sud del Golfo. Il sistema di acque di largo si trova al centro del Golfo, ed ha caratteristiche simili alle acque oligotrofiche tirreniche (Carrada *et al.* 1981; Ribera d'Alcalà *et al.* 1989).

Come risultato della topografia del golfo, l'area interna e l'area di largo sono strettamente associate, la posizione e l'estensione del confine tra questi due sottosistemi varia a seconda delle stagioni (Zingone *et al.* 2009) e nessuna struttura frontale permanente è stata osservata tra i due sottosistemi (Modigh *et al.* 1996). Gli scambi tra queste due sistemi possono essere favoriti dalla circolazione locale (Casotti *et al.* 2000). L'Acqua Superficiale Costiera presenta parametri fisico-chimici (salinità, temperatura e nutrienti) molto variabili a seconda della maggiore o minore influenza degli apporti da terra o da largo. Durante particolari eventi atmosferici è possibile che le acque dolci fluiscano dall'adiacente Golfo di Gaeta in quello di Napoli, come confermato da SeaWiFS data analysis (comunicazione personale di B. Buongiorno Nardelli).

## 4.1 St. LTER-MC

La stazione di campionamento di lungo termine Mare Chiara (LTER-MC, 40°48,5'N, 14°15'E) è situata a due miglia nautiche dalla linea di costa, in prossimità dell'isobata dei 75m (Fig.4), in un'area in cui le influenze da costa sono molto pronunciate per gran parte dell'anno.

La serie storica di campionamenti ha avuto inizio negli anni Ottanta (Scotto di Carlo *et al.* 1985; Ribera d'Alcalà *et al.* 2004). Particolare rilevanza è stata data a studi di tipo biologico e in particolare alle comunità planctoniche (fitoplancton e zooplancton) di cui oggi si ha un'ampia letteratura (ad es. (Mazzocchi&Ribera d'Alcalà 1995; Modigh 2001; Modigh&Castaldo 2002; Modigh&Franzé 2009; Zingone *et al.* 2009). I campioni sono stati raccolti con una frequenza quindicinale, prima del 1991, e settimanale dal 1995 ad oggi. Solo nel periodo che va dall'agosto 1991 al febbraio 1995 si è verificata una lunga interruzione nella raccolta dei campioni.

La St. LTER-MC è caratterizzata da un massimo di clorofilla a maggio, nello strato superficiale, seguito da altri picchi durante l'estate. I valori di biomassa integrati (0-60m) indicano, ad ogni modo, una relativa stabilità nel corso delle stagioni. In acque superficiali, il fitoplancton è dominato da diatomee e nanoflagellati per gran parte dell'anno, compresa l'estate, quando *bloom* di specie di piccole dimensioni si susseguono e si sovrappongono le une alle altre (Scotto di Carlo *et al.* 1985; Zingone *et al.* 1990; Ribera d'Alcalà *et al.* 2004). Il comparto fitoplanctonico ha mostrato un cambiamento quali-quantitativo tra l'inizio della

serie storica e gli anni più recenti. Si è avuta una diminuzione in termini di biomassa e un aumento in termini di abbondanza (Ribera d'Alcalà *et al.* 2004).

In questo scenario il ruolo del microzooplancton nel Golfo di Napoli sembra acquisire sempre maggiore rilevanza, evidenziando la necessità di ulteriori informazioni relative al comparto. Studi mirati che possano rispondere a domande-chiave sulla capacità di crescita degli organismi microzooplanctonici, sull'ammontare della loro produzione e soprattutto su chi controlla il comparto nel suo insieme, appaiono fondamentali per una migliore comprensione dell'area. Allo stesso tempo i risultati ottenuti potrebbero essere la base per la creazione di un modello sui flussi di carbonio nell'ecosistema pelagico marino.

## 5. MATERIALI E METODI

I campioni di acqua necessari per gli esperimenti sono stati prelevati alla St. LTER-MC con l'ausilio della nave oceanografica "Vettoria". Il campionamento è stato effettuato con un campionatore automatico della SeaBird Electronics, equipaggiato con 12 bottiglie Niskin (10L) collegato ad un CTD (SBE 911plus). L'acqua per le analisi settimanali di routine e per gli esperimenti è stata prelevata in superficie (-0.5m). In aggiunta al campionamento settimanale, il sito è stato campionato in quattro periodi diversi dell'anno prelevando campioni lungo tutta la colonna d'acqua (0-60m). Al momento della raccolta dei campioni sono stati acquisiti alcuni dei parametri fisico-chimici (salinità, temperatura, nutrienti) caratterizzanti la colonna d'acqua.

### 5.1 Campionamento alla St. LTER-MC

Per questo studio sono stati analizzati, sia qualitativamente che quantitativamente, campioni di microzooplancton raccolti settimanalmente per tre anni (2006-2008). In aggiunta nei mesi di maggio e luglio 2007 e di febbraio e dicembre 2008 sono stati effettuati prelievi lungo tutta la colonna d'acqua. Campioni per il microzooplancton sono stati raccolti a sei quote di profondità (0-5-10-20-40-60m).

La raccolta dei campioni è avvenuta direttamente dalle bottiglie Niskin in *flasks* da 300ml oscurate e contenenti il fissativo. Il campione è stato fissato con una soluzione acida di Lugo, 2% di concentrazione finale, e conservato in frigo a +4°C. Il campione è stato sedimentato riducendo il volume da 300ml a 100ml. Di questi un aliquota tra i 2.5 e i 50ml, a seconda della concentrazione microzooplanctonica, è stata trasferita in una camera di sedimentazione e lasciata a decantare per un tempo variabile a seconda dell'altezza della colonna (3 ore al cm). I campioni sono stati analizzati, secondo il metodo Utermöhl, con un microscopio invertito Zeiss utilizzando un ingrandimento di 320x in contrasto di fase. Un minimo di 100 cellule di ciliati e 100 cellule di dinoflagellati sono state contate per ciascun contenitore sperimentale in uno o più subcampioni. Le dimensioni delle cellule e, nel caso dei Tintinnidi, delle loriche sono state misurate grazie ad un oculare micrometrico. Tra i protozoi è stato possibile distinguere i seguenti gruppi: ciliati nudi <20µm ESD, Strobilididae >20µm ESD, Strombididae >20 µm ESD, Strombidinopsis spp., Tontonia spp., tintinnidi, *Myrionecta rubra*, dinoflagellati <20µm e sarcodini. I metazoi considerati erano: nauplii e rotiferi. Tutti i ciliati, i dinoflagellati eterotrofi >20µm ESD e i nauplii sono stati sempre contati sull'intera camera di sedimentazione. I dinoflagellati sono stati riconosciuti come autotrofi o eterotrofi sulla base di osservazioni all'epifluorescenza di alcuni campioni vivi e sulla base della tassonomia (Lessard&Swift 1986).

Il biovolume è stato ricavato assimilando la forma della cellula a forme geometriche semplici, e da questo, tramite un fattore di conversione si è risalito al contenuto in carbonio. Il contenuto in carbonio di tutti i ciliati aloricati e dei tintinnidi con lorica ialina è stato ottenuto usando un fattore di conversione di

0.19 pg C  $\mu\text{m}^{-3}$  (Putt&Stoecker 1989). Tintinnidi con lorica fortemente agglomerata (non trasparente) sono stati osservati solo raramente; per questi il contenuto di carbonio è stato calcolato utilizzando la formula proposta da (Verity&Langdon 1984):

$$C = V \times 0.053 + 444.5 \quad (\text{eq.1})$$

in cui C è la biomassa in carbonio (pg C) e V è il volume della lorica ( $\mu\text{m}^3$ ). Per i dinoflagellati il fattore di conversione usato è di 0.14 pg C  $\mu\text{m}^{-3}$  (Lessard 1991) mentre per i nauplii è stato utilizzato 0.045 pg C  $\mu\text{m}^{-3}$  (Gifford&Caron 2000) e per i sarcodini 0.1 pg C  $\mu\text{m}^{-3}$  (Gifford&Caron 2000).

## 5.2 Esperimenti di predazione interna al microzooplancton

Per gli esperimenti di predazione interna al microzooplancton sono necessarie tre serie sperimentali. Nei singoli contenitori vengono miscelati due distinti campioni di acqua, in quantità differenti. Il primo campione è manipolato in modo tale che al suo interno vi sia la minore concentrazione possibile di predatori microzooplanctonici e allo stesso tempo una adeguata concentrazione di clorofilla (vedi messa a punto del metodo). Il secondo è campione naturale setacciato su retino di maglia da 200 $\mu\text{m}$  per eliminare gli organismi mesozooplanctonici. Il protocollo elaborato prevede una fase preliminare e una propriamente sperimentale.



- 1) Uno o due giorni prima dell'esperimento 50 L di acqua sono prelevati dal sito di campionamento alla profondità stabilita (-0.5m). Il campione è sifonato direttamente dalle bottiglie Niskin all'interno di contenitori con l'ausilio di tubicini di silicone sommersi. Tale procedimento garantisce un flusso d'acqua delicato che evita il danneggiamento le cellule. Tutto il materiale utilizzato per gli esperimenti è stato lasciato in immersione in HCL al 10% per una notte prima di essere abbondantemente risciacquato con acqua distillata. Il campione giunto in laboratorio viene setacciato su un retino di maglia da 5 $\mu$ m per ottenere il campione con la percentuale minore di predatori. Il campione così manipolato è incubato in camera termostata per uno o due giorni in modo da consentire alle cellule microzooplanctoniche e fitoplanctoniche di riprendersi dal processo di setacciamento.
- 2) il giorno stabilito per l'esperimento viene prelevata ulteriore acqua nello stesso sito di campionamento, raccolta con la stessa metodologia e portata immediatamente in laboratorio. Nel tempo in cui il campione naturale arriva in sede, l'acqua setacciata su 5 $\mu$ m, preparata precedentemente, viene distribuita in quantità differenti all'interno delle bottiglie sperimentali da 2.8L in policarbonato. Quando il campione naturale arriva in laboratorio, viene setacciato delicatamente su retino con apertura di maglia da 200 $\mu$ m all'interno di un'unica vasca dove verrà mantenuto omogeneo da una continuo e delicato mescolare con lunghe aste di vetro. Il campione naturale viene poi distribuito all'interno delle bottiglie sperimentali mescolandosi a quello in cui la concentrazione dei predatori è stata ridotta. Si ottengono così tre serie sperimentali parallele

di cui una è utilizzata esclusivamente per la caratterizzazione iniziale della concentrazione di clorofilla e del popolamento microzooplanctonico. Le altre due serie vengono incubate per 24 ore in una camera termostata in condizioni di temperatura e di ciclo di luce giorno-notte simili a quelli presenti *in situ* al momento della raccolta del campione. Durante l'incubazione tutti i contenitori sono stati ruotati più volte su se stessi in modo da evitare una possibile sedimentazione delle cellule algali sul fondo del contenitore. Tale procedimento è stato eseguito ogni 2-3 ore durante il giorno. La possibilità che vi sia stata sedimentazione durante le ore notturne è stata comunque esclusa in seguito all'analisi qualitativa dei campioni. Le cellule fitoplanctoniche presenti, infatti, erano in gran parte di piccole dimensioni ( $<5\mu\text{m}$ ) e la loro sedimentazione richiede tempi piuttosto lunghi. Trascorse le 24 ore di incubazione sono stati prelevati i campioni, per le analisi finali di clorofilla *a* e per il popolamento microzooplanctonico, da tutti i contenitori sperimentali.

### 5.3 Analisi Clorofilla

I volumi di acqua prelevati per le analisi della concentrazione di clorofilla sono stati posti all'interno di contenitori di plastica nera per evitare la degradazione del campione. Prima di effettuare le filtrazioni per la determinazione della concentrazione totale di clorofilla il campione è stato agitato delicatamente. I filtri utilizzati sono in fibra di vetro GF/F Whatman da 25mm di diametro con

foro da 0.8  $\mu\text{m}$  e potere di ritenzione 0.45  $\mu\text{m}$ . effettuata la filtrazione i filtri sono stati congelati in azoto liquido fino al momento dell'analisi.

Le analisi spettrofluorimetriche sono state effettuate secondo il metodo di (Holm Hansen *et al.* 1965) utilizzando uno spettrofluorimetro Shimadzu, mod. RF-5301. I pigmenti sono stati estratti in acetone al 90% neutralizzato con carbonato di magnesio e la fluorescenza dell'estratto è stata misurata prima e dopo acidificazione per ottenere, oltre alla frazione fotosinteticamente attiva (Chl *a*), anche quella inattiva (feopigmenti). La curva di calibrazione è stata effettuata utilizzando una soluzione di clorofilla *a* pura estratta da *Anacystis nidulans* della Sigma. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione sono state selezionate sulla base di un pre-scan (350-700 nm) della stessa soluzione e sono risultate sempre di 432 e 668 nm rispettivamente.

## 5.4 Analisi del microzooplancton

Il procedimento di raccolta, conservazione, manipolazione e analisi dei campioni raccolti per l'analisi quantitativa e qualitativa del microzooplancton durante gli esperimenti è la stessa riportata per il campionamento della stazione LTER-MC.

La suddivisione del comparto microzooplanctonico, nel caso degli esperimenti, è stata effettuata secondo un numero inferiore di categorie. Questo ha facilitato l'interpretazione delle dinamiche caratterizzanti il comparto. Il microzooplancton è stato suddiviso in: nanociliati <20  $\mu\text{m}$  ESD, ciliati >20  $\mu\text{m}$  ESD, *Myrionecta rubra*, Tintinnidi, dinoflagellati eterotrofi >20  $\mu\text{m}$ , e nauplii. Nelle

analisi in cui i ciliati sono stati considerati come un unico gruppo *Myrionecta rubra* non è stata inclusa.

## 5.5 Elaborazioni

L'analisi quantitativa del popolamento microzooplanctonico ha consentito di calcolare la crescita apparente ( $k$ ,  $d^{-1}$ ) del comparto, intesa come variazione dell'abbondanza o della biomassa nel corso dell'incubazione. L'equazione che ci consente di ottenere questo parametro è:

$$k = \text{Ln}(C_{T24}/C_{T0})/t \quad (\text{eq.2})$$

in cui  $C_{T0}$  e  $C_{T24}$  sono le concentrazioni iniziali e finali all'interno di ciascuna bottiglia e  $t$  è la durata dell'incubazione che, nel nostro caso, è di un giorno.

La crescita apparente ( $k$ ) è una misura che deve essere considerata al netto della predazione; anche nel contenitore con la minore concentrazione di protozoi, infatti, può esistere una seppur minima predazione interna. Il tasso di crescita potenziale, in assenza di qualsivoglia tipo di predazione, si ottiene dall'analisi di regressione lineare tra la crescita apparente ( $k$ ), misurata in ogni contenitore, e la media dell'abbondanza dei potenziali predatori microzooplanctonici (MPA, Mean Predator Abundance) presenti nello stesso contenitore sperimentale. Per predatori si intendono tutte le cellule microzooplanctoniche con dimensione  $>20\mu\text{m}$  ESD, la loro abbondanza media è stata calcolata secondo la formula proposta da (Tsai *et al.* 2008) e successivamente normalizzata sulla base delle concentrazioni misurate per il campione naturale al tempo zero ( $C_{T0}$ ).

$$\text{MPA} = (C_{T24} - C_{T0})/k \quad (\text{eq.3})$$

Il valore di  $k$  utilizzato nell'equazione riportata fa riferimento alla misura effettuata nel campione con la minore concentrazione di predatori.

Dalla regressione lineare tra i due parametri appena descritti ( $k$  vs MPA) si ottiene il tasso di crescita potenziale del microzooplancton in assenza di predazione ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ), rappresentato dal valore dell'intercetta della retta di regressione lineare con l'asse delle  $y$ , e il tasso di mortalità microzooplanctonica dovuto alla predazione dei protozoi ( $m_p$ ,  $d^{-1}$ ), inteso come pendenza della retta di regressione (Fig 5)

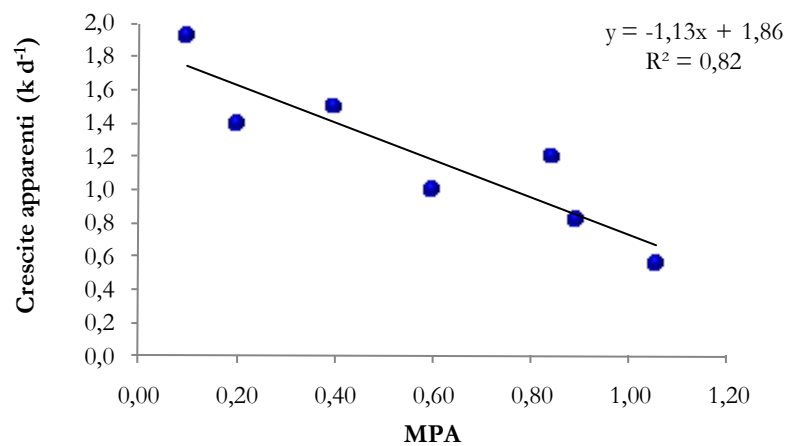


Fig.5 Schematizzazione della correlazione tra le crescite apparenti e la concentrazione di predatori per il calcolo di  $\mu$  e  $g$

I tassi di crescita potenziale dei protozoi da noi calcolati sono stati confrontati con i valori presenti in letteratura ottenuti, in genere, in coltura. Per il gruppo dei ciliati è stato possibile un confronto tra i tassi di crescita ottenuti sperimentalmente in questo lavoro con quelli calcolati, per le stesse cellule, utilizzando le equazioni elaborate da diversi autori sulla base della temperatura e

del volume cellulare medio. Le correlazioni presenti in letteratura sono state effettuate usando un modello di questo tipo:

$$\text{Ln } \mu = a \text{ Ln } T + b \text{ Ln } V + c \quad (\text{eq.4})$$

(Fenchel 1968; Finlay 1977; Montagnes *et al.* 1988; Muller&Geller 1993; Montagnes 1996) in cui T è la temperatura; V il volume medio in  $\mu\text{m}^3$  e a, b e c sono costanti. Per il nostro lavoro abbiamo scelto di utilizzare come valori per le costanti quelli proposti per tutti i ciliati da (Perez *et al.* 1997). In questo caso, infatti, i valori sono stati ricavati da esperimenti effettuati in un sito di campionamento nel Mar Mediterraneo occidentale che è risultato essere il sito con le caratteristiche più simili a quelle della St. LTER-MC rispetto a tutti gli altri siti riportati in letteratura. La formula utilizzata per confrontare i tassi di crescita misurati sperimentalmente con quelli teorici è dunque:

$$\text{Ln } \mu = 0.94 \text{ Ln } T^\circ - 0.08 \text{ Ln } V - 1.79 \quad (\text{eq.5})$$

Per determinare l'intervallo in ore, tra due successive divisioni cellulari (generation time GT), si è utilizzata l'equazione di Laybourn-Parry (1991)

$$\text{GT} = 0,693 / (\mu / 24) \quad (\text{eq.6})$$

## 5.6 Calcoli di produzione

La produzione potenziale ( $P_{\text{pot}}$ ), ovvero la produzione calcolata in assenza di qualsiasi forma di predazione, è stata determinata, per ciascun gruppo microzooplanctonico. Il calcolo della  $P_{\text{pot}}$  è stato effettuato sia per gli esperimenti che in situ (St. LTER-MC). La formula utilizzata è:

$$P_{\text{pot}} = (C_{T0} * \exp(\mu)). \quad (\text{eq.7})$$

Nel caso degli esperimenti  $C_{T0}$  rappresenta la biomassa misurata nel campione naturale (setacciato su  $200\mu\text{m}$ ) e  $\mu$ , il tasso di crescita potenziale, calcolato attraverso la regressione lineare (k vs MPA).

Per la stima della produzione potenziale calcolata alla St. LTER-MC  $C_{T0}$  è la biomassa misurata, per ciascun gruppo microzooplanctonico, nei campionamenti effettuati settimanalmente nei tre anni dello studio e  $\mu$  è la media delle crescite potenziali ottenute negli esperimenti per i singoli gruppi microzooplanctonici.

L'ammontare della produzione potenziale predata nel corso di ogni singolo esperimento può essere calcolato seguendo la formula di (Reckermann&Veldhuis 1997):

$$\%P_{\text{pred.}} = (m_p/\mu) \times 100 \quad (\text{eq.8})$$

Oppure, volendo determinare la percentuale di produzione predata in ogni singolo contenitore sperimentale, si può utilizzare la formula:

$$\%P_{\text{pred.}} = (P_{\text{pot}} - C_{T24}) / P_{\text{pot}} \quad (\text{eq.9})$$

In cui  $C_{T24}$  rappresenta la biomassa dei singoli gruppi microzooplanctonici (nanociliati, ciliati  $>20\mu\text{m}$  e dinoflagellati) misurata alla fine dell'incubazione all'interno dei contenitori.

Avendo determinato per ogni contenitore sperimentale la percentuale di produzione predata e conoscendo il tasso di crescita dei singoli gruppi in assenza di predazione è stato possibile determinare, per ogni contenitore, il tasso di mortalità microzooplanctonica dovuto alla predazione degli stessi protozoi:

$$m_p = (\%P_{\text{pred.}} * \mu) / 100. \quad (\text{eq.10})$$

## 5.7 Analisi statistica

Il tasso di mortalità dei protozoi ottenuto su base sperimentale secondo l'equazione 10 è stato utilizzato come base per ottenere un modello predittivo del tasso di predazione esercitato dai protozoi  $>20\mu\text{m}$  sugli altri protozoi.

Pur essendo consapevoli dell'esiguità del nostro database ( $n=27$ ) per condurre una significativa analisi di tipo statistico, si è scelto di utilizzare una Forward Stepwise Regression per determinare quali parametri, fisici e biologici, influenzano in modo significativo il tasso di mortalità del microzooplancton. I parametri analizzati con la Forward Stepwise Regression sono: la concentrazione di clorofilla, la temperatura a cui gli esperimenti sono stati condotti e la concentrazione dei protozoi predatori. Il risultato dell'analisi ha indicato che i tre fattori considerati influenzano in modo determinante il tasso di mortalità del microzooplancton. Ciò ci ha consentito di ottenere, con una regressione multipla, un modello, specifico per ciascun gruppo microzooplanctonico, da utilizzare nella determinazione del tasso di mortalità ( $m_p$ ,  $d^{-1}$ ) in funzione dei tre parametri individuati. Applicando i modelli ai campioni raccolti alla St. LTER-MC, negli anni 2006-2008 abbiamo determinato il tasso di mortalità subito dai singoli gruppi microzooplanctonici il giorno del campionamento. Da qui si è potuto calcolare l'ammontare della produzione predata e di quella disponibile per i livelli trofici superiori. Tali analisi è stata condotta sia per lo strato superficiale (0m) sulla base dei campioni settimanali raccolti che su tutta la colonna d'acqua (0-60m) utilizzando i campioni raccolti durante le quattro campagne effettuate sul nostro sito di campionamento in febbraio, maggio, luglio e dicembre.



I modelli empirici per calcolare il tasso di mortalità ( $d^{-1}$ ) sono per i nanociliati, i ciliati  $>20\mu\text{m}$  e per i dinoflagellati rispettivamente:

$$m_{\text{pnano}} = 5.136 + (0.847 * Ab_{T0} * 10^4) - (0.300 * chl_a) - (0.197 * T^\circ) \quad (\text{eq.11})$$

$$m_{\text{pCil}>20\mu\text{m}} = 3.925 + (0.701 * Ab_{T0} * 10^4) - (0.396 * chl_a) - (0.134 * T^\circ) \quad (\text{eq.12})$$

$$m_{\text{pDino}} = 1.555 + (0.330 * Ab_{T0} * 10^4) - (0.129 * chl_a) - (0.0552 * T^\circ) \quad (\text{eq.13})$$

in cui  $Ab_{T0}$  rappresenta l'abbondanza dei protisti  $>20\mu\text{m}$  nel campione,  $chl_a$  la concentrazione di clorofilla presente durante il campionamento e  $T^\circ$  la temperatura dell'acqua.

## 6. RISULTATI

### 6.1 Messa a punto del protocollo sperimentale

Il primo obiettivo di questa ricerca era di riuscire ad elaborare un protocollo sperimentale che consentisse di misurare da un lato la crescita dei protozoi in assenza di predazione e dall'altro di stimare l'ammontare della predazione esercitata dai protozoi su altri protozoi in condizioni naturali. Per conseguire tale obiettivo è stato necessario garantire due condizioni sperimentali basilari:

- mantenere il livello della concentrazione delle risorse alimentari all'interno delle bottiglie sperimentali simile a quello misurato *in situ* al momento della raccolta del campione;
- ottenere una riduzione della concentrazione dei predatori in modo da ridurre il più possibile la predazione interna al comparto.

Per far sì che i due assunti venissero rispettati sono state testate diverse ipotesi.

1. *Aggiunta di una coltura algale di *Isochrysis galbani**. È stata creata una serie di diluizione secondo il classico metodo delle diluizioni seriali (Landry&Hassett 1982) miscelando concentrazioni crescenti di campione naturale con acqua di mare filtrata su filtro GF/F. A tale serie è stata aggiunta una quantità di coltura monoalgale di *Isochrysi galbani* tale da reintegrare la concentrazione di clorofilla persa con la diluizione. Si è

ottenuto così una serie sperimentale in cui da un lato il tasso di incontro tra predatori e prede era stato fortemente ridotto e dall'altro la concentrazione di clorofilla era stata mantenuta simile ai livelli presenti nel campione naturale. In tutti gli esperimenti condotti seguendo questo metodo, all'interno del contenitore con la minore percentuale di campione naturale, si è ottenuta la massima riduzione dei protozoi  $>20\mu\text{m}$  pari al 95%. Al contrario, la concentrazione di clorofilla è stata mantenuta simile a quella presente nel campione naturale (ad es.  $8.46$  e  $7.60 \mu\text{g chl}a \text{ L}^{-1}$  rispettivamente). Questo metodo tuttavia non ha dato i risultati attesi. Infatti, è stato possibile determinare il tasso di crescita massimo raggiunto dai protozoi in assenza di limitazione da risorse ma non le interazioni trofiche presenti nel comparto microzooplanctonico. Le crescite misurate in ciascun contenitore sono risultate tutte elevate e simili tra di loro (Fig. 6) evidenziando l'assenza di predazione interna.

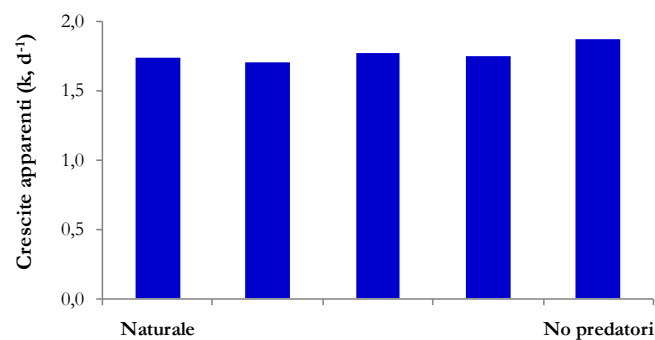


Fig.6 Tassi di crescita apparente nella serie sperimentale con aggiunta di alghe.

2. *Diluizione del campione naturale con acqua setacciata su 10 $\mu$ m.* La serie sperimentale in questo caso è stata creata diluendo il campione naturale con percentuali crescenti di acqua non più filtrata su 0.2 $\mu$ m, ma setacciata su un retino di maglia da 10 $\mu$ m. In questo caso, la maggior parte delle cellule autotrofe presenti nel nostro sito di campionamento ha attraversato la maglia del retino, garantendo una concentrazione di clorofilla simile a quella misurata in situ in tutti i contenitori sperimentali. Il setacciamento del campione naturale non è servito però ad eliminare un numero sufficiente di protozoi di grandi dimensioni. Pur essendo riusciti a ridurre in parte la concentrazione dei protozoi >20 $\mu$ m, grazie alla notevole plasticità che caratterizza queste cellule, un numero troppo elevato di predatori è stato rilevato all'interno del campione in cui la loro concentrazione doveva essere minima. Anche all'interno di tale contenitore sperimentale si è quindi verificata una forte predazione interna al comparto evidenziata dalla presenza di crescite apparenti negative (Fig.7).

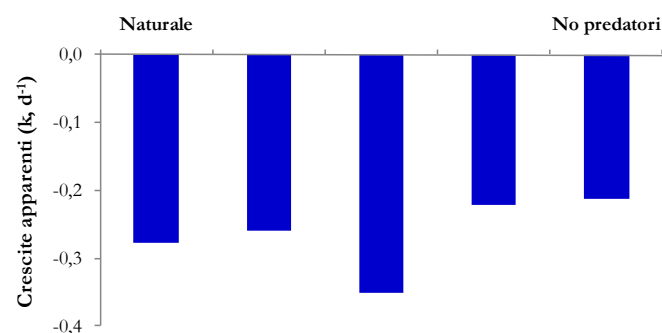


Fig 7 Tassi di crescita apparente nella serie sperimentale creata utilizzando acqua setacciata su 10 $\mu$ m.

3. *Diluizione del campione naturale con acqua setacciata su 5 $\mu$ m.* La stessa procedura adottata in precedenza è stata eseguita setacciando il campione da miscelare con quello naturale su un retino con apertura di maglia da 5 $\mu$ m. Si è ottenuto, anche in questo caso, il passaggio della maggior parte delle cellule autotrofe ma anche il passaggio di molti protozoi.
4. *Elevata velocità del flusso d'acqua durante il setacciamento.* Per ottenere un protocollo che soddisfacesse i nostri assunti è stata sfruttata, infine, una caratteristica fondamentale del plancton: la fragilità e la sensibilità di molti protozoi eterotrofi, in particolare degli abbondanti ciliati nudi, alla manipolazione. Il setacciamento del campione naturale su maglia da 5 $\mu$ m è stato effettuato mantenendo una elevata velocità del flusso d'acqua assicurando, in questo modo, la rimozione della maggioranza dei protozoi >20 $\mu$ m. L'elevata velocità del flusso d'acqua può danneggiare le cellule durante il passaggio attraverso il retino determinando l'incapacità di queste di accrescersi. Per evitare una sovrastima dei protozoi nel campione iniziale, contando come cellule vive cellule danneggiate, il campione setacciato è stato incubato per 24-48 ore a luce e temperatura simili a quelle misurate in situ al momento del campionamento così da dare modo alle cellule di riprendersi. Durante l'incubazione, per evitare l'esaurimento dei nutrienti, è stata aggiunta un medium Guillard F/2 (2  $\mu$ M NO<sub>3</sub> e 0.1  $\mu$ M di PO<sub>4</sub>). Le misure effettuate sul campione setacciato hanno mostrato una forte riduzione della concentrazione dei protozoi >20 $\mu$ m rispetto al campione naturale; la riduzione ottenuta è stata compresa tra il 72 e il 90%. Dopo il setacciamento anche la concentrazione di fitoplancton, valutata come concentrazione di clorofilla, si era ridotta. Tale riduzione è

variata da esperimento ad esperimento in funzione della composizione stessa del popolamento fitoplanctonico. In ogni caso, dopo le 24-48 ore di incubazione precedenti all'esperimento, si è osservato un incremento della concentrazione di clorofilla. In tutti gli esperimenti i protozoi hanno avuto a disposizione sufficiente risorsa algale per accrescersi liberamente come dimostrato dalle correlazioni effettuate tra i tassi di crescita apparente e la concentrazione di clorofilla (Vedi pag. 48-51).

Il campione ottenuto con il processo di setacciamento è stato utilizzato per la creazione di tre serie sperimentali parallele. Le bottiglie di policarbonato da 2.8L sono state riempite con una miscela composta da acqua setacciata e da campione naturale in concentrazioni crescenti. In ciascuna bottiglia della serie il campione naturale era presente con percentuali che andavano dal 0% al 100% (Fig.8).

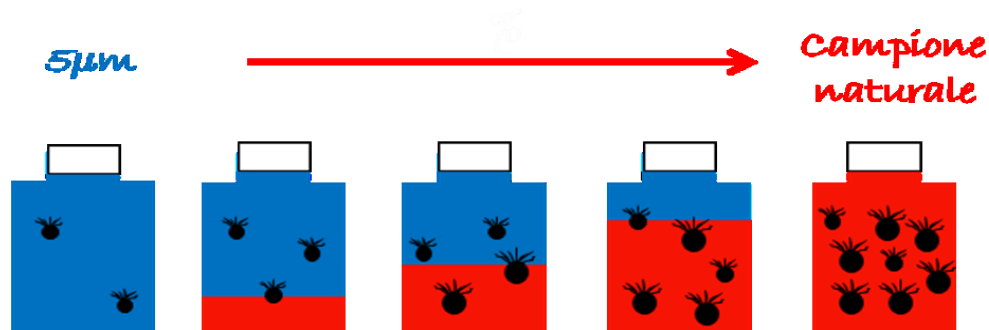


Fig 8. Schematizzazione della serie sperimentale

## 6.2 Esperimenti di predazione interna

### 6.2.1 Condizioni ambientali

Gli esperimenti sono stati condotti in diversi periodi dell'anno. Le condizioni fisiche e di conseguenza le condizioni trofiche caratterizzanti la colonna d'acqua durante ciascun esperimento sono risultate essere molto diverse (Tab. II). L'esperimento di febbraio 2009 è stato condotto in una condizione di completo rimescolamento della colonna d'acqua e sia la concentrazione di clorofilla che la temperatura registrata erano piuttosto basse. La concentrazione di clorofilla a mare era  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  mentre la temperatura era di  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tra il mese di aprile e quello di maggio la stazione di campionamento è caratterizzata dalla presenza di stratificazione termica in seguito all'innalzamento della temperatura dello strato superficiale. Durante l'esperimento di maggio 2008, la temperatura registrata era di  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  ma la concentrazione di clorofilla è risultata piuttosto bassa ( $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Gli altri esperimenti, condotti in piena estate (luglio) o in autunno (ottobre e novembre) hanno presentato condizioni di temperatura relativamente alte, tipiche del periodo, con valori compresi tra i  $21$  e i  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Al contrario, le concentrazioni di clorofilla misurate durante tali esperimenti hanno coperto un *range* molto ampio, che andava da  $0.6 \mu\text{g chl}a \text{ L}^{-1}$ , misurata nell'esperimento di luglio 2009 a  $9.2 \mu\text{g chl}a \text{ L}^{-1}$  misurata nel esperimento di novembre 2008.

Il comparto microzooplantonico è stato caratterizzato da abbondanze e biomasse piuttosto variabili. Le più basse concentrazioni sono state registrate a febbraio 2009 con  $1040 \text{ cell L}^{-1}$  e  $1.53 \mu\text{g C L}^{-1}$  le più alte invece, sono state

misurate durante esperimento condotto a novembre 2008 (41653 cell L<sup>-1</sup> e 108.31 µg C L<sup>-1</sup>).

Mese	Chl	T°	Tot		Nanociliati		Ciliati >20µm		Dino	
			Ab.	Bio	Ab.	Bio	Ab.	Bio	Ab.	Bio
<b>Mag 08</b>	0.3	18.4	6365	4.16	3264	0.64	1115	1.43	1986	2.09
<b>Ott 08</b>	1.3	23	7226	17.33	1735	0.32	2616	7.61	2875	9.40
<b>Nov 08</b>	9.2	21.8	41653	108.31	10064	1.73	21805	87.04	9784	19.54
<b>Feb 09</b>	0.5	15.3	1040	1.54	352	0.09	343	0.86	336	0.58
<b>Lug 09</b>	0.6	25	3654	3.31	768	0.15	2052	1.84	834	1.33

Tab. II Parametri generali caratterizzanti gli esperimenti. Chl= clorofilla µg L<sup>-1</sup>; Ab= abbondanza Cell L<sup>-1</sup>; Bio= biomassa µg C L<sup>-1</sup>

### 6.2.2 *Rispetto degli assunti*

Il presupposto di base per la realizzazione del protocollo sperimentale era di riuscire a garantire un ambiente sperimentale in cui il microzooplankton potesse sostenere la crescita massima raggiungibile in situ. Ciò significa da un lato fornire, in tutti i contenitori sperimentali, una disponibilità di risorsa alimentare paragonabile a quella presente a mare, in termini di concentrazione di clorofilla *a*, e dall'altro ridurre in modo significativo il tasso di predazione esercitato dai protozoi su gli altri protozoi riducendo la loro abbondanza e dunque il tasso di incontro.

Il setacciamento del campione naturale su un retino di maglia da 5µm sembra aver garantito queste due condizioni. Dopo il setacciamento e l'incubazione di 1 o



2 giorni, infatti, la concentrazione di clorofilla misurata all'interno dei contenitori sperimentali si è rivelata quasi sempre simile a quella presente in situ al momento della raccolta del campione. Nella maggior parte dei casi la riduzione di clorofilla nel contenitore con la minore percentuale di campione naturale non ha superato il 50%. Solo nell'esperimento condotto ad ottobre 2008, si è registrata una forte riduzione della concentrazione di clorofilla; il campione maggiormente diluito ha ricevuto solo il 20% della concentrazione iniziale di clorofilla. In questo caso, però, anche il popolamento microzooplanctonico è risultato fortemente ridotto dopo il setacciamento per cui la bassa concentrazione di clorofilla dovrebbe essere risultata sufficiente per la crescita dei protozoi.

In tutti gli esperimenti le serie sperimentali hanno presentato una graduale diminuzione della concentrazione del microzooplancton rispetto al campione naturale. L'abbondanza di tutto il popolamento microzooplanctonico è stata fortemente diminuita ed in particolar modo quella delle cellule  $>20\mu\text{m}$  ESD. Queste ultime, che rappresentano la maggioranza dei protozoi predatori, hanno subito una riduzione in termini di abbondanza compresa tra un massimo del 90% e un minimo del 72%. Dello stesso ordine di grandezza è il calo che si è registrato in termini di biomassa (Tab. III).

Una analisi separata deve essere condotta per l'esperimento del febbraio 2009. Il campione setacciato utilizzato per creare la serie di diluizione ha fatto registrare una elevatissima crescita di cellule fitoplanctoniche di piccole dimensioni durante l'incubazione precedente all'esperimento. Questo ha creato problemi nel calcolo del tasso di predazione, ma ad ogni modo, è stato possibile misurare alcuni dei parametri di interesse per questo lavoro.

	% predatori dopo il setacciamento	
	Abbondanza	Biomassa
<b>Maggio 08</b>	25%	26%
<b>Ottobre 08</b>	10%	6%
<b>Novembre 08</b>	28%	15%
<b>Luglio 09</b>	14%	10%

Tab. III. Percentuali di predatori, in termini di abbondanza e biomassa, all'interno del campione con la minore concentrazione di predatori, rispetto al campione naturale.

### *6.2.3 Stima dei tassi di crescita del microzooplancton*

Grazie ai conteggi effettuati sui campioni di microzooplancton, prelevati all'inizio e alla fine dell'incubazione, si è potuto calcolare il tasso di crescita apparente, caratterizzante sia l'intero popolamento che i singoli gruppi di protozoi, all'interno di ciascun contenitore sperimentale di ogni singolo esperimento. In più, per alcune specie particolarmente abbondanti, è stato possibile calcolare il tasso di crescita specifico.

#### *6.2.3.1 Dipendenza da Chl<sub>a</sub> e T°*

I tassi di crescita apparente ( $k$ ) misurati nel campione con il minor numero di predatori sono stati analizzati in funzione della concentrazione di clorofilla e della temperatura.

Le correlazioni ottenute con la concentrazione di clorofilla hanno fornito risultati paragonabili per tutti i gruppi presi in considerazione. I tassi di crescita apparente ( $k$ ) misurati in condizioni di ridotta predazione per tutto il comparto microzooplanctonico, sia in termini di abbondanza (Fig.9a) che in termini di biomassa, non presentano alcuna relazione con la concentrazione di clorofilla. I due parametri risultano completamente indipendenti avendo  $R^2 = 0.17$  e  $0.40$  rispettivamente in abbondanza e in biomassa. In entrambe i casi si ha  $p > 0.05$ .

Analogamente vi è una completa indipendenza dalla concentrazione di clorofilla anche per i tassi di crescita massima ( $\mu$ ) (in assenza completa di predazione) ottenuti dalla regressione lineare tra la crescita apparente e la media geometrica dell'abbondanza dei predatori. Le correlazioni effettuate per i tassi di crescita dell'interno comparto microzooplanctonico in termini di abbondanza ( $R^2 = 0.14$ ) (Fig. 9b) e biomassa ( $R^2 = 0.14$ ) presentano sempre  $p > 0.05$ .

Utilizzando le crescite apparenti e massime ottenute per i singoli gruppi microzooplanctonici si ottiene lo stesso andamento. Le crescite dei nanociliati, dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  e dei dinoflagellati, sia considerate in termini di abbondanza che di biomassa non sono mai significativamente correlate alla concentrazione della clorofilla; per tutti e tre i gruppi si ha  $p > 0.05$ .

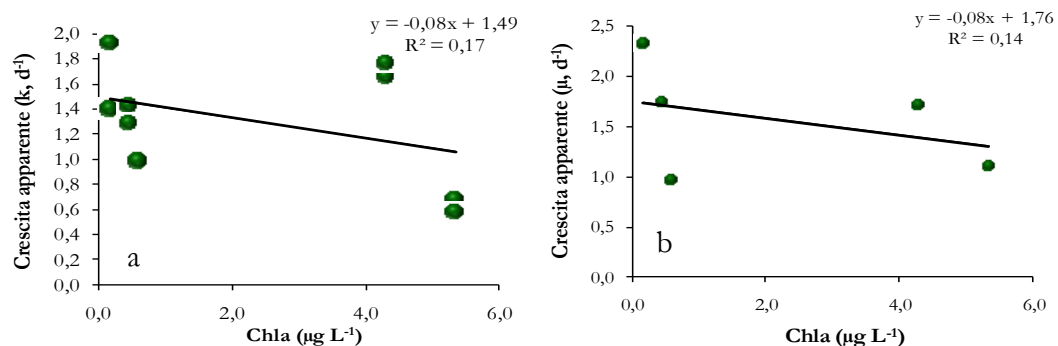


Fig. 9. Concentrazione di chla *vs* tasso di crescita apparente del microzooplancton a) nel campione con il minor numero di predatori b) in assenza di predazione.

Allo stesso modo le crescite apparenti misurate in termini di abbondanza e di biomassa sono state analizzate in funzione delle temperature a cui gli esperimenti sono stati condotti. Considerando il comparto microzooplanctonico nel suo insieme non è stata riscontrata alcuna correlazione né con le crescite apparenti ( $R^2=0.43$  e  $0.26$ ,  $p>0.05$  in abbondanza e biomassa) né con quelle in assenza di predazione ( $R^2=0.38$  e  $0.10$ ,  $p>0.05$ ) (Fig. 10 a-b).

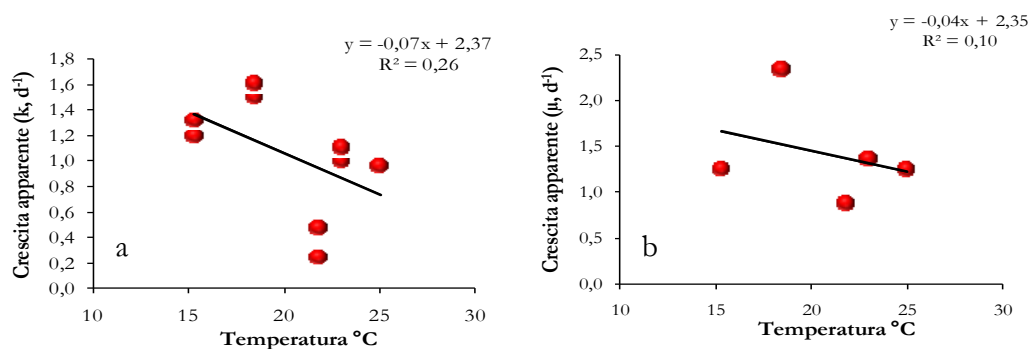


Fig. 10 Correlazione tra la temperatura e il tasso di crescita apparente del microzooplancton nel campione con il minor numero di predatori (a) e in assenza di predazione (b).

Effettuando la correlazione utilizzando i tassi di crescita misurati per i tre gruppi microzooplanctonici si sono ottenute risposte differenziate. Entrambe i gruppi di ciliati sono risultati negativamente correlati con la temperatura a cui è stato condotto l'esperimento. Nello specifico la correlazione è negativa per i nanociliati quando si utilizzano i tassi di crescita apparente in termini di abbondanza ( $R^2=0.64$ ,  $p<0.05$ ) (fig. 11a) e per i ciliati  $>20\mu\text{m}$  utilizzando quelli in termini di biomassa ( $R^2=0.46$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 11d). Nessuna significativa correlazione, invece, è stata riscontrata per i tassi di crescita in biomassa per i nanociliati e in abbondanza per i ciliati  $>20\mu\text{m}$  (rispettivamente  $R^2=0.22$  e  $0.01$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 11 b-c).

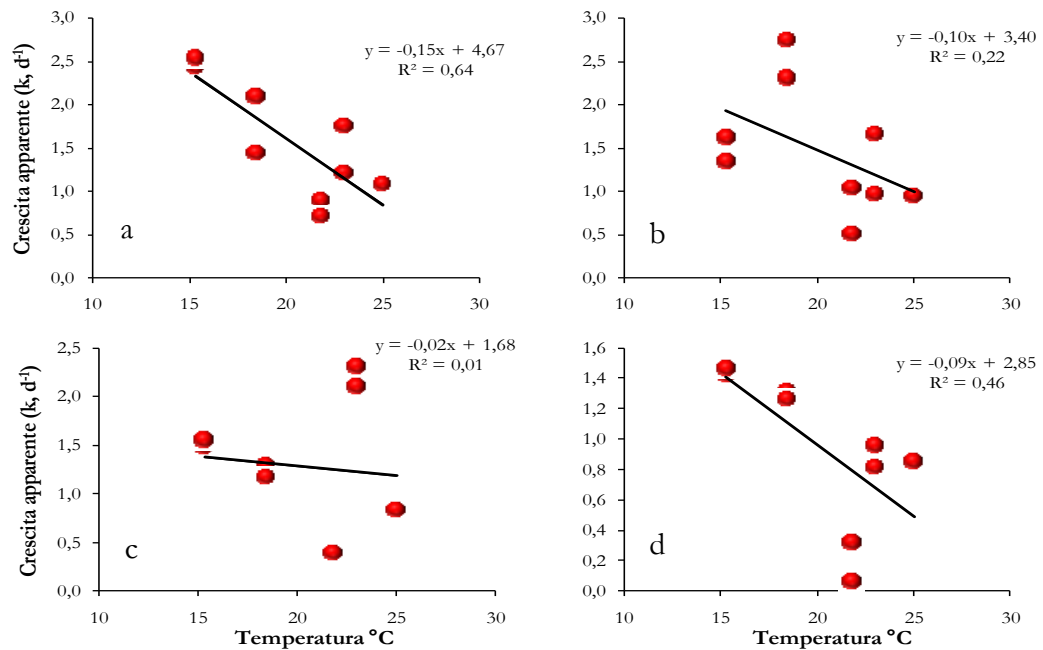


Fig. 11 Tassi di le crescite apparenti nel campione con il minor numero di predatori *vs* temperatura per i nanociliati (a-b) e per i ciliati  $>20\mu m$  (c-d) in abbondanza e biomassa

Se si considerano, però, le crescite apparenti e potenziali dei ciliati nel loro insieme si vede come in nessun caso, né in termini di abbondanza né in termini di biomassa, vi sia una significativa correlazione con la variazione di temperatura ( $R^2=0.21$  e  $0.33$ ).

Per quanto riguarda le crescite sia apparenti che potenziali dei dinoflagellati queste non sono risultate essere in alcun modo dipendenti dalla temperatura. In tutti i casi si riscontra  $p>0.05$ .

La concentrazione di clorofilla e la temperatura sono state utilizzate per effettuare delle correlazioni anche con i tassi di crescita apparenti misurati nei campioni naturali.

Rispetto alla concentrazione di clorofilla non si è trovata alcuna relazione significativa né per il microzooplancton nel suo insieme (Fig.12) ( $R^2=0.09$  e  $0.05$  rispettivamente in abbondanza e in biomassa) né per i singoli gruppi in cui il comparto è stato suddiviso ( $R^2$  compreso tra  $0.21$  e  $0.00$ ).

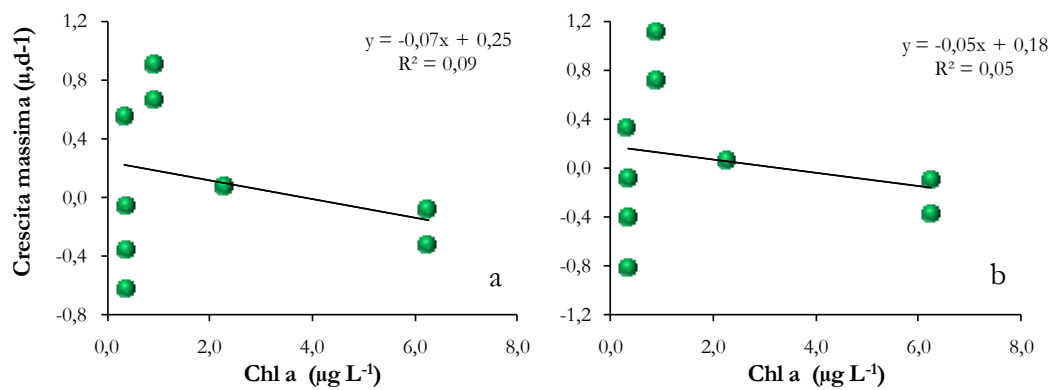


Fig. 12 Correlazione tra la concentrazione di clorofilla *a* e la crescita massima del microzooplancton nei campioni naturali in termini di abbondanza (a) e di biomassa (b).

Di contro, nel campione naturale tutti i gruppi microzooplanctonici sono risultati positivamente correlati alla temperatura. Nello specifico i ciliati  $>20\mu\text{m}$  risultano positivamente correlati sia con i tassi di crescita misurati in termini di abbondanza ( $R^2=0.54$ ,  $p<0.05$ ) che con quelli in termini di biomassa ( $R^2=0.78$ ,  $p<0.001$ ) (Fig.13 a).

Per i nanociliati la correlazione è significativa solo con i tassi di crescita apparente misurati in termini di biomassa ( $R^2=0.47$ ) (Fig. 13 b) mentre per i dinoflagellati è la crescita in termini di abbondanza ad essere dipendente dalla temperatura ( $R^2=0.57$ ).

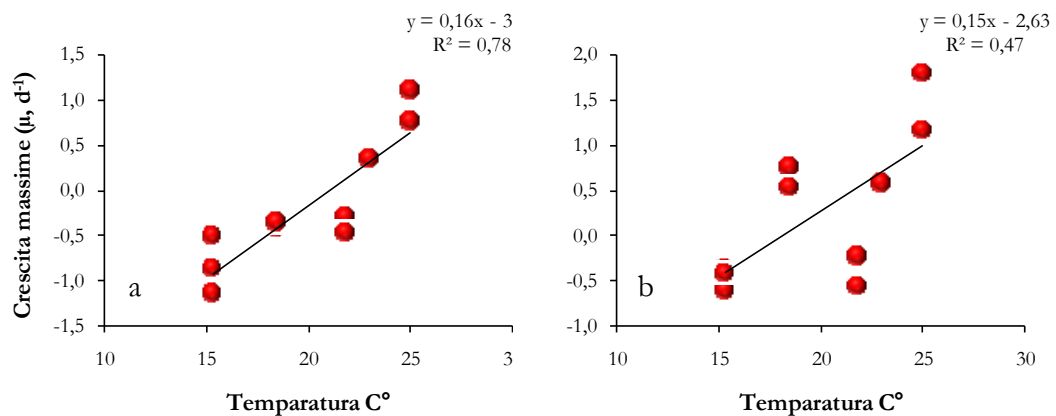


Fig. 13 Correlazione tra la temperatura e i tassi di crescita nel campione naturale in termini di biomassa per i ciliati >20µm (a) e per i nanociliati (b).

### 6.2.3.2 Tassi di crescita apparente

I tassi di crescita apparente misurati all'interno dei campioni naturali e dei campioni in cui la concentrazione dei protozoi >20µm è stata fortemente ridotta sono risultati molto diversi tra loro.

In tre dei nostri esperimenti il popolamento microzooplanctonico, nei campioni naturali, rimane essenzialmente stabile dopo le 24h di incubazione. I tassi di crescita apparente negli esperimenti di ottobre, novembre e febbraio sono 0,07, -0,21 e -0,35 d<sup>-1</sup>. Negli altri due esperimenti (maggio e luglio) si assiste ad un incremento del popolamento con crescite che vanno da 0,56 d<sup>-1</sup> a 0,79 d<sup>-1</sup> (Fig. 14 a). Considerando i tassi di crescita in termini di biomassa i valori di k sono compresi tra -0,44 d<sup>-1</sup> e 0,92 d<sup>-1</sup> (Fig. 14 b)

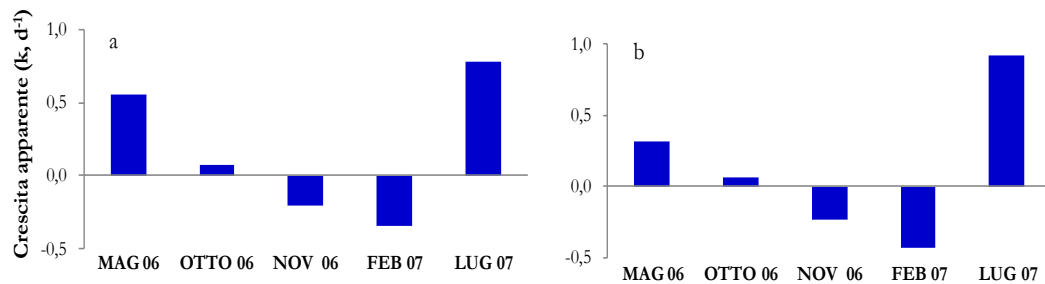


Fig. 14 Tassi di crescita apparente in termini di abbondanza (a) e di biomassa (b) per l'intero comparto microzooplanctonico nel campione naturale.

Nei corrispondenti campioni con il numero minimo di predatori i tassi di crescita misurati si sono rivelati decisamente più elevati. In tutti gli esperimenti dopo le 24h di incubazione si è riscontrato un aumento del popolamento microzooplanctonico. In termini di abbondanza i tassi di crescita risultano tutti  $\geq 1$  d<sup>-1</sup> tranne nell'esperimento di novembre in cui si ha  $k=0,63$  d<sup>-1</sup> (Fig.15 a). In ogni caso tale valore supera decisamente quello misurato nel campione naturale che era pari a  $-0,21$  d<sup>-1</sup>. I tassi di crescita ottenuti sulla base della variazione della biomassa risultano simili ( $k$  compreso tra  $0,36$  d<sup>-1</sup> e  $1,56$  d<sup>-1</sup>) (Fig.15 b).

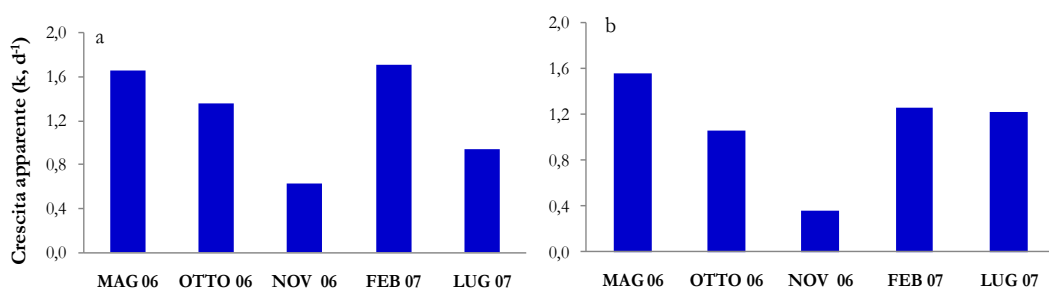


Fig. 15. Tassi di crescita apparente in termini di abbondanza (a) e di biomassa (b) per l'intero comparto microzooplanctonico nel campione con il minor numero di predatori.



L'analisi quali-quantitativa del comparto microzooplanctonico ha consentito di calcolare e confrontare i tassi di crescita apparente che caratterizzano i singoli gruppi in cui il comparto è stato suddiviso. Una prima analisi ha messo a confronto i tassi di crescita di tutti i ciliati e dei dinoflagellati eterotrofi cercando di individuare l'evidenza di relazioni trofiche tra questi due gruppi. In effetti, all'interno del campione naturale, i dinoflagellati in tre esperimenti su cinque mostrano tassi di crescita apparente maggiori di quelli dei ciliati. Se però consideriamo i tassi di crescita apparente misurati nel campione in cui i protozoi >20µm sono stati ridotti la situazione si capovolge completamente. In questo caso, infatti, in tre esperimenti su cinque sono i ciliati a presentare i tassi di crescita maggiori (Tab. IV).

	NATURALE		SETACCIATO	
	CILIATI	DINO	CILIATI	DINO
MAGGIO 06	0.07	0.52	2.06	0.60
OTTO 06	0.37	-0.30	0.96	0.95
NOV 06	-0.38	0.23	0.28	0.52
FEB 07	-0.78	-0.05	1.39	0.82
LUG 07	0.99	0.82	1.27	1.06

Tab. IV Tassi di crescita apparente in termini di biomassa nel campione naturale e nel campione con il minor numero di predatori (setacciato) per tutti i ciliati e per i dinoflagellati.

Se operiamo un'ulteriore scomposizione del comparto distinguendo all'interno dei ciliati tra quelli minori e quelli maggiori di 20µm ESD è possibile individuare come, all'interno del campione setacciato, i tassi di crescita più elevati

siano, nella maggior parte dei casi, quelli relativi ai nanociliati. I tassi di crescita apparente per queste cellule sono compresi tra  $0.81 \text{ d}^{-1}$  e  $2.49 \text{ d}^{-1}$  (Fig. 16).

Valori di  $k > 1$  corrispondono a tempi di riproduzione (G.T.) inferiori alle 12 ore e quindi ad un incremento del popolamento dei nanociliati di più del doppio nell'arco di una giornata. In termini di biomassa si è registrato lo stesso tipo di andamento con tassi di crescita compresi tra  $0.77 \text{ d}^{-1}$  e  $2.53 \text{ d}^{-1}$ . I ciliati  $> 20 \mu\text{m}$  così come i dinoflagellati presentano tassi di crescita più bassi rispetto ai nanociliati sia in abbondanza che in biomassa. Per i primi sono compresi tra  $0.39 \text{ d}^{-1}$  e  $1.51 \text{ d}^{-1}$  in termini di abbondanza e tra  $0.19$  e  $1.44$  in termini di biomassa; per i secondi tra  $0.75 \text{ d}^{-1}$  e  $1.01 \text{ d}^{-1}$  e tra  $0.52 \text{ d}^{-1}$  e  $1.12 \text{ d}^{-1}$  rispettivamente in abbondanza e biomassa.

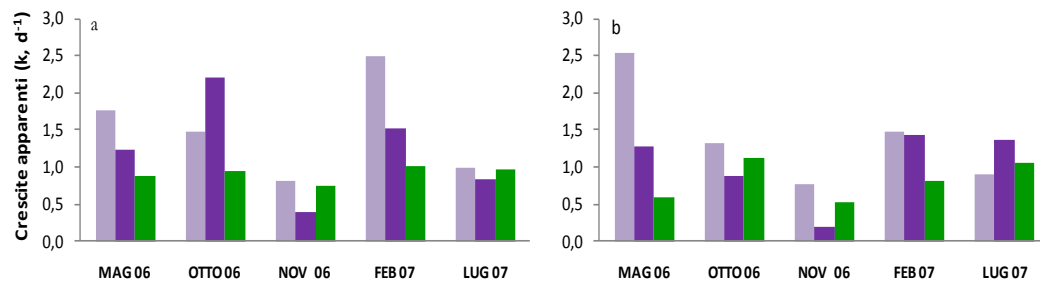


Fig. 16 Tassi di crescita dei tre gruppi del microzooplankton, nel campione setacciato, in termini di abbondanza (a) e di biomassa (b).

#### 6.2.4 Stime di predazione interna

Le correlazioni effettuate tra i tassi di crescita apparente ( $k$ ) e la media dei predatori (MPA) all'interno dei contenitori sperimentali ci consentono di valutare la predazione interna al microzooplankton. Le crescite apparenti dei differenti

gruppi diminuiscono in relazione all'aumento della abbondanza dei predatori. In queste correlazioni si considerano come predatori l'insieme di ciliati e dinoflagellati  $>20\mu\text{m}$  ESD.

In particolare, per i nanociliati le correlazioni risultano significative ( $p < 0.05$ ) in tre esperimenti su cinque. Gli esperimenti in cui, in funzione dell'aumentare della concentrazione dei predatori i tassi di crescita di queste piccole cellule diminuiscono, sono quelli condotti a maggio, ottobre e novembre 2008 (Fig. 17 a-b).

Nell'esperimento condotto a luglio 2009 i nanociliati non sembrano subire alcuna predazione (Fig. 17 c). Durante questo esperimento i tassi di crescita misurati nei singoli contenitori sperimentali, compresi tra  $0.9$  e  $1.4$   $\text{d}^{-1}$ , sono paragonabili e non dipendono dall'abbondanza dei predatori.

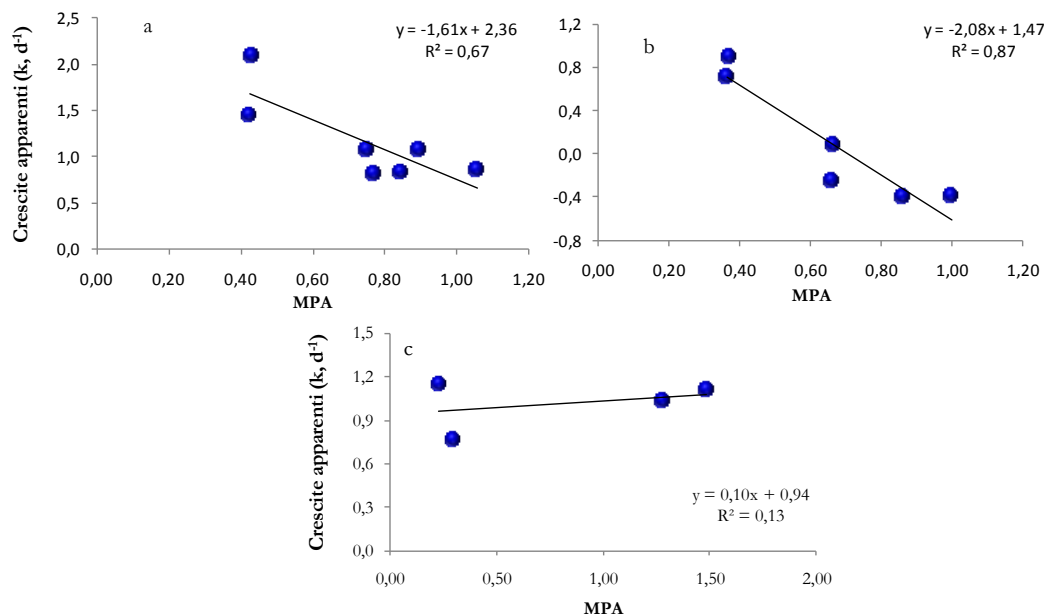


Fig. 17 Andamento dei tassi di crescita dei nanociliati in funzione dell'abbondanza dei predatori a maggio (a) a novembre (b) e a luglio (c)

Lo stesso andamento è evidente per i ciliati con dimensioni maggiori di  $20\mu\text{m}$ . Anche per queste cellule i tassi di crescita apparente diminuiscono con l'aumentare dell'abbondanza dei predatori all'interno dei contenitori sperimentali. Negli esperimenti condotti a maggio, ottobre, novembre e luglio le correlazioni risultano significativamente negative ( $p < 0.05$ ) se si considerano, come possibili predatori, tutte le cellule  $>20\mu\text{m}$  nel loro insieme ( $R^2 = 0.74, 0.99, 0.79$  e  $0.61$  rispettivamente per i quattro esperimenti).

Quando si considera l'abbondanza dei soli dinoflagellati eterotrofi il tasso di crescita apparente dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  mostra una correlazione ancora più significativa negli esperimenti condotti ad ottobre e a luglio ( $R^2 = 1.00$  e  $0.70$  ad ottobre e a luglio rispettivamente) (Fig. 18).

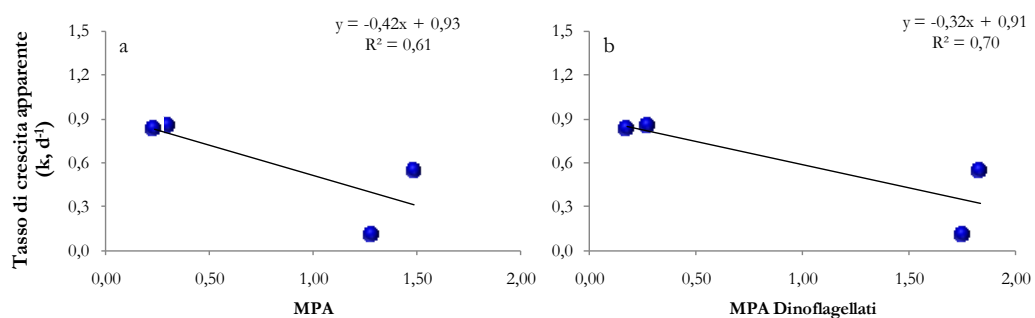


Fig. 18 Andamento del tasso di crescita apparente dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  in funzione della media dell'abbondanza di tutti i protozoi  $>20\mu\text{m}$  (a) e quella dei soli dinoflagellati (b) per l'esperimento di luglio.

L'incremento del tasso di crescita apparente dei dinoflagellati in funzione della diminuzione dell'abbondanza dei predatori è significativo in tre esperimenti su cinque (Fig. 19). Gli esperimenti in cui i tassi di crescita apparente diminuiscono all'aumentare della concentrazione dei predatori sono anche in questo caso quelli condotti a maggio, a ottobre e a novembre. Negli esperimenti

condotti a maggio e a novembre sembra che la maggiore pressione predatoria sui dinoflagellati sia esercitata dai ciliati  $>20\mu\text{m}$ . In più, nell'esperimento di luglio, così come è stato riscontrato per i nanociliati, anche per i dinoflagellati non sembra che vi sia alcuna predazione interna. I tassi di crescita registrati nei singoli boccioni sperimentali nel corso di questo esperimento sono indipendenti dalla concentrazione dei predatori. I tassi di crescita apparente sono infatti compresi tra  $0.80\text{ d}^{-1}$  e  $1.2\text{ d}^{-1}$ .

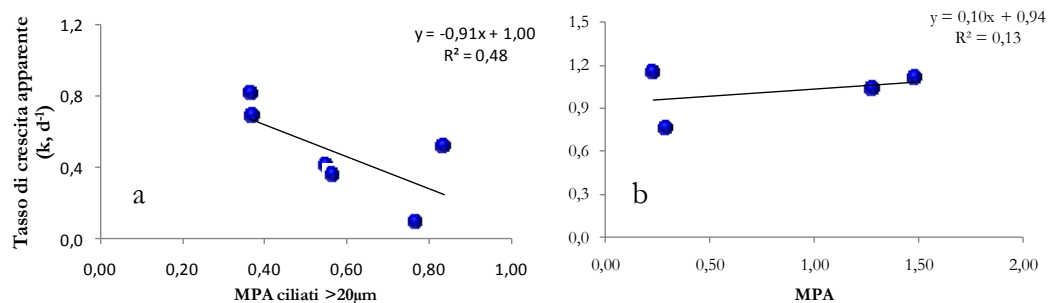


Fig. 19 Andamento del tasso di crescita apparente dei dinoflagellati in funzione dell'abbondanza dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  a novembre (a) e dell'abbondanza dei protozoa  $>20\mu\text{m}$  a luglio (b).

Lo stesso tipo di analisi (tassi di crescita in funzione dell'abbondanza dei predatori) è stata effettuata mettendo insieme i dati di tutti gli esperimenti. Le abbondanze medie dei predatori sono considerate, in questo caso, in termini logaritmici per consentire una migliore visualizzazione dei dati. Il maggior numero di dati ha permesso di evidenziare trend differenti a seconda della concentrazione dei predatori.

Il gruppo dei ciliati mostra uno stesso andamento in cui le crescite apparenti aumentano linearmente all'aumentare della concentrazione dei potenziali predatori quando questi sono presenti in concentrazioni inferiori alle  $1500\text{ cell. L}^{-1}$

( $R^2=0.82$  e  $0.79$ , rispettivamente per i nanociliati e per i ciliati  $>20\mu\text{m}$ ); presentano crescite costanti ( $R^2=0.19$  e  $0.00$ ) quando i protozoi  $>20\mu\text{m}$  si trovano in concentrazioni comprese tra le 1500 e le 4000 cell  $\text{L}^{-1}$ . Quando, invece, i predatori superano le 4000 cellule  $\text{L}^{-1}$  i tassi di crescita dei ciliati risultano negativamente correlati all'abbondanza dei predatori (Fig.20)

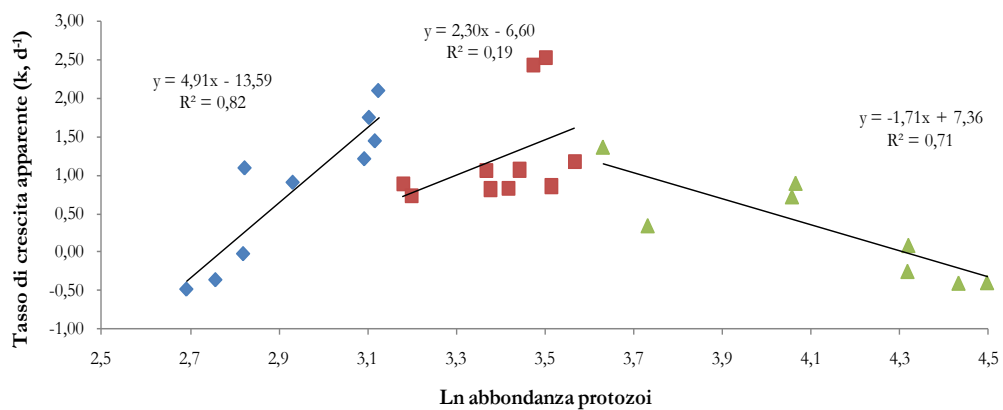


Fig. 20 Correlazione tra le crescite apparenti dei nanociliati in tutti i contenitori sperimentali di tutti gli esperimenti e il logaritmo naturale delle abbondanze medie dei predatori.

Le correlazioni mostrate dai dinoflagellati sono leggermente differenti. A concentrazioni di predatori al di sotto della soglia delle 1500 cellule per litro si ha, anche in questo caso, una relazione lineare positiva tra la crescita dei dinoflagellati e l'abbondanza dei protisti  $>20\mu\text{m}$  ( $R^2= 0.58$ ), ma al di sopra di tali concentrazioni i tassi di crescita dei dinoflagellati sembrano essere indipendenti dalla presenza dei protozoi  $>20\mu\text{m}$  (Fig.21).

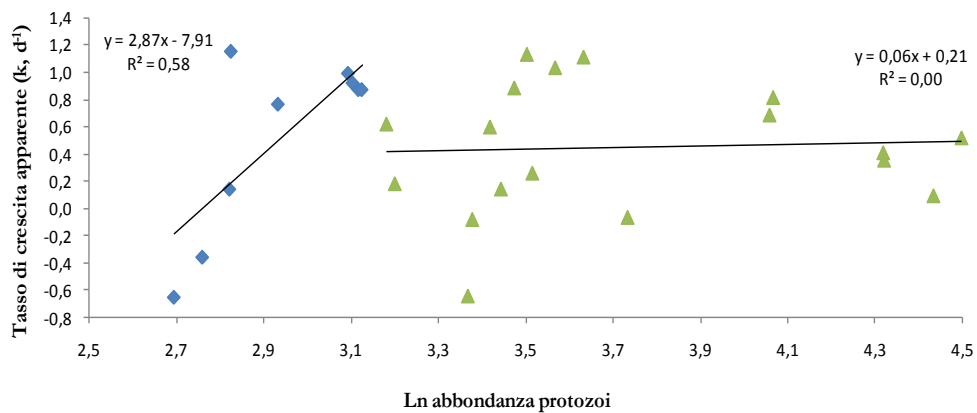


Fig. 21 Correlazione tra le crescite apparenti dei dinoflagellati in tutti i contenitori sperimentali di tutti gli esperimenti e il logaritmo naturale delle abbondanze medie dei predatori.

### 6.2.5 Tassi di crescita potenziali

I tassi di crescita presentati fin ora sono relativi a crescite apparenti, che abbiamo misurato, cioè, nel corso dei nostri esperimenti all'interno di ciascun contenitore sperimentale. Dal momento che i presupposti di base del metodo sono stati assolti i tassi di crescita apparente ottenuti all'interno dei contenitori con il minor numero di predatori potrebbero essere considerati come i massimi tassi di crescita raggiunti dagli organismi microzooplanctonici in specifiche condizioni. È possibile, ad ogni modo, che anche all'interno di questi bocconi, vi sia stata una certa predazione. L'analisi di regressione lineare permette di ottenere l'effettivo tasso di crescita dei protozoi ( $\mu$ ) in assenza di predazione. Il valore di  $\mu$  deriva dalle correlazioni tra i tassi di crescita apparente misurati in ciascun contenitore sperimentale con le medie geometriche delle abbondanze dei predatori ( $>20\mu\text{m}$ ) presenti all'interno delle stesse bottiglie.

L'intercetta della retta che si ricava da questa correlazione rappresenta il tasso di crescita reale in assenza di predazione ( $\mu$ ), la pendenza di tale retta rappresenta il tasso di predazione ( $m_p$ ) esercitato dai predatori. Tale analisi è stata effettuata sia per la determinazione dei tassi di crescita dell'intero comparto microzooplanctonico sia per i singoli gruppi. I valori ottenuti sono presentati nella tabella V.

		$\mu$	$m_p$	$R^2$	$\mu$	$m_p$	$R^2$
<b>Maggio</b>	<b>micro</b>	2,33	1,88	0,72	2,34	2,24	0,76
	<b>nano</b>	2,36	1,61	0,67	3,79	3,42	0,84
	<b>&gt;20</b>	2,23	2,92	0,74	2,41	3,16	0,79
	<b>dino</b>	1,15	1,16	0,25	0,63	0,27	0,09
<b>Ottobre</b>	<b>micro</b>	1,74	1,69	0,99	1,36	1,32	0,93
	<b>nano</b>	1,82	1,49	0,85	1,53	0,96	0,59
	<b>&gt;20</b>	2,86	2,9	0,99	1,05	0,7	0,95
	<b>dino</b>	1,27	1,35	1,00	1,55	1,87	0,9
<b>Novembre</b>	<b>micro</b>	1,11	1,38	0,85	0,88	0,92	0,29
	<b>nano</b>	1,47	2,08	0,87	1,31	1,95	0,68
	<b>&gt;20</b>	0,97	1,42	0,79	0,81	0,89	0,16
	<b>dino</b>	0,93	0,68	0,47	0,67	0,39	0,16
<b>Febbraio*</b>	<b>micro</b>	1,71	0	0	1,26	0	0
	<b>nano</b>	2,49	0	0	1,48	0	0
	<b>&gt;20</b>	1,51	0	0	1,44	0	0
	<b>dino</b>	1,01	0	0	0,82	0	0
<b>Luglio</b>	<b>micro</b>	0,97	0,12	0,32	1,25	0,21	0,19
	<b>nano</b>	0,99	0	0	0,84	0	0
	<b>&gt;20</b>	0,93	0,42	0,61	1,42	0,32	0,17
	<b>dino</b>	0,96	0	0,13	1,06	0,19	0,13

Tab V. Valori di  $\mu$  e di  $g$  in termini di abbondanza e biomassa; \*valori misurati nel contenitore con la minore concentrazione di predatori.



Da questa analisi è stato escluso l'esperimento condotto a febbraio per il quale non è stato possibile determinare la pendenza della linea di regressione. Per questo esperimento sono riportati in tabella i valori delle crescite misurate nel contenitore con il minor numero di predatori.

I valori dei tassi di crescita dell'intero comparto cadono in un *range* compreso tra un minimo di 0.97 d<sup>-1</sup> ed un massimo di 2.33 d<sup>-1</sup> in abbondanza e tra 0.88 e 2.34 d<sup>-1</sup> in biomassa. Analizzando nello specifico i tassi di crescita per i nanociliati, i ciliati >20µm e i dinoflagellati sia in termini di abbondanza che di biomassa si osserva come, nei valori minimi, questi siano molto simili tra di loro. I valori minimi dei tassi di crescita misurati in abbondanza sono 0.99 d<sup>-1</sup>, 0.93 d<sup>-1</sup>, e 0.93 d<sup>-1</sup> per i tre gruppi rispettivamente mentre, in termini di biomassa sono 0.84, 0.81, 0.63 d<sup>-1</sup> leggermente inferiori a quelli ottenuti in abbondanza.

Un trend diverso è stato riscontrato rispetto ai tassi di crescita massimi. In questo caso, i tre gruppi del microzooplancton presentano valori che si discostano gli uni dagli altri. I tassi di crescita maggiori sono stati registrati per le cellule di dimensioni <20µm (nanociliati), sia in abbondanza ( $\mu=2.49$  d<sup>-1</sup>) che in biomassa ( $\mu=3.79$  d<sup>-1</sup>). I ciliati >20µm, crescono con tassi elevati ma inferiori rispetto a quelli misurati per i nanociliati. Il valore massimo in assoluto misurato in termini di abbondanza è di 2.86 d<sup>-1</sup>, riferito all'esperimento condotto nell'ottobre 2008. Rispetto alla biomassa il valore massimo fa riferimento all'esperimento di maggio 2008 ( $\mu=2.41$  d<sup>-1</sup>). I dinoflagellati presentano tassi di crescita più bassi rispetto a quelli misurati per entrambe i gruppi di ciliati. Il massimo tasso in termini di abbondanza è di 1.27 d<sup>-1</sup> mentre in biomassa si ha un valore di 1.55 d<sup>-1</sup>.

Dalla stessa correlazione si è ottenuto, come valore della pendenza della retta di regressione, il tasso di mortalità ( $m_p$ ) dovuto alla predazione dei protozoi

>20 $\mu$ m. In base al tasso di predazione ottenuto, i primi tre esperimenti si distinguono nettamente da quello condotto a luglio. Durante gli esperimenti di maggio, ottobre e novembre i tassi di mortalità dell'intero popolamento microzooplanctonico sono molto elevati con valori che sono compresi tra 1.38 e 1.88 d<sup>-1</sup>. Tali valori convertiti in percentuale di produzione predata seguendo la formula proposta da (Reckermann&Veldhuis 1997): %PP=(mp/ $\mu$ )\*100, ci dicono che la produzione microzooplanctonica predata, nel corso di questi tre esperimenti, è superiore al 100%. Analizzando separatamente i tre gruppi di protozoi si osserva come il gruppo maggiormente predato sia quello dei ciliati >20 $\mu$ m con percentuali di produzione predata che sono in media del 126%. I dinoflagellati risultano il gruppo che subisce la minore pressione predatoria con una media del 93%.

Nell'esperimento del luglio 2009 la situazione risulta completamente diversa. In questo caso la predazione esercitata sul comparto è minima (12%) e per i nanociliati e i dinoflagellati si ha addirittura una predazione nulla. Tali cellule crescendo con tassi molto simili nel contenitore con il minor numero di predatori e in quello con il campione naturale, presentano una pendenza della retta nulla (Figg. 17c e 19b).

### *6.2.6 Tassi di crescita di singole specie*

È stato possibile calcolare i tassi di crescita specifici di alcune specie di protozoi che presentavano abbondanze elevate in uno o più esperimenti. Le specie di cui siamo riusciti a calcolare i tassi di crescita sono sette: *Strobilidium*

sp.1 e *Strobilidium* sp.2, *Strombidium* sp.1, *Strombidium* sp.2, *Balanion*, *Strombidinopsis* sp 1 e *Myrionecta rubra*.

Il tasso di crescita di *Strobilidium* sp. 1 e sp. 2 è stato misurato in due esperimenti. La prima specie era presente nell'esperimento di novembre, la seconda in quello di febbraio. Le dimensioni misurate per le due specie sono simili, nel primo caso 20-25 $\mu$ m ESD, nel secondo le cellule misuravano tra i 15 e i 25 $\mu$ m ESD. Oltre questa lieve differenza nelle dimensioni ve ne erano alcune anche nella morfologia tali da non poter definire le due specie come una sola (Fig 22 a-b).

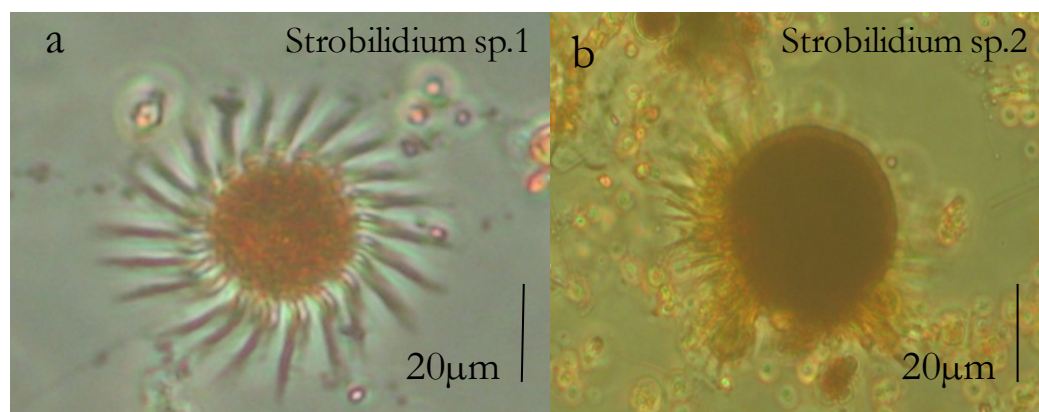


Fig.22 Fotografie al microscopio ottico di *Strobilidium* sp. 1 (a) e sp. 2 (b)

I due esperimenti in cui è stato possibile misurare i tassi di crescita delle due specie di *Strobilidium* sp. erano caratterizzati da condizioni chimico fisiche della colonna d'acqua molto diverse. Durante l'esperimento condotto nel novembre 2008 si è registrata la più alta concentrazione di clorofilla *a* (9.2 $\mu$ g chl*a* L<sup>-1</sup>) e la più alta abbondanza e biomassa del popolamento microzooplanctonico, mentre a febbraio 2009 i valori dei parametri sia fisici che biologici (T°, Chl*a*, abbondanza e

biomassa del microzooplancton) sono risultati tra i più bassi registrati durante i nostri esperimenti.

I tassi di crescita apparente misurati per le due specie sono risultati molto simili. Per *Strobilidium* sp.1 la crescita apparente misurata nel contenitore con la minore concentrazione di predatori, in cui la concentrazione a  $T_0$  era di 882 cell  $L^{-1}$  e a  $T_{24}$  di 5320 cell  $L^{-1}$ , è di 1.80  $d^{-1}$ . Dall'analisi di regressione lineare fra i tassi di crescita apparente misurata in ciascun boccone e la media della concentrazione dei predatori si è ottenuta la crescita ( $\mu$ ) della nostra specie in assenza di predazione. Il valore di  $\mu$  per *Strobilidium* sp.1 è di 2.57  $d^{-1}$  (Fig. 23). Il biovolume di *Strobilidium* sp.1 calcolato sui campioni a  $T_{24}$  è aumentato di un terzo rispetto a quello misurato nei campioni iniziali passando da 2790 a 4700  $\mu m^3$ .

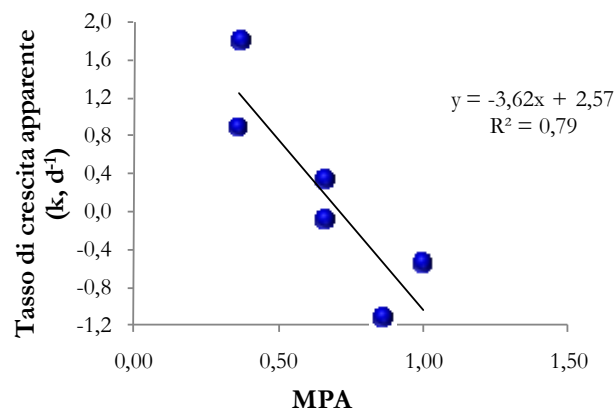


Fig 23 Correlazione tra le crescite apparenti di *Strobilidium* sp1 e la concentrazione dei predatori.

Per l'altra specie dello stesso genere, *Strobilidium* sp.2 si è potuto calcolare la crescita apparente ma non quella massima dal momento che l'esperimento in cui è stata identificata è quello di febbraio in cui non si è riusciti ad ottenere la retta di regressione. Ad ogni modo la crescita apparente di *Strobilidium* sp.2 misurata nel

contenitore con la minore concentrazione di predatori è di  $1.53 \text{ d}^{-1}$ . Si può ipotizzare che, se fossimo riusciti ad ottenere la retta di regressione i valori di crescita massima delle due specie sarebbero risultati molto simili.

Il tasso di crescita di *Strombidium* sp. 1 è stato ottenuto nell'esperimento di febbraio 2009 dove l'abbondanza era di  $375 \text{ cell L}^{-1}$  nel campione iniziale e di  $1300 \text{ cell L}^{-1}$  in quello finale. *Strombidium* sp. 1 a causa della sua particolare morfologia cilindrica (Fig. 24) è risultato facilmente distinguibile rispetto alle altre specie di ciliati. Le cellule di questa specie presentano un *range* dimensionale piuttosto ristretto; la lunghezza della cellula va dai  $20\mu\text{m}$  ai  $30\mu\text{m}$  mentre il diametro orale è compreso tra i  $15$  e i  $25\mu\text{m}$ .

Nonostante la bassa temperatura cui l'esperimento è stato condotto ( $15 \text{ C}^\circ$ ) i tassi di crescita dei protozoi non sembrano essere stati "depressi". Il massimo tasso di crescita apparente misurato per questa specie è stato di  $1.37 \text{ d}^{-1}$ . Tale tasso corrisponde ad un *generation time* di circa 14 ore il che consente a questi organismi di dividersi quasi due volte al giorno. Anche *Strombidium* sp.1 presenta un incremento del biovolume medio dopo le 24 ore di incubazione passando da  $6145 \mu\text{m}^3$  a  $7090 \mu\text{m}^3$ .

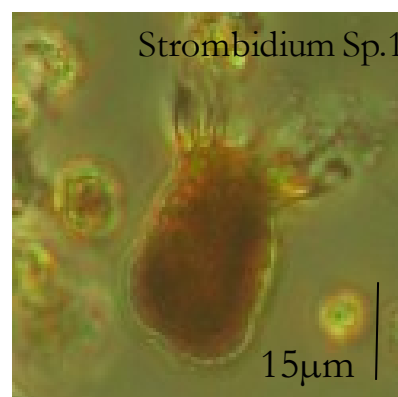


Fig. 24 Fotografia al microscopio ottico di *Strombidium* sp.1 "cilindrico"

Il tasso di crescita di un'altra specie di *Strombidium* è stato determinato nell'esperimento condotto a novembre. Le dimensioni cellulari caratterizzanti tale specie sono: lunghezza della cellula compresa tra i 15 e i 30 $\mu\text{m}$  e diametro orale compreso tra i 12 e i 20 $\mu\text{m}$ . Nonostante la temperatura della colonna d'acqua fosse piuttosto elevata (21.8 C°) il tasso di crescita di questa specie si è mantenuto basso con un  $\mu=0.84 \text{ d}^{-1}$  (Fig.25). Il *generation time* corrispondente a questo tasso di crescita è di circa 20 ore, sensibilmente più lungo rispetto a *Strombidium* sp.1.

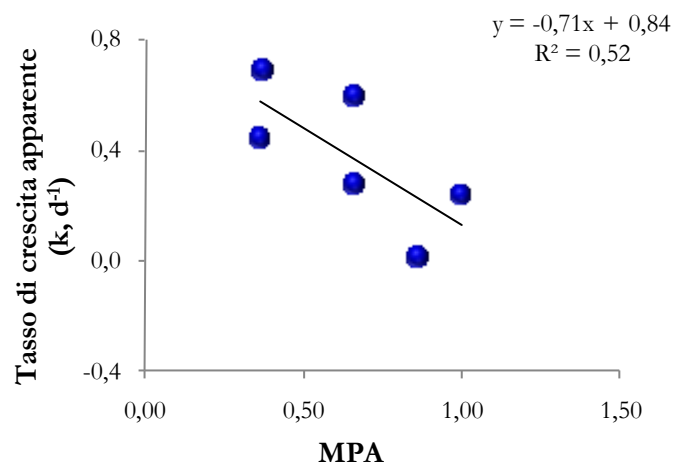


Fig.25 Tassi di crescita apparente di *Strombidium* sp. 2 in funzione dell'abbondanza dei predatori >20 $\mu\text{m}$ .

Gli esperimenti condotti a maggio, novembre e febbraio sono stati contraddistinti da una notevole abbondanza di *Balanion*. Tale specie, nel nostro sito di campionamento, è caratterizzata da dimensioni piuttosto ridotte, comprese tra gli 8 e i 12  $\mu\text{m}$  di diametro. I tassi di crescita apparente misurati durante il corso dei nostri esperimenti ci consentono di dire che tale specie si divide molto

rapidamente anche in condizioni di basse temperature. I tassi di crescita massima, calcolati per due dei nostri esperimenti, sono 1,73 e 2,34 d<sup>-1</sup> (Fig. 26 a-b) e il valore più elevato è stato misurato per l'esperimento di maggio durante il quale la temperatura era di 18°. La crescita apparente più elevata è stata misurata invece nell'esperimento di febbraio (T=15.3°C) all'interno del contenitore con la minore concentrazione di predatori; in questo caso il valore misurato è stato di 2,80 d<sup>-1</sup>.

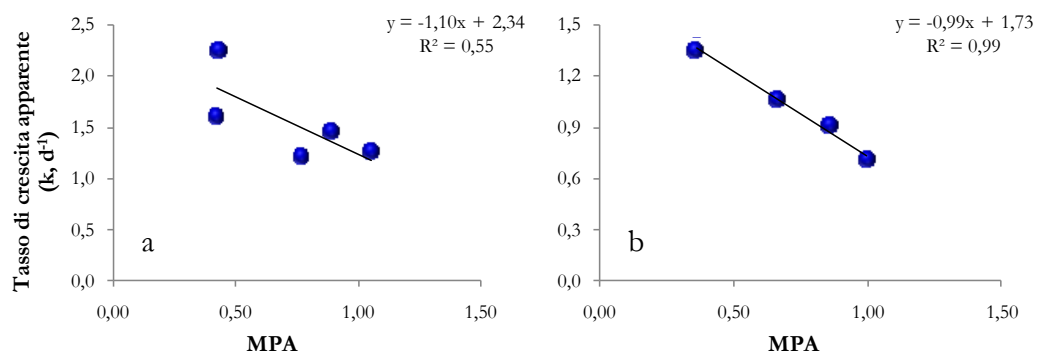


Fig. 26 Tassi di crescita apparente per *Balanion* nell'esperimento di maggio (a) e di novembre (b).

Dai campioni analizzati per l'esperimento di ottobre è stato possibile ricavare anche il tasso di crescita di *Strombidinopsis* sp. Tale ciliato è caratterizzato da dimensioni variabili soprattutto rispetto alla lunghezza della cellula. Le cellule di *Strombidinopsis* sp presenti nel nostro sito di campionamento presentano un diametro orale generalmente compreso tra i 30 e i 40µm la lunghezza della cellula può variare, invece, dai 40µm ai 130µm (Fig. 27 a). Nonostante le grandi dimensioni di *Strombidinopsis* sp. i tassi di crescita apparente misurati sono tali da consentire a tale specie di dividersi ogni 8 ore, infatti, il tasso di crescita ricavato dall'intercetta della retta di regressione dà un valore di 2.05 d<sup>-1</sup> (Fig. 27 b).

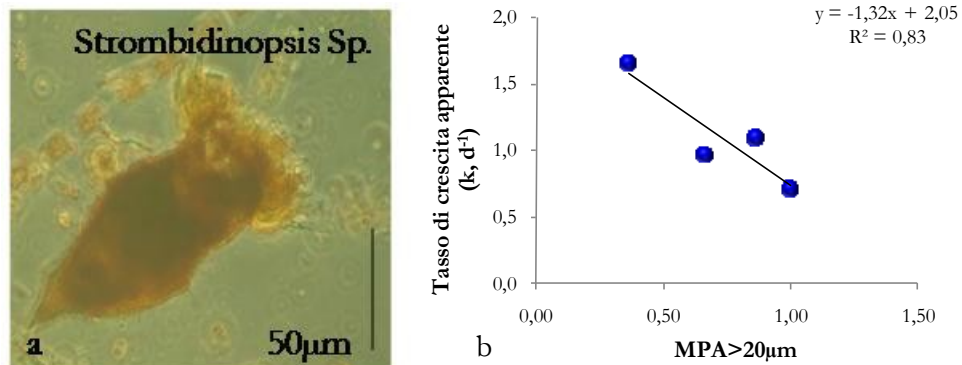


Fig.27 (a) Fotografia al microscopio ottico di strombidinopsis sp. (b) Tassi di crescita apparente di Stombidinopsis sp. in funzione della concentrazione dei predatori.

Un'ulteriore specie di cui è stato possibile determinare il tasso di crescita specifico è *Myrionecta rubra* (Fig. 28). La sua abbondanza in due dei nostri esperimenti ci ha consentito di determinarne il tasso di crescita. Rispecchiando la diversità delle condizioni ambientali degli esperimenti presi in considerazione i valori ottenuti sono risultati alquanto diversi. I tassi di crescita massimi di questa specie sono  $0,93 \text{ d}^{-1}$  e  $0,68 \text{ d}^{-1}$  che corrispondono rispettivamente a divisioni ogni 18 e 24 ore. Il tasso di crescita più elevato corrisponde al mese di maggio.

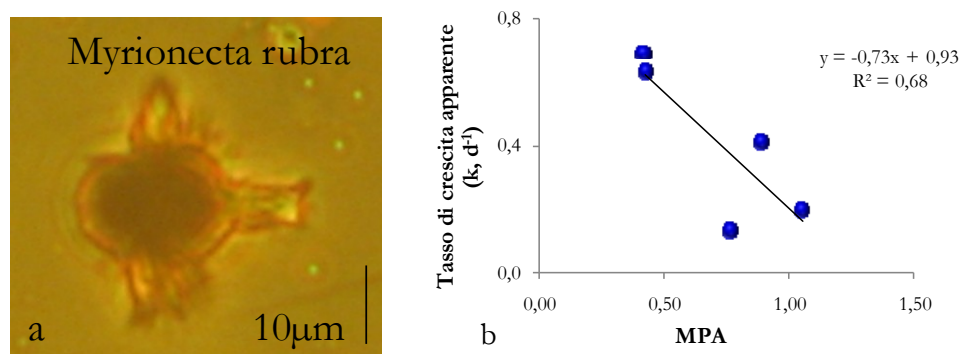


Fig. 28 Fotografia al microscopio ottico di *Myrionecta rubra* (a). Tassi di crescita apparente di *Myrionecta rubra*. in funzione della concentrazione dei predatori (b)Ciclo annuale del microzooplancton alla St. LTER-MC



## 6.3 Ciclo annuale del microzooplancton alla St.LTER-MC

### 6.3.1 *Abbondanza e biomassa*

Il popolamento microzooplanctonico caratterizzante la St. LTER-MC è stato analizzato con campioni raccolti ogni settimana. Sia la biomassa che l'abbondanza microzooplanctonica presentano una elevata variabilità coprendo un *range* di valori molto ampio (Fig. 29 a-b). L'abbondanza minima di 1392 cell L<sup>-1</sup> è stata registrata all'inizio di settembre 2008 periodo in cui la presenza prolungata del termocline ha determinato la riduzione, nello strato superficiale, di nutrienti e risorse. La concentrazione massima di numero di cellule per litro è stata registrata, invece, a giugno 2006 (78912 cell L<sup>-1</sup>) quando l'instaurarsi del termocline da modo a nutrienti e luce di entrare in fase riuscendo così a sostenere importanti *bloom* fitoplanctonici e di conseguenza alte concentrazioni del microzooplancton.

La stessa variabilità è stata riscontrata anche in termini di biomassa, i valori registrati rientrano in un *range* di 3 ordini di grandezza. La minima e la massima concentrazione di carbonio sono state registrate in corrispondenza del minimo e del massimo di abbondanza, con valori compresi tra 0,6 µg C L<sup>-1</sup> e 142 µg C L<sup>-1</sup> (Fig.29 b).

## Ciclo annuale del microzooplancton

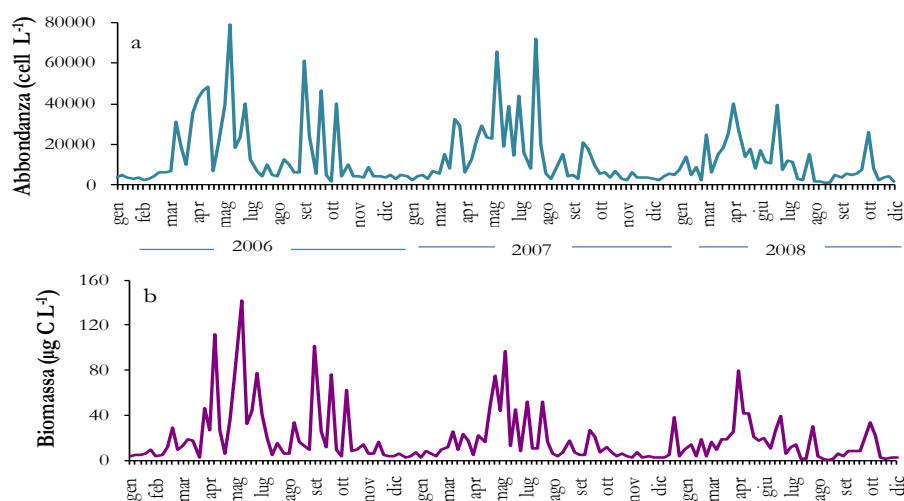


Fig.29 Andamento annuale del popolamento microzooplanctonico in abbondanza (a) e in biomassa (b).

Analizzando l'andamento annuale si evidenziano picchi ricorrenti di abbondanza e biomassa che si ripetono ciclicamente ogni anno. Nei tre anni di campionamento i periodi di massima abbondanza e biomassa sono stati registrati in primavera ed in autunno in corrispondenza dei due principali picchi di clorofilla che caratterizzano la stazione di campionamento (Fig. 30).

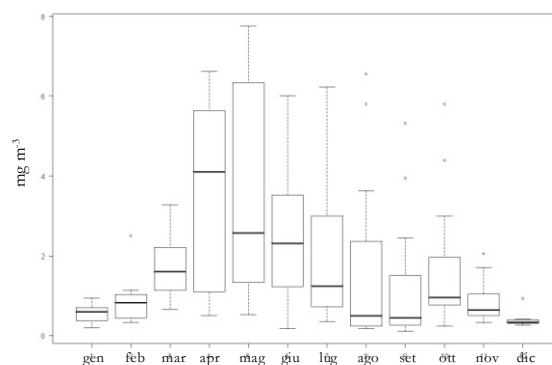


Fig. 30. Distribuzione della mediana mensile della concentrazione di clorofilla sulla St. LTER-MC per i tre anni di campionamento (2006-2008).

In Fig. 31 la distribuzione mensile della mediana per l'intero periodo di campionamento sia in abbondanza (a) che in biomassa (b) evidenzia come nei mesi di aprile maggio e giugno sia le mediane che i valori minimi misurati siano più elevati rispetto alle mediane calcolate per tutti gli altri mesi. Nel periodo primaverile si registrano  $27000 \pm 16500$  cell L<sup>-1</sup> e  $39.5 \pm 33$  µg C L<sup>-1</sup>, in media. Meno pronunciato è il picco che caratterizza il periodo autunnale. Ad ottobre nonostante la presenza di picchi in abbondanza e in biomassa decisamente superiori alla media stagionale la mediana mensile rimane nel *range* del periodo.

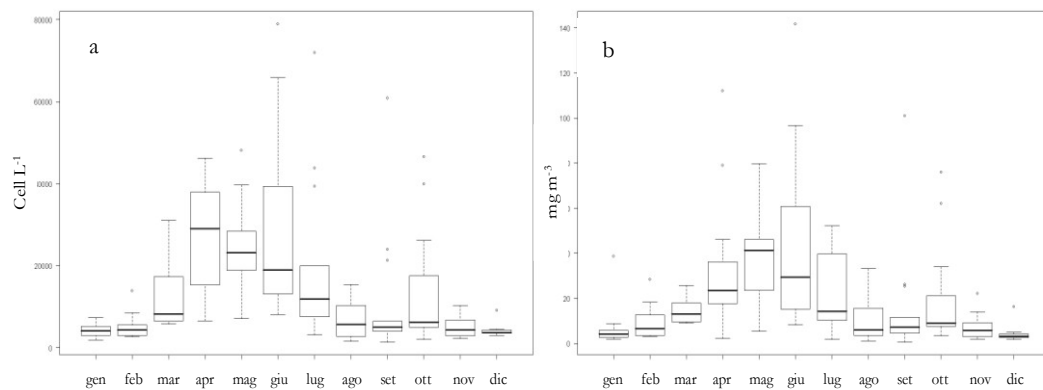


Fig. 31 Distribuzione della mediana mensile in (a) abbondanza e (b) biomassa del popolamento microzooplanctonico

### 6.3.2 Composizione del microzooplancton

Per una migliore caratterizzazione del comparto microzooplanctonico si è analizzato il contributo fornito allo stesso da ciascuno dei tre gruppi principali che lo costituiscono, ciliati, dinoflagellati e microcrostacei.

In termini di abbondanza si ha una netta dominanza della componente a ciliati che risulta la più abbondante durante tutto l'arco dell'anno tranne

## Ciclo annuale del microzooplancton

sporadiche eccezioni (Fig.32 a); i ciliati rappresentano in media più del 70% dell'abbondanza totale. La seconda componente del comparto è costituita dai dinoflagellati che, in media, rappresentano il 30% dell'intero popolamento. I piccoli metazoi, naupli, copepoditi e rotiferi, ricoprono, invece, un ruolo marginale. Essi solitamente rappresentano l'1% dell'abbondanza totale. Qualche eccezione la si può osservare durante i mesi di giugno-luglio quando i microcrostacei possono raggiungere abbondanze fino a 1000 individui o poco più per litro.

In termini di biomassa si ha una variabilità più marcata susseguono, l'uno dopo l'altro, picchi e forti decrementi nel contributo di ciascuna componente (Fig.32 b).

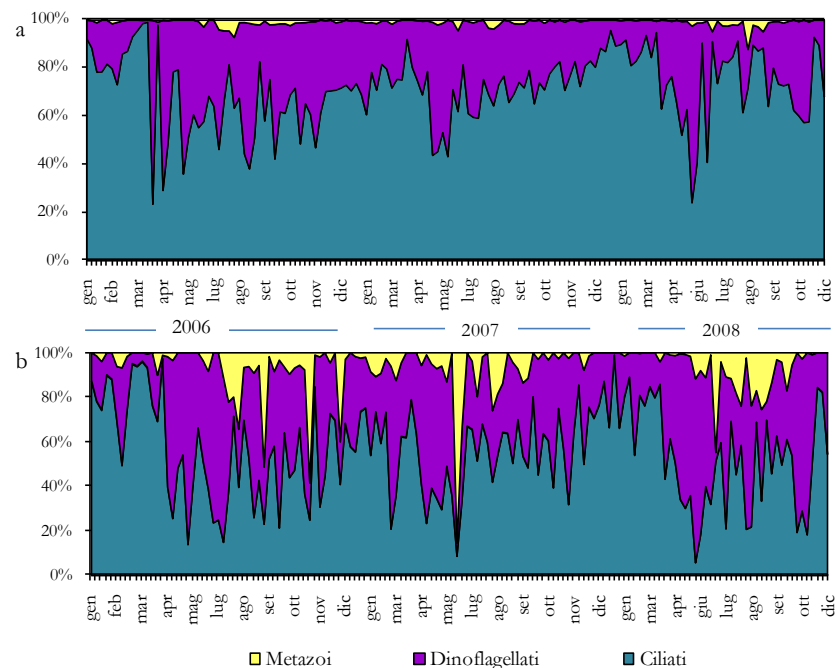


Fig.32 Contributo in percentuale dei singoli gruppi al comparto microzooplanctonico in abbondanza (a) e in biomassa (b)

In ogni caso, anche rispetto alla biomassa in termini di carbonio, la componente che pesa maggiormente all'interno del comparto è quella dei ciliati. Nel loro insieme essi forniscono circa il 50% della biomassa totale. In diverse occasioni tuttavia il contributo maggiore è fornito dai dinoflagellati. In Fig. 33 è riportata la composizione del popolamento microzooplanctonico in termini di biomassa a marzo 2008 (a), quando il maggiore contributo è fornito dai ciliati e a giugno 2008 (b) quando sono i dinoflagellati a dominare il comparto. Il contributo apportato dai metazoi alla biomassa del comparto è significativo in relazione alle grandi dimensioni degli organismi. Generalmente essi contribuiscono con un 10-15% alla biomassa totale.

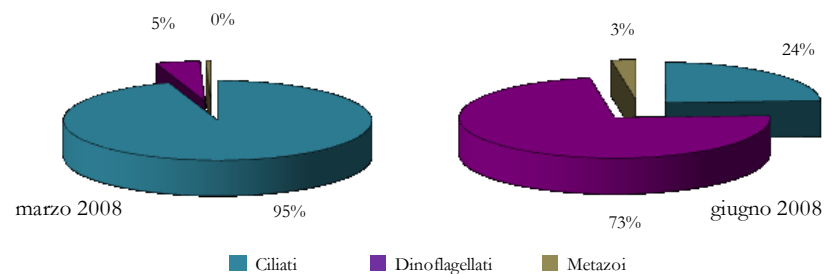


Fig.33. Composizione del microzooplancton in termini di biomassa in differenti periodi dell'anno nella St. LETR-MC

I ciliati, essendo la componente microzooplanctonica dominante della stazione di campionamento, sono stati analizzati più nello specifico. Il *range* registrato nei tre anni di campionamento va da un minimo di 1248 ad un massimo di 54323 cell L<sup>-1</sup> e da 0.3 a 94 µg C L<sup>-1</sup> rispettivamente in abbondanza e in biomassa. L'andamento annuale rispecchia quello presentato per l'intero

comparto. Anche per la singola componente a ciliati, infatti, possono essere distinti un picco primaverile ed uno autunnale.

I ciliati sono stati suddivisi in tre gruppi principali: nanociliati ( $<20\mu\text{m}$ ), ciliati nudi ( $>20\mu\text{m}$ ) e tintinnidi. Tra questi gruppi il maggiore contributo in termini di abbondanza è fornito da i nanociliati (Fig.34 a). Queste piccole cellule ( $<20\mu\text{m}$ ) rappresentano in media il 50% dell'abbondanza di tutti i ciliati anche se è presente, nei tre anni campionati, una forte variabilità. Infatti sia il minimo che il massimo sono stati registrati a luglio del 2008 quando i piccoli ciliati hanno rappresentato, in un campionamento, il 10% e in quello successivo il 92% dell'abbondanza totale dei ciliati. Tutti i ciliati di grandi dimensioni ( $>20\mu\text{m}$ ), escluso i tintinnidi, costituiscono in media il 40% della componente mentre i tintinnidi ne rappresentano il 10%. Anche nel caso di questi ultimi sono presenti picchi stagionali primaverili ed autunnali durante i quali possono rappresentare fino al 52% del popolamento totale.

## Ciclo annuale del microzooplancton

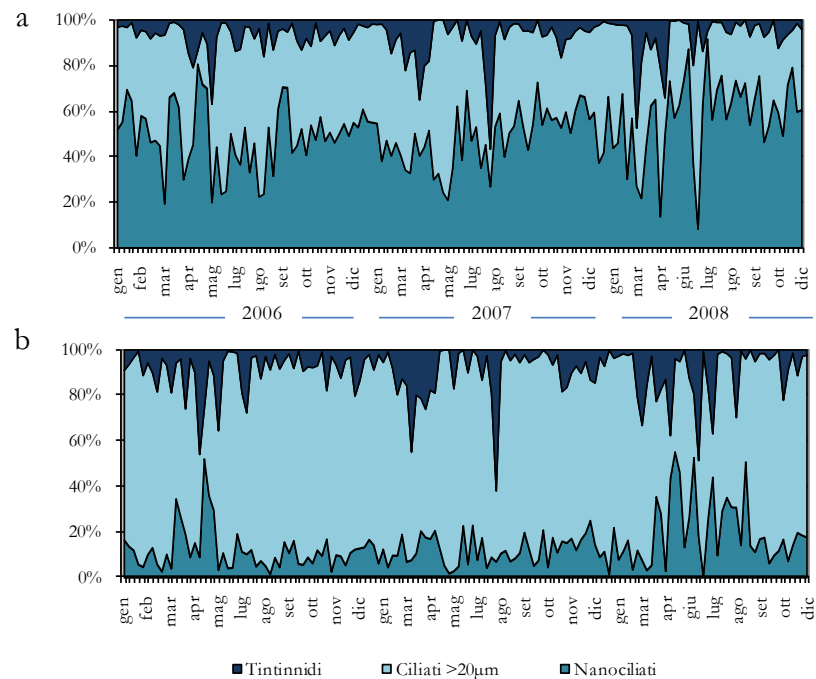


Fig. 34. Andamento temporale in abbondanza (a) e in biomassa (b) dei ciliati

Se si analizza il comparto in termini di biomassa, la situazione si capovolge e a dominare il comparto diventano, ovviamente, le cellule di maggiori dimensioni (Fig.34 b) che, considerate nel loro insieme (Ciliati  $>20\mu\text{m}$  e tintinnidi) raggiungono circa l'86%. È stata effettuata un'ulteriore scomposizione dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  in: Strombididae e Strobilididae  $>20\mu\text{m}$  (SS), mixotrofi, tintinnidi e prostomatidi in ordine di abbondanze decrescenti. Tale analisi ha consentito di stabilire che il contributo maggiore alla biomassa del comparto è fornito dai ciliati nudi, Strombididae e Strobilididae (Fig.35) i quali possono arrivare a rappresentare l'80% delle cellule  $>20\mu\text{m}$ .

## Ciclo annuale del microzooplancton

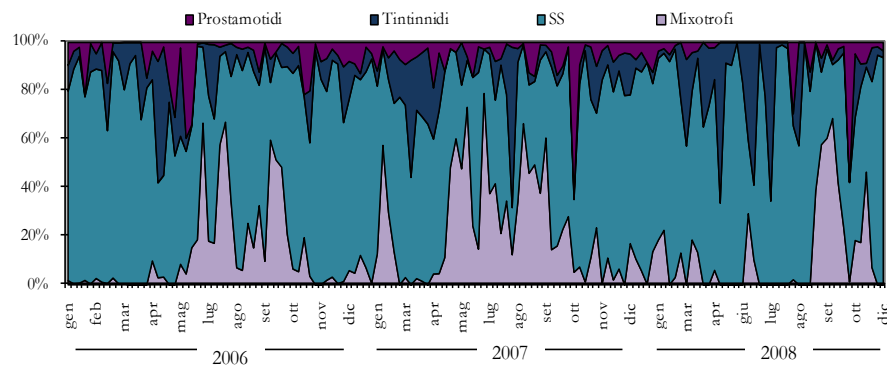


Fig.35 Andamento in biomassa per i diversi gruppi di ciliati >20µm

### 6.3.3 Distribuzione verticale del microzooplancton

Nel corso di quattro crociere condotte in febbraio, maggio, luglio e dicembre 2007, il popolamento microzooplanctonico è stato analizzato sulla St. LETR-MC lungo tutta la colonna d'acqua (0-60m). La distribuzione e la composizione del comparto variano sia a seconda delle stagioni che verticalmente subendo una forte influenza dallo stato di rimescolamento della colonna d'acqua. A maggio e luglio, con la presenza del termoclino, sia l'abbondanza che la biomassa microzooplanctonica presentano valori molto elevati in superficie (72000 cell L<sup>-1</sup> e 52 µg C L<sup>-1</sup> a luglio e 14000 cell L<sup>-1</sup> e 42 µg C L<sup>-1</sup> a maggio) ma già a -5m è possibile assistere ad una forte diminuzione come nel caso di luglio sia nel numero di cellule, che arriva a 17000 cell L<sup>-1</sup> che in biomassa, che crolla a 7 µg C L<sup>-1</sup>. I valori, da -10m in poi, diminuiscono gradualmente fino a -60m (Fig. 36 a) dove si hanno circa 800 cell L<sup>-1</sup> e 0.47 µg C L<sup>-1</sup> a luglio e 700 cell L<sup>-1</sup> e 0.52 µg C



L<sup>-1</sup> a maggio. Nel periodo di rimescolamento, febbraio e dicembre, la distribuzione delle cellule risulta essere più omogenea lungo la colonna d'acqua (Fig.36 b). anche in questo periodo si ha un dimezzamento dei valori, sia di abbondanza che di biomassa, tra 0 e -5m. Da -10m a -60m, invece, il popolamento può essere considerato stabile con valori che si mantengono intorno alle 3000 cell L<sup>-1</sup> e ai 2 µg C L<sup>-1</sup>.

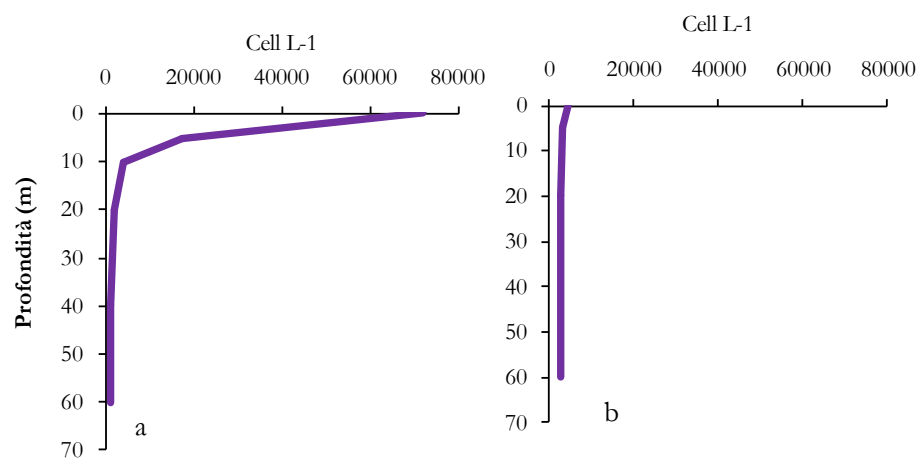


Fig.36 Concentrazione di microzooplancton lungo la colonna d'acqua a luglio (a) e a febbraio (b) 2007.

Oltre all'abbondanza totale anche il contributo che ciascun gruppo di protozoi fornisce al comparto varia lungo la colonna d'acqua.

Nei mesi primaverili ed estivi si hanno forti differenze nella composizione del popolamento di superficie e di profondità. A 0m il contributo in termini di abbondanza fornito da nanociliati, ciliati >20µm, tintinnidi e dinoflagellati è di  $36 \pm 2.95\%$ ,  $17 \pm 4.46\%$ ,  $11 \pm 14.7\%$  e  $36 \pm 16.6\%$  rispettivamente (Fig.37 a). Il popolamento di profondità, invece, è caratterizzato da una composizione completamente diversa (Fig. 37 b). Il contributo delle cellule >20µm va a

diminuire in modo sostanziale e a 60m di profondità ciliati nudi  $>20\mu\text{m}$ , tintinnidi e dinoflagellati contribuiscono con il  $21\pm 7\%$ , il  $4\pm 1.4\%$  e il  $19\pm 14.1\%$  rispettivamente mentre i piccoli ciliati ( $<20\mu\text{m}$ ) diventano il gruppo dominante passando dal  $37\pm 3.54\%$ , della superficie al  $56\pm 22\%$  in profondità.

A febbraio e a dicembre il rimescolamento della colonna d'acqua fa sì che anche la composizione del popolamento microzooplanctonico risulti più omogenea. In Fig.37 (c-d) si vede come non vi siano sostanziali differenze tra l'apporto fornito dai singoli gruppi a 0m e a -60m. In entrambe i casi il gruppo più importante è quello dei nanociliati che contribuiscono con il  $45\pm 2.12\%$  e il  $41\pm 4.24\%$  rispettivamente in superficie e in profondità. Il contributo all'abbondanza totale dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  e dei dinoflagellati si eguaglia in entrambe i popolamenti, i primi rappresentano il  $24.5\pm 0.70\%$  e il  $26\pm 4.95\%$  e i secondi il  $25\pm 2.83$  e il  $29\pm 9.19$  rispettivamente a 0m e a 60m.

I tintinnidi contribuiscono in minima parte all'abbondanza del popolamento invernale a tutte le profondità ( $5\pm 1.41\%$  e  $3\pm 0.0\%$ ). In termini di biomassa, in entrambe i periodi dell'anno, il contributo maggiore è fornito sia in superficie che in profondità dalle cellule  $>20\mu\text{m}$ , siano esse ciliati o dinoflagellati. Esse rappresentano, generalmente, più del 50% della biomassa totale.

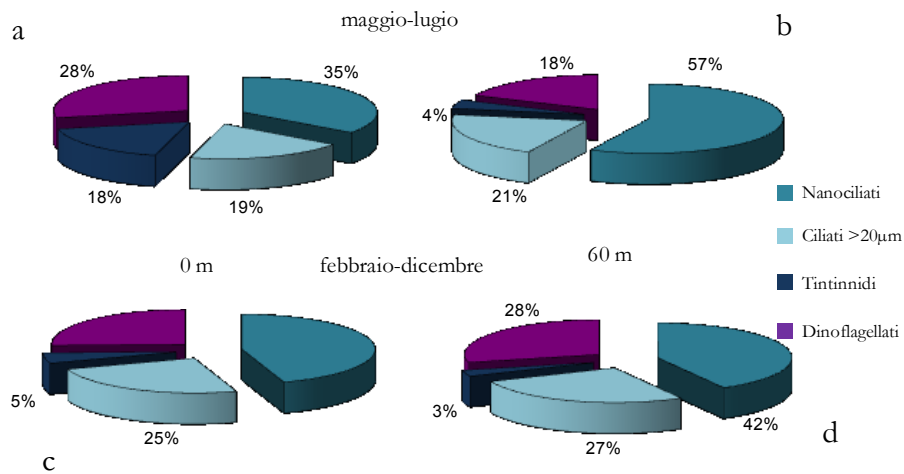


Fig. 37 contributo in abbondanza al comparto microzooplanctonico dei quattro gruppi principali a diverse profondità come medie dei mesi maggio-luglio (a-b) e dicembre-febbraio (c-d).

## 6.4 Produzione microzooplanctonica superficiale

La produzione microzooplanctonica potenziale, definita come la produzione calcolata in assenza di predazione, è stata stimata per la St. LTER-MC a partire dai dati ottenuti sperimentalmente (tassi di crescita in assenza di predazione) e dalle misure di biomassa effettuate ogni settimana. La produzione potenziale dei tre gruppi microzooplanctonici (nanociliati, ciliati >20µm, dinoflagellati) è stata calcolata secondo la formula:

$$C_{T0} \cdot \exp(\mu)$$

in cui  $C_{T0}$  è la concentrazione della biomassa di ciascun gruppo microzooplanctonico misurata nel campione e  $\mu$  è la media dei tassi di crescita potenziale, ottenuto dagli esperimenti, per i nanociliati, i ciliati  $>20\mu\text{m}$  e i dinoflagellati.

Applicando tale equazione ai campionamenti effettuati sulla stazione LTER-MC a 0m si è determinato l'andamento temporale della produzione potenziale microzooplanctonica (Fig.38) per gli anni 2006-2008. Nei tre anni di campionamento è possibile individuare dei massimi di produzione ricorrenti in primavera ed in autunno. L'entità di tali massimi diminuisce progressivamente dal 2006 al 2008.

La massima produzione calcolata è stata osservata per il 2006 a giugno (532.43  $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ), a maggio per il 2007 (307.72  $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) e ad aprile nel 2008 con 269.89  $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Nei mesi autunnali i valori di produzione sono nettamente inferiori ai quelli primaverili (356.25  $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  nel 2006 e 106.68  $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  nel 2008)(Fig.38).

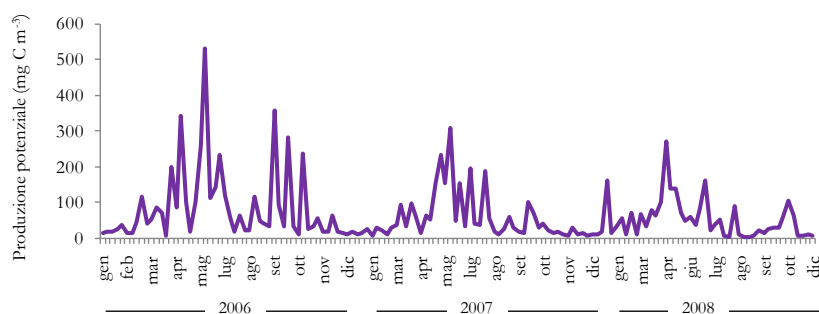


Fig. 38 Produzione microzooplanctonica superficiale alla St. LTER-MC nel 2006-2008

È stata effettuata anche la stima della produzione media stagionale. Secondo i nostri calcoli, la massima produzione potenziale microzooplanctonica si raggiunge durante la stagione primaverile (aprile, maggio e giugno) con una media di  $133,35 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . La produzione del microzooplancton si dimezza in estate per poi ridursi ulteriormente in autunno ed in inverno, quando si registrano i valori di produzione minimi ( $38,13 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ). È interessante notare come le differenze nella produzione estiva, autunnale ed invernale non siano affatto marcate (Fig.39).

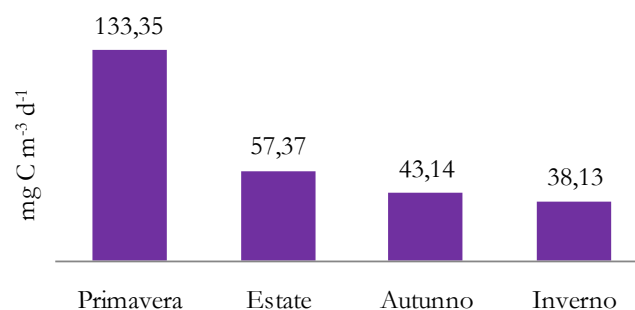


Fig. 39 Produzione microzooplanctonica potenziale stagionale alla St. LTER-MC

Il metodo della Forward Stepwise Regression ha consentito di determinare se la concentrazione di clorofilla, la temperatura cui gli esperimenti sono stati condotti e l'abbondanza dei predatori abbiano o meno un'influenza significativa sulla pressione predatoria esercitata dai protozoi su gli altri protozoi. Tutti e tre i parametri, essendo risultati significativi, sono stati considerati come variabili indipendenti nella regressione multipla lineare condotta per ricavare i modelli predittivi (eq. 1-2-3) del tasso di mortalità del microzooplancton ( $m_p$ ). I modelli ottenuti hanno mostrato un buon adattamento ai dati con un  $R^2$  di 0.65, 0.58 e 0.47 rispettivamente per i nanociliati, i ciliati  $>20\mu\text{m}$  e i dinoflagellati. La concentrazione di clorofilla e la temperatura sono risultati negativamente correlati

al tasso mortalità mentre l'abbondanza dei predatori è risultata positivamente correlata. I *p value* risultano bassissimi in tutti i casi essendo compresi tra  $p < 0.001$  e 0.006; possiamo quindi scartare l'ipotesi che i coefficienti siano 0 (Tab. VI).

Gruppo	Parametro	Coefficienti	P	R <sup>2</sup>
nanociliati	Chl $a$	-0.300	<0.001	0.65
	T°	-0.197	<0.001	
	Ab T <sub>0</sub> *10 <sup>4</sup>	0,847	<0.001	
ciliati >20 $\mu$ m	Chl $a$	-0.396	<0.001	0.57
	T°	-0.134	0.001	
	Ab T <sub>0</sub> *10 <sup>4</sup>	0.701	0.006	
Dinoflagellati	Chl $a$	-0.129	0.003	0.47
	T°	-0.0552	0.002	
	Ab T <sub>0</sub> *10 <sup>4</sup>	0.330	0.003	

Tab. VI risultati della regressione multipla lineare effettuata per i tre gruppi microzooplanctonici.

L'applicazione dei modelli (eq. 11-12-13) ai campionamenti effettuati sulla St. LTER-MC ha consentito di stimare il tasso di mortalità dell'intero comparto microzooplanctonico e di conseguenza l'entità della produzione microzooplanctonica totale predata da altri protozoi. La differenza tra la produzione potenziale e la produzione predata fornisce l'ammontare della produzione microzooplanctonica disponibile per i livelli trofici superiori.

In primavera i protozoi consumano 107.76 mg C m<sup>-3</sup> dell'intera produzione microzooplanctonica. Nelle altre stagioni l'ammontare di produzione predata è stabile. Infatti il carbonio consumato in estate, autunno ed inverno è compreso tra 30.43 e 37.02 mg C m<sup>-3</sup> (Fig. 40).

Per le diverse stagioni è stata calcolata la percentuale di produzione microzooplanctonica predata dai protozoi. In inverno e in primavera la maggior parte della produzione microzooplanctonica prodotta viene consumata all'interno del comparto stesso (97 e 80% rispettivamente). Durante questi mesi, dunque, la maggior parte della produzione dei protozoi è riciclata all'interno del microzooplancton e solo una minima parte, il 3% in inverno e il 20% in primavera, è disponibile per i livelli trofici superiori. Ad ogni modo, in primavera, quando la produzione microzooplanctonica è molto elevata il mesozooplancton ha a disposizione circa  $26 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , mentre in inverno, quando i livelli di produzione sono molto più bassi, la quantità disponibile per i livelli trofici superiori risulta irrisoria (in media  $1.11 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ). In estate ed in autunno, pur consumando più della metà della produzione potenziale, l'ammontare di carbonio a disposizione del mesozooplancton è, rispettivamente, 27 e  $11 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Fig. 40).

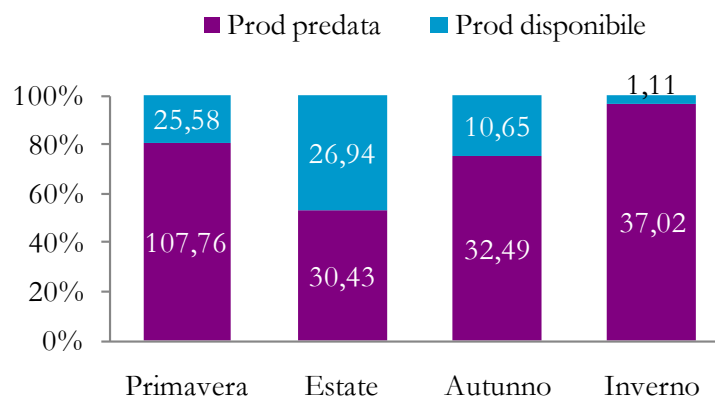


Fig. 40 Medie stagionali della produzione predata dai protozoi e disponibile per il mesozooplancton. I valori riportati sono quelli reali.

### 6.4.1 Contributo dei tre gruppi

#### *microzooplanctonici alla produzione superficiale*

Il contributo delle singole componenti alla produzione microzooplanctonica totale è stato calcolato secondo l'equazione 7. La maggior parte della produzione microzooplanctonica è dovuta ai ciliati  $>20\mu\text{m}$  (Fig. 41) che rappresentano, mediamente, il 56% della produzione potenziale. I dinoflagellati, apportano un contributo minore (30%) ma, soprattutto nei mesi primaverili-estivi, possono fornire la metà dell'intera produzione del comparto. I nanociliati, a causa delle loro piccole dimensioni cellulari, contribuiscono mediamente per il 13%, anche se in primavera, quando raggiungono abbondanze molto elevate, la loro produzione può rappresentare il 40% del totale (Fig.41).

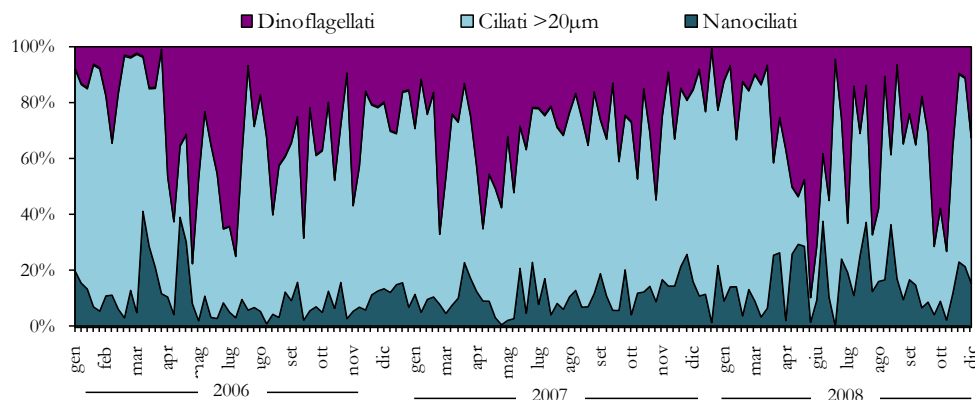


Fig 41 Contributo dei tre gruppi del microzooplancton alla produzione potenziale annuale nello strato superficiale..

Come visto per l'andamento annuale, anche in quello stagionale, secondo il nostro modello, il contributo maggiore alla produzione microzooplanctonica è fornito dai ciliati  $>20\mu\text{m}$  seguiti dai dinoflagellati ed in ultimo dai nanociliati (Fig.



42). La produzione potenziale per i tre gruppi microzooplanctonici rimane, generalmente, stabile in estate, autunno e inverno, mentre in primavera tutti e tre i gruppi raddoppiano il loro contributo. I ciliati  $>20\mu\text{m}$ , che producono durante tutto l'anno mediamente  $37.72 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , in primavera arrivano a produrre  $62 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . I nanociliati raggiungono una produzione di  $14 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  in primavera rispetto ad una media annuale di  $6.78 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e ugualmente i dinoflagellati passano da una media di  $23.50 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a  $57.23 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  prodotti in primavera.

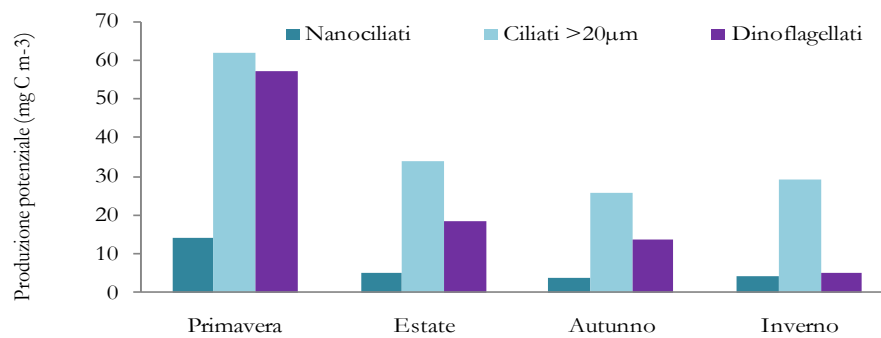


Fig. 42 Produzione potenziale stagionale per i tre gruppi microzooplanctonici nello strato superficiale.

Applicando i modelli (eq. 11-12-13) ottenuti con la regressione lineare ai singoli comparti microzooplanctonici è stato possibile determinare la pressione predatoria esercitata dai protozoi sui tre gruppi del microzooplancton, per la stazione di campionamento nei tre anni della ricerca. Il gruppo microzooplanctonico maggiormente predato dai protisti è quello dei ciliati sia maggiori che minori di  $20\mu\text{m}$  ESD (Fig.43). In primavera, autunno ed inverno mediamente il 92% della produzione dei ciliati è riciclata all'interno del comparto

microzooplanctonico. La maggiore percentuale di consumo si registra in inverno (100%). Una predazione minore si osserva, invece, in estate quando il 56% della produzione dei nanociliati e il 63% di quella dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  è consumata da altri protisti.

I dinoflagellati sembrano subire una predazione piuttosto stabile in primavera ed in inverno, infatti, il 74% della loro produzione è consumata da altri protisti. In autunno e in estate la pressione predatoria sui dinoflagellati si allenta scendendo al 51% e al 34% rispettivamente. (Fig. 43 a-b-c-d).

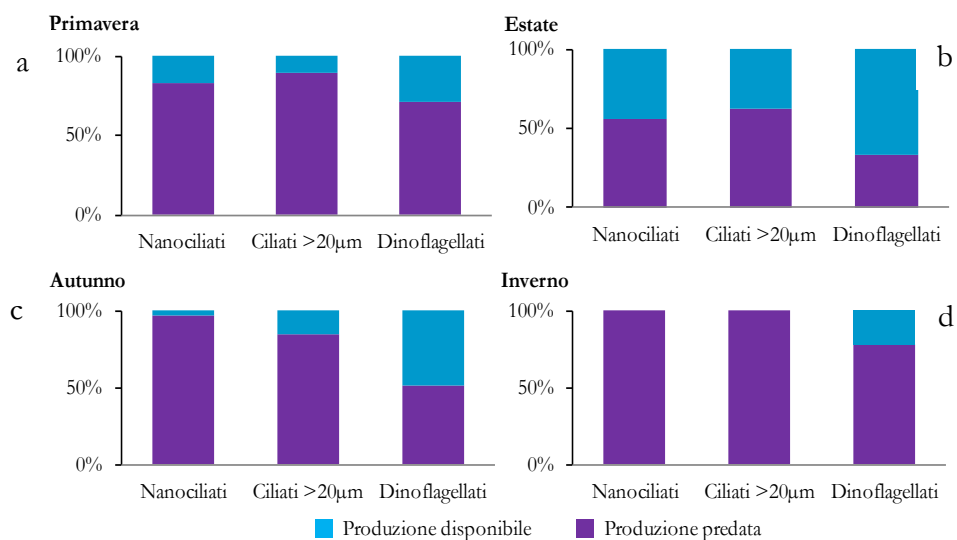


Fig. 43 Percentuali della produzione microzooplanctonica predata e di quella disponibile per i livelli trofici superiori nelle quattro stagioni in superficie.

## 6.5 Produzione microzooplanctonica lungo la colonna d'acqua

I campioni raccolti su più quote nel corso di quattro campagne stagionali condotte alla St. LTER-MC hanno consentito di calcolare la produzione potenziale microzooplanctonica su tutta la colonna d'acqua. Tali analisi forniscono delle indicazioni relative ai giorni di campionamento e non possono essere considerate come rappresentative delle differenti stagioni. Tuttavia, i quattro profili di produzione, evidenziano il forte legame esistente tra la produzione microzooplanctonica e i fattori fisici.

In primavera ed in estate, in concomitanza con stratificazione termica, la produzione potenziale da noi calcolata è risultata molto elevata nei primi metri di profondità, fino a -10m ( $68 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  maggio e  $30 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a luglio). Scendendo lungo la colonna d'acqua la produzione diminuisce drasticamente in relazione alla ridotta abbondanza del popolamento microzooplanctonico ( $\sim 300 \text{ cell L}^{-1}$ ) fino ad arrivare, alla profondità di -60m, ad una produzione di  $1.34 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a maggio e di  $1.96 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a luglio (Fig. 44 a-b). Anche nei mesi di dicembre e febbraio la produzione risulta maggiore in superficie che in profondità ma, in questi periodi dell'anno, i gradienti lungo la colonna risultano meno marcati a causa del rimescolamento che consente una maggiore omogeneità del popolamento microzooplanctonico. A dicembre la produzione è di  $7.36 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  in superficie mentre è di  $3 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a -60m. Lo stesso andamento si ha a febbraio, quando da  $12 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  prodotti in superficie si passa a  $5 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  prodotti in profondità (Fig.44 c-d).

## Ciclo annuale del microzooplancton

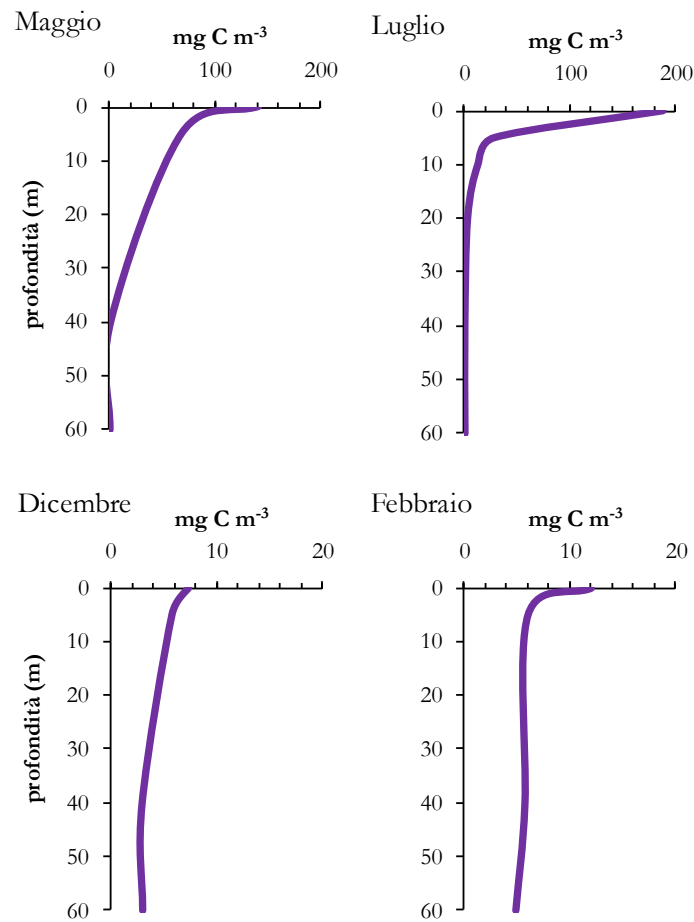


Fig. 44. Produzione potenziale del microzooplancton lungo la colonna d'acqua alla St. LTER-MC in diversi periodi dell'anno.

In figura 45 è possibile confrontare la produzione integrata calcolata in corrispondenza dei quattro campionamenti. La produzione più elevata si osserva a maggio 2007 ( $1792.78 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). A luglio la produzione microzooplanctonica si dimezza ( $850 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) per poi diminuire ulteriormente a dicembre e a febbraio ( $242.30$  e  $359.03 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  rispettivamente).

## Ciclo annuale del microzooplancton

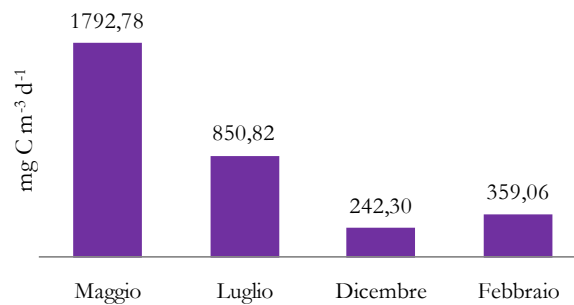


Fig. 45 Produzione potenziale giornaliera del microzooplancton integrata sulla colonna d'acqua nelle quattro crociere alla St. LTER-MC

In corrispondenza dei quattro campionamenti è stata calcolata la percentuale di produzione predata dai protozoi e quella disponibile per i livelli trofici superiori, integrata nello strato 0-60m. La percentuale di produzione microzooplanctonica disponibile per i livelli trofici superiori è ben poca (Fig. 46). A dicembre e a febbraio la quasi totalità della produzione dei protisti è riciclata all'interno del comparto, 93% e 92% rispettivamente, lasciando a disposizione del mesozooplancton solo il 7% e l'8%. I valori calcolati per questi due campionamenti risultano simili a quelli calcolati in superficie nelle corrispondenti stagioni. Tale corrispondenza potrebbe essere legata alla simile composizione del popolamento microzooplanctonico in superficie e in profondità (Fig. 37). A luglio il 52% della produzione del microzooplancton è disponibile per il mesozooplancton. A maggio la predazione subita dal popolamento microzooplanctonico da parte dei protozoi è molto bassa, contrariamente a quanto accade in primavera in superficie (Fig. 40) dove l'80% della produzione microzooplanctonica viene consumata all'interno del comparto. Tale differenza potrebbe essere dovuta alla elevatissima concentrazione di clorofilla ( $6.95 \mu\text{g L}^{-1}$ )

misurata a maggio che ha potuto determinare un consumo basso (5%) di produzione microzooplanctonica da parte degli altri protisti (Fig. 46).

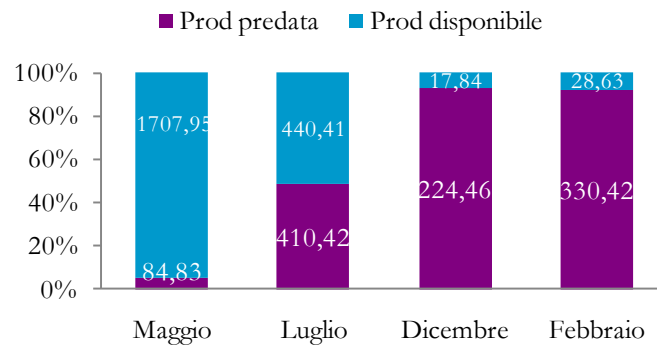


Fig. 46 Produzione microzooplanctonica potenziale predata dai protozoi e quella disponibile per il mesozooplancton lungo la colonna d'acqua.

### 6.5.1 *Contributo dei tre gruppi microzooplanctonici alla produzione sulla colonna d'acqua*

Il contributo dei singoli gruppi microzooplanctonici alla produzione integrata della stazione di campionamento si differenzia nei quattro campionamenti stagionali. A maggio 2008 la maggior parte della produzione è dovuta ai dinoflagellati che da soli contribuiscono con  $926.3 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . A luglio e dicembre 2007 e a febbraio 2008 il gruppo che produce di più è quello dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  che forniscono circa il 50% della produzione totale. La produzione dei nanociliati, a causa delle piccole dimensioni di tali organismi, rappresenta durante

tutte le campagne una frazione esigua della produzione totale (20%) ad eccezione di maggio (30%) (Fig. 47).

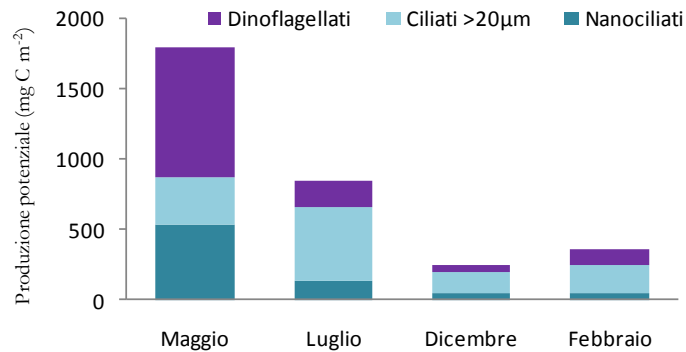


Fig.47 Contributo dei singoli gruppi del microzooplancton alla produzione potenziale nelle quattro crociere lungo la colonna d'acqua.

Applicando i modelli ottenuti dalla regressione multipla alla varie profondità e ai i singoli gruppi microzooplanctonici, e integrando nello strato 0-60m, è stata ricavata la produzione di ciascun gruppo microzooplanctonico predata dai protozoi >20µm. A febbraio e a dicembre i protozoi consumano quasi completamente (95-100%) la produzione dei ciliati mentre quella dei dinoflagellati subisce una pressione predatoria inferiore (Tab. VII). A maggio, data la bassissima predazione totale calcolata nel giorno di campionamento, la produzione dei ciliati >20µm e dei dinoflagellati consumata è nulla e quella dei nanociliati è molto bassa (13%). L'unico caso in cui i dinoflagellati subiscono una pressione predatoria maggiore è a luglio (75%).

	Produzione predata		
	Nanociliati	Ciliati >20 $\mu$ m	Dino
Maggio	13%	0%	1%
Luglio	32%	47%	63%
Dicembre	95%	100%	63%
Febbraio	100%	100%	75%

Tab. VII Percentuali di produzione predata da protozoi >20 $\mu$ m per i tre gruppi microzooplanctonici su tutta la colonna d'acqua.



## 7. DISCUSSIONE

Gli esperimenti condotti hanno consentito di determinare l'ammontare della produzione microzooplanctonica, dimostrando il peso che questa può assumere nel sistema pelagico, e inoltre che la maggior parte di tale produzione è consumata all'interno del comparto dei protozoi pelagici. Tali risultati indicano che una parte molto consistente del carbonio organico veicolato attraverso il microzooplancton è consumato nella respirazione influenzando la capacità del sistema pelagico di sottrarre anidride carbonica dall'atmosfera. A sostegno dei nostri risultati è stata osservata una diminuzione, dagli anni Sessanta ad oggi, dell'efficienza degli oceani ad assorbire anidride carbonica (Sarmiento *et al.* 2009; Doney *et al.* 2009a). Risulta evidente che nello scenario dei cambiamenti climatici in atto il ruolo del microzooplancton potrebbe divenire sempre più importante. L'aumento della temperatura dello strato superficiale degli oceani conduce, inevitabilmente, ad una stratificazione prolungata dello strato superficiale dell'oceano riducendo il vantaggio competitivo delle diatomee (Bopp *et al.* 2005). La previsione che il surriscaldamento climatico produrrà uno spostamento nella comunità fitoplanctonica verso cellule più piccole e non silicee è stata suggerita da Falkowski e Oliver (2007) e osservata sia alla St. LTER-MC (Ribera d'Alcalà *et al.*, 2004) che in altri siti di campionamento (Daufresne *et al.* 2009).

Se l'oceano tende ad una maggiore oligotrofia (Falkowski&Wilson 1992; Behrenfeld *et al.* 2006), allora il circuito microbico assume una posizione

dominante nel veicolare i flussi di energia e materia. Un importante funzione ecologica dei grandi protisti è quella di “impacchettare” il carbonio microbico in particelle di dimensioni facilmente sfruttabili dal mesozooplancton.

I protozoi sono riconosciuti quali maggiori predatori di batteri e fitoplancton (Paffenhofer *et al.* 2007). A livello globale il microzooplancton consuma il 67% della produzione primaria giornaliera (Calbet&Landry 2004), ma allo stesso tempo l'abbondanza dei protisti rimane in uno stato di semi-stabilità (Boyd *et al.* 1995; Caron *et al.* 1995; Sherr *et al.* 2003). L'abbondanza e i tempi di riproduzione che caratterizzano il mesozooplancton non consentono un controllo del microzooplancton tale da mantenere questo stato di equilibrio. Sulla St. LTER-MC, ad esempio, l'abbondanza dei copepodi raggiunge, in media, un massimo di 2.4 ind. L<sup>-1</sup> (Mazzocchi&Ribera d'Alcalà 1995), numeri che non consentono il controllo di un popolamento di migliaia di cellule di protisti. L'equilibrio del popolamento microzooplanctonico è testimoniato anche dai risultati di molti esperimenti di grazing condotti in tutto il mondo in cui, generalmente, non si osserva nessun marcato incremento del popolamento dei protozoi né in abbondanza né in biomassa. Analizzando, tra le centinaia di esperimenti di grazing riportati in letteratura, quelli in cui è menzionato (o ricavabile) il tasso di crescita del popolamento microzooplanctonico nel campione naturale, è possibile vedere come l'abbondanza dei protisti dopo le 24 ore di incubazione rimanga sostanzialmente stabile o presenti piccole variazioni in positivo o negativo. In tabella (VIII), in cui sono riportati i tassi di crescita apparente misurati per l'intero popolamento microzooplanctonico nel campione naturale ottenuti con questa ricerca e tratti dalla letteratura, è possibile vedere come, anche confrontando tassi di crescita misurati in ambienti completamente differenti, il *range* in cui i valori sono racchiusi sia piuttosto ristretto, essendo compreso tra -0.63 d<sup>-1</sup> e 0.95 d<sup>-1</sup>.

I tassi di crescita riportati, essendo ricavati da esperimenti di grazing effettuati secondo un protocollo standard (Landry&Hassett 1982), sono stati tutti determinati in assenza di predazione mesozooplanctonica.

Non essendo presenti predatori superiori e consumando più della metà della produzione primaria giornaliera (Calbet&Landry 2004), non esiste altra spiegazione a tale stabilità se non la fortissima pressione predatoria dei protisti sull'intero comparto microzooplanctonico. Molti lavori pubblicati sul microzooplancton ipotizzano una possibile predazione esercitata dai protozoi su gli altri protozoi (Gifford 1985; Sherr&Sherr 1988; Jeong 1999; Batten *et al.* 2001; Carrias *et al.* 2001; Gaul&Antia 2001; Modigh&Franzé 2009). ma nessuno fino ora ha fornito prove sperimentali di tale ipotesi.

Tasso di crescita	Sito di campionamento	Fonte
0,44	Golfo di Trieste	Fonda Umani &
-0,3	Corpus Christi Bay,	First et al.,2007
0,60	Corpus Christi Bay,	First et al.,2007
-0,5	Golfo del Messico	First et al.,2007
0,95	Golfo del Messico	First et al.,2007
0,70	Golfo del Messico	First et al.,2007
0,30	Nueces Bay, Texas	First et al.,2007
0,00	Laguna Madre	First et al.,2007
0,10	Laguna Madre	First et al.,2007
-0,54	Golfo di Alaska	Strom et al, 2007
-0,63	Golfo di Alaska	Strom et al, 2007
-0,05	Golfo di Alaska	Strom et al, 2007
-0,06	Golfo di Alaska	Strom et al, 2007
-0,03	Golfo di Alaska	Strom et al, 2007
0,14	Golfo di Alaska	Strom et al, 2007
0,06	Golfo di Napoli	Modigh & Franzé,
0,00	Golfo di Napoli	Modigh & Franzé,
-0,37	Golfo di Napoli	Modigh & Franzé,
0,88	Golfo di Napoli	Modigh & Franzé,
0,64	Golfo di Napoli	Modigh & Franzé,
-0,07	Golfo di Napoli	Modigh & Franzé,
0,56	Golfo di Napoli	Questo studio
0,07	Golfo di Napoli	Questo studio
-0,21	Golfo di Napoli	Questo studio
-0,35	Golfo di Napoli	Questo studio
0,79	Golfo di Napoli	Questo studio

Tab VIII tassi di crescita nel campione naturale per l'intero comparto microzooplanctonico ricavato in esperimenti di grazing

Con questo lavoro si fornisce una stima dell'entità della predazione esercitata dai protozoi  $>20\mu\text{m}$  su gli altri protozoi, dimostrando quindi l'esistenza di numerosi livelli trofici all'interno del microzooplancton. Maggiore è il numero di passaggi trofici presenti nel circuito microbico, maggiore sarà la quantità di anidride carbonica disponibile per gli scambi con l'atmosfera e minore la quantità di carbonio organico veicolata verso il fondo oceanico.

È necessario ottenere tali informazioni per tutti gli ambienti acquatici così da poter elaborare modelli sui budget di carbonio in cui vengano presi in considerazione il ruolo e le dinamiche del microzooplancton. Fino ad oggi, infatti, tale comparto è stato considerato semplicemente un elemento di passaggio tra il comparto microbico e i livelli trofici superiori. Se, invece, il microzooplancton è un comparto eterogeneo all'interno del quale i passaggi trofici sono molteplici allora la stima del carbonio organico re-immesso in atmosfera deve essere rivista.

Inoltre, comprendere le dinamiche che regolano il comparto microzooplanctonico risulta fondamentale per ottenere dati realistici della stima di produzione primaria consumata. La determinazione della produzione predata dal microzooplancton viene effettuata attraverso esperimenti di grazing secondo il metodo delle diluizioni seriali. Uno degli assunti base del metodo è che, presupponendo che non vi siano variazioni nell'abbondanza degli erbivori, la pressione da grazing è proporzionale al fattore di diluizione. Avendo dimostrato la presenza di strette relazioni trofiche tra le varie componenti del microzooplancton non è corretto assumere l'assenza di variazioni del comparto microzooplanctonico durante l'incubazione. La crescita o la mortalità di alcune delle componenti può determinare forti differenze nella stima della produzione primaria predata. La differenza assoluta tra il tasso di grazing ottenuto dalla regressione tra la variazione della concentrazione di clorofilla e il fattore di

diluizione ( $g_{dil}$ ) o con la media geometrica dei predatori ( $g_{GMPA}$ ) aumenta esponenzialmente con il tasso di grazing ( $g_{dil}$ ) (Modigh&Franzé 2009) (Fig 48).

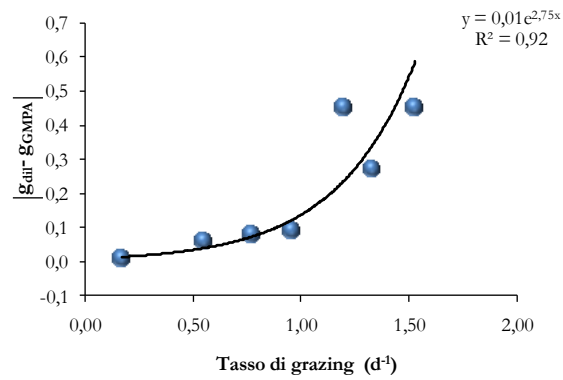


Fig.48. Correlazione tra il tasso di grazing calcolato usando il fattore di diluizione ( $g_{dil}$ ) e la differenza assoluta tra  $g_{dil}$  e il tasso di grazing ottenuto utilizzando la media geometrica dei predatori ( $g_{GMPA}$ ). Modificata da (Modigh&Franzé 2009)

## 7.1 Messa a punto del metodo

Il protocollo elaborato per condurre questa ricerca è frutto di un lungo e complesso lavoro di messa a punto sperimentale. Le numerose prove effettuate prima di giungere al risultato finale sono state scartate l'una dopo l'altra fino a quando non si è ottenuto il procedimento che soddisfaceva le nostre esigenze sperimentali. La difficoltà iniziale è consistita nel dover far fronte alla totale mancanza di letteratura in merito. Infatti, a causa di complessi problemi metodologici (Calbet&Landry 2004) quali, in primo luogo, riuscire a separare prede e predatori che appartengono a classi dimensionali sovrapposte, ad oggi mancano dati sperimentali.

L'elaborazione di un protocollo sperimentale che consenta di misurare la crescita dei protozoi in assenza di predazione e il tasso di predazione interna al comparto è volta proprio a colmare tale lacuna. Il metodo si fonda su due assunti: (1) ottenere un'adeguata concentrazione di risorse alimentari in tutti i contenitori e (2) contemporaneamente ridurre il numero dei predatori. Le prove per la messa a punto del metodo effettuate prima di giungere al protocollo definitivo sono state scartate in quanto non soddisfacevano gli assunti, ma ci hanno aiutato a comprendere meglio alcune dinamiche trofiche dei protozoi pelagici.

Negli esperimenti in cui è stata aggiunta coltura algale all'interno dei contenitori sperimentali contenenti concentrazioni variabili di campione naturale e acqua filtrata, sembra che i protozoi abbiano predato esclusivamente sul comparto autotrofo crescendo in tutti i contenitori secondo lo stesso tasso di crescita (Fig.6). Ciò ha reso impossibile misurare l'effetto della predazione dei protozoi su gli altri protozoi. Tale metodologia era stata pensata in un primo

momento per poter garantire, nella serie sperimentale, la stessa disponibilità di clorofilla in tutti i contenitori e allo stesso tempo la riduzione dell'abbondanza dei protozoi. Ma è risultato evidente che volendo comprendere i meccanismi che sono alla base della catena trofica pelagica è necessario che le condizioni sperimentali siano il più vicino possibile a quelle *in situ*. I protozoi in natura hanno la possibilità di predare un'enorme varietà di prede, sia per taglia che per tipologia (batteri, microalghe, diatomee, protozoi). È possibile, dunque, che l'estrema abbondanza di un unico tipo di cibo, nel nostro caso *Isochrysis galbani*, consenta agli organismi di dividersi secondo il loro massimo tasso di crescita, ma che tale tasso non sia poi realmente raggiunto in condizioni naturali. Potrebbe anche accadere che la grande disponibilità di un'alga, largamente riconosciuta come cibo gradito ai protozoi, induca i protozoi a predare la risorsa alimentare più abbondante e facilmente utilizzabile invece che quella, migliore da un punto di vista nutrizionale, ma più difficile da catturare. Quest'ultima ipotesi è probabile si sia verificata nel corso dei nostri esperimenti di prova, causando un'alterazione dei normali rapporti trofici nel comparto microzooplanctonico.

Negli esperimenti condotti creando la serie di diluizione con una miscela di campione naturale e acqua setacciata su un retino con apertura di maglia da 10 $\mu$ m, la riduzione dei grandi protozoi non è mai risultata adeguata a garantire una corretta valutazione della crescita dei protozoi in assenza di predazione. In tutti i contenitori sperimentali la predazione esercitata dai protozoi sugli altri protozoi è sempre risultata molto elevata, tanto da misurare una crescita negativa per tutte le componenti (Fig. 7). La quantità di protozoi che riesce ad attraversare le maglie del retino è estremamente variabile. Calbet *et al.* (2008), nonostante l'utilizzo di una tecnica di setacciamento considerata molto delicata, ovvero il setacciamento



inverso, hanno ottenuto una riduzione compresa in un *range* molto ampio, 14-85%. Tale metodologia consente, in genere, di ottenere una moderata riduzione del popolamento microzooplanctonico senza danneggiare le fragilissime cellule dei protozoi. Procedendo in modo lento e delicato si dà, infatti, alle cellule microzooplanctoniche la possibilità di trovare una via di fuga per passare attraverso le maglie. La variabilità nella composizione del popolamento microzooplanctonico può influenzare, però, il risultato del procedimento. Una riduzione considerevole è stata ottenuta invece da Carrias *et al.* (2001), i quali sono riusciti a ridurre l'abbondanza del popolamento microzooplanctonico del 98%, anche se alcuni protozoi come il dinoflagellato *Gymnodinium* sono riusciti a passare attraverso il retino in numero consistente (45%).

Setacciare il campione attraverso un retino con dimensioni di maglia da 5µm permette ancora una volta a molte cellule microzooplanctoniche di passare. Tale fenomeno è spiegabile con l'estrema plasticità che caratterizza i protozoi, in particolare quelli privi di strutture rigide che circondano la cellula. I protozoi “nudi” hanno la possibilità di modificare la forma della cellula tanto da poter attraversare maglie molto più piccole rispetto alle loro dimensioni cellulari.

L'unico modo per poter soddisfare i due presupposti base del metodo è stato lo sfruttamento di due caratteristiche: una del nostro sito di campionamento l'altra del microzooplancton in generale. La stazione di campionamento LTER-MC è caratterizzata da acque superficiali dominate per tutto il corso dell'anno da diatomee e nanoflagellati; anche in estate i *bloom* sono di piccole specie, si susseguono e si sovrappongono l'uno con l'altro (Zingone *et al.* 2009). In generale, il 90% del fitoplancton della St. LTER-MC è costituito da cellule <5µm (Santarpià 2006). Il dominio nel sito di campionamento di cellule di dimensioni

ridotte ha consentito che la diminuzione della risorsa alimentare in seguito al setacciamento fosse modesta e che la composizione del popolamento fitoplanctonico non venisse modificata in modo considerevole dal procedimento.

Per quanto riguarda il microzooplancton, invece, si è sfruttata l'estrema fragilità riconosciuta soprattutto alle cellule nude. Setacciando il campione con acqua versata a caduta in un retino a maglia da 5 $\mu$ m, la maggior parte dei protozoi viene trattenuta o danneggiata nella procedura. Tale metodo ci è sembrato l'unico possibile, dato che con filtrazioni gentili i protozoi riuscivano a passare anche attraverso maglie molto più piccole rispetto alle loro dimensioni cellulari.

L'incubazione del campione trattato con il processo di setacciamento per uno o due giorni prima dell'avvio degli esperimenti, è stata necessaria per dare modo a tutte le cellule, sia autotrofe che eterotrofe, di riprendersi da una manipolazione energica. Questo passaggio ha garantito la presenza, nel campione finale, sia di concentrazioni di clorofilla simili a quelle presenti in situ il giorno dell'esperimento (ANOVA  $p > 0.05$ ), che di protozoi in un buono stato funzionale. Eseguendo gli esperimenti immediatamente dopo il processo di setacciamento, protozoi danneggiati e non più in grado di crescere potrebbero essere considerati funzionali e quindi considerati nei campioni iniziali ( $T_0$ ), falsando in questo modo l'analisi dei tassi di crescita.

## 7.2 Tassi di crescita

Il protocollo sperimentale elaborato ha garantito sia una sufficiente disponibilità di risorsa alimentare che una forte riduzione della predazione interna al comparto. Ciò ha consentito di considerare i tassi di crescita del comparto microzooplanctonico, dei gruppi in cui è stato suddiviso e di alcune specie più abbondanti, come valori raggiunti in condizioni simili a quelle riscontrate in situ al momento del prelievo.

La manipolazione del campione (setacciamento e successiva incubazione per 24-48h) ha significativamente ridotto la concentrazione dei protozoi (ANOVA,  $p=0.002$ ), ma ha consentito di mantenere in buona misura la composizione e la concentrazione delle risorse alimentari (ANOVA,  $p>0.05$ ), facendo sì che i tassi di crescita non fossero correlati con la concentrazione di clorofilla (Fig. 8 e 11).

I tassi di crescita dei protozoi in assenza di predazione, ottenuti con l'analisi di regressione, così come i tassi di crescita misurati nei contenitori con la più bassa concentrazione di predatori, si collocano nel *range* dei tassi di crescita riportati in letteratura, ottenuti, però, su colture clonali di singole specie di ciliati e dinoflagellati (Fig. 49).

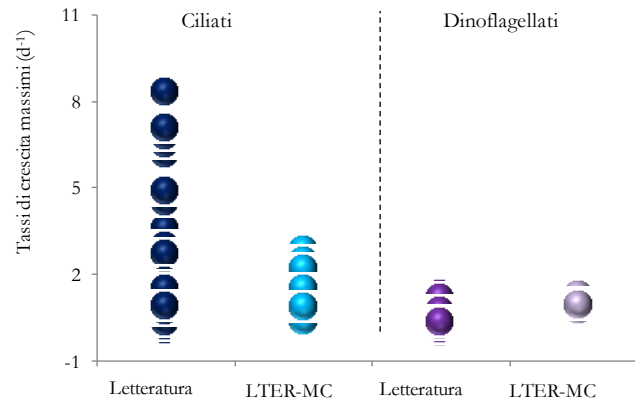


Fig. 49 Confronto fra i tassi di crescita di ciliati e dinoflagellati misurati nei nostri esperimenti e quelli riportati in letteratura vedi la *review* di Rose e Caron (2007).

I tassi di crescita ottenuti nei cinque esperimenti per i dinoflagellati sono compresi tra  $0.93 \text{ d}^{-1}$  e  $1.27 \text{ d}^{-1}$ , valori del tutto simili a quelli ottenuti da colture,  $0.01 \text{ d}^{-1}/1.37 \text{ d}^{-1}$  (Jeong 1999; Rose&Caron 2007). Per i ciliati, invece, il *range* dei tassi di crescita ottenuti dalle colture va da  $0.03 \text{ d}^{-1}$  fino a  $8.32 \text{ d}^{-1}$  (Rose & Caron 2007 per una *review*) ed è decisamente più ampio di quello osservato nei nostri esperimenti,  $0.93 \text{ d}^{-1}/2.86 \text{ d}^{-1}$ . Nonostante ciò, è possibile considerare i valori ottenuti in questa ricerca come massimi, anche considerando che tassi di crescita superiori a  $3 \text{ d}^{-1}$  nel database considerato per i ciliati siano solo una minima parte (12 su 249).

I tassi di crescita di singole specie ottenuti da colture in cui come preda è fornita, generalmente, un unico tipo di alga in eccesso, non possono, ad ogni modo, essere direttamente paragonati con i nostri esperimenti, in cui i tassi di crescita si riferiscono a popolamenti composti da molte specie che si accrescono con una dieta mista. L'obiettivo di questo lavoro era, infatti, quello di determinare

il tasso di crescita massimo che gli organismi microzooplanctonici possono raggiungere a mare ricreando condizioni sperimentali il più possibile vicine a quelle naturali. È stato dimostrato, e non solo nel corso degli esperimenti di prova, in cui è stata aggiunta una coltura monoclonale di *Isochrysis galbani*, ma anche nell'esperimento condotto a febbraio, come l'alterazione delle condizioni naturali possa modificare i rapporti di interazione tra gli organismi, determinando una erronea valutazione dei tassi di crescita dei protozoi. A febbraio, ad esempio, a causa di avverse condizioni meteo-marine, il campione trattato con il processo di setacciamento è rimasto per tre giorni in camera termostata prima che si potesse procedere all'esperimento. Tale permanenza ha determinato una eccessiva crescita del popolamento autotrofo (esperimento =  $4.3 \mu\text{g chl L}^{-1}$ ; mare =  $0.47 \mu\text{g chl L}^{-1}$ ), a causa della quale non si è riusciti a determinare il tasso di predazione interna al comparto.

L'analisi dei tassi di crescita apparente in funzione della concentrazione dei predatori è stata elaborata per i singoli esperimenti. La progressiva riduzione dell'abbondanza dei protozoi nei contenitori che componevano la serie sperimentale ha mostrato che, con l'allentarsi della pressione predatoria, il tasso di crescita apparente andava aumentando. In tutti gli esperimenti, per tutte le componenti microzooplanctoniche, le crescite apparenti sono risultate negativamente influenzate dall'aumento della concentrazione dei predatori (Fig 17-19). Questi risultati consentono di considerare i tassi di crescita misurati nei contenitori con il minor numero di predatori molto vicini ai valori massimi raggiungibili in ambiente naturale. Inoltre, la notevole differenza nei tassi di crescita apparente dei protozoi nei campioni naturali e in presenza di predazione ridotta al minimo (Fig.14 e 15) rivela il forte controllo che i protozoi  $>20\mu\text{m}$

riescono ad esercitare sul resto del popolamento. Alla luce delle nostre osservazioni possono essere reinterpretati anche i risultati dello studio di (Perez et al. 1997) sulla predazione esercitata dai copepodi sui ciliati. Nei campioni in cui sono stati aggiunti copepodi i tassi di crescita misurati sono risultati negativi per i protozoi  $>20\mu\text{m}$ , e più elevati, rispetto a quelli registrati nei campioni naturali o in quelli setacciati su  $64\mu\text{m}$ , per i nanociliati. In base alle nostre osservazioni, la pressione predatoria dei copepodi sui grandi protozoi determina, presumibilmente, una riduzione della predazione tra protozoi. Tuttavia, i tassi di crescita registrati da Perez et al. (1997) erano decisamente inferiori a quelli ottenuti nei nostri esperimenti dove è stata realizzata una drastica riduzione dell'abbondanza dei protozoi  $>20\mu\text{m}$ .

Che il consumo da parte dei protozoi possa determinare cambiamenti qualitativi del popolamento microzooplanctonico si è reso evidente con la correlazione elaborata mettendo insieme tutti i tassi di crescita apparenti misurati nei contenitori sperimentali dei singoli esperimenti con le abbondanze dei predatori ottenute per ogni contenitore (Fig. 20 e 21). Le forti interazioni trofiche tra i diversi gruppi che costituiscono il comparto sono tali da influenzare sia l'abbondanza che la composizione del popolamento microzooplanctonico. Per quanto riguarda i ciliati, nelle correlazioni lineari mostrate in figura 20 si possono individuare tre differenti fasi:

1. rapida crescita a basse concentrazioni di predatori;
2. stabilità dei due gruppi a concentrazioni intermedie;
3. rapida diminuzione del tasso di crescita apparente a elevate concentrazioni di protozoi  $>20\mu\text{m}$ .

Nella prima fase l'aumento dei tassi di crescita apparenti corrisponde evidentemente ad una bassa pressione predatoria. La scarsa concentrazione di cellule microzooplanctoniche riduce la possibilità di incontro tra prede e predatori consentendo alla componente dei ciliati di accrescersi velocemente e di incrementare rapidamente il popolamento nel suo insieme senza essere abbattuto dalla predazione interna. Questa condizione risulta valida fino al punto in cui, essendo aumentata la concentrazione cellulare, anche la possibilità di essere predati va ad incrementarsi. Nella seconda fase, infatti, sembra che crescita e predazione siano in equilibrio; tale stato è palesato dall'apparente stabilità del popolamento. Quando il popolamento microzooplanctonico è caratterizzato da un'elevata abbondanza e quindi da un elevato tasso di incontro fra protozoi, si evidenzia una diminuzione dei tassi di crescita apparente.

Un andamento simile è stato riscontrato anche per la componente dei dinoflagellati i quali, però, non presentano la fase di decremento delle crescite. In questo caso, dopo l'iniziale crescita si giunge in una fase di stabilità che si mantiene anche ad elevate concentrazioni di predatori. Tale andamento potrebbe essere spiegato dal tipo di relazioni trofiche che sono state individuate nel corso di questa ricerca. Le evidenze sperimentali mostrano come, il più delle volte, la maggiore predazione sia esercitata dai dinoflagellati nei confronti dei ciliati, mentre il rapporto di predazione inverso sembra di minore entità o in ogni modo meno frequente, il che potrebbe spiegare la relativa stabilità dei dinoflagellati in presenza di elevate concentrazioni di protozoi  $>20\mu\text{m}$ .

Che i ciliati siano predati preferenzialmente dai grandi protozoi risulta evidente, ad esempio, analizzando i risultati dei tassi di crescita apparente, specifici per i due gruppi, misurati nei campioni naturali e nei contenitori con il

minor numero di predatori. Le crescite apparenti ottenute per i campioni naturali mostrano, nella maggior parte dei casi, tassi di crescita più elevati per i dinoflagellati mentre nei campioni in cui è stato ridotto il tasso di predazione sono i ciliati a presentare i tassi di crescita maggiori (Tab IV). Ciò indica che i ciliati possono accrescersi più velocemente dei dinoflagellati, ma che allo stesso tempo sono sottoposti ad una maggiore pressione predatoria.

Tassi di crescita più elevati per i ciliati rispetto ai dinoflagellati sono riportati in un gran numero di studi su colture clonali (Buskey&Hyatt 1995; Montagnes 1996; Dini&Nyberg 1998; Nakamura 1998; Weisse&Montagnes 1998; Archer *et al.* 2000; Liu&Buskey 2000; Weisse *et al.* 2001; Pedersen&Hansen 2003; Boenigk&Novarino 2004) (Fig. 49), vedi Rose e Caron (2007) e Jeong (1999) per una review.

### *7.2.1 Dipendenza dalla temperatura*

L'analisi delle correlazioni effettuate tra i tassi di crescita dei protozoi e la temperatura a cui gli esperimenti sono stati condotti ha prodotto dei risultati all'apparenza contraddittori. Nei campioni con il minor numero di predatori i tassi di crescita apparenti diminuiscono all'aumentare della temperatura per l'abbondanza dei nanociliati e per la biomassa dei ciliati  $>20\mu\text{m}$ . Nessuna correlazione significativa è stata riscontrata, invece, quando si sono utilizzati i tassi di crescita in termini di biomassa dei nanociliati e di abbondanza per i ciliati  $>20\mu\text{m}$  (Fig. 11 a-d), così come per i ciliati nel loro insieme.

L'apparente discrepanza può essere spiegata con il metodo utilizzato per il conteggio al microscopio dei protozoi. Le cellule microzooplanctoniche sono



misurate con l'ausilio di un micrometro presente nell'oculare del microscopio e, a seconda del loro biovolume, assegnate alla corrispondente classe dimensionale (nanociliati o ciliati  $>20\mu\text{m}$  ESD). L'aumento in dimensione e quindi in biomassa di alcuni nanociliati nel corso dell'incubazione ha potuto determinare l'assegnazione di tali cellule al gruppo dimensionale maggiore. L'inclusione di nanociliati "cresciuti" al gruppo dei ciliati  $>20\mu\text{m}$  determinerebbe una stima del tasso di crescita in termini di abbondanza dei nanociliati inferiore a quello reale.

L'eventualità che possa essersi verificata una situazione simile è supportata dalla mancanza di correlazione tra la temperatura e l'intero comparto a ciliati. La stessa indipendenza è stata riscontrata anche per i dinoflagellati. Possiamo quindi affermare che nel nostro studio non si rileva alcuna dipendenza dalla temperatura nei tassi di crescita dei protozoi pelagici e tale affermazione risulta palesemente in disaccordo con i dati che si trovano in letteratura. Migliaia di tassi di crescita di protisti, determinati in coltura, sono stati analizzati in funzione della temperatura (Rose&Caron 2007). Con temperature comprese tra  $-3^\circ$  e  $40^\circ\text{C}$  si evidenzia un marcato incremento dei tassi di crescita dei protozoi eterotrofi all'aumentare della temperatura. I nostri esperimenti, però, sono stati condotti in un *range* di temperatura molto più ristretto e tipico del nostro sito di campionamento,  $15-25^\circ\text{C}$ . Per confrontare i nostri risultati abbiamo estrapolato i tassi di crescita misurati nello stesso intervallo di temperatura che caratterizza la nostra stazione di campionamento. Dal *database* fornito da Rose e Caron (2007) e da Jeong (1999) abbiamo quindi selezionato alcune centinaia ( $n=345$ ) di tassi di crescita di ciliati e dinoflagellati misurati tra  $15^\circ$  e  $25^\circ\text{C}$ . In questo intervallo di temperatura non vi è alcuna correlazione con i tassi di crescita dei protozoi (Fig. 50). Come specificato anche dagli autori vi è un rapido decremento dei tassi di crescita alle temperature

più basse, ma evidentemente non vi è lo stesso rapido incremento ad alte temperature. Nelle aree temperate, e in particolare nel Mar Mediterraneo, dove le escursioni termiche dell'acqua sono assai limitate rispetto all'Oceano Atlantico e alle alte latitudini, la temperatura ha un'influenza trascurabile o comunque molto limitata sui processi metabolici del plancton (Satta *et al.* 1996). Quindi, come riscontrato nei nostri esperimenti, in un *range* di temperatura intermedio, e tipico del Mediterraneo, i tassi di crescita dei protisti eterotrofi possono essere considerati indipendenti dalla temperatura.

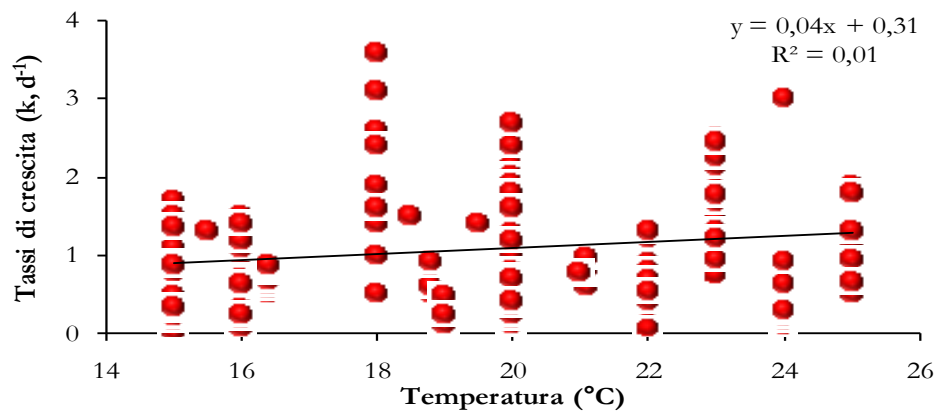


Fig.50 Tassi di crescita di protisti eterotrofi vs Temperatura (dati estrapolati da Rose e Caron, 2007).

Lo stesso tipo di analisi è stata effettuata per i tassi di crescita del microzooplancton misurati all'interno dei campioni naturali. Negli ultimi decenni sono stati condotti centinaia di esperimenti di *grazing* mirati alla determinazione del tasso di predazione esercitato dal microzooplancton sul comparto fitoplanctonico (Calbet&Landry 2004) per una *review*). Tuttavia, solo di recente è stata evidenziata l'importanza di monitorare i possibili cambiamenti nel

popolamento del microzooplancton durante le incubazioni; la crescita o la mortalità dei *grazers* possono, infatti, falsare l'interpretazione dei dati sperimentali sull'ammontare di produzione primaria predata (Dolan *et al.* 2000; Modigh&Franzé 2009). Sono pochi, dunque, i dati sulle variazioni del popolamento microzooplanctonico nei campioni naturali con cui confrontare i nostri risultati.

Correlando la temperatura con i tassi di crescita apparente dell'intero comparto microzooplanctonico misurati nei campioni naturali di questa ricerca e di alcuni studi recenti (Fonda Umani&Beran 2003; First&Lavrentyev 2007; Strom 2007; Modigh&Franzé 2009) è stata evidenziata una relazione significativamente positiva ( $p < 0,001$ ) tra i due parametri (Fig. 51) in un intervallo di temperatura compreso tra 7.5° e i 33°C. Lo stesso trend, anche se non statisticamente significativo, si osserva se prendiamo in esame, tra i dati considerati, solo quelli relativi all'intervallo di temperatura compreso tra i 15° e i 25°C ( $R^2 = 0.24$ )

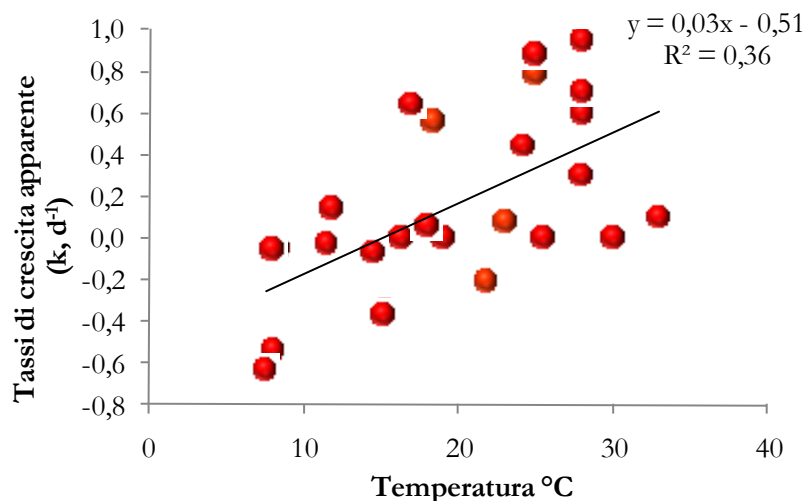


Fig .51 crescite apparenti misurate nei campioni naturali presi da questa ricerca e dalla letteratura in funzione della temperatura

Pertanto, nei campioni naturali il tasso di crescita apparente dell'intero comparto microzooplanctonico aumenta all'aumentare della temperatura, a differenza di quanto riscontrato per i tassi di crescita misurati in condizioni di pressione di predatoria assente o molto ridotta (Fig. 50). Tale differenza la si ottiene perché i tassi di crescita apparente nei campioni naturali sono il risultato finale della crescita dei protozoi e della mortalità dovuta alla predazione interna. Dato che il tasso di mortalità diminuisce all'aumentare della temperatura (Fig. 52), è possibile che tale l'aumento della crescita apparente ad alte temperature sia, in realtà, frutto di una minore predazione interna.

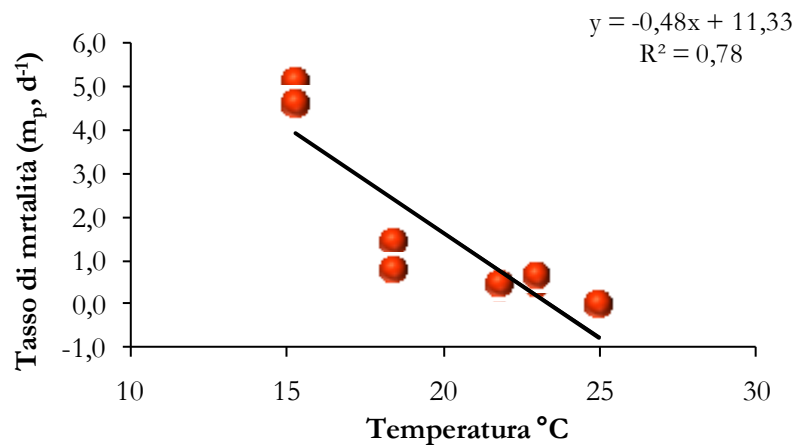


Fig. 52 Tasso di mortalità del microzooplancton nei campioni naturali vs temperatura in tutti gli esperimenti

Una possibile spiegazione della diminuzione del tasso di predazione interna al comparto microzooplanctonico con l'aumentare della temperatura potrebbe venire da un incremento della velocità di fuga dei protisti in relazione ad un incremento generale del metabolismo cellulare. Ciò potrebbe spingere i protozoi a

predare più il comparto autotrofo meno mobile che quello eterotrofo, allentando così la pressione predatoria sui protozoi.

### 7.2.2 *Tassi di crescita delle singole specie*

In ciascuno degli esperimenti condotti la presenza di una o più specie abbondanti ha consentito di calcolare i tassi di crescita specifici. Così come è stato fatto per l'intero comparto o per i singoli gruppi microzooplanctonici anche per le singole specie i tassi di crescita sono stati determinati in assenza di predazione grazie alla correlazione tra i tassi di crescita apparenti misurati in ciascun contenitore ( $k$ ) e la media dell'abbondanza dei predatori (MPA). I tassi di crescita di singole specie presentati in letteratura derivano generalmente da colture, mentre i nostri dati provengono da campioni il più possibile simili a quelli naturali. I valori dei tassi di crescita ricavati dall'analisi di regressione dovrebbero corrispondere ai massimi tassi di crescita raggiungibili a mare in assenza di qualsiasi tipo di predazione.

Comparando i nostri risultati con i valori presenti in letteratura si vede come i tassi di crescita da noi misurati rientrino nel *range* riportato e spesso risultino addirittura superiori ai valori massimi ottenuti in coltura (Fig. 53).

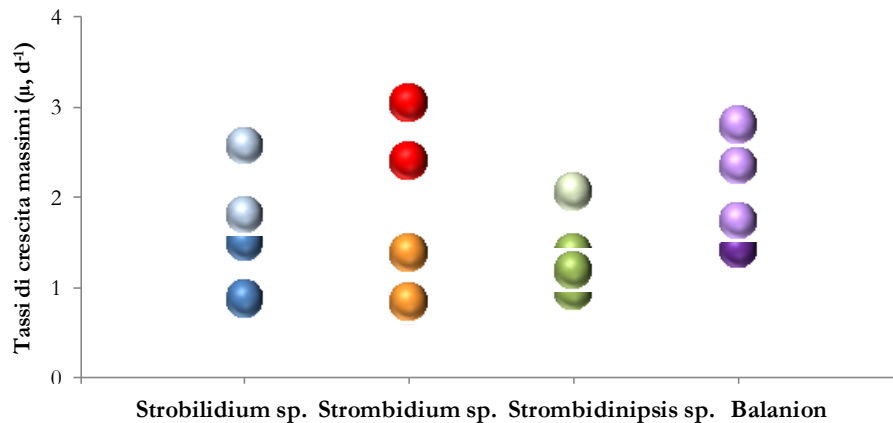


Fig. 53 Tassi di crescita massimi per diverse specie di ciliati ottenute in questo studio (colori chiari) e in letteratura (colori scuri).

La superiorità dei nostri tassi di crescita rispetto a quelli presenti in letteratura può essere spiegata con il fatto che i nostri dati sono relativi a specie dello stesso genere di quelle riportate in letteratura, ma non necessariamente alla stessa specie. Inoltre, i nostri valori sono calcolati in assenza totale di predazione, mentre all'interno delle colture potrebbe avvenire che l'eccessiva abbondanza della singola specie spinga i protozoi verso un cannibalismo in senso stretto (Jeong 1999), cosa che determinerebbe il minore tasso di crescita apparente.

Sulla base di incubazioni sperimentali di campioni naturali del Mediterraneo occidentale Perez *et al.* (1997) hanno elaborato un'equazione con la quale calcolare i tassi di crescita dei ciliati considerando la temperatura del campione e il volume medio delle cellule. Applicando tale equazione ai nostri dati abbiamo ottenuto i tassi di crescita teorici e li abbiamo confrontati con quelli realmente misurati (Fig. 54). I tassi di crescita ottenuti in assenza di predazione superano, nella maggior parte dei casi, quelli ottenuti su base teorica. L'equazione elaborata da Perez *et al.*

(1997) è stata elaborata sulla base di crescite apparenti misurate in campioni naturali setacciati su retino con apertura di maglia da  $64\mu\text{m}$ . Tale setacciamento elimina la predazione da parte del mesozooplankton ma non quella dei protozoi  $>20\mu\text{m}$ , di conseguenza i tassi di crescita su cui è basata l'elaborazione dell'equazione non sono massimi ma al netto della predazione interna al comparto.

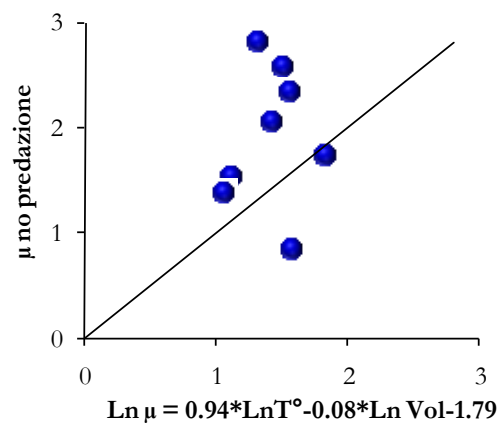


Fig. 54 Correlazione tra i tassi di crescita ottenuti in assenza di predazione e quelli teorici ottenuti in base all'equazione di Perez et al. (1997).

In un solo caso il tasso di crescita da noi misurato è risultato inferiore a quello stimato tramite l'equazione. *Strombidium* sp.2 cresce, nei nostri esperimenti, ad un tasso pari a  $0.84 \text{ d}^{-1}$ , valore che rientra nei valori riportati in letteratura (Fig. 52). Non è escluso, ad ogni modo, che per le sue ridotte dimensioni tale specie sia stata sottoposta ad un'intensa predazione da parte dei protozoi  $>20\mu\text{m}$  anche nel campione con la minore percentuale di predatori, falsando in questo modo la stima del tasso di crescita in assenza di predazione.

### 7.2.3 *Myrionecta rubra*

A differenza degli altri ciliati, *Myrionecta rubra* (= *Mesodiinium rubrum*) (Lohmann, 1908) è considerato, da un punto di vista funzionale, autotrofo. Il ruolo funzionale di *M. rubra* è stato oggetto di molti dibattiti finché non è stato dimostrato che tale ciliato consuma cryptofite dalle quali “sequestra” organelli necessari ad aumentare sia il tasso fotosintetico che quello di crescita (Gustafson *et al.* 2000). Sebbene *M. rubra* catturi le sue prede per acquisirne i plastidi, è da lungo tempo considerato funzionalmente autotrofo. È capace di utilizzare il carbonio inorganico disciolto (Packard *et al.* 1978; Wilkerson&Grunseich 1990) e di dare vita a *bloom* come le spettacolari maree rosse (Smith&Barber 1979)

*Bloom* o maree rosse causate da questa specie sono eventi comuni in estuari, lagune, e zone costiere di *upwelling* (Johnson&Stoecker 2005). Tale ciliato può contribuire in maniera significativa al flusso di carbonio verso i livelli trofici superiori in aree dominate da cellule fitoplanctoniche <5 $\mu$ m (Modigh 2001).

Per questi motivi, di norma *M. rubra* non viene trattato insieme agli altri ciliati e anche in questo lavoro si è ritenuto opportuno escluderlo dalla trattazione generale dei dati. Ad ogni modo, essendo una componente importante del comparto microzooplanctonico caratterizzante la St. LTER-MC (Modigh 2001) ne abbiamo calcolato, lì dove l'abbondanza lo ha consentito, i tassi di crescita in assenza di predazione.

*M. rubra* è una specie molto fragile ed è difficile portarla in coltura, per cui i dati sui tassi di crescita sono limitati. In letteratura sono riportati tassi di crescita relativi ad ambienti freddi (3°C), in cui *M. rubra* cresce secondo valori piuttosto



bassi,  $0.19 \text{ d}^{-1}$  (Gustafson *et al.* 2000; Johnson&Stoecker 2005), e ad ambienti temperati ( $15^{\circ}\text{C}$ ), in cui i valori si alzano fino a  $0.4 \text{ d}^{-1}$  e  $0.52 \text{ d}^{-1}$  (Yih *et al.* 2004); (Hansen&Fenchel 2006). I tassi di crescita misurati nei nostri esperimenti sono stati ottenuti entrambi in condizioni di temperature più elevate ( $18.3^{\circ}$  e  $21.8^{\circ}\text{C}$  rispettivamente a maggio e a novembre), il che potrebbe aver determinato valori più alti ( $0.68 \text{ d}^{-1}$  e  $0.93 \text{ d}^{-1}$ ).

Il tasso di crescita massimo è stato misurato nell'esperimento di maggio. Durante la primavera il numero di ore di luce a disposizione delle cellule è maggiore e ciò potrebbe aver favorito la maggiore crescita di un ciliato fotosintetico quale *M. rubra*.

### 7.3 Produzione e predazione

Come già sottolineato in precedenza, nonostante l'interesse crescente per il ruolo svolto dal microzooplancton nell'ambito della catena trofica pelagica, non esistono in letteratura misure inerenti alla produzione di tale comparto. Questa lacuna ha reso impossibile un confronto diretto dei nostri risultati con quelli prodotti in altre ricerche. Tuttavia, per poter effettuare delle stime dei flussi di carbonio nell'ecosistema pelagico è importante avere a disposizione dati sperimentali, e non solo modelli concettuali, che permettano di quantificare la produzione microzooplanctonica e la frazione di essa disponibile per i livelli trofici superiori.

Molti dei modelli prodotti fino ad oggi hanno considerato il microzooplancton solo come un elemento di passaggio, per energia e materia, tra il comparto autotrofo e i metazoi (Archer *et al.* 2000; Batten *et al.* 2001; Calbet&Saiz 2005; Sherr *et al.* 2009). I nostri dati sperimentali, invece, mostrano come una quota molto consistente della biomassa microzooplanctonica venga riciclata all'interno del comparto e in gran parte re-immessa come anidride carbonica.

Il rapporto tra la produzione microzooplanctonica e primaria, calcolato mediante modelli teorici, risulta compreso tra 21 e 55%; tale percentuale cresce con l'aumentare dei livelli trofici presenti all'interno del comparto microzooplanctonico (Calbet&Landry 2004; Landry&Calbet 2004).

Alla St. LTER-MC il rapporto tra produzione microzooplanctonica e produzione primaria potenziali, ossia calcolate in assenza di predazione, assume un valore medio del 75%. Per effettuare tale stima, la produzione primaria è stata

calcolata utilizzando il valore medio di P/B pari a 5.5 (Mangoni, 1998), ricavato dalle curve PvsE, e la concentrazione di biomassa superficiale per il periodo 2006-2008. La produzione primaria potenziale è compresa tra un minimo di  $7.9 \mu\text{g C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e un massimo di  $511.65 \mu\text{g C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e la produzione microzooplanctonica potenziale è dello stesso ordine di grandezza ( $2.30\text{-}532 \mu\text{g C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ). Il rapporto tra le due produzioni, maggiore di quello previsto da Landry e Calbet (2004), evidenzia un maggiore riciclo interno al comparto microzooplanctonico legato, presumibilmente, alla presenza di un numero superiore di livelli trofici.

Se confrontiamo le due produzioni misurate sperimentalmente, al netto della predazione, tale rapporto diminuisce notevolmente.

La produzione primaria misurata secondo il metodo del  $^{14}\text{C}$  per la stazione di campionamento è compresa tra  $12$  e  $600 \mu\text{g C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Modigh *et al.* 1996). Pur considerando che il metodo dell'assorbimento del  $^{14}\text{C}$  non misura tutto il carbonio fissato, ma che parte di esso viene utilizzato dai consumatori primari durante l'incubazione (Laws *et al.* 2000; Dolan&McKeon 2005), i valori ottenuti non si discostano molto da quelli teorici. Al contrario, la stima della produzione microzooplanctonica giornaliera, basata sulle crescite apparenti del popolamento in condizioni paragonabili a quelle in situ ( $0.18 \text{ d}^{-1}$ ), fornisce valori nettamente inferiori a quelli potenziali, compresi cioè tra  $0.74$  e  $170 \mu\text{g C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Questa differenza fa sì che il rapporto produzione microzooplanctonica - produzione primaria scenda in media al 11%.

La differenza tra la stima di produzione microzooplanctonica potenziale e quella misurata in situ rende chiara l'esistenza del forte controllo esercitato dai protozoi sugli altri protozoi.

Ciò che siamo riusciti ad ottenere con questa ricerca è una determinazione sperimentale della produzione microzooplanctonica potenziale e dell'ammontare del suo riciclo. Per una stima del numero dei livelli trofici presenti all'interno del comparto microzooplanctonico sarebbero tuttavia necessari ulteriori esperimenti mirati ad evidenziare le possibili interazioni tra:



L'importanza di misure sperimentali della produzione microzooplanctonica è palesata anche dal confronto tra i risultati della nostra ricerca e le stime di produzione mesozooplanctonica. La produzione microzooplanctonica supera considerevolmente la produzione mesozooplanctonica misurata non solo in altre aree costiere ( $1.18 - 6.85 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) (Nielsen&Kiorboe 1994; Escaravage&Soetaert 1995; Uye&Liang 1998), ma anche in ambienti altamente produttivi come gli estuari (da  $0.96 \pm 0.236$  a  $5.65 \pm 0.894 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) (Leandro *et al.* 2007).

Risulta evidente, quindi, l'enormità dell'errore che si produce, volendo prevedere il budget di carbonio esportato verso le profondità oceaniche e quello restituito all'atmosfera senza tenere presente ciò che accade nel comparto microzooplanctonico.

Avendo determinato i tassi di crescita del comparto microzooplanctonico, nel suo insieme e per le singole componenti in cui è stato suddiviso, in assenza di predazione mesozooplanctonica e riducendo drasticamente quella microzooplanctonica (setacciamento su  $5\mu\text{m}$ ), è stato possibile stimare l'ammontare di produzione microzooplanctonica lorda e, conseguentemente,

grazie alla graduale riduzione dei protozoi  $>20\mu\text{m}$ , il tasso di mortalità inflitto da questi all'intero comparto dei protozoi. Il tasso di mortalità microzooplanctonica calcolato per gli esperimenti secondo l'equazione 8 indica un forte controllo interno al comparto tale da ridurre, spesso, anche lo standing stock dei protozoi. È stato dimostrato che le dinamiche del microzooplancton sono fortemente influenzate dalla disponibilità delle risorse. Alla St. LTER-MC sia l'abbondanza (Fig.55) che la biomassa dell'intero comparto microzooplanctonico sono significativamente correlate ( $p < 0.05$ ) con la concentrazione di clorofilla. Allo stesso tempo, però, è necessario un controllo dall'alto per evitare l'esaurimento totale delle risorse e la conseguente drastica mortalità per assenza di cibo. Il controllo biologico dei protisti sul loro stesso popolamento regola, dunque, le evoluzioni temporali su media scala dell'intero comparto riducendo l'ampiezza delle oscillazioni sia della biomassa fitoplanctonica che di quella del microzooplancton.

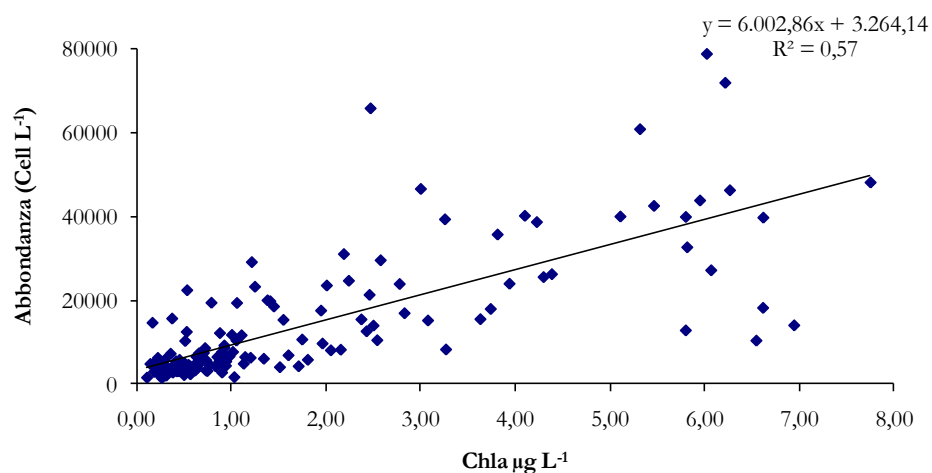


Fig.55. Correlazione tra l'abbondanza del comparto microzooplanctonico e la concentrazione di clorofilla alla St-LTER-MC.

Il tasso di mortalità calcolato nei singoli contenitori sperimentali (eq. 10) è stato messo in relazione, con una regressione multipla lineare, alla concentrazione di clorofilla, alla temperatura e all'abbondanza dei protozoi  $>20\mu\text{m}$ . Tale analisi ha fornito modelli con cui calcolare, per la St. LTER-MC, il tasso di predazione esercitato dai protozoi sui tre gruppi microzooplanctonici, partendo dai tre parametri sopra elencati.

Nonostante il database utilizzato per il calcolo della regressione multipla non fosse molto ampio ( $n=27$ ) i risultati ottenuti indicano che la stima del tasso di predazione dei protozoi su nanociliati, ciliati  $>20\mu\text{m}$  e dinoflagellati è buona (Tab. VI). Un'unica eccezione è stata riscontrata in condizioni di numeri molto bassi di predatori e di basse concentrazioni di clorofilla e temperatura. In questo caso i modelli non sembrano corrispondere alle osservazioni sperimentali.

La discordanza tra il modello e le osservazioni sperimentali è stata osservata solo per i campionamenti di profondità effettuati alla St. LTER-MC nel mese di maggio e di luglio. In questi casi il modello ha fornito valori elevati di mortalità per il microzooplancton cosa che, data la bassa concentrazione di protozoi  $>20\mu\text{m}$  ( $\sim 300 \text{ cell L}^{-1}$ ) e quindi il relativo basso tasso di incontro tra le cellule, non è risultato accettabile. È stato osservato, nei nostri esperimenti, che a concentrazioni di predatori inferiori a  $1500 \text{ cell L}^{-1}$  nessuna delle componenti microzooplanctoniche subiscono una significativa predazione (Fig. 20-21).

Applicando i modelli a tutti i campionamenti effettuati sulla St. LTER-MC, tranne in quelli appena descritti in cui è stato applicato un tasso di predazione pari a 0, è stato possibile determinare la produzione microzooplanctonica predata nello strato superficiale e su tutta la colonna d'acqua.

Sia considerando la produzione superficiale che quella integrata la predazione interna al comparto microzooplanctonico risultata molto elevata. Nello strato superficiale la mortalità va da un minimo del 53% ad un massimo del 97% mentre, considerando tutta la profondità della colonna d'acqua, si ha un minimo del 5% a maggio, fino ad arrivare ad un massimo del 93% a dicembre. La bassa percentuale di predazione registrata a maggio su tutta la colonna d'acqua, a differenza di ciò che accade in superficie, è attribuibile sia alla diversità nella composizione del popolamento microzooplanctonico in questi due ambienti (Fig.37), che alle condizioni fisiche e trofiche presenti durante il campionamento di maggio. Mentre nello strato superficiale vi è, generalmente, una distribuzione più omogenea sia in abbondanza che in biomassa tra le differenti componenti del comparto, in profondità la componente che acquisisce maggiore importanza è quella dei nanociliati (Fig. 37 a-b) e, venendo ad essere fortemente ridotta l'abbondanza delle cellule  $>20\mu\text{m}$ , anche la capacità di predazione dell'intero popolamento è minore. In aggiunta, in corrispondenza del campionamento di maggio, il *bloom* fitoplanctonico superficiale ( $6.95 \mu\text{g Chl}a \text{ L}^{-1}$ ) e la drastica riduzione della concentrazione di protozoi  $>20\mu\text{m}$ , di clorofilla e di temperatura negli strati profondi della colonna d'acqua, hanno fatto sì che la produzione predata fosse bassa in superficie e nulla in profondità.

Al contrario le percentuali di predazione esercitata all'interno del comparto microzooplanctonico risultano essere simili, tra la superficie e l'intera colonna'acqua, nei campionamenti di dicembre e febbraio. Dato che, in questo periodo dell'anno il popolamento microzooplanctonico, in conseguenza del rimescolamento della colonna d'acqua, risulta essere più omogeneo potrebbe essere possibile estendere tale osservazione all'intera stagione invernale.

Le percentuali più elevate di predazione dei protozoi >20µm sugli altri protozoi corrisponderebbero proprio alla stagione autunno-inverno in concomitanza di una minore disponibilità di risorse alimentari. In questo periodo la concentrazione di clorofilla sulla stazione LTER-MC è generalmente <1µg Chla L<sup>-1</sup>, il che fa ipotizzare che è proprio la minore disponibilità di risorse alimentari autotrofe a spingere i protozoi verso una più intensa predazione sulla componente eterotrofa.

È stata evidenziata, ad alte concentrazioni di clorofilla, una correlazione inversa tra quest'ultima e il tasso di grazing esercitato dal microzooplancton sul comparto autotrofo. Al contrario non vi è alcuna correlazione a basse concentrazioni di clorofilla (<1µg Chla L<sup>-1</sup>) sia sulla St. LTER-MC (Modigh&Franzé 2009) che in altri studi (Fig.56)

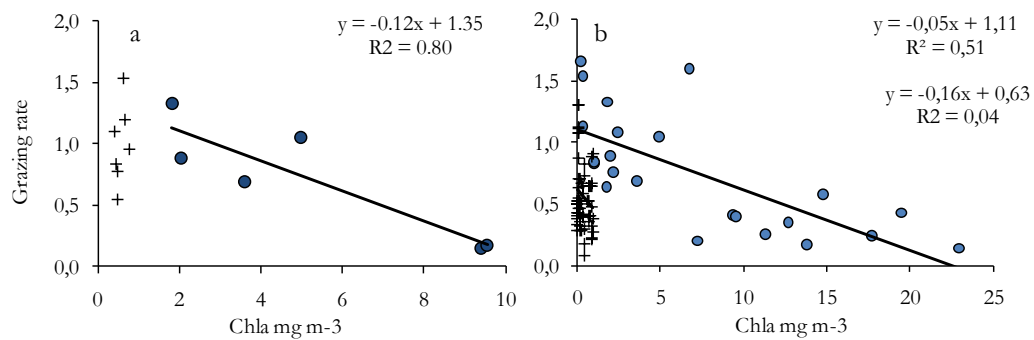


Fig. 56. Relazione tra la concentrazione di Chla e il tasso di grazing del microzooplancton (a) per la St. LTER-MC (b) basato sui dati ricavati dalla letteratura (McManus *et al.*, 1992; Landry *et al.*, 1998; Lessard & Murrel, 1998, Dolan *et al.*, 2000; Latasa *et al.*, 2005; Calbet *et al.*, 2008). Modificata da Modigh & Franzé (2009)

È stato ipotizzato che tale disaccoppiamento possa essere dovuto ad un limite del metodo delle diluizioni seriali. Durante gli esperimenti di grazing, infatti,



viene presa in considerazione esclusivamente la predazione che il microzooplancton esercita sul comparto autotrofo, misurando le variazioni nella concentrazione di *Chl<sub>a</sub>*, mentre non si tiene affatto conto dell'importanza che possono avere le prede eterotrofe quale risorsa alimentare aggiuntiva, come dimostrato in diversi studi (Lessard 1991; Murrell&Hollibaugh 1998; Fonda Umani&Beran 2003).

Analizzando i risultati della nostra ricerca alla luce di tali informazioni, risulta evidente che è proprio in condizioni di basse concentrazioni di clorofilla, come quelle che caratterizzano il periodo autunnale-invernale, che i protisti predano preferenzialmente su altri protisti, riuscendo a ricavare energia anche quando la fonte alimentare autotrofa è scarsa e riducendo così la competizione per le risorse.

In fig. 56 si evidenzia anche una graduale diminuzione della predazione del microzooplancton sul comparto autotrofo in presenza di concentrazioni di clorofilla che superano  $1\mu\text{g Chl}_a \text{ L}^{-1}$ . Di norma la concentrazione di clorofilla, sulla stazione di campionamento LTER-MC, raggiunge i valori massimi in primavera (Fig 30), quando numerosi *bloom* fitoplanctonici si susseguono l'uno dopo l'altro. In questo stesso periodo dell'anno si registra, però, anche una concomitante riduzione della predazione dei protozoi sui protozoi. Tale andamento può essere spiegato con una serie di interazioni tra le componenti dominanti. In primavera la St. LTER-MC vede spesso la dominanza, nel comparto microzooplanctonico, della componente dei dinoflagellati (Fig.31 a-b). Questi, essendo dotati di forme di nutrizione quali la *myzocitosi* e il *pallium feeding*, sono in grado, a differenza dei ciliati, di esercitare una forte pressione predatoria anche sulle grandi catene di diatomee (Jeong 1999; Landry *et al.* 2000; Landry *et al.* 2002).

È possibile dunque, alla St. LTER-MC, che in primavera la catena trofica microbica segua un percorso alternativo. I dinoflagellati esercitano una predazione preferenziale sul comparto autotrofo avendo la possibilità di predare le grandi diatomee, che danno vita ai picchi fitoplanctonici primaverili (Ribera d'Alcalà *et al.* 2004), così che la pressione predatoria normalmente esercitata sui ciliati viene ad essere allentata, lasciando a disposizione dei livelli trofici superiori più del 90% della produzione microzooplanctonica. In condizioni di *bloom* elevati, cioè in presenza di concentrazioni di clorofilla superiori ai  $6 \mu\text{g L}^{-1}$ , si assiste ad una forma di saturazione e la predazione sul comparto autotrofo si mantiene stabile ( $\sim 0.1-0.6 \text{ d}^{-1}$ ) (Fig. 46). È proprio nel periodo tardo primaverile-estivo che sulla St. LTER-MC si registrano le maggiori concentrazioni di metazoi (Fig. 31) (Mazzocchi & Ribera d'Alcalà 1995; Ribera d'Alcalà *et al.* 2004), i quali avranno a disposizione non solo grandi quantità di risorsa autotrofa ma, come si è detto, anche microzooplanctonica.

Sulla base dei dati ottenuti è possibile inoltre distinguere anche chi tra le componenti del microzooplancton risulta essere a maggiore disposizione dei metazoi. I nostri risultati evidenziano la presenza di una forte pressione predatoria, esercitata soprattutto dai dinoflagellati sulla componente a ciliati. Lungo il corso dell'anno i ciliati, sia maggiori che minori di  $20 \mu\text{m ESD}$ , producono la parte più sostanziosa (70%) di tutta la produzione microzooplanctonica ma, al tempo stesso, di tale produzione ne rimane ben poca a disposizione dei livelli trofici superiori (20% in media). È ragionevole sostenere che la produzione dei ciliati sia quella che viene riciclata all'interno del comparto e utilizzata per il sostentamento e l'accrescimento dei protozoi stessi, mentre la

produzione dei dinoflagellati, che viene consumata in misura minore dagli altri protozoi, risulta a disposizione dei metazoi.

È esattamente nel quadro generale della rete trofica pelagica che i risultati della nostra ricerca devono essere valutati. La determinazione della produzione microzooplanctonica e dell'ammontare della stessa che viene riciclata all'interno del comparto è necessaria per far luce sui flussi di carbonio che sono diretti verso i livelli trofici superiori. Una parte di questo carbonio può essere incanalato verso il fondo oceanico sotto forma di *faecal pellets*, ma la maggior parte è riciclata all'interno del comparto microzooplanctonico e re-immessa in atmosfera attraverso la respirazione degli organismi coinvolti in questi numerosi passaggi. Questo implica che il bilancio di carbonio sottratto e restituito all'atmosfera deve essere rivisto.

## 8. CONCLUSIONI

La ricerca è stata condotta con l'obiettivo di determinare l'entità e il destino della produzione microzooplanctonica. Il primo passo è stato la messa a punto di un protocollo sperimentale per ottenere 1) i tassi di crescita potenziale del microzooplancton (nanociliati, ciliati  $<20\mu\text{m}$  e dinoflagellati) in presenza di concentrazioni di risorse alimentari simili a quelle *in situ* e in assenza di predazione sia mesozooplanctonica che microzooplanctonica; 2) il tasso di predazione che i protozoi esercitano sul resto del comparto microzooplanctonico.

I tassi di crescita potenziale sono risultati molto simili ai massimi tassi di crescita riportati in letteratura per colture monoclonali di protozoi. Ciò potrebbe indicare che i protozoi a mare raggiungono tassi di crescita massimi come già ipotizzato da Nielsen e Kjørboe (1994).

Dai dati sperimentali è stata calcolata la produzione microzooplanctonica per lo strato superficiale della St. LTER-MC. La produzione potenziale del microzooplancton è risultata molto elevata, fino a  $532 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , e la maggior parte di questa produzione, in media il 72%, è consumata all'interno dello stesso comparto. Ciò dimostra sia l'efficiente controllo interno al popolamento dei protozoi sia che, con i numerosi passaggi trofici all'interno del comparto, buona parte della produzione microzooplanctonica è "persa" in respirazione.

La parte della produzione potenziale del microzooplancton disponibile per il mesozooplancton va da un minimo del 3% in inverno a un massimo del 47% in estate. E' interessante notare che il mesozooplancton raggiunge il suo massimo in estate mentre in inverno presenta abbondanze minime.

Le informazioni ottenute con questa ricerca hanno importanti applicazioni sia nell'elaborazione di modelli sui flussi di materia e energia nell'ecosistema pelagico sia nelle previsioni degli scambi di anidride carbonica tra atmosfera e oceano.

## BIBLIOGRAFIA

- Archer, S., P. Verity, et al. (2000). "Impact of microzooplankton on the progression and fate of the spring bloom in fjords of northern Norway." *Aquatic Microbial. Ecology* **22**: 27-41.
- Azam, F., T. Fenchel, et al. (1983). "The Ecological role of Water column microbes in the Sea." *Marine Ecology Progress Series* **10**: 257-263.
- Batten, S., E. Fileman, et al. (2001). "The contribution of microzooplankton to the diet of mesozooplankton in an upwelling filament off the north west coast of Spain." *Progress in Oceanography* **51**: 385-398.
- Behrenfeld, M., R. O'Malley, et al. (2006). "Climate driven trends in contemporary ocean productivity Enzo 1327." *Nature* **444**: 752-755.
- Berninger, U. and S. Wickham (2005). "Response of the microbial food web to manipulation of nutrients and grazers in the oligotrophic Gulf of Aqaba and Northern Red Sea." *Marine Biology* **147**: 1017-1032.
- Boenigk, J. and G. Novarino (2004). "Effect of suspended clay on the feeding and growth of bacterivorous flagellates and ciliates." *Aquatic Microbial. Ecology* **34**: 181-192.
- Bopp, L., O. Aumont, et al. (2005). "Response of diatoms distribution to global warming and potential implications: A global model study." *Geophysical Research Lett* **32**: L19606, doi:10.1029/2005GL023653. .
- Boyd, P., S. Strom, et al. (1995). "The NE subarctic Pacific in winter: II. Biological rate processes." *Marine Ecology Progress Series* **128**: 25-34.
- Broglio, E., E. Saiz, et al. (2004). "Trophic impact and prey selection by crustacean zooplankton on the microbial communities of an oligotrophic coastal area (NW Mediterranean Sea)." *Aquatic Microbial. Ecology* **35**: 65-78.
- Buskey, E. and C. Hyatt (1995). "Effects of the Texas (USA) brown tide alga on planktonic grazers." *Marine Ecology Progress. Series* **126**: 285-292.
- Calbet, A. (2001). "Mesozooplankton grazing effect on primary production: a global comparative analysis in marine ecosystems." *Limnology Oceanography* **46**: 1824-1830.
- Calbet, A. and M. Landry (2004). "Phytoplankton growth, microzooplankton grazing and carbon cycling in marine systems." *LO* **49**: 51-57.
- Calbet, A. and E. Saiz (2005). "The ciliate copepod link in marine ecosystems." *Aquatic Microbial Ecology* **38**: 157-167.

- Calbet, A., I. Trepas, et al. (2008). "Impact of micro- and nanograzers on phytoplankton assessed by standard and size-fractionated dilution grazing experiments." *Aquatic Microbial Ecology* **50**: 145-156.
- Caron, D., H. Dam, et al. (1995). "The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface water of the Sargasso Sea near Bermuda." *Deep-Sea Research II* **42**: 943-972.
- Caron, D., M. Dennett, et al. (2000). "Microzooplankton herbivory in the Ross sea Antarctica." *Deep Sea Res.* **47 II**: 3249-3272.
- Carrada, G., M. Marino, et al. (1981). "Variazioni spaziali in acque superficiali di nutrienti, clorofilla ed associazioni fitoplanctoniche nel Golfo di Napoli." *Quaderni del Laboratorio di Tecnologia della Pesca, Ancona (X Congr. SIBM)* **3(1)**: 419-434.
- Carrias, J., A. Thouvenot, et al. (2001). "Dynamics and growth estimates of planktonic protists during early spring in Lake Pavin France." *Aquatic Microbial Ecology* **24**: 163-174.
- Casotti, R., C. Brunet, et al. (2000). "Mesoscale features of phytoplankton and planktonic bacteria in a coastal area as induced by external water masses." *Marine Ecology Progress Series* **195**: 15-27.
- Corlis, J., Ed. (1979). *The ciliated protozoa, Characterization, classification and guide to the literature*, Pergamon press.
- Daufresne, M., K. Lengfellner, et al. (2009). "Global warming benefits the small in aquatic ecosystems." *PNAS* **106**: 12788-12793.
- Del Giorgio, P., J. Cole, et al. (1997). "Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems." *Nature*: 148-151.
- Dini, F. and D. Nyberg (1998). "Growth Rates of Marine Ciliates on Diverse Organisms Reveal Ecological Specializations within Morphospecies." *Microbial Ecology* **37**: 13-22.
- Dolan, J. and C. Gallegos (2001). "Estuarine diversity of tintinnids (planktonic ciliates)." *Journal of Plankton Research*. **23**: 1009-1027.
- Dolan, J., C. Gallegos, et al. (2000). "Dilution effects on microzooplankton in dilution grazing experiments." *Marine Ecology Progress Series*. **200**: 127-139.
- Dolan, J. and K. McKeon (2005). "The reliability of grazing rate estimates from dilution experiments: have we overestimated rates of organic carbon consumption by microzooplankton?" *Ocean Science* **1**: 1-7.
- Doney, S., V. Fabry, et al. (2009a). "Ocean acidification: the other CO<sub>2</sub> problem." *Ann. Rev. Mar. Sci.* **1**: 169-192.
- Ducklow, H. W., D. Steinberg, et al. (2001). "Upper ocean carbon export and the biological pump." *Oceanography* **14(4)**: 50-58.

- Escaravage, V. and K. Soetaert (1995). "Secondary production of the brackish copepod communities and their contribution to the carbon fluxes in the Westerschelde estuary (The Netherlands)." Hydrobiologia **311**: 103-114.
- Falkowski, P. and M. Oliver (2007). "Mix and match: how climate selects phytoplankton." Nature Reviews Microbiology **5**: 813-819.
- Falkowski, P. and C. Wilson (1992). "Phytoplankton productivity in the North Pacific ocean since 1900 and implications for absorption of anthropogenic CO<sub>2</sub>." Nature **358**(27 August): 741-743.
- Feely, R., T. Takahashi, et al. (2006). "Decadal variability of the air-sea CO<sub>2</sub> fluxes in the equatorial Pacific Ocean." Journal of Geophysical Research **111**: C07S03.
- Fenchel, T. (1968). "The ecology of marine microbenthos. III The reproductive potential of ciliates" Ophelia **5**: 123-136.
- Finlay, B. (1977). "The dependence of reproductive rate on cell size and temperature in freshwater ciliated protozoa." Oecologia **30**: 75-81.
- First, M. and P. Lavrentyev (2007). "Patterns of microzooplankton growth in dilution experiments across trophic gradient: Implications for herbivory studies." Marine Biology **151**: 1929-1940.
- Fonda Umani, S. and A. Beran (2003). "Seasonal variations in the dynamics of microbial plankton communities: first estimates from experiments in the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea." Marine Ecology Progress Series **247**: 1-16.
- Gallegos, C., W. Vant, et al. (1996). "Microzooplankton grazing of phytoplankton in Manukau Harbour, New Zealand." NZ Journal of Marine Freshwater Research **30**: 423-34.
- Gaul, W. and A. Antia (2001). "Taxon-specific growth and selective microzooplankton grazing of phytoplankton in the Northeast Atlantic." Journal of Marine Systems **30**: 241-261.
- Gifford, D. (1991). "The protozoan-metazoan trophic link in pelagic ecosystems." Journal of Protozoology **38**(1): 81-86.
- Gifford, D. and D. Caron (2000). Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton. ICES Zooplankton Methodology Manual, Academic Press: 193-221.
- Gifford, J. (1985). "Laboratory culture of marine planktonic oligotrichs (Ciliophora, Oligotrichida)." Marine Ecology Progress Series **23**: 257-267.
- Gustafson, D., D. Stoecker, et al. (2000). "Cryptophyte algae are robbed of their organelles by the marine ciliate *Mesodinium rubrum*." Nature **405**: 1049-1052.
- Hansen, P. and T. Fenchel (2006). "The bloom-forming ciliate *Mesodinium rubrum* harbours a single permanent endosymbiont." Marine Biology Research **2**: 169-177.
- Holm Hansen, O., C. Lorenzen, et al. (1965). "Fluorimetric determination of chlorophyll." J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer. **30**(1): 3-15.



- Honjo, S. (2004). "Particle export and the biological pump in the Southern Ocean." *Antarctic Science* **16**(4): 501-516.
- Jeong, H. (1999). "The ecological roles of heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic communities." *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**(4): 390-396.
- Johnson, M. and D. Stoecker (2005). "Role of feeding in growth and photophysiology of *Myrionecta rubra*." *Aquatic Microbial Ecology* **39**(3): 303-312.
- Kirchman, Ed. (2008). *Microbial Ecology of the Oceans*, John Wiley & Sons, Inc.
- Kleppel, G. (1993). "On the diets of calanoid copepods." *Marine Ecology Progress Series* **99**: 183-195.
- Landry, M., Ed. (1993). *Estimating rates of growth and grazing mortality of phytoplankton by the dilution method*. Handbook of methods in aquatic microbial ecology, Lewis Publishers, Ann Arbor.
- Landry, M., R. Barber, et al. (1997). "Iron and grazing constraints on primary production in the central equatorial Pacific: an EqPac synthesis." *Limnology and Oceanography* **42**(3): 405-418.
- Landry, M., S. Brown, et al. (1998). "Spatial patterns in phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the Arabian Sea during monsoon forcing." *Deep Sea Research II* **45**: 2353-2368.
- Landry, M. and A. Calbet (2004). "Microzooplankton production in the oceans." *Journal of Marine Science* **61**: 501-507.
- Landry, M., J. Constantinou, et al. (2000). "Biological response to iron fertilization in the eastern equatorial Pacific (Ironex II). III. Dynamics of phytoplankton growth and microzooplankton grazing." *Marine Ecology Progress Series* **201**: 57-72.
- Landry, M. and R. Hassett (1982). "Estimating the grazing impact of marine microzooplankton." *Marine Biology* **67**: 283-288.
- Landry, M., K. Selph, et al. (2002). "Seasonal dynamics of phytoplankton in the Antarctic Polar Front region at 170°W." *Deep Sea Research II* **49**: 1843-1865.
- Laws, E., M. Landry, et al. (2000). "Carbon cycling in primary production bottle incubations: Inferences from grazing experiments and photosynthetic studies using <sup>14</sup>C and <sup>18</sup>O in the Arabian Sea." *Deep-Sea Research II* **47**: 1339-1352.
- Laybourn-Parry, Ed. (1991). *Protozoan energetics - session summary*. Protozoa and their role in marine processes. Berlin, Springer-Verlag.
- Leandro, S., F. Morgado, et al. (2007). "Temporal changes of abundance, biomass and production of copepod community in a shallow temperate estuary (Ria de Aveiro, Portugal)." *Estuarine Coastal and Shelf Science* **74**: 215-222.
- Lee, J., G. Leedale, et al., Eds. (2000). *The illustrated guide of the Protozoa*, Society of protozoologists.

- Lessard, E. (1991). "The trophic role of heterotrophic dinoflagellates in diverse marine environments." Marine Microb FW **5**(1): 49-58.
- Lessard, E. and E. Swift (1986). "Dinoflagellates from the North Atlantic classified as phototrophic or heterotrophic by epifluorescence microscopy." Journal of Plankton Research **8**: 1209-1215.
- Liu, H. and E. Buskey (2000). "The exopolymer secretions (EPS) layer surrounding *Aureoumbra lagunensis* cells affects growth, grazing, and behavior of protozoa." Limnology Oceanography **45**(5): 1187-1191.
- Liu, H., K. Suzuki, et al. (2002). "Phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the subarctic Pacific Ocean and the Bering Sea during summer 1999." Deep Sea Res. I **49**: 363-375.
- Longhurst, A. (1991). "Role of the marine biosphere in the global carbon cycle." Limnology Oceanography **36**(8): 1507-1526.
- Mazzocchi, M. and M. Ribera d'Alcalà (1995). "Recurrent patterns in zooplankton structure and succession in a variable coastal environment." ICES Journal of Marine Science **52**: 679-691.
- McManus, G. and J. Fuhrman (1986). "Bacterivory in seawater studied with the use of inert fluorescent particles." Limnology Oceanography **31**(2): 420-426.
- Modigh, M. (2001). "Seasonal variations of photosynthetic ciliates at a Mediterranean coastal site." Aquatic Microbial Ecology **23**: 163-175.
- Modigh, M. and S. Castaldo (2002). "Variability and persistence in tintinnid assemblages at a Mediterranean coastal site." Aquatic Microbial Ecology **28**: 299-311.
- Modigh, M. and G. Franzé (2009). "Changes in phytoplankton and microzooplankton populations during grazing experiments at a Mediterranean coastal site." Journal of Plankton Research **10.1093/plankt/fbp035**.
- Modigh, M., V. Saggiomo, et al. (1996). "Conservative features of picoplankton in a Mediterranean eutrophic area, the Bay of Naples." Journal of Plankton Research **18**(1): 87-95.
- Montagnes, D. (1996). "Growth responses of planktonic ciliates in the genera *Strobilidium* and *Strombidium*." Marine Ecology Progress Series **130**: 241-254.
- Montagnes, D., J. Roff, et al. (1988). "The annual cycle of heterotrophic planktonic ciliates in the water surrounding the Isle of Shoals, Gulf of Maine: assessment of their trophic role." Marine Biology **99**: 21-30.
- Muller, H. and W. Geller (1993). "Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered." Arch Hydrobiol **126**: 315-327.

- Murrell, M. and J. Hollibaugh (1998). "Microzooplankton grazing in Northern San Francisco Bay measured by the dilution method." Aquatic Microbial. Ecology **15**: 53-63.
- Nakamura, Y. (1998). "Growth and grazing of a large heterotrophic dinoflagellate, *Noctiluca scintillans*, in laboratory cultures." Journal of Plankton Research **20**(9): 1711-1720.
- Nielsen, T. and T. Kiorboe (1994). "Regulation of zooplankton biomass and production in a temperate, coastal ecosystem. @. Ciliates." Limnology Oceanography **39**(3): 508-519.
- Packard, T., D. Blasco, et al., Eds. (1978). Mesodinium rubrum in the Baja California upwelling system. Upwelling ecosystem. Berlin, Boje, Tomczak.
- Paffenhöfer, G. (1998). "Heterotrophic protozoa and small metazoa: feeding rates and prey consumer interactions." Journal of Plankton Research **20**(1): 121-133.
- Paffenhofer, G., B. Sherr, et al. (2007). "From small scale to the big picture: persistence mechanisms of planktonic grazers in the oligotrophic ocean." Marine Ecology **28**: 243-253.
- Pedersen, M. and P. Hansen (2003). "Effects of high pH on the growth and survival of six marine heterotrophic protists." Marine Ecology Progress Series **260**: 33-41.
- Perez, M., J. Dolan, et al. (1997). "Planktonic oligotrich ciliates in the NW Mediterranean: growth rates and consumption by copepods." Marine Ecology Progress Series **155**: 89-101.
- Pomeroy, L. R. (1974). "The ocean's food web: A changing paradigm." BioScience **24**: 499-504.
- Putt, M. and D. Stoecker (1989). "An experimentally determined carbon : volume ratio for marine "oligotrichous" ciliates from estuarine and coastal waters." Limnology Oceanography **34**(6): 1097-1103.
- Quevedo, M. and R. Anadon (2001). "Protist control of phytoplankton growth in the subtropical north-east Atlantic." Marine Ecology Progress Series **221**: 29-38.
- Rassoulzadegan, F. (2008). Marine microbial loop. Washington, D.C., Eds. Cutler J. Cleveland.
- Reckermann, M. and M. Veldhuis (1997). "Trophic interactions between picophytoplankton and micro- and nanozooplankton in the western Arabian Sea during the NE monsoon 1993." Aquatic Microbial. Ecology **12**: 263-273.
- Ribera d'Alcalà, M., F. Conversano, et al. (2004). "Seasonal patterns in plankton communities in a pluriannual time series at a coastal Mediterranean site (Gulf of Naples): an attempt to discriminate between recurrences and trends." Scientia Marina **68**(suppl 1): 65-83.

- Ribera d'Alcalà, M., M. Modigh, et al. (1989). "Una storia infinita. Eutrofizzazione nella baia di Napoli." *Oebalia* **15**: 491-501.
- Rivkin, R. and L. Legendre (2001). "Biogenic carbon cycling in upper ocean: Effects of microbial respiration." *Science* **291**: 2398-2400.
- Rose, J. and D. Caron (2007). "Does temperature constrain the growth rates of heterotrophic protists? Evidence and implications for algal bloom in a cold water." *Limnology Oceanography* **52**(2): 886-895.
- Ryther, J. (1969). "Photosynthesis and fish production in the sea." *Science* **166**: 72-76.
- Santarpia, I. (2006). "Ultraplankton in marine ecosystem: from diel to seasonal cycle." *PhD Thesis Università degli Studi di Napoli Federico II*: pp 165.
- Sarmiento, J., M. Gloor, et al. (2009). "Trends and regional distributions of land and ocean carbon sinks." *Biogeosciences Discuss.* **6**: 10583-10624.
- Satta, M., S. Agusti, et al. (1996). "Microplankton respiration and net community metabolism in a bay on the NW Mediterranean coast." *Aquatic Microbial Ecology* **10**(165-172).
- Scotto di Carlo, B., C. Tomas, et al. (1985). "Uno studio integrato dell'ecosistema pelagico costiero del Golfo di Napoli." *Nova Thalassia* **7**(3): 99-128.
- Sherr, B., E. Sherr, et al. (1986). "Trophic interactions between heterotrophic Protozoa and bacterioplankton in estuarine water analyzed with selective metabolic inhibitors." *Marine Ecology Progress Series* **32**: 169-179.
- Sherr, B., E. Sherr, et al. (1988). "Trophic interactions within microbial communities: Indications of feedback regulation of carbon flow." *Hydrobiologia* **159**: 19-26.
- Sherr, E. and B. Sherr (1988). "Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept." *Limnology Oceanography* **33**(5): 1225-1227.
- Sherr, E. and B. Sherr (2002). "Significance of predation by protists in aquatic microbial food web." *Antonie Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbial* **81**: 293-308.
- Sherr, E. and B. Sherr (2007). "Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea." *Marine Ecology Progress Series* **352**: 187-197.
- Sherr, E., B. Sherr, et al. (2009). "Microzooplankton grazing impact in the Western Arctic Ocea." *Deep-Sea Research II* **56**: 1264-1273.
- Sherr, E., B. Sherr, et al. (2003). "Temporal and spatial variation in stocks of autotrophic and heterotrophic microbes in the upper water column of the central Arctic Ocean." *Deep-Sea Research I* **50**: 557-571.
- Sieburth, J., V. Smetacek, et al. (1978). "Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions." *Limnology Oceanography* **23**(6): 1256-1263.
- Smith, W. and R. Barber (1979). "A carbon budget for the autotrophic ciliate *Mesodinium rubrum*." *Journal of Phycology* **15**: 27-33.

- Steel, J. (1974). *Structure of Marine Ecosystems*, Harvard University Press.
- Stoecker, D. and N. Sanders (1985). "Differential grazing by *Acartia tonsa* on a dinoflagellate and a tintinnid." *Journal of Plankton Research* **7**(1): 85-100.
- Strom, S., Macri EL, Olson MB (2007). "Microzooplankton grazing in the coastal Gulf of Alaska: Variations in top-down control of phytoplankton." *Limnology Oceanography* **52**(4): 1480-1494.
- Tsai, A., K. Chiang, et al. (2008). "Seasonal variations in trophic dynamics of nanoflagellates and picoplankton in coastal waters of the western subtropical Pacific Ocean." *Aquatic Microbial Ecology* **51**: 263-274.
- Turner, J. and E. Graneli (1992). "Zooplankton feeding ecology : grazing during enclosure studies of phytoplankton blooms from the west coast of Sweden." *Journal of Experimental Marine Biology Ecology* **157**: 19-31.
- Uye, S. and D. Liang (1998). "Copepods attain high abundance, biomass and production in the absence of large predators but suffer cannibalistic loss." *Journal of Marine Systems* **15**: 495-501.
- Verity, P. and C. Langdon (1984). "Relationship between lorica volume, carbon and nitrogen and ATP content of tintinnids in Narragansett Bay." *Journal of Plankton Research* **6**(5): 859-868.
- Verity, P., C. Robertson, et al. (1992). "Relationship between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton." *Limnology Oceanography* **37**(7): 1434-1446.
- Verity, P., D. Stoecker, et al. (1993). "Grazing, growth and mortality of microzooplankton during 1989 North Atlantic spring bloom at 47 N, 18 W." *Deep Sea Res.* **40**(9): 1793-1814.
- Waterbury, J., S. Watson, et al. (1979). "Widespread occurrence of a unicellular marine planktonic cyanobacterium." *Nature* **277**(25 January): 293-294.
- Weisse, T., N. Karstens, et al. (2001). "Niche separation in common prostome freshwater ciliates: the effect of food and temperature." *Aquatic Microbial Ecology* **26**: 167-179.
- Weisse, T. and D. Montagnes (1998). "Effect of temperature on inter and intraspecific isolates of *Urotricha* (Prostomatida, Ciliophora)." *Aquatic Microbial Ecology* **15**: 285-291.
- Wilkerson, F. and G. Grunseich (1990). "Formation of blooms by the symbiotic ciliate *Mesodinium rubrum*: the significance of nitrogen uptake." *Journal of Plankton Research* **12**: 973-989.
- Yih, W., H. Kim, et al. (2004). "Ingestion of cryptophyte cells by marine photosynthetic ciliate *Mesodinium rubrum*." *Aquatic Microbial Ecology* **36**: 165-170.
- Zimov, S., E. Schuur, et al. (2006). "Permafrost and the global carbon budget." *Science* **312**: 1612-13.

- Zingone, A., L. Dubroca, et al. (2009). "Coastal phytoplankton do not rest in winter." Estuaries and Coasts **10.1007/s12237-009-9157-9**.
- Zingone, A., M. Montresor, et al. (1990). "Summer phytoplankton physiognomy in coastal waters of the Gulf of Naples." Publication S.Z.N. Marine Ecology **11(2)**: 157-172.