



ENTE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E L'AMBIENTE

Dipartimento Ambiente

IL MICROZOOPLANKTON E LA SUA DISTRIBUZIONE NEI DIVERSI AMBIENTI

C. CREO

ENEA - Dipartimento Ambiente
Centro Ricerche Casaccia, Roma

P. GRENNI

RT/AMB/99/19

Nel corso della ricerca descritta nel presente Rapporto Tecnico
P. GRENNI era ospite dell'ENEA in qualità di borsista

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA
rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Ente.

DISCLAIMER

Portions of this document may be illegible in electronic image products. Images are produced from the best available original document.

ABSTRACT

The microzooplankton and its distribution in different aquatic environments

In this work, some examples of studies performed with the use of microzooplankton as biological indicator are reported.

KEYWORDS: microzooplankton, biological indicator, aquatic environment, epifluorescence.

RIASSUNTO

Scopo del lavoro è quello di dimostrare come lo studio della distribuzione del microzooplankton in ambienti acquatici, possa permettere la caratterizzazione trofica dell'ambiente oggetto di studio. Il microzooplankton, infatti, essendo un componente fondamentale della catena trofica di differenti ambienti acquatici, può essere considerato un buon "indicatore biologico". È quindi riportata un'ampia ed approfondita analisi sistematica, necessaria al fine di individuarne le diverse specie dalla cui presenza (oltreché dal numero degli esemplari) è possibile desumere lo stato chimico-fisico e trofico di un determinato ambiente acquatico. Sono poi indicati i diversi metodi per il campionamento, la conservazione, la concentrazione ed il conteggio del microzooplankton; in particolare per la concentrazione ed il conteggio sono indicate e sperimentate nuove tecniche effettuate rispettivamente con l'ausilio della concentrazione dei campioni a flusso tangenziale e con l'utilizzo di coloranti fluorescenti.

INDICE

INTRODUZIONE	7
1- LA COMPONENTE MICROZOOPLANKTONICA IN AMBIENTE ACQUATICO: FINALITÀ E MODALITÀ DI SVILUPPO DEL LAVORO.....	8
2- GLI ORGANISMI DEL MICROZOOPLANKTON ED IL LORO RAPPORTO CON IL NANOPLANKTON	10
3- ANALISI SISTEMATICA DEI PROTOZOI.....	14
4- LE MODALITÀ DI TRATTAMENTO DEI CAMPIONI: RACCOLTA, CONSERVAZIONE, CONCENTRAZIONE E CONTEGGIO	20
4.1. Raccolta.....	21
4.2. Conservazione dei campioni prelevati.....	22
4.3. Concentrazione dei campioni.....	25
4.4. Conteggio dei campioni.....	28
4.4.1 Osservazione al microscopio.....	28
5- IL RUOLO DEL MICROZOOPLANKTON NELLA CATENA TROFICA	35
5.1. Rapporti tra i popolamenti microzooplanctonico e fitoplanctonico.....	37
5.2. Il riciclo dei sali nutritivi.....	38
5.3. Organismi autotrofi e mixotrofi.....	39
6- IL MICROZOOPLANKTON COME INDICATORE AMBIENTALE	41
6.1: Gli indicatori ambientali biologici.....	41
6.2: Il microzooplancton come indicatore biologico.....	43
6.3: L'utilizzo dei Ciliati in prove di laboratorio.....	51
6.4. Prove <u>in situ</u>	55
6.5. Indici biologici.....	58
7- GLI AMBIENTI DI DISTRIBUZIONE MICROZOOPLANKTONICA E RELAZIONI DI TALI ORGANISMI CON LE MASSE D'ACQUA.....	59
7.1. Il Mediterraneo.....	59
7.1.1 Il Mar Tirreno	59
7.1.2 L'Adriatico.....	63
7.1.3 Golfo di Napoli.....	66
7.1.4 Stretto di Messina.....	67
7.1.5 Altre zone mediterranee.....	67
7.2 Altri mari.....	68
7.3 Ecosistemi di acque dolci.....	70
7.4. Ecosistemi di acque salmastre.....	74
8- CONCLUSIONI.....	79
Ringraziamenti	80
BIBLIOGRAFIA	81
ALLEGATO: FIGURE E TABELLE.....	101

IL MICROZOOPLANKTON E LA SUA DISTRIBUZIONE IN DIVERSI AMBIENTI ACQUATICI

INTRODUZIONE

Il presente lavoro nasce dall'esigenza di individuare all'interno della componente biologica di un ecosistema acquatico, dei buoni indicatori di livello trofico. A tale scopo è stato preso in considerazione il microzooplankton e attraverso lo studio della sua distribuzione in diversi ambienti acquatici (marino, acquidulcicolo, salmastro), è stata verificata la validità del loro utilizzo in questo contesto. A tal fine sono descritte le sue caratteristiche peculiari ed il suo ruolo nella catena trofica. È altresì compiuta un'ampia ed approfondita analisi sistematica, necessaria al fine di individuarne le diverse specie dalla cui presenza (oltreché dal numero degli esemplari) è possibile desumere lo stato chimico-fisico e trofico di un determinato ambiente acquatico. Sono poi indicati i diversi metodi per il campionamento, la conservazione, la concentrazione ed il conteggio del microzooplankton; in particolare per la concentrazione ed il conteggio (l'analisi) sono indicate e sperimentate nuove tecniche effettuate rispettivamente con l'ausilio della concentrazione dei campioni a flusso tangenziale e con l'utilizzo di coloranti fluorescenti.

Sono altresì approfonditi studi tassonomici ed ecologici, volti a verificare la presenza del microzooplankton nonché le sue caratteristiche in diversi ecosistemi, quali l'ambiente marino, dulciacquicolo e salmastro.

In particolare, sono stati presi in considerazione i risultati ottenuti in alcune attività di ricerca relative al microzooplankton e svolte a partire dal 1989. Il primo studio considerato è relativo ai risultati ottenuti da campagne effettuate nel Tirreno toscano nell'ambito del "Progetto mare" coordinato dalla Prof.ssa Serena Fonda Umani dell'Università di Trieste.

Nel Mar Mediterraneo, inoltre, sono state considerate anche altre diverse zone di mari italiani (Adriatico, Golfo di Napoli, Stretto di Messina). L'analisi microzooplanctonica in ambiente marino si conclude con il richiamo ad altri mari diversi dal Mediterraneo.

Sono presi in considerazione anche ambienti di acque dolci nei quali è stata messa in evidenza, in particolare, la relazione esistente tra lo stato trofico dell'acqua e la presenza-assenza e/o abbondanza di diverse specie di organismi microzooplanctonici.

Per lo studio del microzooplancton in ambienti lagunari si fa poi cenno ai risultati di alcune attività relative alla Laguna di Venezia e alle Lagune di Fogliano e Caprolace (Parco Nazionale del Circeo - Latina).

In particolare, analisi e studi della componente microzooplanctonica sono state svolte nell'ambiente salmastro della Laguna di Venezia, nell'ambito del progetto "Biogeochimico II" (1993-94) realizzato per conto del Consorzio Venezia Nuova, dall'ENEA e da FISIA s.r.l.

Un ulteriore approfondimento di questa tematica è stato possibile attraverso le attività relative alla borsa di studio bandita dall'ENEA (n. 17/94) sul "Microzooplancton in ambienti lagunari" nel corso delle quali è stato possibile mettere a punto nuove tecniche di concentrazione e conteggio degli organismi planctonici. Tale borsa di studio è stata svolta nell'ambito del Progetto di ricerca congiunto dell'ENEA e dell'Istituto di Idrobiologia del Ministero delle Politiche Agricole, a sua volta compreso nel Programma per lo "Sviluppo dell'acquacoltura nazionale" (D.M. 585/7240/93), Sottoprogetto "Ricerca e sviluppo di modelli ed indicatori ecologici e di sistemi esperti di monitoraggio ambientale per la gestione delle zone umide salmastre ai fini dell'acquacoltura". Le relative analisi sono state effettuate tra la primavera 1995 e l'inverno 1996 nelle Lagune Pontine (Parco Nazionale del Circeo).

1- La componente microzooplanctonica in ambiente acquatico: finalità e modalità di sviluppo del lavoro.

In ogni sistema acquatico sono individuabili tre componenti biologiche, distinte tra loro per le differenti modalità che caratterizzano il loro rapporto con l'ambiente: il necton (solo animale), il bentos ed il plancton (con organismi sia animali, sia vegetali). Va sottolineato che tali componenti biologiche sono strettamente connesse ed interdipendenti tanto che, in alcuni casi, una stessa specie biologica, a seconda della fase del proprio ciclo vitale, appartiene ad una componente o all'altra. In particolare:

a) il necton è costituito da organismi che vivono sospesi nell'acqua e che possiedono movimenti propri, tali da vincere le correnti e, quindi, da permettere loro di spostarsi liberamente nell'ambiente. Tra di essi, alcuni passano in tale condizione l'intero loro ciclo vitale, altri divengono "nectonici" una volta divenuti individui adulti, mutando le loro caratteristiche (un esempio per tutti è dato dai pesci).

b) Il benthos comprende organismi che vivono sul fondo dell'ambiente acquatico, aderendovi in modo stanziale (si hanno così le "forme sessili", come i Coralli o alcuni Molluschi Bivalvi), o muovendosi sullo stesso (si hanno così le "forme vagili", come i Crostacei e i Gasteropodi).

c) Il plancton, è costituita da organismi, animali (zooplancton) e vegetali (fitoplancton), che vivono nelle acque dolci e marine fluttuando in esse, senza avere contatti con il fondo (sono quindi per questo distinti dal benthos). I loro scarsi mezzi di locomozione non consentono loro di superare le correnti e sono da queste trasportati, grazie anche al loro peso specifico quasi uguale a quello dell'acqua, alle loro piccole o piccolissime dimensioni, nonché, in alcuni casi, alla presenza di particolari organi idrostatici.

L'accennata interdipendenza tra le componenti biologiche comporta che, anche nel plancton, siano individuabili organismi che sono planctonici per tutto il loro ciclo vitale (oloplanctonici) o che lo sono per un periodo limitato della loro esistenza (meroplanctonici; a titolo esemplificativo si ricordano le uova o gli stadi larvali di pesci e crostacei).

Gli studi effettuati sul plancton hanno contribuito alla elaborazione di diversi criteri per la sua classificazione; tra essi ha particolare rilevanza quello "dimensionale" (UNESCO, 1968; Ghirardelli, 1981; Trégouboff & Rose, 1957; Sieburth, 1982) che distingue gli organismi planctonici, animali (zooplancton) o vegetali (fitoplancton), a seconda della loro differente grandezza. Tale classificazione suddivide gli organismi dal punto di vista tassonomico e corrisponde ad altrettanti classi trofiche presenti in acqua; solo le prime due più piccole categorie dimensionali includono, a parte alcune e rare eccezioni, il fitoplancton (cioè i produttori primari), mentre le altre categorie sono costituite quasi esclusivamente dallo zooplancton (eterotrofo, cioè da organismi consumatori), suddiviso in organismi via via di maggiori dimensioni.

In particolare, secondo la classificazione dimensionale, si individua:

- il *picoplancton*: con organismi di dimensioni $< 2 \mu\text{m}$, essenzialmente i batteri eterotrofi ed i cianobatteri;
- il *nanoplancton*: con organismi da 2 a $20 \mu\text{m}$, come i Flagellati, sia eterotrofi che fotosintetici; le Amebe, i piccoli Ciliati e le Diatomee;
- il *microplancton*: con organismi da $20 \mu\text{m}$ a $200 \mu\text{m}$, quali i Ciliati o i Radiolari di piccole dimensioni, oppure molte Diatomee e Dinoflagellati fotosintetici;

- il *mesoplancton*: con organismi da 200 μm a 5 mm (come, ad esempio, i Protozoi di maggiori dimensioni quali i Radiolari ed i Foraminiferi, ma anche alcune specie di Diatomee che si collocano in questa classe dimensionale nonostante siano organismi fotosintetici; tra i Metazoi sono inclusi piccoli Crostacei planctonici);
- il *macroplancton*: che comprende organismi con dimensioni tra i 5 mm e i 5 cm, quali alcuni Crostacei o i Chetognati;
- il *megaplancton*: che include gli organismi più grandi di dimensioni maggiori di 5 cm quali, ad esempio, alcune Meduse.

In questa sede viene considerato il *microzooplancton*, (cioè il microplancton eterotrofo) *con particolare riferimento alla classe dimensionale compresa tra 20 μm e 200 μm* . Esso è un componente fondamentale della catena trofica, in quanto trasferisce l'energia e la biomassa presente nel fitoplancton (prodotta cioè dagli organismi presenti nel "picoplancton" e nel "nanoplancton") ai successivi anelli della catena trofica, cioè a tutti gli organismi consumatori caratterizzanti le maggiori categorie dimensionali. Per tale sua particolarissima ed insostituibile funzione, il microzooplancton può assurgere ad "indicatore ambientale", nel senso di indicatore di uno stato trofico di un ambiente, soprattutto se posto in correlazione con altre componenti planctoniche, in particolare con il fitoplancton. La sua analisi (peraltro poco dispendiosa per la raccolta dei dati) consente di verificare gli spostamenti delle masse d'acqua, nonché lo stato trofico di un tratto di mare, di uno specchio d'acqua, di un fiume, con moltissime e rilevanti implicazioni per la tutela dell'ambiente in rapporto agli insediamenti umani.

2- Gli organismi del microzooplancton ed il loro rapporto con il nanoplancton.

Il termine microzooplancton è riferito agli organismi eterotrofi o mixotrofi che vivono in sospensione fluttuando nell'acqua (Ghirardelli, 1981) per l'intero loro ciclo vitale o per parte di esso.

Gli organismi microzooplanctonici si distinguono da quelli propri delle altre categorie planctoniche, per due caratteristiche: le piccole dimensioni e l'alimentazione che è, come abbiamo detto, eterotrofa. Essi possiedono una dimensione compresa tra i 20 μm (Fenchel, 1987) e i 200 μm (Travers, 1972 a e b; Fenchel, 1987; Revelante & Gilmartin, 1987; Fonda Umani, 1989), seppure, secondo un differente ma più datato criterio, il limite dimensionale

inferiore sarebbe (Margalef & Durant, 1953) di soli 10 μm . Altra ma più semplicistica teoria di classificazione dimensionale microzooplanctonica, considera appartenenti a tale categoria quegli organismi zooplanctonici che passano attraverso un filtro di maglia di 200 μm includendo in tal modo anche quelli di dimensioni inferiori a 20 μm ; tale teoria, però, non distingue il "nanoplancton", che include organismi diversi dal "microzooplancton" anche dal punto di vista trofico.

L'alimentazione del microzooplancton avviene attraverso ingestione attiva di altri microrganismi o loro frammenti o di particelle organiche, digeriti tramite appositi vacuoli. Tale modalità di alimentazione, definita "fagotrofia", distingue questi organismi animali dalla componente fitoplanctonica autotrofa (ove l'autotrofia è svolta con l'ausilio di pigmenti fotosintetici) o osmotrofa (cioè da quella componente fitoplanctonica caratterizzata dalla capacità di nutrirsi assumendo sostanze dall'ambiente esterno per diffusione, attraverso la propria membrana cellulare).

Il microzooplancton comprende organismi appartenenti a due gruppi: Protozoi e Metazoi.

Gli organismi appartenenti al Phylum Protozoa sono quelli preponderanti numericamente. Tra essi si hanno (Laval-Peuto, 1982):

- a) i Ciliati (nell'ambito dei quali si distingue l'ordine dei Tintinnidi, rilevanti, sempre in ambiente marino in quanto maggiormente studiati, seppur presenti in percentuale del 5.5%), che rappresentano nel loro complesso circa il 71% della biomassa totale dei Protozoi;
- b) i Protozoi non Ciliati, presenti in percentuali più ridotte (Taylor G.T., 1982; Sparla & Guglielmo, 1992), costituiti dai Radiolari, dagli Acantari e dai Foraminiferi. Tale distinzione viene fatta per la loro diversa distribuzione in ambiente marino ed in ambiente dulciacquicolo, soprattutto in funzione delle differenti caratteristiche chimico-fisiche e trofiche del mezzo.

La classificazione dei Metazoi è, invece, più difficile per la peculiarità degli organismi ad essi appartenenti, essenzialmente costituiti da individui allo stato larvale o da uova. Tra detti organismi si individuano:

- a) gli "organismi meroplanctonici", che vivono solo una parte del ciclo vitale in fase planctonica (ed in particolare microzooplanctonica) e che nella loro fase adulta diventano bentonici o sessili epifiti (Trégouboff & Rose, 1957); tra questi le uova di diversi organismi marini ed i micrometazoi in stadio larvale precoce (Celenterati, Anellidi, Echinodermi, Gasteropodi Bivalvi) sono quelli che vengono ritrovati più frequentemente;
- b) "organismi oloplanctonici" che vivono l'intero ciclo vitale in forma planctonica, seppure, tuttavia, non tutto in forma microzooplanctonica; le loro prime fasi di sviluppo, che consentono di farli appartenere al microzooplancton, sono caratterizzate da dimensioni <200 µm e sono talvolta comuni a molte specie, o addirittura molti taxa; non è quindi possibile classificare gli organismi in tale stadio in modo preciso (come del resto anche per i micrometazoi). Insormontabili difficoltà di classificazione si riscontrano per le uova dei Metazoi tanto che esse normalmente non vengono classificate (o meglio, non possono esserlo). Le fasi vitali adulte implicano invece un aumento dimensionale di tali organismi, il loro passaggio ad altre categorie planctoniche (ad esempio al mesoplancton) e la conseguente possibilità di classificarli. Tali organismi sono, ad esempio, gli stadi naupliari di alcuni Crostacei, Copepodi ed Ostracodi (Revelante & Gilmartin, 1983; 1987).

Il microzooplancton ha un ruolo particolarmente importante nella catena trofica in quanto rappresenta l'anello di congiunzione tra il fitoplancton e lo zooplancton, cioè tra i produttori primari e i successivi anelli della catena trofica; nonostante ciò le conoscenze su di esso sono relativamente scarse. Ciò è imputabile ai problemi di campionamento e conservazione nonché alle difficoltà nell'identificazione tassonomica degli organismi ad esso appartenenti (specialmente dei Ciliati non Tintinnidi e delle forme cistiche). Sussistono inoltre notevoli difficoltà nel riprodurre in laboratorio delle colture microzooplanctoniche, sia per la complessità dei cicli vitali (mostrata soprattutto da Protozoi non Ciliati, quali i Sarcodini ed in particolare i Foraminiferi, i Radiolari e gli Acantari), sia per il tipo di riproduzione, coniugazione ed incistamento (mostrato dai Ciliati; Heinbokel, 1982).

E' per questo motivo che gli studi che hanno preso in considerazione il microzooplancton sin dalla loro prima osservazione (effettuata nel 1676, durante uno studio sulle acque costiere del Mar di Bering; Taylor G.T., 1982) hanno approfondito maggiormente la tassonomia degli organismi e la loro morfologia dando poca importanza alla loro funzionalità biologica.

Gli studi quantitativi dei popolamenti microzooplanctonici sono relativamente recenti e solo alcuni di questi (Beaver & Crisman, 1989; Berk et al., 1977; Conover, 1982; Porter et al.,

1979; Sorokin, 1981; Taylor G.T., 1982) hanno iniziato ad analizzare la funzione ecologica del microzooplancton e il suo ruolo all'interno della catena trofica. In tale ambito, alcuni studi prendono in considerazione il "protozooplancton" (Laybourn-Parry & Rogerson, 1993; Laybourn-Parry et al., 1992), includendovi tutti i Protozoi, sia autotrofi che eterotrofi presenti nel plancton, a prescindere dalle loro dimensioni, e quindi considerando congiuntamente i Ciliati, gli Ameboidi planctonici, anche con le loro forme endosimbiontiche fotosintetiche, e i Flagellati. Altri invece (Caron, 1983; Haas, 1982; Beers & Stewart, 1971) esaminano nei diversi ecosistemi il microplancton non fotosintetico prendendo in considerazione tutti gli organismi zooplanctonici eterotrofi di dimensioni $<200\text{ }\mu\text{m}$. Tale analisi risulta però poco attenta alle forme planctoniche più piccole facendo sorgere le stesse perplessità di cui alla classificazione, poc'anzi ricordata, dell'UNESCO (1968) e di Beers & Stewart (1971). Esistono infatti molti Ciliati di dimensioni $<20\text{ }\mu\text{m}$ talvolta tanto abbondanti da costituire la maggior parte del nanoplancton eterotrofo (Sherr et al., 1986). Ecco la ragione per la quale negli ultimi anni si è rivolta l'attenzione anche verso il "nanoplancton", ed in particolare verso i microflagellati eterotrofi (di dimensioni $2\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$: Fenchel, 1987), organismi unicellulari eucarioti (Protozoi), con o senza cloroplasti (cioè, rispettivamente, appartenenti alle classi Fitomastigofora e Zoomastigofora). Questi ultimi sono poco conosciuti per le difficoltà tecniche esistenti nella loro determinazione, dovute alle loro piccole dimensioni e alla difficoltà di numerazione e di identificazione con i metodi classici quali, ad esempio, la tecnica di sedimentazione di Utermöl e l'osservazione di campioni in vivo al microscopio ottico, inadatto per l'analisi di tali organismi perché con poca risoluzione.

Lo sviluppo di nuovi metodi di indagine ha permesso invece di distinguere nell'ambito del nanoplancton le forme fotosintetiche (Fitoflagellati) da quelle non fotosintetiche (Zooflagellati), soprattutto (Sieburth, 1982) attraverso le tecniche di epifluorescenza, che permettono di individuare la fase autotrofa, con pigmenti clorofilliani, da quella eterotrofa, non pigmentata. Tali tecniche utilizzano coloranti fluorescenti (DAPI, FITC; primulina) ed il microscopio ad epifluorescenza (Laybourn-Parry & Rogerson, 1993; Laybourn-Parry et al., 1992; Bloem et al., 1989; Caron, 1983; Sieburth, 1982). Si è così potuto constatare, ad esempio, che i Flagellati eterotrofi sono fagotrofi (mangiatori di particelle; Chrzanowski & Simek, 1990; Bloem et al., 1989) come gli organismi appartenenti al microzooplancton ed hanno un ruolo importante nella catena trofica di consumatori di batteri eterotrofi, cianobatteri e nanoplancton fototrofo (Laybourn-Parry et al., 1992; Caron, 1983). Sono inoltre dei componenti ubiquitari del plancton e la loro densità è bassa in aree oligotrofiche (con basso contenuto di nutrienti), mentre aumenta in acque costiere eutrofiche (con elevato contenuto di nutrienti). Infatti, in acque oceaniche oligotrofiche sono in genere presenti con pochi individui

ed il loro numero decresce ulteriormente con la profondità; le fluttuazioni stagionali in tale ambiente sono quasi inesistenti. Al contrario, il loro numero aumenta notevolmente in acque costiere eutrofiche, e si verificano notevoli variazioni stagionali causate dai "blooms" fitoplanctonici seguiti dall'incremento di batteri, di cui il nanoplancton è predatore. Quest'ultimo è poi una sorgente di nutrimento per lo zooplancton filtratore, ed è noto il suo ruolo nella decomposizione e nella rimineralizzazione della sostanza organica (Taylor G.T., 1982; Bloem et al., 1989).

Gli elementi di somiglianza anche dal punto di vista funzionale all'interno della catena trofica giustificano la già evidenziata analisi congiunta degli organismi appartenenti al microzooplancton, e al nanoplancton (essenzialmente Flagellati non fotosintetici), effettuata anche nell'ambito dell'attività sperimentale relativa alle Lagune Pontine (Parco del Circeo). Nella circostanza sono state approfondite le tecniche "classiche" di analisi al microscopio ottico per il microzooplancton, ma anche le tecniche in auto- ed epifluorescenza per l'analisi sia dello stesso microzooplancton sia del nanoplancton, per ottenere un quadro il più possibile completo della componente eterotrofa microplanctonica negli ambienti acquatici (laghi di Fogliano e Caprolace) esaminati.

3- Analisi sistematica dei Protozoi.

Come in precedenza evidenziato, nel microzooplancton gli organismi unicellulari che vengono più facilmente classificati sono compresi nel Phylum dei Protozoi. Per questi ultimi, il sistema di nomenclatura e classificazione più comunemente utilizzato è quello di Laval-Peuto (1982). Secondo tale schema è possibile distinguere tre Subphylum, a loro volta distinti in varie Classi:

A) Subphylum Ciliofora, con l'unica Classe dei Ciliati (o Infusori, con organi locomotori consistenti in ciglia) e due sottoclassi:

A.1) Sottoclasse Infusori, con cinque diversi Ordini, distinti a seconda del tipo e della disposizione delle ciglia; in particolare:

- a) Olotrichi, con ciglia distribuite uniformemente su tutto il corpo (tra cui sono presenti i generi *Uronema* e *Lacrimaria*, nonché *Mesodinium rubrum*);
- b) Eterotrichi, con cilia che si riuniscono a formare membranelle nella zona orale (il genere *Stentor* di acque dolci);

- c) Oligotrichi con membranelle orali e ciglia somatiche ridotte o assenti (un esempio sono i generi *Strombidium*, *Halteria* e *Laboea*);
- d) Tintinnidi, i Ciliati con il corpo racchiuso in una lorica a forma di vaso, come ad es. il genere *Favella* (Fauré-Fremiet, 1969);
- e) Ipotrichi con cilia riunite in cirri sulla superficie ventrale ed assenti sulla superficie dorsale (*Euplotes*, di acqua dolce o salmastra);
- f) Peritrichi con cilia del corpo ridotte o assenti e gli individui adulti peduncolati e sessili (*Vorticella*);

A.2) Sottoclasse Suttori, con vari generi, per lo più sessili, bentonici o epifiti, muniti di tentacoli succhiatori che servono alla cattura e all'ingestione dell'alimento;

B) Subphylum Sarcodina con organi locomotori costituiti da pseudopodi; comprende sue Superclassi, Amoebida (pseudopodi molli: *Amoeba*) e Foraminiferida (con corpo racchiuso in un guscio di vario genere); quest'ultimo a sua volta ha quattro Classi: Acantarea (scheletro con solfato di stronzio o siliceo: Acantari e Radiolari), Polycistinea, Heliozoa (involucro gelatinoso e pseudopodi sostenuti da un asse rigido) e Feodarea;

C) Subphylum Mastigophora (o Flagellati, con uno o più flagelli come organi locomotori) con le due classi degli Zooflagellati e dei Fitoflagellati, tra cui ha notevole importanza l'ordine dei Dinoflagellati.

Tutti i Protozoi, nonostante siano organismi unicellulari, mostrano una varietà di specializzazioni ed una complessità di strutture e funzioni tanto da essere comparabili alle cellule di organismi pluricellulari (Fenchel, 1987). Si muovono liberamente nell'ambiente, proprio tramite le ciglia (velocità di 1 mm/s); possiedono in genere un citostoma, da cui si diparte la citofaringe con una corona boccale di ciglia utilizzate per la nutrizione; possiedono gli organelli tipici degli eucarioti, ma la caratteristica che li contraddistingue è quella di possedere un macronucleo somatico, ed un micronucleo o nucleo gametico. La loro

riproduzione è asessuata; negli organismi adulti avviene la coniugazione, che evita il loro invecchiamento e morte.

Al fine di meglio comprendere le caratteristiche dei diversi organismi microzooplanctonici, pare opportuno, anche per completezza della ricerca, soffermarsi distintamente sui tre Subphylum ora indicati.

A) I Protozoi Ciliati sono organismi unicellulari eucarioti distribuiti in tutti gli ambienti acquatici, anche in acque anaerobiche e in molti microhabitat; in ambiente acquatico sono presenti sia nelle catene trofiche bentoniche che planctoniche. Si registrano elevate concentrazioni di questi organismi in zone neritiche di "upwelling" (risalita di acque profonde, con molti nutrienti) dove si verificano elevate produzioni di fitoplancton al quale essi sono associati; invece, in condizioni di oligotrofia (cioè con poche sostanze nutritive assimilabili) essi sono più scarsi, poiché il sistema favorisce i Protozoi di dimensioni maggiori a crescita più lenta. I Ciliati sono caratterizzati dalla presenza di ciglia sulla superficie della cellula, persistenti durante tutto il ciclo vitale ad eccezione delle fasi di incistamento.

Alcuni Ciliati presentano un guscio esterno (lorica) di tipo chitinoso o pseudochitinoso: sono i Tintinnidi. Essi abbondano in aree costiere, ed in particolare in baie presso gli estuari dei fiumi (Fonda Umani et al., 1985; Revelante, 1981; Krsinic, 1979 b; 1980; 1988) dove spesso si verificano condizioni di eutrofia.

I Tintinnidi costituiscono una piccola porzione dei Ciliati planctonici, ma tra le più conosciute perché la lorica chitinoso che protegge l'animale meglio sopporta le operazioni di conservazione rispetto alle altre parti del corpo che normalmente vengono perse o distrutte dai fissanti (quali la formalina).

La loro classificazione è molto più semplice (in particolare i testi di riferimento sono Kofoid & Campbell del 1929 e 1939; Rampi & Zattera, 1982; Krsinic, 1977; Jörgensen, 1924; Laval-Peuto & Brownlee, 1986; Brandt, 1906 e 1907; Burkovskii, 1976; Smrelkov, 1955; Balech, 1959, 1968, 1971, 1972, 1975; Loeblich & Tappan, 1968; Paranjape & Gold, 1982; per una recente riclassificazione si richiama anche Fonda Umani et al., 1985; Revelante, 1981; Krsinic, 1979 b e 1980 e, in particolare per gli Undellidi, Balech, 1975) e si basa quasi esclusivamente sulla morfologia esterna della lorica, sulle sue dimensioni, sulle sue proporzioni tra lunghezza e larghezza (Kofoid & Campbell, 1929 e 1939). E' la lorica, quindi, la caratteristica peculiare dei Tintinnidi (più che la loro parte molle), che caratterizza l'animale come il guscio dei Dinoflagellati, dei Foraminiferi e dei Radiolari. Solo pochi Autori per procedere alla loro classificazione si basano sulla struttura citoplasmatica (Hedin, 1974; 1975).

La seguente suddivisione dei Tintinnidi viene fatta quindi in dipendenza del tipo di lorica:

- specie a lorica ialina, liscia e trasparente o con striature ed opaca (es. i generi *Eutintinnus*, *Amphorella*). Alcuni Autori (Capriulo et al., 1982), considerano lo sviluppo della lorica dei Tintinnidi come un adattamento contro la predazione, specie per quella liscia e trasparente, grazie alla quale diventano meno visibili ai loro predatori;
- specie a lorica agglutinata (es. i generi *Tintinnopsis*, *Stenosemella*, *Dictyocysta*), che presentano sulla superficie della lorica particelle di vario genere e natura, minerale od organica (Capriulo et al. 1982). L'agglutinazione avviene avvalendosi principalmente di un'accumulazione passiva delle particelle, mediante adesione alla lorica ed uso di ciglia specializzate, presenti nella parte anteriore dell'organismo. Le loriche agglutinate, a loro volta, possono essere distinte in due tipi (Gold & Morales, 1976 a): *arenacee*, se le loriche presentano particelle in predominanza di minerali inorganici (quarzo e silicio); b) *agglomerate*, se presentano materiale sia non biogeno che biogeno (inclusi frammenti di frustuli di Diatomee e Coccolitoforidi).

La suddivisione ora descritta non ha invero valore tassonomico. Si è infatti osservato (Bernatzky et al., 1981) che nei Tintinnidi di acqua dolce l'agglutinazione può presentarsi o meno a seconda delle condizioni ambientali e della stagione. Ciò è confermato da uno studio con esperimenti in coltura (Gold, 1979): in particolare alcune specie che normalmente agglutinano sulla lorica varie sostanze rimangono invece con la lorica ialina in assenza di particelle adatte nel mezzo di coltura (il riferimento è a diverse specie di *Tintinnopsis* che comunemente presentano la lorica agglutinata, ma allevate in assenza di particelle, producono una lorica ialina e su di essa una matrice organica adesiva; aggiungendo poi alla coltura varie particelle, si è osservato che gli organismi agglutinavano la lorica). Questo dimostra che è la presenza di particelle adatte nell'ambiente di crescita (zone con detrito in sospensione) a determinare la comparsa di specie a lorica agglutinata. Si badi che tale elemento è di particolare rilevanza: l'eventuale differenza tra i materiali utilizzati anche da diverse specie, suggerisce l'area geografica in cui si è formata la lorica, nonché il tipo di sedimenti presenti nella colonna d'acqua abitata dagli organismi microzooplanctonici in esame ed esistono differenze nella natura delle particelle utilizzate da organismi lorica agglutinata e di generi quali *Tintinnopsis* e *Stenosemella* (Gold & Morales, 1976 b e c). Se a ciò si aggiunge che le specie a lorica agglutinata sono potenzialmente capaci di concentrare direttamente minerali insolubili, o forme solubili assorbite da particelle siltose, deriva non solo l'importanza tassonomica ed evolutiva dei materiali utilizzati nella costruzione della lorica, ma anche la rilevanza di questi al fine di conoscere le caratteristiche delle acque e dei sedimenti dei siti.

La formazione della lorica è talvolta influenzata anche da fattori ambientali (Laval-Peuto, 1982) tanto da rendere in alcuni casi difficile la classificazione delle relative specie; ed infatti molte forme di passaggio tra le forme più rappresentative di due specie vengono erroneamente descritte come specie nuove (Hofker, 1931; Margalef & Duran, 1953; Halme, 1958; Davis, 1978; Boltovskoy et al., 1990). Si è osservato che la variazione della lunghezza delle loriche e delle dimensioni del diametro orale (DO) in individui appartenenti ad una stessa specie è inversamente correlata alla temperatura tanto che individui segnalati in regioni fredde presentano una lunghezza della lorica maggiore rispetto ad altri della stessa specie rinvenuti in acque più calde (anche Marshall, 1969). È il DO, più che la lunghezza, che risulta essere la miglior costante nella fisionomia della lorica (Verity, 1987). Diventa così rilevante utilizzare le caratteristiche citologiche per la determinazione delle specie. Per una miglior determinazione delle specie, sono richiesti anche studi sulla distribuzione geografica dei Protozoi planctonici (Laval-Peuto, 1982) perché ad ogni regione biogeografica corrispondono patterns dimensionali della lorica. Secondo Laval-Peuto e Brownlee (1986) la classificazione migliore dovrebbe basarsi anche su conoscenze ecologiche, fisiologiche, biochimiche ecc. In questo modo sarebbero più chiari i rapporti filogenetici per i vari taxa dei Ciliati e dei Tintinnidi in rapporto con gli altri Protozoi.

In ogni caso (Laval-Peuto, 1981) anche se il metodo di determinazione dei Tintinnidi basato sulla lorica può essere soddisfacente solo a livello di famiglia e genere (ma non di specie) è il più frequentemente utilizzato. Il metodo citologico, invece, basato sull'osservazione delle strutture interne della cellula, è generalmente considerato complicato, costoso e lungo (Laval-Peuto, 1982) e, quindi poco utilizzato, soprattutto in studi che implicano l'analisi di molti campioni.

L'identificazione dei Ciliati senza lorica (tra cui gli Oligotrichi) si basa essenzialmente sulle caratteristiche morfologiche della cellula: forma e dimensioni, struttura e distribuzione delle ciglia, peculiarità dell'area citostomale.

Tali strutture possono venire seriamente danneggiate dalla fissazione al punto che, per la determinazione sistematica (Corliss, 1979; Pilling et al., 1988; Kahl, 1940; Montagnes e Lynn, 1988; Lynn et al., 1988; Fauré-Fremiet, 1969), si consiglia di operare su materiale vivo. In quest'ultimo caso per la classificazione ci si può riferire ai nuclei diploidi o poliploidi (Laval-Peuto, 1982) o alla posizione dell'apertura boccale.

B) Il secondo Subphylum (Sarcodina), che include le Superclassi Amoebida e Foraminiferida, è caratterizzato da organismi unicellulari che usano pseudopodi per la

locomozione; essi sono comunque relativamente poco presenti nel microzooplancton in quanto, nella maggior parte dei casi, hanno dimensioni maggiori di 200 μm (limite dimensionale massimo del microzooplancton).

Ai fini del presente lavoro hanno rilevanza in modo particolare i Foraminiferi, i Radiolari e gli Acantari.

Per i primi (Trégouboff e Rose, 1957; Anderson, 1980 e 1983; Murray, 1971), la determinazione a livello di genere e specie deve prendere in considerazione non solo la struttura dello scheletro (ad es. la forma del guscio, il numero di aperture primarie e secondarie del guscio stesso, la quantità e grandezza dei pori, la presenza di reticulopodi) ma anche di alcune caratteristiche del protoplasma (Spero, 1988). A tal fine, però, è necessaria una strumentazione adeguata; con l'ingrandimento del microscopio normalmente utilizzato (200x e 320x) ci sono, infatti, difficoltà ad osservare questi dettagli.

Relativamente ai Radiolari e agli Acantari, ci si limita in questa sede a richiamare i testi di riferimento; per i primi si rinvia a Anderson (1983), mentre per i secondi a Bottazzi Massera (1963; 1964 a e b; 1978), Bottazzi Massera & Andreoli, 1971 e Bottazzi Massera & Vanucci (1964).

C) Vengono inclusi nel microzooplancton anche alcuni organismi del Subphilum Mastigophora ed, in particolare, i Dinoflagellati eterotrofi e mixotrofi (come quelli dei generi *Noctiluca*, *Pyrocystis* e *Spatilodinium* per la cui determinazione ci si avvale dei lavori di Dodge, 1982; Gains & Elbräcter, 1987; Elbräcter, 1991); questi ultimi hanno al loro interno i cloroplasti che, tuttavia, non sempre è facile distinguere a causa del metodo di conservazione (ciò rende difficile discernere gli individui autotrofi da quelli eterotrofi o mixotrofi). In ogni caso le strutture prese maggiormente in considerazione per la classificazione dei Dinoflagellati sono lo scheletro e la teca, composta da numerose placche cellulosiche perforate da abbondanti pori associati con i tricocisti.

D) Un caratteristica comune di molti organismi microzooplanctonici, è la formazione di cisti; esse, che possono essere di resistenza, temporanee o di riproduzione, sono state riconosciute come una fase del ciclo vitale dei Ciliati Tintinnidi (Reid & John, 1978; Reid, 1987; Paranjape, 1980; Beers et al., 1977), dei Sarcodini e dei Dinoflagellati (Reid & Boalch, 1987). La fase di incistamento è stata osservata anche per gli Oligotrichi planctonici; ad esempio, in *Strombidium oculatum* (Ciliata Oligotrichida), si sono riscontrati intervalli di tempo brevi tra l'incistamento e le forme attive (Fenchel, 1987).

Le cisti di resistenza possono formarsi quando le condizioni dell'ambiente, sia chimico-fisiche che trofiche, divengono sfavorevoli per la sopravvivenza degli organismi. In tali ipotesi gli organismi microzooplanctonici provvedono a rivestirsi con una capsula resistente (cisti) al cui interno rimangono in uno stato di vita latente. Successivamente, ristabilitesi le condizioni per la loro normale sopravvivenza, riprendono la vita attiva "uscendo" dalla cisti.

Vari sono gli agenti esterni che inducono all'incistamento (o all'esocistamento) come i cambiamenti di pH, la composizione ionica dell'acqua, la temperatura o la luce (Fenchel, 1987). La classificazione delle cisti di resistenza è essenzialmente fondata sulla morfologia (Reid & John, 1978).

La funzione delle cisti, che possiedono lo stesso patrimonio genetico della specie, non è peraltro univoca; esse rappresentano certamente un meccanismo di sopravvivenza in condizioni sfavorevoli, come le cisti di resistenza già richiamate, ma sono presumibilmente connesse anche con gli aspetti riproduttivi, plausibilmente formandosi anche dopo la coniugazione sessuata (cisti di riproduzione). Del resto sia la formazione di cisti, sia l'attività sessuale sono state osservate nei Tintinnidi alla fase finale dei "blooms" o in vecchie colture che mostrano un declino della crescita (Stoecker et al., 1983).

4- Le modalità di trattamento dei campioni: raccolta, conservazione, concentrazione e conteggio

L'efficacia dell'analisi del microzooplancton dipende essenzialmente dal metodo di campionamento e dal trattamento successivo dei campioni; tali metodi incidono quindi in modo significativo sul successo di una attività di ricerca volta allo studio dell'ambiente acquatico. In altre parole è la correttezza metodologica ad essere rilevante al fine del risultato; ecco la ragione della importanza attribuita, nel presente lavoro (che tiene conto delle problematiche connesse all'attività di laboratorio), alle diverse metodologie di trattamento del materiale microzooplanctonico.

Il ricercatore, quindi, si trova a scegliere tra diversi metodi per le differenti fasi di raccolta, di conservazione, di concentrazione e di analisi del materiale. Tale scelta deve essere ispirata alla tipologia di studio che si vuole effettuare (analisi di routine, tassonomiche, ecc.), ma anche alla natura degli organismi oggetto dell'indagine ed all'ambiente. Ovviamente, una volta individuate le metodiche più opportune, queste stesse devono essere esattamente seguite al fine di ottenere un risultato scientificamente apprezzabile.

Alla luce delle considerazioni ora illustrate, è parso necessario in questa sede descrivere le possibili opzioni metodologiche che si pongono al ricercatore che volesse analizzare il microzooplancton, con particolare riguardo alle varie fasi del suo lavoro, cioè quella della raccolta degli organismi, quella della loro conservazione e concentrazione, quella conclusiva dell'analisi. Per la fase dell'osservazione al microscopio dei campioni microzooplanctonici viene illustrata la conta degli organismi con il metodo dell'epifluorescenza, normalmente utilizzato per la sola analisi del nano- e del picoplancton.

4.1. Raccolta

A) Bottiglie

I prelievi di microzooplancton possono venire effettuati mediante bottiglie (indifferentemente del tipo Niskin, Van Dorn, NIO) normalmente utilizzate anche per il fitoplancton (Fonda Umani & Milani, 1990). Per la frazione microzooplanctonica, però, la capacità di tali bottiglie deve essere maggiore di quella necessaria per il fitoplancton in quanto la densità degli organismi microzooplanctonici è minore di 1 o 2 ordini di grandezza rispetto a quella degli organismi fitoplanctonici (Fonda Umani & Milani, 1990). Sussiste, cioè, la necessità di aumentare la quantità di acqua prelevata in rapporto all'aumento dimensionale degli organismi da analizzare, oltreché all'ambiente analizzato, la cui diversificazione determina una maggiore o minore concentrazione degli organismi.

Per il microzooplancton, in genere, si utilizzano bottiglie con capacità dai 2 ai 10 l o contenitori con capacità 20-30 l a seconda della densità di popolamento prevista nell'ambiente acquatico esaminato.

In particolare, ed a titolo esemplificativo, si utilizzano le bottiglie con capacità di 2 l per le aree portuali, dove è presente una grande quantità di materiale organico oltre che di sedimento, che sovente copre e confonde gli organismi presenti nel campione analizzato al microscopio e che deve essere adeguatamente filtrato.

In aree oligotrofiche (come il mare aperto e, più in generale, in zone ad alta profondità) o in periodi stagionali caratterizzati da bassa densità di popolamento si utilizzano, invece, preferibilmente contenitori più grandi, da 20-30 l (Fonda Umani & Milani, 1990). In tali ambienti è opportuno verificare anche la distribuzione verticale del popolamento; a tal fine si eseguono pesche a profondità crescenti dalla superficie al fondo, oppure alla quota superficiale, intermedia e al fondo. La profondità del campionamento intermedio deve essere scelta in corrispondenza degli strati di discontinuità termoclinale. Dai risultati dei prelievi

effettuati alle tre diverse quote, è possibile ricavare la media complessiva del popolamento nella colonna d'acqua secondo una formula prefissata (Verity, 1987):

$$(C0 + 2C4 + C8)/4,$$

dove C0 indica la concentrazione degli organismi in superficie, C4 quella a metà battente, C8 quella al fondo.

B) Pompe

Altro metodo di campionamento è quello eseguito tramite pompe (Travers 1972 a e b; Beers, 1978; Stirn, 1981) che, normalmente, hanno la portata di 2-5 l/min.

Attraverso la pompa si possono prelevare volumi d'acqua variabili a diverse profondità o, addirittura, in continuo su tutta la colonna d'acqua. Tale metodo consente quindi di prelevare notevoli volumi d'acqua (e ciò rende migliore il metodo per la raccolta di campioni in zone oligotrofiche), ma, d'altra parte, l'aspirazione meccanica danneggia la struttura delicata degli organismi campionati e questo incide sulla precisione della classificazione e quantificazione degli organismi (Fonda Umani & Milani, 1990).

C) Retini

I metodi precedentemente descritti possono essere affiancati anche all'uso di reti da plancton (consigliabili per la raccolta di alcuni taxa) con apertura di maglia corrispondente o, meglio, inferiore alle dimensioni degli organismi da analizzare. A titolo esemplificativo, si dovranno utilizzare retini con vuoto di maglia di 165 µm per la raccolta degli Acantari, i quali hanno una dimensione di 0.3-1.5 mm.

4.2. Conservazione dei campioni prelevati

Gli organismi planctonici prelevati attraverso i metodi sopra descritti devono essere conteggiati dopo essere stati fissati e concentrati.

Il conteggio in vivo degli organismi, da effettuarsi necessariamente in tempi brevissimi - nel giro di poche ore dopo la loro raccolta - se pure è certamente preferibile (Dale & Burkill, 1982; Sime-Ngando et al., 1990; Gasol, 1993) non sempre è realizzabile per difficoltà logistiche (ad esempio nell'ipotesi di una distanza notevole tra il punto di prelievo ed il laboratorio dove i campioni possono essere trattati ed esaminati). E' così necessario "fissare" i campioni con l'ausilio di apposite sostanze chimiche (formalina, gluteraldeide, ecc.) per la

loro conservazione e successiva analisi. Gli organismi, tra l'altro, possono perdere la loro motilità dopo circa 10 minuti di esposizione alla luce del microscopio a causa della temperatura elevata. Ecco che l'unica possibilità per uno studio efficace è data dall'uso di fissanti prima del conteggio (Sime-Ngando et al., 1990). I tempi per l'analisi degli organismi campionati, una volta fissati, non deve tuttavia superare i 2 - 3 mesi dal prelievo (a seconda del tipo di fissante utilizzato).

La formalina risulta essere il fissativo più frequentemente utilizzato (Fonda Umani & Milani 1990).

Sotto il profilo delle modalità operative, al fine di ottenere il miglior risultato conservativo, 1 parte di formalina al 38-40% deve essere aggiunta a 9 parti di acqua di mare in modo da ottenere una concentrazione finale oscillante tra il 4% ed il 2% di formaldeide (Fonda Umani & Milani, 1990). I campioni così trattati non necessitano di particolari ulteriori accorgimenti per la loro conservazione se non lo stoccaggio in contenitori di vetro azzurro scuri, riempiti fino all'orlo per evitare il contatto con l'aria e conservati a temperatura ambiente. Secondo Stoecker et al. (1988) i campioni fissati con formalina, oltre a dover essere tenuti al buio, dovrebbero essere mantenuti in ambiente refrigerato (a 4°C) ed analizzati preferibilmente entro 5 settimane dalla raccolta; ciò consentirebbe una migliore osservazione dei cloroplasti delle forme mixotrofe ed autotrofe.

Gli organismi, per la loro conservazione, necessitano di essere mantenuti in una soluzione con un pH molto simile a quello dell'ambiente dal quale provengono (ad esempio l'acqua di mare ha un pH di 8.2 circa). L'aggiunta di formalina potrebbe abbassare bruscamente il pH del mezzo; per ovviare a tale inconveniente, l'acidità della formalina deve essere preventivamente neutralizzata con il tetraborato di sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Fonda Umani & Milani, 1990) oppure di esametilentetramina (100 g/l) (Stoecker et al., 1989).

Un secondo fissativo (Revelante & Gilmartin, 1983) è costituito da una soluzione all'1% di acido di Rodhe (costituito da I_2 e KI, in soluzione di acido acetico; Rodhe et al., 1958), una variante dell'acido di Lugol (Lovegrove, 1960). Tale fissante seppure, secondo gli studi effettuati, assicurerebbe una miglior conservazione degli organismi (in particolare dei Ciliati non loricati) non consente di conservare a lungo (qualche mese, come nel caso della formalina) i campioni raccolti; infatti lo iodio in esso contenuto (I_2) è volatilizzabile e perde la sua efficacia in poco tempo (Fonda Umani & Milani, 1990).

Per gli studi volti ad analizzare i pigmenti clorofilliani, ed in particolare modo per operare la distinzione degli organismi autotrofi da quelli eterotrofi, oppure per la determinazione della

biomassa è consigliabile la fissazione dei campioni con gluteraldeide (Kimmerer & McKinnon, 1986) ed il loro stoccaggio in ambiente buio e refrigerato (4 °C). Nel caso di campioni di acqua dolce si consiglia di tamponare la gluteraldeide con una soluzione 1 M di sodio monofosfato. Anche per la fissazione dei campioni di nanoplancton (Bloem et al., 1989) viene preferita la gluteraldeide.

La gluteraldeide tamponata può essere utilizzata in soluzione con la paraformaldeide nel caso in cui si volessero effettuare delle osservazioni in vitro (Karnovsky, 1965) utilizzando il microscopio elettronico (Gold, 1969), anche a scansione (Gold & Morales, 1976 a). Tale soluzione, che preserva tutte le strutture dell'organismo analizzato, comprese le parti molli, ha fornito risultati eccellenti tanto da consentire, ad esempio, l'individuazione, all'interno del Ciliato loricato *Favella*, di una delle numerose specie di Dinoflagellati (il *Peridinium*) che compongono la sua dieta.

Un altro fissante, utilizzato in particolare per osservare i Ciliati anche di dimensioni <20 µm nonché i Dinoflagellati, è il cloruro di mercurio (HgCl₂) al 4 o 5% (Laybourn-Parry et al., 1992; Berninger et al., 1991) ed il così detto fissante di Bouin (Lee et al., 1985).

I diversi metodi di fissazione sopra elencati, sebbene indispensabili per la stessa determinazione, possono danneggiare gli organismi (fino al 20% degli Oligotrichi; Sime- Ngando et al., 1990) presenti nei campioni raccolti. Ciò emerge da una comparazione effettuata tra i diversi metodi di fissaggio dei campioni (HgCl₂, acido di Rodhe, formaldeide, gluteraldeide) e tra i diversi metodi di conteggio degli stessi (filtrazione, conta in vivo, centrifugazione), sui quali ci si soffermerà successivamente. Sin da ora si anticipa -e del resto si è già evidenziato- che, ove possibile, il conteggio in vivo è preferibile, in quanto è l'unico metodo che permette di avere dati sulla reale quantità di popolamento microzooplanctonico. Tale conteggio, che presuppone comunque la concentrazione dei campioni da analizzare tramite filtrazione passiva, è statisticamente accettabile per determinare l'abbondanza e la composizione specifica del microzooplancton in analisi quantitative di routine; la preparazione dei campioni è poi relativamente rapida (70-90 min. per campione), soprattutto se comparata con gli altri metodi che possono presentare errori dovuti al sub-campionamento dei campioni fissati e preservati (Dale & Burkill, 1982).

4.3. Concentrazione dei campioni

Si è detto che prima del conteggio degli organismi planctonici raccolti, è spesso necessario operare la loro fissazione, ma che nella maggior parte dei casi è altresì necessario operare la concentrazione dei campioni prelevati sia per ottenere campioni più maneggevoli (perché di volumi minori), sia (ove si utilizzi la filtrazione) per eliminare una parte del particolato che rende più difficoltosa l'analisi al microscopio.

Le operazioni di "concentrazione" possono essere effettuate attraverso tre distinti metodi, i primi due dei quali sono quelli comunemente utilizzati, mentre il terzo è stato sperimentato con buon esito; i risultati sono riportati in una pubblicazione delle stesse Autrici (*Grenni & Creo*, in press). Più precisamente il primo è quello della "filtrazione con l'utilizzo di retini"; il secondo è quello della "sedimentazione"; il terzo metodo è dato dall'utilizzazione della concentrazione dei campioni a flusso tangenziale, già sperimentata ampiamente in altri settori scientifici.

A) Retini

Il "retino" è il metodo di filtrazione più comunemente usato, soprattutto per grandi volumi d'acqua o per campioni che possiedono un grande quantitativo di detrito in sospensione, ma presenta l'inconveniente di perdere facilmente quegli organismi di dimensioni minori o uguali al vuoto di maglia utilizzato per la filtrazione che vanno così dispersi.

Operativamente si concentra il campione subito dopo il prelievo utilizzando reti con vuoto di maglia di 10 μm (o 30 μm : Vitiello, 1964); si risciacqua poi con cura il retino per togliere nel miglior modo possibile gli organismi ad esso aderenti utilizzando, a tal fine, la stessa acqua filtrata. Il volume finale del campione dovrà essere di circa 200-250 ml. Subito dopo tali operazioni di concentrazione, si aggiunge il fissativo (Fonda Umani & Milani, 1990) per la sua conservazione, oppure si analizza subito in vivo.

B) Sedimentazione

Il metodo di concentrazione per sedimentazione dei campioni è più elaborato del precedente (Revelante & Gilmartin; 1983) e utilizza la proprietà delle particelle in sospensione contenute nei campioni, compresi gli organismi, di depositarsi sul fondo del contenitore dopo un certo lasso di tempo. E' preferibile la preventiva fissazione degli organismi in quanto i tempi lunghi necessari per la loro sedimentazione rischierebbero di danneggiarli. Ciò incide, naturalmente, sulla quantità di fissante da utilizzare, particolarmente elevata in questo caso in quanto

necessaria per preservare il campione tal quale e non già concentrato come nell'ipotesi della filtrazione con retino.

Il tempo complessivo necessario alla sedimentazione in laboratorio di tutti gli organismi presenti nel campione è calcolato tenendo conto della forma e della dimensione del contenitore del campione e della velocità di sedimentazione degli organismi microzooplanctonici più piccoli (che ovviamente presentano la velocità di sedimentazione più bassa) che è pari a 1 cm ogni 3 ore.

Una volta sedimentato il particellato, il surnatante viene prelevato mediante un capillare ad ansa collegato con un tubicino in lattice preferibilmente a caduta libera, senza far ricorso a pompe a vuoto (Fonda Umani & Milani, 1990). Successivamente è possibile analizzare il campione così concentrato.

Sotto il profilo pratico, le operazioni relative alla sedimentazione possono essere attuate in due diversi modi: il primo (a) è suddiviso in tre distinte fasi (Revelante & Gilmartin; 1983), mentre per il secondo (b), meno articolato e più preciso, viene utilizzata la concentrazione a flusso tangenziale.

a) Il primo metodo prevede la collocazione di un campione, ad esempio di 5 l, in un cilindro graduato alto 30 cm; tale campione si riduce ad 1 l dopo 72 ore di sedimentazione. Tale quantità, collocata in un cilindro graduato alto 35 cm, dopo altre 72 ore di sedimentazione, viene concentrata ad un volume finale 100 ml. Un terzo periodo di sedimentazione, ancora di 72 ore, serve per concentrare il campione, collocato in un cilindro graduato di 25 cm di altezza, fino a 10 ml. Tale quantità finale è quella utilizzata per le analisi (Fonda Umani & Milani, 1990).

b) Il secondo metodo mira ad evitare tempi così lunghi; a tal fine si provvede a far sedimentare i campioni direttamente nei contenitori cilindrici di raccolta calcolando preventivamente il tempo di sedimentazione degli organismi presenti e riducendoli, poi, ad un volume finale di 200 - 250 ml.

C) Concentrazione a flusso tangenziale

Per concentrare i campioni raccolti è possibile utilizzare il "Minitan Millipore", un concentratore di particelle adoperato in altri settori della ricerca scientifica come in biologia ed in medicina, ove è utilizzato per concentrare la parte solida del sangue, le cellule, le proteine ed i virus. In particolare il Minitan è stato utilizzato in via sperimentale nello studio

relativo alle Lagune Pontine (Grenni & Creo, *in press*), per la concentrazione a flusso tangenziale dei campioni raccolti.

La peculiarità di tale metodo consiste nella facoltà di concentrare in poco tempo anche grossi volumi d'acqua (fino a due litri nello strumento utilizzato in tale occasione ma anche fino a cento litri in altre versioni), contenenti organismi da concentrare. Il Minitan filtra i campioni d'acqua in flusso tangenziale separando così le particelle ivi presenti dal liquido stesso; si evita in tal modo l'utilizzo del "retino", con le problematiche relative alle aderenze a questo stesso degli organismi campionati e con la conseguente difficoltà di rimettere detti organismi in soluzione. Più esattamente, il flusso tangenziale è idoneo per concentrare sospensioni con elevate quantità di particelle, microrganismi, cellule e detriti cellulari, che altrimenti sarebbero generalmente difficili da filtrare quando si opera a flusso ortogonale (ad esempio con il retino) sia sottovuoto, sia in pressione. Tale strumento è associato ad una pompa peristaltica (a pressione variabile) a basso flusso che muove le soluzioni all'interno dello strumento, dove sono presenti filtri di diversa porosità.

In particolare il sistema filtrante è formato da piastre di microfiltrazione di 60 cm² di superficie ciascuna, costituite da due membrane saldate su una cornice in plastica; per attuare la filtrazione, la soluzione viene pompata ad alta velocità lungo la superficie della membrana stessa. Nel caso specifico della sperimentazione sui campioni di Fogliano e di Caprolace, sono stati utilizzati filtri di porosità 0.22 µm e di 0.65 µm, in modo da eliminare parte dei batteri e del particolato, presente in notevole quantità; il tempo necessario a tale operazione è molto basso: nel caso dei filtri di 0.22 µm è di circa 1 ora, mentre con l'utilizzo dei filtri a 0.65 µm il tempo necessario alla concentrazione è stato di circa 10 minuti.

Una volta concentrati, i campioni vengono fissati e tenuti in bottiglie di vetro scuro con tappo ermetico riempite fino all'orlo, in modo da evitare il più possibile il contatto con l'aria. Si può procedere poi al conteggio degli organismi presenti nei campioni disponibili.

La sperimentazione ha dato risultati altamente positivi, ed apre nuovi orizzonti nell'analisi del microzooplankton per la capacità di tale strumento di coniugare precisione di analisi alla quantità dei campioni considerati.

4.4. Conteggio dei campioni

4.4.1 Osservazione al microscopio

La quarta fase relativa all'analisi del microzooplancton è quella del conteggio dei campioni prelevati e trattati, effettuata con l'ausilio del microscopio.

Essa può essere effettuata con l'ausilio del microscopio ottico, o "a scansione"; quest'ultimo, però, è preferibile negli studi tassonomici nonché per l'analisi specifica di alcune determinate specie, e non è adatto alle analisi di routine di molti campioni.

Anche in tale ultima fase di analisi, si è sperimentato un metodo nuovo. Ed infatti, i campioni raccolti nell'ambito dello studio sulle lagune Pontine, sono stati analizzati prima con il microscopio ottico a contrasto di fase e successivamente utilizzando la tecnica dell'epifluorescenza, innovativa, come già sottolineato, per il microzooplancton. I dati così ottenuti, tra loro confrontati, hanno dimostrato l'efficacia e la precisione della tecnica dell'epifluorescenza che consente soprattutto tempi più brevi per l'osservazione; ciò ne consiglia l'utilizzazione, soprattutto in presenza di un gran numero di analisi da effettuare ed in particolari situazioni ambientali. Tale tecnica, inoltre, consente di distinguere la fase autotrofa da quella eterotrofa degli organismi analizzati garantendo una maggiore precisione dell'analisi rispetto alla metodologia tradizionale. Si consiglia perciò (soprattutto in campioni con un elevato quantitativo di detrito e con una percentuale elevata di Ciliati non Tintinnidi rispetto agli altri gruppi del microzooplancton) di effettuare entrambe le analisi: la tecnica tradizionale del contrasto di fase comunque è infatti necessaria per identificare alcune specie di Ciliati, soprattutto Tintinnidi, mentre la tecnica dell'epifluorescenza consente di effettuare un conteggio preciso degli individui presenti, ovviando all'inconveniente della sottostima numerica che la tecnica del contrasto di fase in alcuni casi possiede.

A) Microscopia a contrasto di fase

Come poc'anzi evidenziato, la metodologia "a contrasto di fase" è quella tradizionalmente utilizzata per l'analisi microzooplanctonica, in quanto consente di mettere in evidenza eventuali strutture ialine degli individui osservati (soprattutto per le loriche dei Tintinnidi).

Il tipo di microscopio ottico a contrasto di fase normalmente utilizzato è quello "rovesciato" (quello cioè con l'obiettivo al di sotto del piano di osservazione) che permette di analizzare gli organismi sedimentati, e posti sul fondo della camera di sedimentazione. Lo strato d'acqua

presente in quest'ultima non permetterebbe, infatti, di focalizzare gli organismi ivi collocati se si utilizzasse un microscopio normale.

Al fine di confrontare l'efficacia dell'esame dei campioni analizzati con la microscopia a contrasto di fase rispetto a quelli con la tecnica ad epifluorescenza, per quanto riguarda il microscopio rovesciato ci si è serviti dell'ingrandimento più usato, cioè quello di 200x e 400x seguendo il metodo Utermöl, (Utermöl, 1958) e considerando tutta l'area della vaschetta di sedimentazione (Fonda Umani & Milani, 1990). L'osservazione a ingrandimento maggiore (400x) viene utilizzata per osservare la struttura interna degli organismi ed i particolari della struttura chitinosi dei Tintinnidi; nonostante ciò, non sempre si riesce a distinguere le caratteristiche delle parti molli, spesso in precedenza distrutte (o comunque deteriorate) dai fissanti.

Sotto il profilo più strettamente sperimentale, giova sottolineare che il conteggio del microzooplankton viene effettuato su un sub-campione, prelevato dal campione originale (quello cioè già concentrato e fissato), dopo che questo stesso è stato agitato delicatamente per circa 1 minuto. Il volume del sub-campione in genere varia da 10 a 100 ml, in relazione alla concentrazione degli organismi; un sub-campione si può ritenere rappresentativo se vi è un conteggio minimo di circa 100 ind/l per i taxa maggiormente rappresentati e ritenuti significativi ai fini dell'analisi. In caso contrario si dovrà procedere al conteggio di altri sub-campioni (Fonda Umani & Milani, 1990). Il sub-campione necessita poi di una fase di sedimentazione; viene così collocato entro i cilindri di sedimentazione, di varia capacità in funzione della quantità di sub-campione che si vuole analizzare e caratterizzati da una base staccabile che costituisce la camera di sedimentazione.

Concluso il tempo di sedimentazione (calcolato secondo gli stessi criteri di quello necessario nella precedente fase della concentrazione del campione), la base viene separata dal cilindro, chiusa con un vetrino copri oggetti, ed il suo contenuto viene analizzato.

Una particolare attenzione deve essere posta nell'analisi dei Ciliati loricati (Tintinnidi); per questi ultimi vengono conteggiate tutte le loriche, sia cioè quelle che presentano l'organismo al loro interno, sia quelle nelle quali l'organismo non è visibile a causa dell'agglutinamento della lorica o per la sua assenza (cagionata dalle operazioni di conservazione). E' così possibile incorrere in una piccola sovrastima (circa il 5%) degli organismi conteggiati in quanto nell'analisi, risultano inclusi anche quelli già morti al momento del prelievo (Fonda Umani & Milani, 1990).

B) Microscopia ad epifluorescenza

In alcuni studi sul plancton si riscontrano alcune difficoltà nelle analisi al microscopio dei campioni operato con il metodo tradizionale del "contrasto di fase". Con particolare riguardo al microzooplancton, tale metodo di osservazione impedisce l'osservazione dei differenti organismi per la presenza di un'elevata quantità di detrito nei campioni d'acqua; inoltre non permette l'analisi delle caratteristiche citologiche degli organismi e perciò rende difficoltosa l'osservazione e la classificazione dei Ciliati, soprattutto quelli non loricati (prevalenti in ambienti di acqua dolce e salmastra). La metodologia tradizionale di osservazione al microscopio a contrasto di fase inoltre, prescindendo dai tempi necessari per l'analisi dei campioni, non risulta efficace nel far distinguere il microzooplancton eterotrofo dagli organismi autotrofi presenti nei campioni d'acqua.

Al fine di superare tali difficoltà, in occasione delle analisi quantitative svolte sui campioni delle Lagune Pontine è stata messa a punto la tecnica dell'epifluorescenza che, attraverso l'osservazione dei campioni al microscopio, ha consentito di evidenziare solo gli organismi in essi contenuti -distinguendoli tra autotrofi ed eterotrofi- e di non far risaltare il detrito presente.

Tale tecnica, di relativa recente comparsa (Fenchel, 1987; Stoecker et al., 1989; Burney et al., 1981; Laybourn-Parry et al., 1992; Sorokin, 1977; Caron, 1983; Davis, 1982; Sherr & Sherr, 1983; Sherr et al., 1986; Bloem et al., 1989) è normalmente applicata negli studi del nano e picoplancton, cioè in quegli studi che considerano individui planctonici $< 20 \mu\text{m}$ (Flagellati, piccoli Ciliati, Batteri) e si è dimostrata la migliore anche per il microzooplancton in quanto evita la sottostima del numero degli organismi rispetto alle tecniche di osservazione al microscopio a contrasto di fase.

Essa si basa su una proprietà particolare posseduta da alcune sostanze: la fluorescenza. Quest'ultima è definita come la luminescenza di una sostanza eccitata da una radiazione. In altre parole alcune sostanze, colpite da una radiazione di energia relativamente alta (radiazione di eccitazione), ne assorbono (o convertono) una piccola parte e la restante la emettono a loro volta sotto forma di luce; ciò consente loro di divenire fluorescenti. La peculiarità del fenomeno non è tanto nella capacità di dette sostanze di riemettere energia sotto forma di luce, quanto nelle modalità attraverso le quali tale riemissione avviene. Infatti la lunghezza d'onda della luce di emissione fluorescente che tali sostanze eccitate da una radiazione con lunghezza d'onda vicino all'UV invisibile sono in grado di emettere è più lunga della loro radiazione di eccitazione e rientra nel campo della luce visibile; per tale motivo le sostanze fluorescenti in un fondo scuro risultano all'osservazione variamente colorate.

In natura esistono varie sostanze fluorescenti; di particolare importanza sono i pigmenti clorofilliani, presenti negli organismi autotrofi ed in quelli mixotrofi (es. Batteri (Sorokin, 1981) e Cyanobatteri). Sfruttando, dunque, tale peculiare proprietà delle clorofille, è possibile distinguere le cellule con o senza pigmenti fotosintetici: nel caso specifico di campioni d'acqua, la fase eterotrofa del microplancton da quella autotrofa o mixotrofa sulla base della presenza o assenza, rispettivamente, di pigmenti fotosintetici autofluorescenti.

Nei vetrini preparati vengono così messi in rilievo gli organismi che presentano i pigmenti clorofilliani (autotrofi), che vengono anche definiti autofluorescenti. All'osservazione, gli individui con pigmenti autofluorescenti sono colorati di rosso, distinguendosi da quelli non pigmentati strettamente eterotrofi che non saranno evidenti (Flagellati non fotosintetici).

Un vantaggio di questa tecnica consiste nella possibilità di poter mettere in evidenza, e quindi conteggiare, oltre agli individui autotrofi anche gli individui che non possiedono pigmenti clorofilliani e che quindi non sono autofluorescenti di propria natura (cioè, nel campo planctonico, gli organismi eterotrofi). Esistono infatti delle sostanze di sintesi (i così detti epifluorescenti o fluorocromi) capaci di legarsi a strutture o a composti presenti negli organismi da analizzare (quali ad es. il legame amminico, oppure il DNA); tali sostanze, essendo anch'esse fluorescenti, rendono tali gli organismi ad essi legati e, perciò, evidenti al microscopio; in altre parole tali sostanze conferiscono la fluorescenza agli organismi con i quali si legano. Gli organismi eterotrofi così resi fluorescenti risultano variamente colorati.

Le sostanze di sintesi epifluorescenti utilizzate negli studi relativi ai Batteri ed al nanoplancton sono diverse: FITC (Isotiocianato di fluoresceina), AO (Acridine Orange), proflavine (3-6-diaminoacridine emisolfato), fluorocromo primulina (Bloem et al., 1986), DAPI (4',6 diamidino-2-fenilindole).

La scelta del tipo di colorante fluorescente è dettata dal tipo di organismo che si vuole osservare, nonché dal genere di studio che si vuole portare avanti; ad esempio, per gli studi citologici, come la divisione cellulare ed il tempo di riproduzione, o nelle misure in laboratorio della produzione secondaria, è preferibile utilizzare il "DAPI" e l'"Acridine orange", che si legano al nucleo degli organismi da analizzare (Coats & Heinbokel, 1982).

Da prove effettuate (Grenni, Creo, in press) il colorante più idoneo per lo studio del microplancton (ma anche del nanoplancton) è il FITC (soprattutto se confrontato con il DAPI); del resto esso si era già dimostrato efficace nelle conte batteriche e dei Flagellati, dei quali è riuscito ad evidenziare il profilo cellulare, le strutture interne ed i flagelli (Sherr & Sherr, 1983). La soluzione colorante di FITC consiste (Sherr & Sherr, 1983) in 0.25 ml di

tampone sodio carbonato 0.5 M (pH 9.5), 1.1 ml di tampone potassio fosfato 0.01 M (pH 7.2), 1.1 ml di cloruro di sodio allo 0.85% ed 1.0 mg di FITC (Isomero I, Calbiochem, San Diego, California); tale soluzione viene tenuta al buio in frigo ed utilizzata entro 2-3 settimane. Giova sottolineare che, in via precauzionale, al fine di eliminare residui batterici è opportuno filtrare le soluzioni man mano preparate ad una porosità di 0.22 μm .

Secondo alcuni Autori la distinzione tra organismi autotrofi ed eterotrofi in vetrini preparati con il FITC è possibile (Sherr & Sherr, 1983) in quanto la fluorescenza delle clorofille è diversa da quella dei coloranti epifluorescenti; in particolare gli organismi autotrofi autofluorescenti risultano rossi mentre gli organismi eterotrofi colorati con il FITC risultano di colore verde chiaro. Il FITC, nonostante si leghi anche agli organismi autotrofi – secondo Sherr & Sherr (Sherr & Sherr, 1983) che lo avevano utilizzato, seppur con esclusivo riguardo al nanoplancton- non maschererebbe l'autofluorescenza rossa della clorofilla delle cellule autotrofe. E' da sottolineare però il fatto che le sostanze autofluorescenti si legano sia agli organismi eterotrofi (cioè privi di clorofilla), sia agli organismi autotrofi, la cui autofluorescenza spesso viene coperta dalla colorazione dei fluorocromi; infatti la lunghezza d'onda che eccita le clorofille, eccita anche i fluorocromi per la sovrapposizione dello spettro di emissione delle sostanze fluorescenti con quello della clorofilla (Caron, 1983). Ciò avrebbe potuto implicare un errore nella stima della proporzione tra la fase autotrofa e quella eterotrofa. Per tale motivo mentre il conteggio di tutti gli organismi, sia autotrofi (colorati in verde e rosso o solo in rosso) che eterotrofi (colorati in verde) viene effettuata in vetrini nei quali si è utilizzato un fluorocromo e per il conteggio dei soli individui autotrofi i vetrini vengono preparati senza l'ausilio di tali sostanze. La differenza di conteggio tra i due vetrini dello stesso campione permette di conoscere l'abbondanza degli organismi autotrofi ed eterotrofi (Caron, 1983).

Sotto il profilo metodologico-strumentale, il microscopio utilizzato negli studi di epifluorescenza è di tipo rovesciato con illuminazione verticale; la fluorescenza è data da una lampada -per lo più ai fumi di mercurio HBO 50W- che emette luce in un "range" di lunghezze d'onda nel campo degli Ultra Violetti.

Con i filtri di eccitazione che si possono inserire nel cammino ottico del raggio incidente, da tale "range" viene adeguatamente selezionata la lunghezza d'onda che eccita i pigmenti clorofilliani presenti negli individui che li contengono e che, in un fondo scuro quale quello del filtro ove viene fatta l'osservazione, risulteranno evidenti. Analogamente, sempre sul cammino ottico della luce fluorescente vengono inseriti dei filtri di barriera che tolgono

l'eccesso di luce di eccitazione (quella cioè non assorbita dalle sostanze fluorescenti) e che potrebbe in qualche modo interferire con l'osservazione .

Gli obbiettivi normalmente utilizzati sono il Neofluoar con immersione ad olio, per il nanoplancton a 100X, mentre per il microzooplancton a 63X; l'oculare è in entrambi i casi di 10 ingrandimenti.

Per quanto riguarda i filtri Millipore utilizzati per la filtrazione dei campioni e osservati al microscopio, si sottolinea come, in genere, possono essere di varia porosità (a seconda della dimensione degli organismi che si vogliono osservare: 0.22 μm nel caso del nanoplancton e 10 μm nel caso del microzooplancton); tali filtri devono essere preventivamente trattati con l'Irgalan Black (Watson et al., 1977), colorante nero che copre la fluorescenza del filtro e che permette di avere un fondo scuro all'osservazione del vetrino. I campioni di acqua da sottoporre alla filtrazione dopo il prelievo vengono preservati con la gluteraldeide al 25% in quantità tale da avere una concentrazione finale nei campioni del 10% in gluteraldeide (Laybourn-Parry et al., 1992); tale fissante, a differenza della formalina, evita la distruzione delle clorofille e, quindi, non permetterebbe più di distinguere gli organismi autotrofi da quelli eterotrofi. Nei campioni di acqua dolce (Caron, 1983) è consigliabile tamponare la gluteraldeide con un tampone a pH 7 preparato in acqua distillata di sodio cacodilato (0.1 M; Berninger et al., 1991).

Il volume di campione da filtrare per la preparazione dei vetrini varia: per il nanoplancton tale volume può essere di 10-20 ml di campione (fissato con gluteraldeide, mantenuti in frigo ed al buio), mentre per il microplancton può essere maggiore (30-40 ml) tratti da un campione di 250 ml ottenuto dalla concentrazione di 2 l con il metodo del flusso tangenziale (lo stoccaggio dei campioni e il fissante è il medesimo dei campioni di nanoplancton). La pressione di filtrazione del campione non deve superare i 5-10 cm Hg per evitare la rottura delle cellule.

Al di sotto dei filtri Millipore sono posti dei prefiltri per evitare la dispersione del campione sul filtro stesso.

Per l'osservazione dei soli organismi autofluorescenti il filtro così preparato è direttamente montato su vetrino; tra il filtro ed il vetrino copri-oggetti sopra apposto è inserita una goccia di olio d'immersione RS per microscopia (Carlo Erba).

Analogamente è la preparazione dei filtri per l'osservazione degli organismi sia autotrofi che eterotrofi; viene filtrata una medesima quantità di campione usata per la preparazione del

filtro per l'osservazione degli autofluorescenti ma , prima dell'osservazione, detto filtro è trattato con una certa quantità di colorante fluorescente che, a seguito di diverse prove, come già detto, è risultato il FITC il colorante migliore.

I filtri immersi nella soluzione di FITC vengono lasciati ad incubare per 10 minuti al buio; il FITC viene poi filtrato ed il filtro risciacquato con 5-10 ml di tampone sodio carbonato 0.5 M (pH 9.5; Sherr & Sherr, 1983); il filtro è montato su vetrino ed è osservato al microscopio dopo che tra il filtro ed il vetrino coprioggetti è messa una goccia d'olio d'immersione RS per microscopia (Carlo Erba).

E' da sottolineare il fatto che i campioni sono stati analizzati entro una settimana dalla raccolta; per ogni campione sono state fatte 2-3 repliche e per ogni vetrino sono stati contati 50-100 campi.

Per tradurre i conteggi effettuati in numero di organismi per litro, è stata misurata esattamente l'area del campo del microscopio (A) e l'area effettiva di filtrazione (B); la formula applicata è la seguente (Sherr & Sherr, 1983):

$$n^{\circ}/l = N \cdot n/ml \cdot 1000 \cdot f$$

dove N è la media degli organismi per campo, n è il numero di campi dell'area filtrata, ml sono i millilitri di campione filtrati, f è il fattore di diluizione del campione (nel caso di aggiunta della gluteraldeide (per il nanoplancton) o di concentrazione, nel caso del microzooplancton).

Il numero di campi presente nell'area filtrata (n) risulta dalla divisione tra l'area effettiva di filtrazione e l'area di un singolo campo (B/A). Per ottenere il numero totale di nanoplancton eterotrofo e di microzooplancton è stata poi fatta la differenza in numero tra i conteggi del filtro trattato con FITC e quelli senza.

La tecnica di analisi con l'epifluorescenza ha avuto notevole estensione dei campi di applicazione; tra questi l'estensione della stessa agli organismi microzooplanctonici e all'analisi dell'immagine del microscopio a fluorescenza al computer (Chisholm et al., 1988; Viles & Sieracki, 1992; Sieracki et al., 1989; Sieracki & Webb, 1991; Yentsch et al., 1983; Montagnes et al., 1988) che consente il conteggio automatico degli organismi picoplanctonici e nanoplanctonici e, quindi, velocizza ulteriormente l'analisi dei campioni.

5- Il ruolo del microzooplancton nella catena trofica

In ogni ambiente eterogeneo la distribuzione degli organismi dipende dalla loro dimensione nonché dal loro potenziale tasso di crescita. I Protozoi, per la loro peculiarità di sfruttare al meglio le fluttuazioni delle disponibilità delle risorse alimentari e per le piccole dimensioni, riescono ad adattarsi continuamente alle modificazioni dell'ambiente in cui vivono; essi sono presenti in ogni ambiente acquatico, dal più esteso oceano alla più piccola pozza d'acqua. Da qui la loro rilevanza e, di conseguenza, la rilevanza del microzooplancton.

Negli ultimi decenni sono stati condotti studi sul microzooplancton relativi non solo agli aspetti morfologici e sistematici, ma anche a quelli biochimici ed ecologici, allo scopo di valutarne la rilevanza nella rete trofica del mare e, più generalmente, negli ambienti acquatici. Più esattamente si è approfondito il ruolo dei popolamenti microzooplanctonici nei trasferimenti energetici dai produttori primari ai successivi anelli della catena trofica (Margalef, 1963; Skogstad et al., 1987; Montagnes et al., 1988; Beers & Stewart, 1971; Epstein et al., 1992; Stoecker & McDowell Capuzzo, 1990). Seppure infatti -in coltura- i Protozoi si siano mostrati in grado di assumere direttamente dall'ambiente esterno composti del carbonio disciolti quali zuccheri, amminoacidi, vitamine, acidi grassi e nucleotidi (Rasmussen, 1973; Soldo & Merlin, 1977; Soldo et al., 1978), in natura predomina la fagotrofia. Si è potuto così constatare che essi costituiscono l'anello essenziale per operare il trasferimento dell'energia contenuta nel fitoplancton -di cui appunto sono consumatori- ai livelli successivi della catena trofica (Taylor G.T., 1982).

La maggior parte dei Ciliati è infatti erbivora e, preferenzialmente, si nutre di Flagellati (tra cui Dinoflagellati) nonché di alcune specie di Diatomee e Coccolitoforidi.

Studi teorici sulla dinamica delle catene alimentari hanno dimostrato che il microzooplancton è capace di consumare una porzione significativa della produzione primaria (Pace et al., 1984; Frost, 1987; Vezina & Platt, 1988; Ferrier & Rassoulzadegan, 1991; Benovic, 1981) ed è stato spesso possibile distinguere all'interno di alcuni individui la preda e la presenza di vacuoli digestivi. Del resto è stata verificata (Skogstad et al., 1987; Taylor G.T., 1982) la predazione dei Ciliati planctonici sulle alghe unicellulari (quali, appunto, Dinoflagellati autotrofi, e Diatomee, delle quali consumano circa il 6% della produzione giornaliera). E' stato rilevato (Landry & Hassett, 1982) anche che gli organismi microzooplanctonici effettuano il maggior prelievo sulla frazione di fitoplancton di dimensioni minori, il nanofitoplancton, costituito da cellule di dimensioni $<30\ \mu\text{m}$ (Cabrini et al., 1989). Infatti il microzooplancton limita l'abbondanza di nanoplancton eterotrofo (Berninger et al., 1991; Verity, 1991). I Protozoi

microzooplanctonici sono rilevanti, quindi, nella catena trofica anche per il trasferimento ai livelli superiori dell'energia contenuta nel nanozooplancton (Flagellati eterotrofi e piccoli Ciliati) e nel picoplancton e la loro abbondanza e diversità (di popolazione) appare controllata, tra gli altri fattori, dalla competizione per la preda in quanto ogni specie è selettiva per il tipo di preda (ad esempio nei Ciliati bentonici, ogni popolazione si nutre solo da una a 5 specie di prede).

Il popolamento protozooplanctonico (micro e nanoplanctonico) è sempre associato a quello batterico. Alcune specie di Ciliati sono in grado di predare i Batteri (consumano cioè picoplancton; Epstein et al., 1992; Margalef, 1982; Taylor G.T., 1982; Fonda Umani, 1989; Cabrini et al., 1989). L'influenza dei Ciliati sulla dinamica di popolazione dei Batteri si esplica attraverso una predazione diretta, "grazing", che è comunque moderata, ed indirettamente con il "grazing" esplicato sui Flagellati, a loro volta batteriofagi. Giova sottolineare che tali informazioni sono acquisibili attraverso il metodo dell'epifluorescenza applicato alla conta batterica (Turner & Tester, 1992). I Ciliati batteriofagi sono però competitivi con gli altri Ciliati fitofagi solo in presenza di un'elevata concentrazione batterica. Le zone con tale caratteristica sono quelle eutrofiche, quelle cioè con elevata densità di materiale organico da degradare e, quindi, di Batteri. Infatti in acque aperte di mari e laghi la concentrazione batterica è bassa (es. 7×10^5 Batteri/ml in acque aperte) e non si rinvenivano, se non in concentrazioni esigue, i Ciliati batteriofagi che, quindi, vi svolgono un modesto ruolo nel turn-over del plancton (Fenchel, 1980 e 1987).

Per i Ciliati che si cibano di particelle più grosse ($>1-5 \mu\text{m}$) esiste, invece, una competizione con i Metazoi per la capacità di questi ultimi di concentrare particelle da sospensioni diluite.

Come ora esposto, in presenza di sostanza organica in degradazione, dove si verificano picchi di accrescimento batterico (di 10^9 o più cellule/ml), si forma in pochi giorni un aumento considerevole di Ciliati batteriofagi che rapidamente riduce il numero di Batteri. Tali Ciliati sono a loro volta prede di Ciliati carnivori o di altri organismi (Rotiferi, Turbellari, Copepodi, larve di pesci, alcuni pesci planctonofagi nonché Salpe, larve di Policheti, Pteropodi, Chetognati ed altri ancora; Conover, 1982) che ristabiliscono l'equilibrio numerico della popolazione microzooplanctonica. Conferma di ciò si è avuta in esperimenti di laboratorio (Berk et al., 1977) ove si è dimostrato che i Protozoi non Flagellati sono appunto una potenziale sorgente di nutrimento per i Copepodi; tra essi negli ambienti marini, di estuario e in acque costiere (Smetacek, 1981; Peinert et al., 1982) nonché nei laghi temperati (Porter et al., 1979) dominano i Ciliati.

5.1. Rapporti tra i popolamenti microzooplanctonico e fitoplanctonico

Come abbiamo detto, i Protozoi possono adeguarsi rapidamente alle variazioni ambientali per i brevi loro cicli riproduttivi (12-24 ore, secondo Heinbokel, 1978 a e b), per la loro rapida crescita dovuta all'elevato metabolismo e per la caratteristica abilità ad "incistarsi" in mancanza di cibo, nonché per la possibilità di svilupparsi in grosse cellule posponendo la divisione cellulare e la conseguente riproduzione finché il cibo non torni ad essere disponibile.

Un'ipotesi tipica di modificazione ambientale è rappresentata dall'incremento dell'eutrofizzazione che comporta un "rimpiazzo tassonomico" nella comunità del plancton per cui gli organismi di dimensioni maggiori, in predominanza Ciliati Oligotrichi, sono progressivamente rimpiazzati da forme più piccole (Flagellati). Ne deriva che, determinando il rapporto tra Ciliati Oligotrichi e Flagellati, è possibile determinare il livello di eutrofizzazione dell'ambiente.

Una conseguenza dell'eutrofizzazione è la maggior frequenza del manifestarsi di "blooms" fitoplanctonici (le così dette maree rosse, una fioritura improvvisa e rilevante del fitoplancton) che si verificano a seguito dell'aumento di sali nutritivi ed all'instaurarsi di determinate condizioni ambientali correlate a modificazioni di temperatura, salinità, ecc.; ciò comporta un rapido aumento della concentrazione della preda per i Ciliati. Questi ultimi riescono a svilupparsi in modo altrettanto rapido, catturando prontamente l'energia del fitoplancton, sotto forma di biomassa; va sottolineata, a questo riguardo, la funzione di equilibrio ambientale svolta dal microzooplancton, in assenza del quale l'energia del fitoplancton non verrebbe trasferita agli altri organismi planctonici, ed andrebbe ad alimentare la comunità bentonica. Secondo delle stime, l'intera comunità di Ciliati consuma il 10% della produzione primaria giornaliera data dalle alghe unicellulari ed il 93% della produzione giornaliera dei Dinoflagellati (Epstein et al., 1992); il prelievo operato dai soli Tintinnidi può oscillare tra il 4 e il 16% (Heinbokel e Beers, 1979, in uno studio effettuato lungo le coste della California) ed arriva fino al 60% (Burkill, 1982, che riporta uno studio effettuato in un estuario dell'Inghilterra meridionale). In ambiente marino il rapporto tra Ciliati e fitoplancton è di circa 1:50 espresso in numero di cellule (ad ogni Ciliato, ne corrispondono 40-60 di fitoplancton) e di circa 1:10 espresso in biomassa (Margalef, 1982); con tale relazione, nota la quantità di Ciliati, è possibile così approssimativamente ottenere la quantità di fitoplancton e, quindi, la produzione primaria di un certo ambiente acquatico.

Va tuttavia sottolineato che le percentuali di prelievo di biomassa sopra descritte devono essere considerate orientative. Il tasso d'ingestione di fitoplancton da parte dei Ciliati rilevato

in condizioni sperimentali varia, infatti, sia in funzione del metabolismo proprio dell'organismo microzooplanctonico, sia in relazione alle diverse condizioni ambientali, sia alla densità e alle dimensioni del popolamento fitoplanctonico (Rassoulzadegan, 1978, 1982 a e b; Rassoulzadegan & Etienne, 1981; Capriulo, 1982; Capriulo & Carpenter, 1980, 1983; Landry & Hassett, 1982; Scott, 1985; Paranjape, 1990).

La successione Batteri, Flagellati eterotrofi, Ciliati che si verifica a seguito di "blooms" fitoplanctonici è stata osservata in zone di risalita di acque profonde (upwelling) altamente nutritive ed in aree di mare aperto (Sorokin, 1977).

Stime di "grazing" (Paranjape, 1990) del microzooplancton sul fitoplancton, mostrano che nella frazione microzooplanctonica è presente in elevata percentuale la "clorofilla *a*", cosa che conferma il ruolo fitofago (Beaver & Crisman, 1989; Beers & Stewart, 1971); ed infatti studi in ambiente costiero confermano che le quote di crescita della popolazione naturale di Tintinnidi sono fortemente correlate con quelle del nanofitoplancton (ove è presente la "clorofilla *a*" (Verity, 1987).

E' quindi evidente che l'abbondanza del popolamento microzooplanctonico è correlata positivamente con quello del popolamento fitoplanctonico e quindi con la clorofilla; Beers & Stewart, 1971); tale dato può essere utilizzato al fine dell'importanza ambientale del microzooplancton stesso. A questo riguardo si sottolinea il ruolo dei Tintinnidi come indicatori della qualità dell'acqua e delle correnti inteso come indicatore di condizioni fisico-chimiche particolari; infatti le diverse specie prediligono ognuna acque più diluite, più salate e così via.

5.2. Il riciclo dei sali nutritivi

Il microzooplancton, grazie ai rapidi tassi di crescita ed ai tassi metabolici elevati, è in grande misura responsabile del riciclo dei sali nutritivi (Goldmann & Caron, 1985; Harrison, 1980; Caron, 1991; King et al., 1987; Fenchel, 1987). L'azoto ed il fosforo vengono assunti sotto forma di particellato e restituiti all'ambiente l'uno come ione ammonio (Johannes, 1968; Fenchel & Harrison, 1976; Soldo & Merlin, 1977) e l'altro sotto forma di fosfati. Il ruolo del microzooplancton nel ciclo dei nutrienti è descritto anche da Stout, 1980, soprattutto in relazione alle interazioni di questi organismi con gli altri Protozoi.

Un ruolo significativo nella dinamica della chimica dell'acqua e nella formazione dei sedimenti è operato anche dalle loriche chitinee dei Tintinnidi, dai gusci calcarei dei Foraminiferi, da quelli silicei dei Radiolari, o da quelli di solfato di stronzio degli Acantari

(Heinbokel, 1982). Infatti, ad esempio, le parti dure di tali organismi sedimentano sul fondo dell'ambiente acquatico in cui si trovano e lì subiscono, con il lento trascorrere del tempo, processi diagenetici costituendo parte integrante della roccia sedimentaria così formata. L'analisi di quest'ultima, e l'individuazione di tali strutture, consente di individuarne le specie ed il numero e, quindi, di datare il sedimento e di ricostruire le caratteristiche dell'ambiente al momento in cui detti organismi sono vissuti.

5.3: Organismi autotrofi e mixotrofi

Tra gli organismi appartenenti al microzooplancton (in particolare tra i Foraminiferi, Radiolari, Acanthari e Ciliati), sono state individuate alcune specie, molto frequenti soprattutto in acque tropicali, che presentano fenomeni di simbiosi.

E' tra i Ciliati che si riscontrano le situazioni simbiotiche più interessanti; tra le molte simbiosi che si possono verificare è rilevante in particolare dal punto di vista trofico l'endosimbiosi con un'alga unicellulare che rende gli organismi, di per sé eterotrofi, mixotrofi o autotrofi.

Giova ricordare che gli organismi eterotrofi (quali i Ciliati), sono caratterizzati dalla necessità di catturare dall'ambiente esterno materiale organico per la loro nutrizione. L'autotrofia caratterizza invece quegli organismi capaci di trasformare in sostanze nutritive la sostanza inorganica catturata dall'ambiente esterno attraverso diversi processi, tra cui spicca la fotosintesi. La mixotrofia, infine, è la possibilità che alcuni organismi hanno di sopravvivere utilizzando, a seconda delle condizioni dell'ambiente in cui sono inseriti, uno o l'altro processo nutritivo.

Si è detto che il microzooplancton, in generale, è eterotrofo e, specificamente, fagotrofo; solo alcune specie sono mixotrofe, mentre l'unica specie totalmente autotrofa (sempre a causa della endosimbiosi con un'alga unicellulare) è un Ciliato chiamato *Mesodinium rubrum*. Quest'ultimo si comporta nell'ambiente acquatico da organismo microzooplanctonico per le possibilità di locomozione ma anche da organismo fitoplanctonico sia per la sua autotrofia sia per la possibilità di provocare le maree rosse non tossiche, tipiche degli organismi fitoplanctonici. Tale organismo ha notevole importanza particolarmente nelle aree di risalita di acque profonde (upwelling), dove è responsabile di gran parte della produzione primaria (Taylor F.J.R., 1982).

Il fenomeno della mixotrofia causata dalle richiamate simbiosi con alghe unicellulari è in particolare osservata in molti Ciliati planctonici, marini e di acque dolci, come ad esempio

alcune specie della fam. Strombididae (ordine Oligotrichida: *Laboea strobila*, *Strombidium capitatum* ed alcune specie del genere *Tontonia*; Montagnes & Lynn, 1988). Tale simbiosi avviene mediante la fagocitosi degli endosimbionti procariotici dotate di cloroplasti che, tuttavia, non vengono digeriti dal Ciliato ma rimangono in vita al suo interno. I cloroplasti che si osservano in questi organismi non sono quindi propri dei Ciliati ma derivati dalle cellule algali da questi ingerite (Blackbourn et al. 1973, Laval-Peuto et al. 1988, Stoecker & Silver, 1987; 1990; Stoecker et al. 1988/89; Fenchel, 1987; Rogerson et al., 1989; Perriss et al., 1994; Michaels, 1988). A seguito dell'ingestione degli endosimbionti i Ciliati diventano mixotrofi continuando ad essere in grado di fagocitare particelle e, contemporaneamente, di operare anche la fotosintesi grazie all'alga presente al loro interno (Jonsson, 1987; Stoecker et al., 1988; Putt, 1990); quest'ultima, altamente modificata a seguito di detta simbiosi, ha come beneficio dalla stessa la possibilità di acquisire più facilmente nutrienti minerali grazie alla capacità di locomozione del suo ospite.

La presenza di simbionti fotosintetici nei Ciliati non è correlata alla posizione tassonomica dell'ospite, ma piuttosto a speciali tipi di habitat (Fenchel, 1987).

Il tempo di ritenzione dei cloroplasti funzionali all'interno dei Ciliati derivanti dalle cellule algali ingerite dipende dal tipo di cloroplasto (Stoecker & Silver, 1990).

Il ciclo vitale del cloroplasto si può concludere all'interno del Ciliato; in tale ipotesi, il Ciliato, avendo la necessità di continuare la simbiosi, deve catturare una nuova alga per poter beneficiare del relativo cloroplasto. Il Ciliato deve affrontare una analoga necessità al momento della sua riproduzione per divisione; il cloroplasto, infatti, non si divide con il suo ospite, ma rimane all'interno di un solo organismo, costringendo l'altro a catturare una nuova alga.

In alcuni casi le associazioni simbiotiche sono obbligatorie per entrambi gli organismi nel senso che nessuno di essi può crescere senza l'altro; in questo caso la morfologia del simbionte è altamente modificata. Si può intuire che la simbiosi tra un organismo fotosintetico ed uno fagotrofo si stabilisca preferenzialmente in condizioni di stratificazione dell'acqua e/o in ambienti oligotrofici dove il ciclo dei pochi nutrienti all'interno del consorzio simbiotico porta vantaggio per entrambe le parti. In tali condizioni, sfavorevoli all'autotrofia, gli organismi in simbiosi si nutrono attraverso l'ingestione di altre cellule; modificatosi l'ambiente (venuta, ad esempio, meno la stratificazione dell'acqua e quindi tornati in circolazione i nutrienti), gli organismi preferiscono la fotosintesi. In tali condizioni i Ciliati Oligotrichi con cloroplasti regolano la loro posizione nella colonna

d'acqua, normalmente durante il giorno a metà altezza della zona eufotica (come il fitoplancton, che ivi si colloca per necessità fotosintetiche).

L'importanza ecologica e trofica delle forme simbiotiche è data dal loro stesso numero; esse, sia in acque costiere che oceaniche, possono costituire fino ad oltre il 40% dei Ciliati presenti (Stoecker & Silver, 1987, Stoecker et al. 1989, Stoecker 1991). Il loro contributo alla produzione primaria totale, nonostante il loro numero è, tuttavia, minimo, fatta eccezione per le zone di up-welling.

Per completezza espositiva si sottolinea che la mixotrofia è un fenomeno esistente anche nel fitoplancton per il quale, ovviamente, avviene il processo inverso a quello ora descritto. In particolare alcuni Dinoflagellati (tra cui *Noctiluca*) che, come organismi fitoplanctonici, sono muniti di cloroplasti, sviluppano una nutrizione anche di tipo eterotrofo, in particolare saprofagico, assorbendo dall'ambiente esterno la sostanza organica disciolta nell'acqua (Fenchel, 1987).

6- Il microzooplancton come indicatore ambientale

6.1: Gli indicatori ambientali biologici

Un "indicatore" è un elemento che consente di interpretare un fenomeno non comprensibile a causa delle troppe variabili in esso contenute (Nicolai, 1992).

Un indicatore ambientale è in particolare rappresentato da un valore in grado di trasferire sinteticamente l'informazione relativa allo stato o alla dinamica delle condizioni ambientali a potenziali utenti che ne faranno un uso mirato a specifici obiettivi (Cirillo et al., 1996).

Gli indicatori ambientali possono essere formulati, e quindi raggruppati, secondo vari criteri. Un recente rapporto dell'OECD (OECD, 1994) fa riferimento al concetto di causalità applicato alle attività umane: queste ultime esercitano una pressione sull'ambiente (*pressione antropica*) cambiando la qualità e la quantità delle sue risorse (*lo stato* dell'ambiente). Da qui la classificazione degli indicatori ambientali in: "*indicatori di pressione*", "*indicatori di stato*" e "*indicatori di risposta*".

Anche l'EPA, in un rapporto sugli indicatori per il monitoraggio dell'inquinamento (EPA, 1990) raggruppa gli indicatori in tre gruppi: due di essi sono assimilabili ai gruppi dell'OECD "*indicatori di pressione*", e "*indicatori di risposta*". Il terzo gruppo, comprendente gli "*indicatori di esposizione e gli indicatori di habitat*", mette l'accento sulle

caratteristiche dell'ambiente (indicatori di esposizione) e sugli attributi che caratterizzano le condizioni necessarie al mantenimento di un organismo, una popolazione o una comunità in assenza di inquinamento (indicatori di habitat).

Gli indicatori ambientali giocano un ruolo fondamentale nella procedura di Valutazione di Impatto Ambientale (V.I.A.). In questo senso un indicatore ambientale è definito anche come variabile statistica, quantitativa o qualitativa, che descrive un fattore ambientale di interesse naturale o umano in un contesto specifico (Colombo, 1996).

Un indicatore è quindi una variabile oggettiva, scelta soggettivamente. Può essere definito in una o più dimensioni ed è generalmente espresso in funzione del tempo e/o dello spazio.

In ecologia sono presi in considerazione due tipi di indicatori ambientali: "biologici" e "non biologici".

Gli "indicatori non biologici" presi in considerazione comunemente concernono le caratteristiche chimico-fisiche di un sito: ad esempio la concentrazione di nitrati e fosfati in un corso d'acqua sono indicatori della quantità di nutrienti in esso presenti e della sua eutrofizzazione; la concentrazione di CO e di NO_x sono indicatori del grado di inquinamento atmosferico, e così via. Le caratteristiche chimico-fisiche di un sito sono però un aspetto particolare e spesso istantaneo della qualità dell'acqua o dell'aria e vengono espressi in valori numerici.

Gli "indicatori ambientali biologici" sono invece costituiti da organismi o da strutture di diverso livello della scala gerarchica che esprimono la risultante di una serie di parametri. Poiché gli organismi viventi sono dotati, entro certi limiti, di autoregolazione, le loro caratteristiche fisiologiche o strutturali possono rispecchiare situazioni che si manifestano su scale temporali relativamente lunghe, non risentendo delle oscillazioni su piccola scala (Nicolai, 1992; Blundo & Fusco, 1982). In tal senso, quindi, sono più idonei, rispetto a quelli non biologici, a rappresentare le caratteristiche ambientali; un'analisi completa di un ambiente presuppone comunque l'utilizzazione integrata di entrambi tali indicatori.

E' definito indicatore biologico uno o più taxon (a livello di specie, genere, famiglia) con la cui presenza (o assenza) e abbondanza indica una determinata situazione dell'ambiente (Ravera, 1986); in altre parole si intende un gruppo di organismi che mostrano requisiti, la cui presenza o assenza in un certo ambiente ben rappresenta particolari caratteristiche dello stesso. Più in generale si può dire che un indicatore biologico consiste in una risposta

biologica ritenuta idonea per giudicare una data situazione ambientale (Blundo & Fusco, 1982).

Gli indicatori biologici vengono misurati mediante monitoraggio biologico, cioè attraverso lo studio sistematico delle risposte biologiche degli organismi presi in esame, per valutare i cambiamenti ambientali di origine naturale o antropica ed è finalizzato alla misura e al controllo della qualità ambientale (Matthews et al., 1982).

6.2: Il microzooplancton come indicatore biologico

Anche i Protozoi sono considerati indicatori degli inquinanti (Curds, 1982; Fenchel, 1987) e dello stato trofico dell'ambiente. Come abbiamo illustrato, i Protozoi, grazie alla loro rapida crescita dovuta all'elevato metabolismo e grazie ai brevi cicli riproduttivi (12-24 ore secondo Heinbokel, 1978 a e b), si possono adeguare rapidamente alle variazioni ambientali: la dinamica della relativa popolazione in un certo ambiente è un indicatore sensibile della qualità dell'ambiente medesimo.

I Ciliati, in particolare, come abbiamo esposto nei capitoli precedenti, giocano un ruolo fondamentale nel controllo dei Batteri ed, in alcuni casi, del fitoplancton.

I Protozoi sono indicatori di inquinamento acquatico, correlandosi allo stato trofico dell'ambiente. Aumentando in quest'ultimo la sostanza organica (ad esempio a causa di scarichi inquinanti), aumenta la quantità di Batteri che la decompongono, ma, che nella decomposizione, consumano ossigeno. Un parametro che definisce la quantità di sostanze organiche da degradare è il BOD (*Biological Oxygen Demand*); tale parametro però non è sufficiente a definire il livello di inquinamento, soprattutto perché non individua le sostanze organiche presenti nell'acqua e che devono essere degradate. D'altra parte è difficile poter analizzare tutte le componenti organiche presenti in acqua che, tra l'altro, talvolta agiscono in modo diverso anche a seconda delle condizioni di temperatura, salinità, interazione con altre sostanze ecc. Né l'indicatore biologico (il BOD), né l'analisi chimica, garantiscono un soddisfacente grado di certezza nell'analisi volta a valutare il livello di inquinamento di un ambiente acquatico: ecco che l'analisi delle comunità planctoniche e bentoniche risulta essere decisiva.

Il descritto processo (aumento di Batteri, poi di Flagellati e quindi di Ciliati batteriofagi) avviene sia in ambiente marino, sia in ambiente di acque salmastre e dolci. Con riferimento a quest'ultimo, ed in particolare per l'inquinamento dovuto a materiale organico, si parla di "Saprobic system", cioè di quel sistema di successione di organismi che si instaura in zone in

cui si verificano scarichi organici. La possibilità di riferirsi ai Ciliati quali indicatori di questi sistemi deriva, come detto, dal fatto che a massivi aumenti di sostanza organica corrisponde un aumento considerevole di Ciliati batteriofagi (Fenchel, 1987); la composizione di queste comunità, poi, riflette sempre la condizioni chimiche dell'ambiente, soprattutto con riguardo all'ossigeno ed all'idrogeno solforato (H_2S) presente (Fenchel, 1987).

Studi sperimentali hanno dimostrato che i Ciliati hanno la possibilità sia di trasferire l'inquinante agli altri organismi della catena trofica, per la loro funzione di consumatori primari e di consumatori di detrito (alcune sostanze nocive si possono accumulare nel detrito: Beers et al., 1977; Dive & Persoone, 1984) sia di accumulare al loro interno varie sostanze (Beers et al., 1977). Per questo motivo, negli studi degli effetti degli inquinanti nell'ecosistema, è importante considerare tutti i Protozoi, e, quindi, i Ciliati nei prove di tossicità di sostanze nocive.

Il microzooplancton è sensibilmente influenzato dalle modificazioni delle masse d'acqua nelle quali questi è inserito. Così il popolamento microzooplanctonico varia in dipendenza delle modificazioni dei fattori fisico-chimici o biologici degli ambienti acquatici. I corpi d'acqua, indipendentemente dalle loro dimensioni, possono essere classificati per le loro comunità planctoniche che, pur non essendo unità biocenotiche, rappresentano un efficiente strumento discriminatorio di particolari aree con caratteristiche fisiche e chimiche ben definite (Ghirardelli & Specchi, 1982).

I fattori fisico-chimici (salinità, temperatura, pH) dell'ambiente acquatico sono sovente messi in correlazione con i "patterns" di distribuzione del microzooplancton la cui sopravvivenza o crescita al variare di detti fattori è stata analizzata anche in laboratorio. Si è dimostrato, e ciò è stato confermato anche da dati provenienti da studi in ambienti naturali, che molte specie di Ciliati e Flagellati marini e di acqua dolce sono "eurialini", cioè tollerano facilmente cambiamenti di salinità (Fenchel, 1987); in tal senso, però, sia in ambienti "iperallini" (cioè con elevata salinità) che di alta temperatura, oppure di acidità elevata (che si verificano, ad esempio, in alcuni laghi) la varietà delle specie è notevolmente ridotta.

Anche i dati micropaleontologici e di zoogeografia suggeriscono che le proprietà fisico-chimiche delle masse d'acqua sono degli importanti fattori che determinano l'abbondanza e la distribuzione di differenti specie di microzooplancton (Lee, 1980). Tra queste proprietà hanno maggiore rilevanza la temperatura, oltre che la clorofilla e i feopigmenti del nanoplancton, importante fattore correlato alla densità dei Tintinnidi (Sanders, 1987); questi ultimi mostrano altresì una significativa correlazione negativa con la

concentrazione di ossigeno e con la salinità (Travers 1978). Studi svolti in Adriatico (Fonda et al., 1989) hanno ben evidenziato che in condizioni di stratificazione termica e salina dell'acqua, la biomassa dei Ciliati, sia loricati che nudi, corrisponde o eccede la biomassa dei micrometazoi. In tali condizioni i Ciliati aumentano di densità di circa dieci volte; i micrometazoi, dal canto loro, aumentano solo poco più del doppio. Tra i Ciliati, quelli non loricati normalmente dominano in Adriatico, sia in densità che in volume, e in condizione di stratificazione, i Tintinnidi danno lo stesso contributo alla biomassa che forniscono i Ciliati non loricati. Questo significa che di per sé anche solo il numero di Ciliati, la loro biomassa (rispetto a quella data dai micrometazoi) e la proporzione tra le diverse componenti del microzooplancton possono definire le caratteristiche fisico-chimiche dell'ambiente.

Per meglio interpretare le situazioni in campo, sono stati studiati in ambiente anaerobico gli effetti della temperatura, della concentrazione dei solfati che aumenta proprio in queste condizioni e dell'abbondanza del nutrimento su Ciliati anaerobici (Massana et al., 1994); è stato osservato che per alcune di queste specie (*Plagiopyla nasuta* e *Metopus* sp.) la crescita è condizionata dalla temperatura e che concentrazioni elevate di solfuri (2 mM) la inibiscono. E' stato inoltre osservato che i tassi d'ingestione di Batteri dei Ciliati anaerobici sono gli stessi di quelli aerobici.

L'abbondanza e la distribuzione in ambiente acquatico del microzooplancton può essere determinata anche da un ulteriore fattore fisico: le correnti, sulle quali ci si soffermerà nel capitolo che segue.

I fattori descritti -temperatura, salinità ossigeno, correnti- incidono sulla popolazione microzooplanctonica, sia direttamente che indirettamente; in quest'ultimo caso, l'effetto si esplica attraverso l'influenza sul nanoplancton, la maggior fonte di nutrimento per il microzooplancton. Quindi la predazione, la competizione e la disponibilità di nutrimento sono i fattori biologici che, insieme a quelli fisici, determinano l'esatta dimensione e struttura della popolazione del microzooplancton in generale.

Gli effetti più evidenti dell'inquinamento (domestico o industriale) in un ambiente acquatico sono l'alterazione della struttura delle comunità sia planctoniche che bentoniche ivi presenti. L'ambiente, per mantenere l'equilibrio della propria comunità, deve mantenere costanti le sue caratteristiche chimiche e fisiche e non deve subire invasioni di altre specie, che creano nuove competizioni ed alterano la comunità già presente. In assenza di disturbi, un popolamento (planctonico o bentonico) non presenta variazioni notevoli nella sua struttura e biomassa, in quanto ha raggiunto un soddisfacente equilibrio con il suo ambiente. Se

l'ambiente fisico viene alterato, sia da una causa naturale sia dall'influenza antropica, la comunità reagisce modificando la sua struttura e la sua biomassa. Queste modificazioni si traducono con l'estinzione o con la diminuzione numerica di alcune specie e l'aumento di altre, dovuto alla scomparsa o alla diminuzione di specie antagoniste (Sladeczek, 1979, 1981).

Queste modificazioni delle comunità si possono descrivere in modo sintetico e quantitativo mediante gli indici biologici di diversità, che possono essere più o meno sofisticati, ma sono tutti basati sulla relazione tra il numero di individui appartenenti alle diverse specie ed il numero di specie presenti nell'ambiente. Seppure, quindi, ogni organismo acquatico può essere preso come indicatore di inquinamento, è lo studio delle comunità, e cioè di tutte le specie presenti, che definisce lo stato di salute di un ambiente. Questi indici vengono spesso applicati per confrontare il livello di inquinamento di ambienti diversi o, in uno stesso ambiente, per verificare la variazione nel tempo del livello di inquinamento.

Un esempio tipico di disturbo dell'ambiente e della conseguente modificazione delle comunità in esso presenti, è il versamento di scarichi domestici, ma anche quelli dovuti all'agricoltura intensiva ed agli scarichi industriali, che apportano in grande quantità azoto e fosforo; di questi ultimi sin dal secolo scorso, sono stati studiati l'impatto con l'ambiente (Kolkwiz & Marsson, 1908) e le modificazioni da essi cagionate sulle comunità.

In mare il fattore nutriente limitante è l'azoto disponibile (sotto forma di nitriti, nitrati, ammonio ed urea), che limita la crescita del fitoplancton. A minore presenza di azoto, corrisponde una limitata crescita del fitoplancton; viceversa, aumentando l'azoto si hanno i "blooms" fitoplanctonici causati da eventi naturali (quali il rimescolamento dell'acqua), e da fattori antropici, quali gli scarichi, buona sorgente di elementi nutritivi (azoto e fosforo) e di fattori di crescita per il plancton, come la vitamina B (Curds, 1982). Esiste così una proporzionalità tra la quantità di eventi di scarico e i "blooms" fitoplanctonici e dell'unico Ciliato autotrofo *Mesodinium rubrum*. L'effetto principale dei "blooms" è un aumento spropositato di fitoplancton con densità elevate (da 200 cellule/ml-limite inferiore di concentrazione per il quale viene considerato l'evento- fino a 254.400 cellule/ml, osservati anche per alcuni Ciliati Oligotrichi non fotosintetici; Dale & Dahl, 1987; McManus & Fuhrman, 1986). Gli effetti secondari dei "blooms" si ripercuotono però sul fitoplancton stesso che aumentando di densità, determina l'incremento della torbidità dell'acqua, provocando la diminuzione dell'attività fotosintetica e una maggior richiesta di ossigeno nell'acqua stessa. All'aumento della biomassa del fitoplancton, dunque, aumentano anche i Batteri e diminuisce l'ossigeno disciolto per l'attività di decomposizione da questi operata. Quando queste condizioni perdurano nel tempo si instaurano situazioni di anossia per la

decomposizione del fitoplancton. Un esempio di tale fenomeno è quello delle "maree rosse", fenomeno tipicamente costiero che si può verificare anche in condizioni di non inquinamento (cioè per eventi naturali, in assenza di fattori limitanti), ma certamente la cui frequenza aumenta con la presenza di scarichi inquinanti (Curds, 1982).

All'aumento di fitoplancton adattabile a condizioni di maggior presenza di nutrienti e all'aumento di Batteri presenti in acqua, corrisponde un aumento dei microzooplanctoni specifici per il consumo di questi organismi, come le Amebe marine (*Vexillifera telmathalassa*: Roper & Marshall, 1978) ed i Ciliati batteriofagi riescono a manifestarsi con un certo numero con un minimo di circa 10^6 Batteri/ml (Berninger et al., 1991). Ne deriva che l'aumento dell'azoto quale fattore limitante per la crescita del fitoplancton incide direttamente sul microzooplancton; una stretta relazione infatti è stata riscontrata con i Tintinnidi i quali non vengono trovati in acqua marina se la concentrazione dell'acqua di scarico supera il 5% o più. In questo senso, l'assenza di Tintinnidi, associata ad altre analisi, può essere indicatore di inquinamento di un ambiente marino.

La presenza o assenza di specie della catena trofica e la loro quantità possono dare indicazioni sul tipo ed il livello di inquinamento.

In ambiente fluviale, si usano gli indici biologici saprobici di qualità delle acque per la valutazione del livello di inquinamento. Va ricordato che il plancton non si rinviene in acque dolci in tutte le componenti che presenta invece in altri ambienti come il mare. In ambiente fluviale sono comunque presenti i Ciliati e per tale ragione, seppur sommariamente, si descrive il metodo del "*Saprobic system*" che si basa sui bioindicatori di acque di scarico tra cui sono compresi, appunto, anche i Ciliati. Gli studi di tale metodo risalgono ai primi del novecento quando Kolkwiz e Marsson studiarono alcuni corsi d'acqua della Germania inquinati da scarichi domestici, e classificarono molte specie animali e vegetali in funzione delle zone più o meno inquinate in cui esse sopravvivevano. Questo metodo consente l'analisi ambientale dei fiumi a decorso lento ed uniforme che ricevono forti scarichi; tali ambienti possono essere suddivisi in 4 zone saprobie (Kolkwiz & Marsson, 1908; Kolkwiz, 1950; Bick, 1963). Per zona saprobica si intende il tratto di corso d'acqua in cui si verificano tipici processi di decomposizione della sostanza organica. Sono differenziabili 4 livelli di avanzamento del processo di ossidazione biologica, cui corrispondono le 4 zone saprobie, che si succedono a partire dallo scarico con decrescita dell'inquinamento. Queste zone sono le seguenti:

- *polisaprobica*, con processi riduttivi dominanti e perciò molto inquinata; in essa si riscontra assenza di ossigeno e la degradazione della sostanza organica avviene mediante processi riduttivi operati da Batteri anaerobici, con produzione di idrogeno solforato e metano (conferendo quindi all'ambiente il tipico odore di putrescenza);
- *alfa-mesosaprobica e beta-mesosaprobica*, in cui i processi riduttivi vengono via via sostituiti da quelli ossidativi;
- *oligosaprobica*, a soli processi ossidativi, in quanto la zona è ben ossigenata.

La loro sequenza riflette il processo di auto-purificazione dell'acqua. Queste quattro zone, caratterizzate da un particolare contenuto di ossigeno, sostanza organica ecc., sono riconoscibili soprattutto per gli organismi che vi si insediano, che saranno perciò indicatori di saprobietà o di inquinamento organico. Tali organismi vengono qualificati con la stessa denominazione usata per le loro zone.

Secondo Sládeček (1973) anche i Ciliati sono indicatori di saprobietà (Fig. 6.1-1), cioè di carico di sostanza organica di un corso d'acqua; tra essi vengono messi in evidenza *Halteria* (Ciliato Oligotrico), *Paramecium*, *Codonella* e *Tintinnidium* (queste ultime due specie sono Tintinnidi).

Sládeček (1961; 1973) aggiunge tre ulteriori categorie alla classificazione di Kolkwiz e Marsson:

- *catabiotica* per le acque molto diluite di sorgente;
- *limnbiotica*, che include le oligo- beta-meso alfa-meso e poli-biotica;
- *eusaprobica* che designa acque a forte carico organico sia di scarico che industriali con decomposizione batterica; in essa si distinguono:
 - isobiotica: zona a Ciliati,
 - metabiotica: zona a Flagellati eterotrofi,
 - iperbiotica: zona a Batteri,
 - ultrabiotica: zona azoica, ma non tossica, con processi di decomposizione batterica dopo un certo tempo;

- *trans-saprobica* per acque in cui i processi di mineralizzazione sono impediti dalla presenza di sostanze tossiche (antibiotica) o scarichi radioattivi (radiobiotica), che possono incidere anche sul livello più basso e plastico delle forme di vita, quello costituito dai microrganismi decompositori: sono scarichi perciò inaccessibili alla decomposizione batterica (Bick, 1963; Mancini et al., 1993).

Sono state fatte anche altre classificazioni ancora più dettagliate per gli organismi o le comunità presenti (Bick, 1963), ma spesso è difficile identificare alcuni dei loro indicatori.

Gli studi successivi a quello che ha portato alla definizione del "Saprobic system" si sono da questo differenziati solo per la nomenclatura e la delimitazione delle zone, ma hanno mantenuto le generalità. In tal senso Liebman (1962) ha sostituito il concetto di zona saprobica con quello di "Classe di Qualità delle Acque" estendendolo non solo agli scarichi fognari ma anche a sorgenti inquinanti organiche, inorganiche e industriali; questi ha inoltre redatto una lista e descritto tutte le specie delle diverse zone, definendo il livello di inquinamento in base alla presenza o assenza di una o più specie.

Il concetto di "Saprobic system" è stato poi anche esteso ad acque ferme, come i laghi ed i serbatoi d'acqua.

La scarsa diffusione ed applicazione degli indici saprobici e di diversità, ad eccezione che nei Paesi in cui essi sono stati formulati, è dovuta a deficienze applicative per aree geografiche in cui non esiste una conoscenza profonda degli ecosistemi naturali. In altre parole, non conoscendo le comunità naturali presenti in un certo ambiente è difficile poi stabilire la variazione dovuta ad agenti inquinanti. La scarsa attenzione agli organismi planctonici ha sviluppato, in alternativa, altri metodi di studio sulla qualità delle acque che si basano sulla struttura delle comunità dei macroinvertebrati, ritenuti erroneamente più rappresentativi rispetto ad altri organismi dell'ecosistema sia perché relativamente sedentari e differentemente sensibili agli inquinanti, sia perché ubiquitari, abbondanti e relativamente facili da campionare; la loro classificazione non è particolarmente difficoltosa e non richiede particolari mezzi tecnici per il campionamento e la determinazione (Nicolai, 1992).

Nelle acque a scarsa dinamicità in cui si ha sversamento d'acqua di scarico o una grande produzione di materie organiche nell'ambiente si assiste alla formazione dei fanghi in fermentazione (Bee & Vioget, 1989). Se la materia organica è molto abbondante, i Batteri saprofiti proliferano ed i Ciliati Infusori (*Vorticelle* soprattutto) che si nutrono di Batteri mostrano popolazioni molto dense, in alcuni casi addirittura visibili ad occhio nudo. Tali ambienti sono quindi definiti "fanghi attivi".

Al fine di procedere alla depurazione delle acque, si utilizzano appositi impianti sfruttando i processi di tali fanghi: questi sono gli impianti di depurazione a fanghi attivi. Essi possono essere considerati ambienti artificiali creati dall'uomo per accelerare i processi naturali di depurazione. In un impianto ben funzionante le comunità viventi si succedono fino a raggiungere una stabilizzazione che corrisponde al mantenimento della migliore efficienza di depurazione prevista dalle caratteristiche dell'impianto. Si crea così la già descritta catena trofica in cui le componenti principali sono ancora una volta: Batteri, Flagellati, Ciliati. Per valutare il grado di efficienza di tali impianti sono analizzati anche i Ciliati, che risultano così essere indicatori anche di una situazione ambientale artificiale (Fenchel, 1987). Sono state evidenziate correlazioni tra la composizione delle biocenosi dei fanghi attivi e le concentrazioni dei parametri in processo, mentre la classificazione degli organismi colonizzatori permette di rilevare alcune disfunzioni dell'impianto (Di Brizio et al., 1993). I Ciliati, già presenti nel liquame in arrivo all'impianto, colonizzano in grandi quantità il fango nel quale si instaurano processi aerobici; la fase di stabilizzazione dell'impianto è caratterizzata da popolamenti di Ciliati la cui struttura consiste prevalentemente da forme sessili (fissate ad un substrato -il fiocco- per mezzo di un peduncolo) e mobili di fondo. I Ciliati migliorano la qualità dell'effluente in quanto regolano la biomassa batterica, compresa quella patogena, attraverso meccanismi di predazione (Di Brizio et al., 1993). La presenza/assenza di alcune specie e la composizione della microfauna nel suo insieme possono essere assunti come indicatori di funzionamento (Di Brizio et al., 1993; Madoni, 1991); un efficiente fango attivo presenta le seguenti caratteristiche:

- elevata densità di Ciliati (dell'ordine di 10^6 per litro);
- prevalenza di Ciliati sessili e mobili di fondo, assenza di Flagellati;
- taxocenosi ben diversificata in cui nessuna specie o gruppo prevale numericamente sulle altre forme al di sopra di un fattore 10.

Quando, al contrario, questo quadro non si presenta, l'identificazione del gruppo dominante la microfauna, permette di diagnosticare stati particolari nel funzionamento dell'impianto di depurazione. Ad esempio:

- gruppo dominante piccoli Flagellati: corrisponde ad uno scarso rendimento con fango poco ossigenato e carico troppo forte;
- gruppo dominante piccoli Ciliati natanti ($<50\ \mu\text{m}$): rendimento mediocre per la ritenzione del liquame troppo breve ed una scarsa ossigenazione;

- gruppo dominante grandi Ciliati natanti (>50 µm): rendimento mediocre per carico troppo forte;
- gruppo dominante Ciliati mobili di fondo da soli o accompagnati da Ciliati sessili: rendimento buono;
- gruppo dominante Ciliati sessili: rendimento in ribasso per fenomeni transitori (carico discontinuo; estrazione recente di fanghi);
- gruppo dominante piccole Amebe e Flagellati: rendimento scarso per carico elevato poco degradabile.

Ulteriori e più complete informazioni possono essere ottenute dall'identificazione delle varie specie che formano la microfauna (Madoni, 1981; 1988); ogni specie è in grado di aggiungere informazioni più dettagliate rispetto all'analisi dei soli gruppi funzionali. Ad es. *Vorticella microstoma* caratterizza la prima fase di colonizzazione dell'impianto, ed è sostituita poi da *V.convallaria* che diventa specie dominante durante la fase di crescita delle biocenosi del fango.

L'analisi dei Protozoi Ciliati come indicatori di efficienza della depurazione consente di valutare celermente e precisamente l'ambiente dei fanghi rappresentando uno strumento diagnostico valido e pratico.

6.3: L'utilizzo dei Ciliati in prove di laboratorio

Le prove di laboratorio sono rilevanti in quanto necessarie per sperimentare in ambiente controllato la reazione degli organismi alle possibili variazioni dell'ambiente, dovute sia a sostanze inquinanti in esso immesse, sia a fattori fisici (temperatura, salinità , pH ecc.). E' noto che ogni organismo predilige determinate condizioni fisico-chimiche in un intervallo di variazione all'interno del quale vi è la condizione ottimale. Considerando più fattori fisico-chimici contemporaneamente e tenendo costante nella condizione ottimale uno di essi, l'intervallo di tolleranza degli altri fattori sui tassi di riproduzione dei Ciliati è ampliato; nell'ipotesi in cui quel fattore fisso si allontanasse dall'"optimum", l'intervallo di tolleranza (o di fecondità) dell'organismo rispetto ad un secondo fattore diminuisce, divenendo solo una piccola frazione dell'intervallo del singolo fattore considerato da solo.

Molti studi americani (Antipa, 1977; Cairns, 1969, 1978; Carrick et. al, 1992) ed europei (Bick, 1963; Bringmann & Kuhn, 1980; Kutt & Martin, 1974; Dive & Leclerc, 1975; Dive et al., 1980; Persoone & Dive, 1978; Dive & Persoone, 1984), effettuati in laboratorio,

confermano che i Ciliati sono dei buoni indicatori dell'ambiente che occupano. I Ciliati vengono utilizzati in particolare in prove volti a studiare la tossicità di componenti chimici o di acque inquinate; essi sono infatti organismi rappresentativi della microfauna degli ecosistemi acquatici (Persoone & Dive, 1978), tanto da essere considerati indicatori biologici. Tali organismi hanno il vantaggio di essere unicellulari ed eucarioti (quindi semplici ma evoluti) Per tale motivo le loro risposte fisiologiche ai prove sono più facilmente standardizzabili. Tra i metodi fisiologici per la stima biologica dei livelli di inquinamento vi sono (Bick, 1963) quelli per la stima della tossicità delle acque di scarico, che acquisiscono la propria denominazione da quella della particolare specie utilizzata; quest'ultima viene inoculata nell'acqua da saggiare. Tra tali prove è importante il *Microregma herostoma*, prova che considera l'inibizione di predazione di questo Ciliato batteriofago in presenza di inquinanti. Nel mezzo di coltura vengono immesse quantità crescenti di sostanza da saggiare. *Microregma* preda attivamente molti Batteri in campioni non tossici, facendo quindi diminuire la torbidità dell'acqua data dalla concentrazione dei batteri; al contrario, se la sostanza inoculata risulta tossica per tale organismo, la predazione batterica è inibita e la torbidità dell'acqua rimane invariata (la valutazione è fatta nefelometricamente in un tempo di circa 28 ore).

In molte specie di Ciliati non esiste un tegumento atto a fungere da barriera contro gli agenti tossici (come, ad esempio, hanno i Batteri); per tali ragioni i Ciliati vengono utilizzati anche per le loro risposte genetiche a diverse sostanze tossiche (Dive & Persoone, 1984; Prevot, 1982).

Tali prove sono definite generalmente "Protozoa Toxicity Tests" e consistono nell'isolare le singole specie da provare; queste vengono coltivate in laboratorio in condizioni standard e alle colture vengono aggiunte quantità crescenti di sostanza tossica, o ritenuta tale, tenendo sempre a confronto una popolazione di controllo. In tale modo si verificano le risposte morfologiche, ultrastrutturali, etologiche (mobilità, stress, comportamento nutrizionale) e metaboliche (letale o subletale, ed in quest'ultimo caso include l'accrescimento e la riproduzione) degli organismi stessi a fronte delle aggiunte crescenti di inquinanti. In genere in queste prove di laboratorio vengono considerati due parametri principali: il tempo di generazione (T: tempo per raddoppiare in numero la popolazione) e la quota intrinseca di accrescimento (r: quante volte la popolazione può moltiplicarsi per unità di tempo); essi in genere variano con i fattori ambientali quali salinità, temperatura, pH, nutrimento. In generale T o r crescono con un incremento di temperatura fino all'optimum per ogni specie. Il limite termico superiore è normalmente non molto distante dall'optimum di temperatura (Piccinni & Albergoni, 1994).

Sebbene i Protozoi siano utilizzati da molti anni come bioindicatori dell'inquinamento dell'acqua nei "saprobic systems", le prove di laboratorio con i Protozoi sono limitate a laboratori specializzati. Con esperimenti di laboratorio su organismi scelti come indicatori è possibile valutare la tossicità, l'accumulo e il tempo di permanenza nel corpo di questi organismi degli inquinanti (Gray & Ventilla, 1973; Lindmark, 1981). Un saggio di laboratorio è utile ai fini pratici se l'organismo considerato presenta un elevato grado di sensibilità agli inquinanti da saggiare, se i dati sono riproducibili e se la metodologia è semplice e non molto costosa. Ai fini pratici la risposta degli organismi saggiati viene espressa con numeri mediante l'adozione di indici ad es.: limite di tolleranza, dose letale (TL50 o DL50), concentrazione letale, tempo di sopravvivenza (Ravera, 1986). Tutti questi indici sono relativi alla percentuale di mortalità di un gruppo di organismi della stessa specie esposti ad una particolare e crescente concentrazione di inquinante. In quest'ultimo caso la maggior difficoltà è di discriminare gli individui vivi da quelli morti alla fine della prova. Le tecniche utilizzabili dipendono molto dal tipo di specie per cui è necessario procedere alle standardizzazioni di prove di tossicità.

Le prove di laboratorio vengono eseguiti anche per la previsione degli effetti a lungo termine di sostanze tossiche (Schäfer et al., 1994; Schultz et al., 1990).

Molti studi riguardanti gli effetti tossici di sostanze inquinanti sui Protozoi hanno considerato, ad esempio, vari metalli pesanti; ciò in quanto in diversi ecosistemi negli ultimi anni le loro concentrazioni sono aumentate e divenute tossiche a causa di una maggiore pressione antropica. In particolare:

- il rame e i ditiocarbammati: vengono usati in agricoltura come fungicidi (Beers et al., 1977; Anderson & Morel, 1978);
- l'atrazina è un erbicida usato nella coltivazione del mais, sorgo ed asparago (Jüttner et al., 1995);
- il mercurio (Dini, 1982);
- l'alluminio (George et al., 1995);
- il cadmio: in ambienti oceanici la sua concentrazione è di circa 0.02-0.12 mg/l, mentre in ambiente estuarino la concentrazione eccede i 50 mg/l (Krawczynska et al., 1989; Sekkat et al., 1992; Fernandez-Leborans & Novillo, 1993; 1995; Coppellotti, 1994; Coppellotti & Albergoni, 1990); queste elevate concentrazioni sono dovute al fatto che il cadmio è un

residuo dei fertilizzanti fosfatici e la sua tossicità dipende dalla quantità di sostanza organica disciolta in acqua oltre che dal pH del mezzo, dalla presenza di altri metalli (Fernandez-Leborans & Novillo-Villajos, 1993; 1995; Curds, 1982) e dalla salinità (Cross & Sunda, 1985). Alcuni effetti negativi di questo ione sono ben conosciuti (cambi strutturali della cellula, riduzione dei tassi di crescita, meccanismi di bioaccumulazione, decrescita dell'arricchimento di specie) e sono stati verificati mediante saggi biologici di tossicità monospecifici (Coppellotti, 1989; 1994; Fernández-Leborans & Novillo-Villajos, 1993; Prevot & Soyer, 1978) che, tuttavia, non forniscono informazioni circa le interazioni che avvengono fra gli organismi durante il processo di accumulo dell'inquinante, non descrivono cioè cosa accade realmente in ambiente naturale.

Le prove di laboratorio sono svolte anche utilizzando misture tra vari elementi inquinanti in quanto nell'ambiente si trovano più facilmente una situazione di inquinamento cagionato da più elementi inquinanti simultaneamente piuttosto che da uno solo di essi; infatti, ad esempio, i descritti elementi possono essere rinvenuti contemporaneamente sia in suoli che in acque superficiali soprattutto come residui dell'attività agricola (Sekkat et al., 1992). Del resto l'uso di modelli cellulari molto semplici quali sono quelli dei Protozoi permettono di correlare le risposte biochimiche-metaboliche di questi organismi che si manifestano con modificazioni morfologiche anche in alle condizioni estreme (ad es. elevata pressione parziale di ossigeno disciolto e bassa temperatura) e di poterle paragonare a quelle degli organismi più complessi.

E' stato così studiato l'effetto di vari agenti tossici (atrazina, cadmio, rame, e bromacil - sterilizzante dei suoli- ecc.) in *Tetrahymena pyriformis*. Questa specie è spesso presa in considerazione nelle prove di tossicità in quanto anello trofico fondamentale negli ecosistemi acquatici ricchi in materia organica dove preda i Batteri, e gioca un ruolo importante nell'autopurificazione dell'acqua (Schäfer et al., 1994; Carter & Cameron, 1973; George et al., 1995); risulta infatti essere un indicatore più sensibile rispetto ad animali come i pesci, alla contaminazione dell'acqua con metalli pesanti. Le prove su *Tetrahymena pyriformis* o su altre specie prendono in esame le varie azioni degli inquinanti sugli aspetti morfologici (ad es. il volume cellulare misurato con il "Coulter counter"), sulla sua motilità, sull'attività di nutrizione e sulle sue variazioni durante le fasi di accrescimento. Quando una popolazione in condizioni standard è sottoposta a concentrazioni crescenti di un tossico vengono misurate le variazioni delle curve di accrescimento e le si comparano con quelle di una popolazione di controllo. Queste prove danno risposte soddisfacenti, sono applicabili a molti tipi di tossici ed hanno il vantaggio di essere rapide ed accurate (Persoone & Dive, 1978).

Tale specie (ma anche *Paramecium*) è stata altresì utilizzata per provare la presenza di inquinanti tossici anche in sorgenti d'acqua (Hutner, 1964; Bergquist & Bovee, 1975; Bovee et al., 1979; Bovee & O'Brien, 1982), e, più ampiamente, in prove di tossicità (Juchelka & Snell, 1995), volti anche a saggiare gli effetti di farmaci (Hutner, 1964).

In alcune specie in coltura è stato osservato una buona tolleranza a variazioni estreme di pH (ad es. in *Euglena gracilis*); ma dall'altra parte esistono specie come *Stentor coeruleus* che sopportano variazioni molto strette di questo parametro (in questo caso si trova ad un pH tra 7.8 e 8). Saranno preferenzialmente le specie stenoece ad essere utilizzate a fini pratici come indicatori biologici in quanto maggiormente sensibili alle variazioni ambientali.

Studi sugli aspetti fisiologici e tossicologici della contaminazione da metalli sono stati fatti anche in Protozoi planctonici antartici (Albergoni et al., 1989; 1992; Coppellotti & Albergoni, 1990).

6.4. Prove *in situ*

I Protozoi Ciliati vengono usati per saggiare gli effetti di sostanze inquinanti nell'ambiente ma anche di diversi componenti presenti nell'acqua ed i dati sperimentali sugli effetti dei fattori fisico-chimici sui tassi di riproduzione e sulla variazione della composizione della comunità planctonica sono stati confermati dai dati rilevati negli habitat.

Studi sperimentali hanno dimostrato, ad esempio, che il contenuto in sabbia nell'acqua fa variare marcatamente la comunità planctonica (Jack et al., 1993) tanto che sopprime alcuni organismi del mesoplancton quali i Cladoceri, i Copepodi ed i Rotiferi, inibisce la presenza di alcuni Ciliati, mentre altre specie, in particolare Ciliati Oligotrichi, non subiscono conseguenze. Si tratta di effetti diretti sullo zooplancton esercitati dalla sabbia in sospensione e non indiretti esercitati attraverso le alghe o i Batteri, cioè sul nutrimento dei Ciliati.

E' in alcuni casi necessario (ed anzi auspicabile) che tali esperimenti siano effettuati *in situ*, cioè in ambiente naturale, al fine di verificare direttamente la variazione di alcuni fattori e le conseguenze di dette variazioni.

Per quanto riguarda le procedure di raccolta dei campioni, queste possono essere di diverso tipo (Borror, 1975) ma il risultato rappresenta solo una situazione istantanea che non dà alcuna informazione sulla dinamica di popolazione.

La sperimentazione *in situ* più tipica è quella volta all'osservazione dei tassi di modificazione nella colonizzazione su substrati naturali o artificiali in aree inquinate; consiste

essenzialmente nell'inserimento, in una certa area da saggiare, di tale substrato standardizzato che sarà ricoperto progressivamente da popolazioni che potranno così essere analizzate che saranno diverse a seconda del livello di inquinamento dell'ambiente. Questo metodo, naturalmente, è ristretto alle specie sessili e specie che aderiscono al substrato e danno informazioni pertinenti agli studi di inquinamento della struttura e della dinamica delle comunità di Protozoi su substrati solidi (Dive & Persoone, 1984).

Gli studi *in situ*, presuppongono necessariamente l'avvenuta preventiva effettuazione delle prove in laboratorio o comunque la conoscenza delle reazioni degli organismi e dei popolamenti alle diverse variazioni di condizioni fisiche, chimiche e biologiche dell'ambiente. Gli studi degli effetti degli inquinanti sui Protozoi vengono svolti secondo tre diverse procedure (Dive & Persoone, 1984):

a) Approccio delle specie indicatrici. Consiste nell'analisi del popolamento e nella conseguente individuazione delle specie più caratteristiche; è tuttavia inadeguato in molte circostanze per la complessità degli inquinanti presenti negli scarichi industriali. Generalmente questo metodo fornisce una informazione limitata sulla relazione causa-effetto; le risposte portano ad accertare l'apparizione o la scomparsa di singole specie, la riduzione del loro numero o cambiamenti nelle rispettive popolazioni o, ancora, nella composizione proporzionale delle specie nella comunità (McManus & Pauly, 1990), la variazione nel grado di autotrofia-eterotrofia e le variazioni nel tasso di produttività (Hawkes, 1977).

Potranno essere perciò considerati "indicatori biologici" solo quegli organismi che possiedono un intervallo di tolleranza alle variazioni ambientali molto limitato (specie stenoece).

b) Analisi della comunità. Tale procedura è laboriosa perché implica uno studio qualitativo sugli organismi di un determinato sito al fine di verificarne anche le correlazioni; richiede quindi molto tempo e personale specializzato. Le osservazioni contemporanee su tutti i componenti della catena trofica pelagica danno informazioni importanti sui possibili effetti indiretti o a lungo termine degli inquinanti che non potrebbero essere ottenute osservando i singoli taxa, o parti limitate della catena trofica separate e isolate dai loro naturali ecosistemi. Questo tipo di studi richiede comunque un'approfondita conoscenza delle specie e degli ecosistemi: a parte particolari zone, questo è un presupposto che non sempre si verifica ed è poco attuabile in quanto, soprattutto per organismi invertebrati o per i Protozoi, il loro studio presuppone una approfondita conoscenza tassonomica, fisiologica, ecc.

Con tale procedura è stato comunque possibile effettuare una prova in situ che ha consentito di analizzare la popolazione naturale ed i suoi cambiamenti in zone naturali circoscritte artificialmente ed influenzate da agenti tossici (Dive & Persoone, 1984).

Una tale procedura è stata usata da Beers et al. (1977) in uno studio su materiale proveniente da Saanich Inlet (Columbia Britannica, Canada). E' stata considerata la composizione tassonomica, l'abbondanza numerica e la biomassa del microzooplankton sottoposto ad un trattamento con il rame; il microzooplankton in osservazione era contenuto in un grosso volume d'acqua (68 m³) e posto in un ecosistema sperimentale controllato (Menzel & Case, 1977). Naturalmente esistevano delle popolazioni di controllo, necessarie per verificare se i cambiamenti dei popolamenti presenti nell'ambiente sperimentale e dovuti al trattamento con aliquote crescenti di rame, fossero o meno significativi.

A seguito dei trattamenti il numero di cisti presenti aumentava, confermando il fatto che le cisti sono anche una risposta ai cambiamenti chimici dell'ambiente; è stato altresì dimostrato che il microzooplankton è in grado di concentrare materiali nocivi. Con l'aiuto di particolari tecniche di colorazione è stato possibile poi distinguere gli individui vivi da quelli morti per poter determinare la dose letale degli inquinanti. A tal fine è stato ritrovato in colonna d'acqua un elevato numero di loriche vuote dei Tintinnidi; poichè i Tintinnidi appartengono a tutti gli ambienti il fatto che in caso di peggiorate condizioni ambientali essi escano dalla lorica permette di considerarli primi indicatori di stress da inquinamento.

c) Analisi funzionale, raramente usata, in quanto complessa tanto da richiedere personale molto specializzato; si basa comunque sulla misurazione dell'ATP e sull'analisi dei processi di degradazione del detrito.

Al fine di individuare parametri indicativi per l'inquinamento minerale e di composti organici specifici possono essere considerati diversi approcci metodologici:

- analisi morfologiche della popolazione di una specie, particolarmente per quelle con la lorica o con lo scheletro (Seiglie, 1971); una variazione nella composizione chimica dello scheletro può infatti dare informazioni utili sulla presenza di inquinanti nell'ambiente come metalli pesanti e radionuclidi;

- analisi dell'attività di ossidazione a funzione mista (Mixed-Function Oxidase, M.F.O.) di primaria importanza per la sua relazione con le sostanze oncogene. Una precisa analisi dell'M.F.O. nei Protozoi (ma anche in altri organismi) e la sua variazione con le condizioni ecologiche possono indicare la presenza di sostanze cancerogene.

6.5. Indici biologici

Come già accennato, l'analisi quali-quantitativa degli indicatori biologici di un determinato ambiente, al fine di una sua corretta rappresentazione, deve essere tradotta in numeri. A tale scopo sono utilizzati gli "indici biologici", che tengono conto della composizione quali-quantitativa di determinati taxa indicatori di uno stato particolare dell'ambiente e la correlano a quella di altri taxa al fine di verificare le interazioni presenti nel popolamento esaminato nonché le variazioni di quest'ultimo in conseguenza delle perturbazioni dell'ambiente.

Tra gli indici biologici che considerano i Protozoi hanno particolare rilievo:

1) il "*Deficit di specie* di Kothé" (Bick, 1963) elaborato in relazione a studi su scarichi fognari secondo il quale se le condizioni di vita in un ecosistema cambiano dalla situazione normale, diminuisce il numero di specie ed aumenta il numero di individui delle specie più tolleranti. La differenza tra il numero di specie (A_1) in un campione indisturbato, rispetto a quello di un campione sottoposto all'effetto di sostanze tossiche (A_x) è espressa come percentuale rispetto ad A_1 e indica il "deficit di specie". Esso è espresso dalla formula:

$$[(A_1 - A_x) / A_1] * 100$$

La percentuale del 100% significa la totale soppressione della biocenosi. Questo indice potrà essere applicato anche alla popolazione microzooplanctonica di un tratto di mare o di un fiume in cui si verificano situazioni di inquinamento.

2) Il sistema "*R-P-C*" di Gabriel usato come indice biologico (I), è basato sul numero di riduttori (R) (ad es. Batteri), produttori (P) (es. alghe), e consumatori (C) (es. Ciliati) in acqua. La formula è (Bick, 1963):

$$bI = 2P / (R + C)$$

In acque fortemente inquinate che presentano una chiara decomposizione della sostanza organica prevalgono i Batteri (riduttori); con l'incremento dell'autopurificazione aumenta il numero dei consumatori eterotrofi; in ultimo compaiono anche i produttori autotrofi. Questa procedura include certi vantaggi, ma ha l'inconveniente di non essere considerato un metodo standard.

Indice biologico di inquinamento di Horasawa (BIP) è dato dalla formula (Bick, 1963):

$$BIP=[B/(A+B)]*100$$

dove A è la biomassa degli organismi che hanno clorofilla e B di quelli che non la possiedono. In questo caso i Batteri non vengono considerati, ma vengono inclusi solo i Protozoi.

7- Gli ambienti di distribuzione microzooplanctonica e relazioni di tali organismi con le masse d'acqua

Il microzooplancton -come più volte evidenziato- risulta essere presente in tutti gli ambienti acquatici. In questa sede è presa in particolare considerazione la situazione microzooplanctonica in ambiente marino, dulciacquicolo e salmastro.

Per quanto riguarda l'ambiente marino viene analizzata la presenza del microzooplancton nel Mare Mediterraneo, senza tuttavia trascurare di richiamare alcuni studi relativi a diverse altre aree (quali l'Antartide, la costa del Canada, il Golfo del Maine e di Biscaglia ecc.). Viene descritta poi la presenza planctonica nell'ambiente delle acque dolci ed infine, in relazione all'ambiente delle acque salmastre, vengono riportati i risultati di un primo breve lavoro sperimentale relativo a campionamenti effettuati in due punti nella laguna di Venezia (Grenni & Creo, in press) e i risultati di un lavoro sperimentale relativo alle Lagune Pontine (Parco Nazionale del Circeo) svoltosi nell'anno 95-96, che ha considerato il microzooplancton ed il nanoplancton eterotrofo di due laghi salmastri: Fogliano e Caprolace (Grenni & Creo, in press).

Nel presente lavoro è quindi descritta la popolazione microzooplanctonica di particolari aree; i dati raccolti ed elaborati consentono di ricostruire il relativo popolamento microzooplanctonico, in relazione alla stagione, alla temperatura dell'acqua ed alla distanza dalla costa.

7.1 Il Mediterraneo

7.1.1 Il Mar Tirreno

A) Il microzooplancton non è stato studiato molto approfonditamente nel Mar Tirreno sino agli anni ottanta, tanto che ampie ricerche nell'Alto Tirreno sono iniziate solo dal 1986; la letteratura è, quindi, piuttosto scarsa (Fonda Umani et al., 1988). L'area ad esso più prossima meglio esplorata è il Mediterraneo Nord Occidentale (Rassoulzadegan, 1977) ed in particolare

il Mar Ligure, il Golfo di Marsiglia e zone limitrofe (Rampi, 1948, 1950; Posta, 1963; Travers, 1973, 1975; Travers & Travers, 1963; 1971; 1975).

Lungo le coste francesi del Tirreno è stata approfondita la distribuzione stagionale dei Tintinnidi (Rassoulzadegan, 1977, che si è soffermato su una rada di Villefranche-sur-Mer nel periodo 1973-1974) ed è stato rilevato che la concentrazione dei Ciliati è più abbondante in prossimità della costa e diminuisce progressivamente verso il largo. I Ciliati aloricati costituiscono la parte essenziale della biomassa microzooplanctonica durante il periodo caldo, a differenza dei Tintinnidi che predominano in inverno assieme ai nauplii di Copepodi. Le concentrazioni massime di microzooplancton si ritrovano dopo le principali fioriture nanoplanctoniche.

B) Il mare Tirreno settentrionale (toscano) è stato oggetto di una lunga ed articolata ricerca nell'ambito del "Progetto Mare", finanziato dalla Regione Toscana (AA.VV., 1993), grazie alla quale sono stati raccolti molti dati significativi dell'ambiente acquatico, tra cui anche quelli relativi alla frazione microzooplanctonica, con particolare riguardo alla loro distribuzione sia spaziale che stagionale.

Per tale progetto negli anni dal 1986 al 1989 è stata effettuata una serie di crociere periodiche durante le quali sono stati rilevati dati fisico-chimici (temperatura, salinità, densità, correnti, nutrienti ed alcuni micro elementi), biologici (analisi quali-quantitativa dei popolamenti fito-, micro- e mesozooplanctonici) e bentonici (Fonda Umani & Monti, 1993). Tali dati sono stati poi elaborati mediante analisi multivariata per evidenziare i rapporti tra fattori fisico-chimici e la frazione planctonica presa in considerazione; sono stati poi comparati i dati delle diverse campagne al fine di visualizzare l'andamento annuale degli organismi microzooplanctonici relativamente ai gruppi più significativi in tali acque.

In particolare, la distribuzione dei Ciliati loricati ialini e di quelli a lorica agglutinata, nel periodo invernale, rappresentano circa il 50% della popolazione microzooplanctonica presente nel Tirreno toscano. Dai grafici spaziali relativi alla distribuzione è stato riscontrato che i Tintinnidi a lorica agglutinata si trovano preferibilmente in zone costiere; ciò è dovuto non solo alla loro preferenza per acque a minor salinità a causa degli apporti fluviali ma anche per il maggior quantitativo di particolato presente. I Tintinnidi ialini, invece, hanno una maggior concentrazione al largo e sono distribuiti più omogeneamente come gli altri organismi del microzooplancton.

L'analisi della distribuzione quantitativa ha dimostrato poi che i popolamenti microzooplanctonici sono relativamente scarsi a tutte le profondità; tale povertà invernale è,

peraltro, del tutto normale essendo connessa alla scarsa disponibilità trofica, mentre negli altri periodi dell'anno non si verifica ma il popolamento microzooplanctonico è più ricco in specie ma soprattutto in individui. Infatti i popolamenti del periodo invernale (espressi in numero di individui) sono mediamente inferiori anche a quelli rilevati nella stessa area e in aree contigue in autunno mentre non sono neppure paragonabili, sotto il profilo quantitativo, con quelli primaverili ed estivi. Infatti, mentre il numero di individui massimo riscontrato in inverno è di 226 ind/l, si registra un picco in primavera di 1387 ind/l ed in estate di 375 ind/l.

Dalle analisi effettuate, nonché dagli studi comparativi svolti, è stato possibile così affermare che nella zona considerata il popolamento annuale, ad esclusione del periodo estivo ove la presenza di organismi microzooplanctonici è maggiore, risulta equamente distribuito; questo nonostante che la maggiore presenza degli organismi sia riscontrabile in ambiente costiero con valori più alti tra 1 e 49 m di profondità. In particolare si è osservato che i massimi superficiali e sub superficiali corrispondono alle aree maggiormente influenzate dagli apporti fluviali e sono caratterizzati dalla prevalenza di Ciliati non loricati, micrometazoi e Tintinnidi a lorica agglutinata.

Sono inoltre state individuate le specie caratteristiche in relazione con le masse d'acqua procedendo ad una loro classificazione.

In particolare, il "Progetto mare" ha reso possibile individuare nella zona monitorata la presenza di 189 specie (di cui 93 rinvenute nel periodo invernale) di Tintinnidi (tra i quali prevalgono quelli a lorica ialina), di cui 31 segnalate per la prima volta nel Mediterraneo (Fonda Umani & Monti, 1993). Tale abbondanza non era stata invece riportata in studi precedenti effettuati da Autori come Kofoid e Campbell (1929; 1939), Rampi (1948; 1950), Posta (1963) Travers (1975), Krsinic (1977; 1980); Rampi e Zattera (1982) ed Abboud-Abi Saab (1989).

Si riporta in allegato una lista faunistica (Tab. 7.1.1-1) relativa alle campagne novembre 1986, marzo 1987, aprile-luglio-novembre 1988, febbraio 1989 (Fonda Umani & Monti, "Progetto mare" 1993, 193-197).

Tra le specie ora indicate sono state trovate nel solo campionamento invernale: *Tintinnopsis cincta*, *Codonellopsis orthoceras*, *Climacocylis elongata*, *Helicostomella edentata*, *Cyttarocylis magna*, *Rhabdonella cuspidata*, *Parundella aculeata*, *Xistonella lohmanni*, *Undella claparedi* var. *angustior* e il genere *Epicancella*. Sono, invece, perennanti nell'area considerata 37 specie. Tra queste soltanto *Stenosemella nivalis*, *Stenosemella ventricosa* e *Steenstrupiella steenstrupii* sono sempre abbondanti in tutte le stazioni costiere;

le specie del genere *Salpingella* risultano invece ubiquitarie; *Dadayiella ganimedes*, *Amphorella quadrilineata*, nonché le specie appartenenti al genere *Dictyocysta* e *Undella* presentano una spiccata stagionalità.

Da un punto di vista ecologico ed alla luce delle specie così individuate si conferma la predilezione della specie ialine per le acque oligotrofiche (come quelle dell'Arcipelago toscano di mare aperto), povere di detrito e, in termini più generali, "oceaniche". Nelle zone costiere si hanno incrementi di biomassa della frazione microzooplanctonica a causa degli apporti terrigeni e i valori più alti si riscontrano nelle aree a salinità minore. Confrontando la classificazione delle specie ottenuta con i metodi di analisi multivariata dei prelievi con le caratteristiche delle masse d'acqua, si è osservata una buona corrispondenza tra i popolamenti microzooplanctonici e le caratteristiche termoaline delle differenti zone di prelievo. Ne è derivata la possibilità, anche a seguito dell'analisi statistica dei dati, di individuare quattro distinte comunità di specie associate a quattro diversi ambienti acquatici caratterizzati da diverse tipologie di temperatura e salinità. La prima di esse, che viene definita "neritica superficiale" (assimilabile a quella propria dell'Alto Adriatico), è associata ad acqua a bassa temperatura e bassa salinità ed è influenzata dagli apporti fluviali ed è caratterizzata dalla presenza di Ciliati indeterminati non Tintinnidi, *Strombidium* spp. (un Ciliato Oligotrico, non Tintinnide), *Amphorella quadrilineata* var. *minor* e da *Steenstrupiella steenstrupii* (entrambe Tintinnidi) nonché da micrometazoi. La seconda comunità, che viene definita "di profondità", è caratterizzata da specie ialine ed è associata a masse d'acqua a relativamente alta temperatura e salinità (riscontrata in particolare nei prelievi di profondità, nella zona campionata più meridionale); essa è presumibilmente quella maggiormente presente in mare aperto (e quindi nell'intero Mediterraneo con l'esclusione dell'Alto Adriatico). Le altre due comunità individuano masse d'acqua a densità intermedia; la prima caratterizza le acque superficiali in mare aperto e del fondo in area costiera ed è scelta come habitat da specie di Tintinnidi a lorica ialina; la seconda è presente a profondità intermedia in zone di mare aperto (le stazioni più centrali della campagna) .

Le correlazioni così evidenziate consentono di considerare le comunità microzooplanctoniche come indicatrici delle tipologie delle masse d'acqua. L'esempio più tipico è quello legato alla presenza di una stessa comunità in masse d'acqua di origine superficiale, che tendono a sprofondare al limite del sistema frontale mantenendo però omogeneità di popolamento per un certo periodo di tempo. In questo senso si può affermare che la frazione microzooplanctonica mantiene una memoria delle aree da cui proviene per un tempo relativamente lungo, maggiore sicuramente di quello riscontrato nelle comunità fitoplanctoniche, e che più si avvicina, data la velocità dei ritmi riproduttivi, a quella delle

comunità mesozooplantoniche. Queste ultime, però, si prestano meno a descrivere le caratteristiche delle masse d'acqua in quanto esistono difficoltà oggettive di campionamento in corpi d'acqua di scarso spessore ben distinti in quanto richiedono per la loro analisi, volumi di acqua maggiori da campionare.

7.1.2 L'Adriatico

Il microzooplankton in Adriatico è stato oggetto di studio già da parecchi anni, tanto che la letteratura al riguardo è relativamente ampia (Cattani & Corni, 1992; Fonda Umani & Ghirardelli, 1988; Fonda Umani et al., 1989; Ghirardelli et al., 1989; Krsinic & Vilicic, 1989; Krsinic, 1977, 1979 a e b, 1980, 1981, 1982, 1987 a e b, 1988; Revelante & Gilmartin, 1983; Revelante et al., 1985).

La popolazione microzooplanctonica è stata osservata in particolare nel Golfo di Trieste (Cabrini et al., 1989; Fonda Umani et al., 1989; Ghirardelli et al., 1989; Milani et al., 1989; Milani et al., 1991-94; Fonda Umani, 1989 e 1991) ed in tutto il bacino Nord Adriatico ove esiste una certa correlazione tra le condizioni trofiche e la composizione del popolamento dei Ciliati. Infatti i Ciliati non Tintinnidi prevalgono per tutto l'anno ad eccezione dei periodi più freddi e delle aree superficiali di zone costiere influenzate dagli apporti fluviali in cui prevalgono i Tintinnidi seppure con un popolamento comunque numericamente ridotto rispetto al resto del popolamento microzooplanctonico. Più esattamente nel Golfo di Trieste i popolamenti microzooplanctonici presentano valori massimi in maggio (Fonda Umani et al. 1989), con un picco riscontrato nel 1988 di 4676 ind/l, e seguono quelli fitoplanctonici di circa 15 giorni. Durante l'estate e l'autunno mantengono valori relativamente stabili ed ancora piuttosto alti, mentre per tutto l'inverno e l'inizio primavera si attestano sui minimi annuali (minimo assoluto 52 ind/l al fondo per l'anno 1988). In linea generale i valori più alti si riscontrano alle quote superficiali. Nel bacino Nord Adriatico (anni 1983 e '84) sono stati rinvenuti i Ciliati non Tintinnidi in percentuale variabile da un minimo di 2.4 ind/l al fondo nell'area più meridionale di campionamento ad un massimo di 553.6 ind/l superficiale, a conferma dello stato trofico delle acque dell'Adriatico, ed un aumento della presenza dei Tintinnidi, soprattutto quelli di piccole dimensioni, nelle vicinanze degli scarichi del fiume Po (Fonda Umani et al, 1989).

Per quanto riguarda i Tintinnidi presenti nel Golfo di Trieste, essi sono rappresentati essenzialmente dai generi *Tintinnopsis* (*T.beroidea*, *T.nucula*, *T.compressa*, *T.fracta*, *T.nana*), *Stenosemella* (*S.nivalis*, *S.ventricosa*), *Eutintinnus* (*E.lusus-undae*, *E.apertus*, *E.fraknoi*) e da *Salpingella rotundata*, *Helicostomella subulata*, e *Metacylis jörgenseni*. I Ciliati non Tintinni-

di sono rappresentati invece dai generi *Laboea*, *Lacrymaria* e *Strombidium*, quest'ultimo presente in modo significativo in primavera. Gli altri Protozoi, presenti in quantità piuttosto ridotte, sono costituiti da Foraminiferi, Acantari, Radiolari e Dinoflagellati (*Noctiluca scintillans*) e sono presenti con una certa consistenza solo alle quote superficiali in estate. Tra le fasi larvali di Metazoi di dimensioni $<200\ \mu\text{m}$ prevalgono i nauplius dei Copepodi, ma sono numericamente consistenti anche uova e larve di altri Invertebrati, abbondanti soprattutto da giugno ad agosto (Fonda Umani, 1989 e 1991). Analogie con la descritta situazione sono state trovate nelle acque costiere dell'Adriatico del Sud (Krsinic, 1979 a e b).

Sempre nel Golfo di Trieste è stato altresì analizzato il rapporto tra il fito ed il microzooplancton (Cabrini ed al., 1989). In generale i popolamenti microzooplanctonici hanno una funzione limitante sulla frazione di diametro $<30\ \mu\text{m}$ della biomassa fitoplanctonica che, in periodo primaverile-estivo, è particolarmente bassa e tende ad aumentare a partire da settembre, nel momento in cui diminuisce il prelievo della frazione microzooplanctonica (Fonda Umani, 1989 e 1991). E' stato così possibile constatare che solo in autunno ed in inverno il nanofitoplancton può sostenere la crescita del microzooplancton, mentre in primavera ed in estate la sua concentrazione relativa, in relazione alla richiesta del microzooplancton, è troppo bassa e, quindi, non sufficiente a sostenerne la crescita. Ne deriva che in queste ultime due stagioni il microzooplancton deve integrare la sua nutrizione utilizzando altre fonti, come il pico ed il batterioplancton, il particellato o la sostanza organica disciolta (Cabrini et al., 1989).

Il bacino del Nord Adriatico è caratterizzato da un'alta produzione secondaria sostenuta da abbondanze stagionali di fitoplancton e di detrito organico, importante sorgente di nutrimento per lo zooplancton (Cattani & Corni, 1992). In tale area (Revelante & Gilmartin, 1983; 1990) si è registrata la dominanza dei Ciliati oltrechè differenze di popolamento tra la situazione di stratificazione e quella di rimescolamento degli strati d'acqua. Nel corso dello studio, effettuato dal 1978 al 1982, sono state registrate concentrazioni microzooplanctoniche oscillanti tra un minimo di 70 ed un massimo di 58700 ind/l. Il popolamento planctonico è più abbondante in caso di stratificazione dell'acqua rispetto alle condizioni di omeopinia (cioè di rimescolamento dell'acqua) ed in particolare l'abbondanza numerica dei Protozoi Ciliati, sia Tintinnidi che non Tintinnidi, risulta essere circa dieci volte maggiore, mentre i micrometazoi solamente raddoppiano in numero; le concentrazioni medie individuate in condizioni di stratificazione sono di 3805 ind/l per i Ciliati non loricati, 1212 ind/l per i Tintinnidi e 102 ind/l per i micrometazoi. E' da sottolineare inoltre che in queste condizioni la biomassa dei Ciliati è talmente alta che eguaglia o eccede la biomassa dei micrometazoi. I Ciliati non Tintinnidi in situazioni di omeopinia predominano in volume ed

in biomassa, mentre in condizione di stratificazione danno lo stesso contributo alla biomassa dei Tintinnidi .

E' opportuno, inoltre, ricordare che il popolamento microzooplanctonico adriatico è di tipo "neritico", dovuto al considerevole apporto fluviale che immette detrito incidendo sulla temperatura e salinità delle acque. Questo conferma la stretta relazione esistente tra i popolamenti microzooplanctonici e le caratteristiche fisico-chimiche delle masse d'acqua, ulteriormente comprovata dalla circostanza che detti organismi prediligono le condizioni di stratificazione dell'acqua particolarmente frequenti in estate.

In conclusione è stato possibile affermare che i popolamenti microzooplanctonici del Tirreno settentrionale presentano valori globalmente variabili tra 0 e 1387 ind/l, con massimi primaverili, generalmente localizzati nella parte settentrionale costiera. I valori ritrovati nel Tirreno settentrionale sono dello stesso ordine di grandezza di quelli segnalati per l'Adriatico centro settentrionale (Fonda Umani et al., 1989), sul quale si tornerà nel seguito, anche se decisamente inferiori a quelli riscontrati nella zona maggiormente influenzata dalla "plume" del Po (Revelante & Gilmartin, 1983; Ghirardelli et al., 1989). Ma, mentre in Adriatico, soprattutto nella sua parte più settentrionale e ad eccezione del periodo invernale, i popolamenti microzooplanctonici sono costituiti prevalentemente da Ciliati diversi dai Tintinnidi, con percentuali variabili dal 44 al 91% (Fonda Umani et al., 1989), in Tirreno sono costituiti per più del 50% da Tintinnidi, ad eccezione della crociera estiva del luglio 88, dove non superano il 36%. L'abbondanza dei Ciliati diversi dai Tintinnidi in Adriatico è stata messa in relazione con la prevalenza della frazione nanoplanctonica su quella microfitoplanctonica (Revelante e Gilmartin, 1983; Revelante et al., 1985; Cabrini et al., 1989), viceversa i Tintinnidi sono meno correlati con la distribuzione della frazione nanoplanctonica in quanto possono probabilmente gravare anche sulle prime classi dimensionali del micro-fitoplancton (Ghirardelli et al., 1989). Si può inoltre osservare come, soprattutto per le profondità di prelievo superficiali, la maggiore presenza del microzooplancton si riscontra prevalentemente in corrispondenza delle foci dei fiumi Cecina ed Arno, mentre l'Ombrone non sembra influenzare la distribuzione di questa frazione (se non, al limite, in senso negativo). Si è riscontrata una corrispondenza quasi perfetta tra la distribuzione del microzooplancton totale e quella dei soli Tintinnidi; le differenze rilevate, imputabili all'apporto dei micrometazoi, riguardano prevalentemente il periodo primaverile e più marcatamente quello estivo. I micrometazoi rappresentano circa il 30% sul totale in autunno e primavera mentre nella crociera estiva sono stati spesso superiori al 50%. Evidentemente tale andamento particolare deve essere messo in relazione con le caratteristiche climatiche stagionali. La struttura dei popolamenti microzooplanctonici dell'area oggetto di studio è risultata pertanto influenzata,

da un lato dagli apporti costieri, più evidenti in momento di cospicuo apporto fluviale o di netta stratificazione termoclinale, dall'altro dagli apporti delle acque di provenienza meridionale che influenzano gli strati più profondi e, a seconda delle stagioni, tendono ad invadere gli strati più superficiali, sovrastanti la piattaforma continentale. I popolamenti microzooplanctonici, pertanto, si prestano piuttosto bene a descrivere masse d'acqua di origine e provenienza diversa, di cui mantengono per un certo tempo la memoria (Fonda Umani & Monti, in "Progetto Mare: distribuzione dei popolamenti microzooplanctonici nell'arcipelago toscano", 1993, 170-171).

7.1.3 Golfo di Napoli

E' stato eseguito tra il marzo 1984 e gennaio 1985 (Scotto di Carlo et al., 1985) lo studio del microzooplancton superficiale attraverso prelievi effettuati presso una stazione fissa nel Golfo di Napoli a circa due miglia dalla costa. Tale indagine è stata compresa in un più ampio studio integrato sull'ecosistema pelagico costiero del Golfo di Napoli; altri studi sulla zona risalgono a tempi ben poco recenti: Issel (1934), Entz (1884), Jörgensen (1924).

Sono stati così rilevati un'elevata oscillazione del numero di Tintinnidi (da 11 a 5300 cellule/l) nonché rapidi cambiamenti della composizione specifica. Sono stati ritrovati tre picchi di abbondanza caratterizzati da una forte dominanza di una o poche specie, due picchi nel periodo primavera-inizio estate ed il terzo all'inizio dell'autunno, in corrispondenza di altrettanti picchi del fitoplancton.

Le variazioni qualitative e quantitative osservate per il microzooplancton superficiale sono in correlazione con l'instabilità dei parametri ambientali nei primi strati della colonna d'acqua, la quale produce effetti relativamente immediati sugli organismi inseriti nei primi livelli della catena trofica. Mettendo a confronto i dati del microzooplancton con gli altri dati biologici (fitoplancton, zooplancton, clorofilla) ed i dati fisico-chimici (temperatura, salinità, nutrienti) si è riscontrato che nella colonna d'acqua si distinguono due principali strati, uno superficiale e uno di profondità, che restano separati per la maggior parte dell'anno. Tale dato conferma quanto già illustrato in rapporto alle tipologie di popolamenti presenti nel Tirreno e nell'Adriatico; tuttavia i popolamenti dei due strati sono differenti da quelli del Tirreno e dell'Adriatico in quanto qui i movimenti delle masse d'acqua ed i popolamenti ad esse afferenti sono differenti. Tra essi, lo strato superficiale mostra caratteristiche tipiche delle acque costiere; ivi gli andamenti della clorofilla e del numero di cellule fitoplanctoniche coincidono con gli andamenti del microzooplancton e dimostrano la stretta dipendenza tra quest'ultimo ed il fitoplancton stesso.

7.1.4 Stretto di Messina

Uno studio preliminare del microzooplancton nello Stretto di Messina è stato eseguito nel 1990 (Sparla & Guglielmo, 1992), al fine di ottenere una migliore conoscenza di questa frazione planctonica in aree particolari, come lo Stretto, frontali e di upwelling. Sotto il profilo della rappresentazione quantitativa degli organismi, i Ciliati non loricati ed i Tintinnidi si confermano quali rappresentanti della quasi totalità del popolamento microzooplanctonico con una distribuzione spaziale che mostra un andamento strettamente legato alle condizioni idrodinamiche dello Stretto, con specie tipicamente di acque fredde e di profondità ritrovate in campionamenti superficiali. Emerge ancora una volta che le comunità microzooplanctoniche possono ben caratterizzare le acque, tanto che la provenienza di queste ultime può essere individuata in base alle specie ivi presenti.

7.1.5 Altre zone mediterranee

Per quanto riguarda gli studi nell'est del Mediterraneo, Abboud-Abi Saab (1989) riporta i dati della Costa Libanese. Vi si riscontrano ampie fluttuazioni numeriche e di composizione di specie, in particolare per i Tintinnidi. Si notano altresì due distinti picchi di abbondanza assimilabili a quelli che si riscontrano nelle altre zone mediterranee: uno di maggior rilevanza in maggio-giugno, l'altro in novembre-dicembre. La temperatura e la disponibilità nutritiva sembrano essere i fattori determinanti nella distribuzione stagionale dei Tintinnidi; il primo si esplica sia direttamente per le specie con caratteristiche termofile, sia indirettamente sul fitoplancton che costituisce la sorgente maggiore di nutrimento. La disponibilità nutritiva, invece, influisce soprattutto per la comparsa del picco primaverile, che segue il massimo picco di fitoplancton, e questo suggerisce una correlazione positiva tra le due popolamenti; in tale periodo le specie più abbondanti sono *Tintinnopsis beroidea* ed *Eutintinnus lusus-undae*.

Un'altra zona mediterranea monitorata (Vitiello, 1964) con particolare riferimento ai Tintinnidi è stata la Baia di Algeri, particolarmente interessante in quanto più ricca di organismi rispetto al resto del Mediterraneo derivati da una corrente più fredda di origine atlantica che attraversa questa zona da ovest verso est. Da ciò dipende la grande fertilità delle acque marine Nord africane e la grande ricchezza di specie e di individui microzooplanctonici correlata ad analoga ricchezza fitoplanctonica. Proprio per la già descritta circostanza che i popolamenti microzooplanctonici caratterizzano le masse d'acqua, seguendoli nei loro movimenti dovuti alle correnti, sono state campionate nella zona specie (*Stenosemella ventricosa*, *Tintinnopsis beroidea* e *Favella azoica*) tipiche dell'oceano Atlantico e

normalmente non presenti in Mediterraneo. Inoltre i loro massimi sono stati riscontrati con la salinità e le temperature più basse (in inverno), quando cioè la corrente atlantica è più forte e contiene una maggiore quantità di fitoplancton nutritivo.

La distribuzione microzooplanctonica è connessa quindi anche ai fattori che influenzano la corrente oceanica stessa e che possono operare contemporaneamente, quali quelli meteorologici (agitazione dell'acqua e nebulosità).

7.2 Altri mari

Studi dello "standing stock" dei Protozoi pelagici di zone oceaniche e neritiche sono stati riassunti da Taylor G.T. (1982). Ne è emerso che in zone oligotrofiche quali, ad esempio, l'oceano aperto, la concentrazione degli organismi microzooplanctonici è piuttosto bassa ed oscilla tra 68 e 440 ind/l (Beers & Stewart, 1967); in zone di "upwelling", quali quelle al largo della costa peruviana, assumono valori compresi tra 2400 e 18000 ind/l (Beers et al., 1971).

Numerosi Autori riportano notizie sulla distribuzione verticale e sui cicli stagionali del microzooplancton in generale e dei Tintinnidi in particolare. Fra questi si evidenzia (Paranjape, 1987) uno studio condotto nel Bedford Basin (Canada) che riscontra massimi di abbondanza in primavera e nella tarda estate a cui segue il minimo invernale.

E' stato altresì analizzato il popolamento microzooplanctonico del Golfo del Maine (Revelante & Gilmartin, 1987), ove i piccoli Ciliati sono rappresentati in misura maggiore sia in caso di alta che di bassa concentrazione di nutrienti. Nel primo caso, grazie al loro rapido tasso di crescita, rispondono subito al "bloom fitoplanctonico"; nel secondo caso, possono nutrirsi di Batteri e nanodetrito più efficacemente di quanto non facciano i pascolatori più grandi.

Studi condotti tra il 1981 ed il 1982 da Villalte (1991) sulle coste atlantiche, in particolare presso il porto di Abra (Golfo di Biscaglia, in Spagna), rivelano nuovamente gli stretti rapporti esistenti tra il fito ed il microzooplancton. In particolare trovano conferma le coincidenze in estate dei massimi di clorofilla con quelli della frazione minore microzooplanctonica (<45 µm), mentre la sua frazione maggiore (>250 µm) si presenta più abbondante in primavera; i picchi secondari di abbondanza sono dati da blooms di Tintinnidi (*Stenosemella nivalis*) in primavera e di *Noctiluca scintillans* in estate. Il crollo della biomassa fitoplanctonica si ha nel primo autunno e, successivamente, a metà autunno si assiste ad un forte decremento dello zooplancton; nel periodo invernale la clorofilla e lo

zooplancton non subiscono notevoli variazioni, mantenendosi su valori minimi, con un cambiamento nella composizione e nelle dimensioni di quest'ultimo.

Per quanto riguarda i numerosi studi fatti in Antartide (Buck & Garrison, 1983; Boltovskoy et al., 1989, 1990; Garrison & Buck, 1989; Monti & Fonda Umani, 1995) si richiama in particolare (Boltovskoy & Alder, 1992) la distribuzione spaziale del microzooplancton, in special modo di profondità (o verticale), rilevata nelle campagne effettuate negli anni 1987 e 1989. I Dinoflagellati eterotrofi dominavano il microzooplancton a tutte le profondità, ma erano altresì presenti i Tintinnidi, microcrostacei e Radiolari; viene comunque confermata la relazione tra la concentrazione della clorofilla *a* (e quindi del fitoplancton) e la biomassa del microzooplancton. Per quanto riguarda più in particolare la distribuzione dei Tintinnidi, Monti & Fonda Umani (1995) riportano che in periodo estivo australe sono presenti 6 generi e 14 diverse specie, tutte tipiche di quest'area e che sono per la maggior parte a lorica ialina, ma che presentano un'elevata diversità morfologica, soprattutto nella lunghezza della lorica. Anche in questo caso viene confermata la relazione della distribuzione dei Tintinnidi con la clorofilla *a*.

7.3 Ecosistemi di acque dolci

Come è stato detto precedentemente il microzooplancton in generale ed i Protozoi in particolare occupano ogni ambiente, ed assumono quindi una certa importanza, anche in ambiente di acqua dolce. I numerosi studi effettuati in proposito hanno cercato di mettere in relazione la composizione quali-quantitativa del microzooplancton in generale, dei Ciliati e dei Flagellati in particolare, con lo stato trofico delle acque (Porter, 1990), individuando quindi ancora una volta il microzooplancton come un buon indicatore dello stato trofico.

Gli ecosistemi di acque dolci correnti (fiumi, torrenti ecc., cioè di acque che possiedono una certa velocità) non possiedono di per sé popolazione planctonica in quanto, come può essere ben comprensibile, verrebbero trasportati via dalle correnti. Nelle acque in movimento la popolazione protozoica si sviluppa solo nel sedimento e sulle superfici solide, quali rocce o piante acquatiche (Fenchel, 1987), mentre eventuali cellule che si dovessero rinvenire in sospensione provengono da detti substrati solidi o dai sedimenti da cui sono state rimosse (Fenchel, 1987).

E' quindi solo nelle acque dei laghi o nelle acque stagnanti che si ha la possibilità di individuare una popolazione planctonica pelagica; i fattori che favoriscono l'insediarsi di popolamenti planctonici in tali ambienti sono il rimescolamento dell'acqua e i tassi di diluizione (il tasso di deflusso diviso il volume totale dell'acqua del bacino). Infatti solo quando il tasso di deflusso non supera il tasso di crescita degli organismi planctonici è possibile l'instaurarsi di un popolamento planctonico (Fenchel, 1987); in caso contrario il popolamento verrebbe via via portato fuori dal bacino senza essere rimpiazzato con nuovi individui.

Il deflusso da ogni bacino potrà, naturalmente, contenere cellule planctoniche in grado di crescere nel torrente o nel fiume (Fenchel, 1987).

E' da sottolineare che negli ambienti di acqua dolce esistono comunità differenti rispetto a quelle presenti in acque salate; infatti, accanto a specie eurialine, vi sono specie stenoaline tipicamente dulciaquicole diverse dalla specie stenoaline tipicamente marine. In ambiente di acqua dolce non esistono né Radiolari né Foraminiferi mentre è maggiore l'importanza delle Amebe e la loro diversità (Fenchel, 1987). Gli altri gruppi dei Protozoi non manifestano particolari differenze nei due tipi di ambienti, eccettuati due gruppi di Flagellati, i Dinoflagellati fagotrofi di grosse dimensioni (eterotrofi) ed i Coanoflagellati che, in ambiente di acqua dolce, non sono presenti (Fenchel, 1987). Il numero di specie di Protozoi di acqua

dolce è minore rispetto a quelle presenti in mare, soprattutto se il confronto include anche i Radiolari ed i Foraminiferi.

Per quanto riguarda il ruolo del microzooplancton nelle acque dolci deve essere ricordato che gli studi ecologici sono relativamente recenti. Studi di laboratorio hanno dimostrato che lo zooplancton di maggiori dimensioni (cioè > di 200 µm come Crostacei, tra cui Rotiferi, Cladoceri e Copepodi) è in grado di utilizzare i Ciliati come sorgente trofica (Porter et al., 1979), ma le indicazioni al riguardo sono scarse.

I Ciliati a loro volta possono essere voraci "grazers" sia del batterioplancton che del fitoplancton: ogni specie ha al riguardo un intervallo o una dimensione di particelle preferiti, che sono in funzione sia delle dimensioni che della morfologia boccale del Ciliato medesimo. Il trasferimento dell'energia dai Batteri di acqua dolce verso i livelli superiori della catena trofica avviene in modo significativo sempre grazie alla presenza dei Ciliati (o dei Flagellati eterotrofi) in quanto molti Metazoi sono degli inefficienti "grazer" di Batteri (Porter, 1984; Fenchel, 1987; Berninger et al., 1991).

La parte epilimnica dei laghi, in genere, possiede una considerevole varietà di specie di Ciliati. In particolare vi sono quattro ordini di Ciliati che dominano: Haptoride (es. *Mesodinium*, *Askenasia*), Scuticociliatide (es. *Cyclidium*) e, soprattutto, Oligotrichi e Tintinnidi, preponderanti come in mare. Questi ultimi, peraltro, si presentano con bassa diversità (al contrario che negli ambienti marini) ed i generi maggiormente rappresentati sono *Codonella*, *Tintinnopsis* e *Tintinnidium*. Tra gli Oligotrichi (nudi, senza lorica) i generi presenti sono *Halteria* e varie specie del genere *Strombilidium* e *Strombidium*. Con riguardo a quest'ultimo, ne esistono specie mixotrofe per la presenza di endosimbionti (tra cui, ad es., *S. viride*). Essi, in alcuni casi, sono presenti con una biomassa tale da eguagliare quella del fitoplancton (Fenchel, 1987). A conferma di ciò è stato riscontrato che nei laghi eutrofici i Ciliati mixotrofi possono essere dei componenti importanti in alcune comunità, particolarmente durante i periodi di limitazione dei nutrienti o durante il loro spostamento dal fondo. Più in generale, i Flagellati (sia autotrofi che eterotrofi) e i Ciliati dominano il protozooplancton (Laybourn-Parry & Rogerson, 1993); la comunità di Ciliati, come è già stato accennato, è dominata da Oligotrichi, particolarmente dal mixotrofo *Strombidium viride*, Vorticelle (Ciliati meroplanctonici sessili) e da Tintinnidi. La proporzione relativa di ogni gruppo varia comunque in funzione dello stato trofico in acqua; nel bacino maggiormente oligotrofico la comunità è dominata da Oligotrichi, mentre nel bacino più eutrofico i Tintinnidi e le Vorticelle sono i maggior componenti della comunità.

Il plancton di acqua dolce include anche Ciliati che non sono tipicamente pelagici ma bentonici. Tra essi sono comuni *Frontonia* ed *Euplotes* (Fenchel, 1987), alcuni Peritrichi peduncolati, non attaccati al substrato (come *Vorticella*; Fenchel, 1987) e Ciliati batteriofagi che si manifestano in quantità elevate in seguito a "blooms" batterici vicino allo strato di ossigenazione in laghi monomittici e meromittici, presenti in forme non propriamente planctoniche (tra esse i Scuticoliliati, come *Cyclidium* e *Uronema*).

Appare ora utile soffermarsi sulla distribuzione numerica e qualitativa dei popolamenti microzooplanctonici presenti negli ambienti in esame, ed in particolare di quella dei quattro ordini di Ciliati maggiormente rappresentativi (Haptoride, Scuticociliatide, Oligotrichi e Tintinnidi).

In generale va detto che (Beaver & Crisman, 1989; Fenchel, 1987) vi è una forte relazione tra lo stato trofico del lago (misurato in base alla concentrazione di clorofilla *a* e del fosforo totale) con la biomassa ed il numero dei Ciliati. In laghi oligotrofici la popolazione di Ciliati è modesta (<10 cellule/ml), con densità media dei Ciliati tra 10^2 e 10^3 ind/l ed una prevalenza degli Oligotrichi, predatori di fitoplancton. In laghi mesotrofici la densità degli Oligotrichi è fino a 10^4 ind/l, mentre in laghi eutrofici o ipereutrofici è più elevata (fino a 215 cellule/ml) con densità media fino a 10^5 ind/l (Pace, 1982); in questo tipo di laghi che possiedono una così elevata quantità di nutrienti i Ciliati batteriofagi (Scuticociliati) giocano un ruolo quantitativo considerevole (Fenchel, 1987). C'è quindi una tendenza per i Ciliati a crescere in abbondanza con l'aumento della produttività.

La media annuale dell'abbondanza dei quattro ordini sopra citati generalmente aumenta con il gradiente trofico, e quest'ultimo fa variare anche marcatamente la dominanza delle diverse specie. Infatti si verificano rimpiazzamenti tassonomici con l'aumento dell'eutrofizzazione: le forme più grosse (in predominanza Oligotrichi e Tintinnidi) sono progressivamente rimpiazzate da Ciliati a taglia più piccola (Scuticociliati). Il contributo degli Haptoridi non appare marcatamente interessato dallo stato trofico. Ne deriva che la composizione qualitativa dei Ciliati può definire lo stato trofico di un lago.

Sempre per quando riguarda la distribuzione dei Ciliati, i laghi a maggior acidità, rispetto ai laghi meno acidi e con uguale trofia, mostrano una pronunciata dominanza delle forme più grosse ed una diminuzione sia nella biomassa che nel numero di individui. Gli ordini sopra citati sono co-dominanti con forme di dimensioni piccole (20-30 μ m) in laghi con acidità fino a pH 5 mentre in laghi a maggior acidità risultano dominanti gli Oligotrichi con dimensioni maggiori (40-50 μ m: Beaver & Crisman, 1981).

L'esame comparativo dell'acidità e della trofia dell'ambiente dulciacquicolo consente di osservare che la struttura delle comunità dei Ciliati è determinata largamente dalla trofia: in laghi con pH acidi e sistemi oligotrofici, comparati ai sistemi ipereutrofici, vi è una ridotta diversità ed un arricchimento in numero di individui.

Nei laghi a regime termico che possiedono sorgenti a concentrazioni trofiche localizzate vi è una distribuzione spaziale e temporale dei Ciliati piccoli ($<100\ \mu\text{m}$). La distribuzione lungo la colonna d'acqua delle singole specie è influenzata anche dalla stratificazione. Ed è infatti durante le stratificazioni termiche estive che si rinvergono i maggiori quantitativi di Ciliati presenti con una notevole varietà di specie, in cui dominano gli Scuticociliati, tanto da contribuire fino al 60% alla biomassa dell'intero zooplancton (Fenchel, 1987), mentre nei periodi di rimescolamento la diversità specifica è minore e dominano gli Oligotrichi, i Tintinnidi ed i Peritrichi (Pace, 1982).

In laghi molto produttivi i Ciliati più grandi ($>100\ \mu\text{m}$) meroplanctonici dal fondo entrano in colonna d'acqua durante la metà estate dopo la formazione della stratificazione termica e la loro apparizione è associata alla deossigenazione del fondo. In queste condizioni essi rivestono un ruolo importante nella regolazione del numero dei Batteri, soprattutto perché tollerano condizioni di anossia o di microaerofilia non sopportate dai Metazoi (Finlay, 1985).

Anche Pace (1982) prende in considerazione l'abbondanza, la biomassa, la distribuzione verticale e la successione stagionale dei Ciliati planctonici di un lago poco profondo (Oglethorpe, Georgia, con profondità massima di 8 m, e media di 3 m), eutrofico per la concentrazione di fosforo e Batteri (16-1078 mg/l e $1.5\text{-}32 \times 10^6$ cellule/ml), ma con produttività moderata ($100\text{-}200\ \text{g C/m}^2$ anno) causata da alti livelli di torbidità. Le caratteristiche della popolazione planctonica sono così nuovamente messe in relazione all'abbondanza batterica, alla clorofilla *a* e ai feopigmenti. La variazione stagionale dei Ciliati si riferisce ai periodi di stratificazione estiva e al rimescolamento invernale. I Ciliati Oligotrichi, Tintinnidi e Peritrichi dominano la comunità durante i periodi di rimescolamento (da novembre a marzo). Le buone correlazioni tra la biomassa di Ciliati specifici e i parametri microbiologici, sia nelle osservazioni stagionali che verticali, suggeriscono che concentrazioni appropriate di fonti di nutrimento sono importanti nel determinare l'abbondanza dei Ciliati eterotrofi nel plancton.

E' anche utile ricordare che studi sull'influenza dell'anossia stagionale dell'acqua e dei sedimenti sulla distribuzione, densità e struttura delle comunità di Ciliati in laghi di acque dolci (Reid, 1982) hanno dimostrato che molti Ciliati bentonici presenti nel sedimento

lacustre sono probabilmente aerobi obbligati. E' stato infatti osservato (in due laghi inglesi di diversa profondità) che quando il fondo dei laghi è privo di ossigeno i Ciliati migrano verso la superficie del sedimento; quando questa situazione evolve in anossia per la stratificazione stagionale delle acque, che si verifica in tutti i laghi produttivi, i Ciliati migrano verso la colonna d'acqua (da bentonici diventano planctonici). Questa migrazione viene attuata soprattutto da Ciliati di grandi dimensioni che, divenuti planctonici, catturano l'ossigeno disponibile nello strato che lo possiede, il più superficiale. La biomassa che rimane nel benthos viene ridotta ed è costituita solo dalle specie < 150 µm. Con il collasso della stratificazione termica in autunno i Ciliati ritornano nel benthos per la durata dell'inverno e della primavera. Un singolo fattore come ad es. la tensione d'ossigeno ha come conseguenza la variazione della distribuzione dei Ciliati di acque dolci.

7.4 Ecosistemi di acque salmastre

Gli ambienti lagunari sono di particolare interesse naturalistico per le specie floristiche e faunistiche in essi presenti. Sono bacini costieri in genere originatisi a seguito dell'avvenuta formazione di un cordone litorale dinanzi ad una insenatura o ad una baia, che ha separato questa stessa in modo più o meno continuo dal mare; il collegamento con quest'ultimo è comunque assicurato attraverso bocche di entrata e di uscita della corrente di marea.

La peculiarità delle lagune (basti pensare a quelle di Fogliano e Caprolace, nel Parco Nazionale del Circeo, ma anche a lagune come quelle di Orbetello e Venezia) è data dall'elevata variabilità delle caratteristiche fisico-chimiche delle loro acque, che si manifestano in intervalli anche relativamente ampi a causa soprattutto della profondità piuttosto ridotta di tali bacini. Ciò consente alle diverse condizioni fisico-chimiche di manifestarsi velocemente in tutta la colonna d'acqua, conferendo un'elevata instabilità all'ambiente medesimo. Così, ad esempio, la salinità, che dipende dal prevalere dei diversi tipi di apporti di acque, varia notevolmente da laguna a laguna ma anche da periodo a periodo dell'anno (con variazioni annuali ad esempio di tale parametro anche tra il 20 ed il 40‰) o, addirittura, nell'ambito di uno stesso giorno. Le salinità minori si manifestano in corrispondenza di un maggiore afflusso di acque dolci per i maggiori apporti fluviali o ad un'elevata piovosità; i massimi di salinità, invece, si manifestano in corrispondenza di consistenti correnti entranti di marea che apportano acqua marina salata oppure, soprattutto in periodo estivo, in corrispondenza di un'elevata evaporazione dell'acqua. Quest'ultima determina non solo un innalzamento notevole della salinità nell'ambiente acquatico ma anche una diminuzione della tensione di ossigeno nonché la stratificazione termica dell'acqua stessa;

in tali condizioni, in assenza di vento, è ostacolato il rimescolamento degli strati profondi carichi di sostanze nutritive con quelli più superficiali maggiormente ossigenati. Modificandosi le condizioni climatiche, anche e soprattutto in autunno ed inverno, diminuendo cioè la temperatura esterna e quindi l'evaporazione dell'acqua e/o manifestandosi i fenomeni ventosi, si favorisce nuovamente il rimescolamento dell'acqua e quindi la risalita dal fondo delle sostanze nutritive nonché la maggior ossigenazione dell'intera colonna d'acqua.

Nonostante tali ambienti siano molto "fragili" proprio per il continuo mutare delle loro caratteristiche sono tuttavia eutrofici e molto produttivi; la catena trofica in essi presente è caratterizzata infatti da un elevato numero di individui a tutti i suoi livelli. Tale elevata produttività è dovuta alla presenza di consistenti carichi di sostanze nutritive derivate dalle acque interne che, quindi, in tali ambienti non rappresentano un fattore limitante alla crescita algale e favoriscono contestualmente tutta la catena trofica. Ciò ha suggerito all'uomo una utilizzazione anche economica delle lagune costiere; in queste ultime, infatti, trovano la loro migliore collocazione allevamenti intensivi di pesci o di molluschi che, a loro volta, fanno aumentare ulteriormente i carichi di sostanze nutrienti.

Gli elevati carichi nutritivi, come si è già detto, comportano, in presenza di condizioni fisico-chimiche adeguate di temperatura, salinità, luminosità ecc., abbondanti fioriture algali planctoniche e lo sviluppo di specie macrofittiche bentoniche, sia alghe pluricellulari che fanerogame acquatiche. Queste ultime, una volta terminato il loro ciclo vitale, si trasformano in una grossa quantità di sostanza organica che va incontro a processi degenerativi (rimineralizzazione) ad opera di Batteri aerobici; tali processi degenerativi sono di tipo ossidativo e consumano l'ossigeno disciolto in acqua. Quando il livello di ossigeno diminuisce drasticamente proprio per l'elevata quantità di sostanza organica da rigenerare o per la stratificazione estiva, si instaurano invece i processi degenerativi anaerobici via via più significativi ad opera dei Batteri anaerobici (si ha così la distrofia) con la produzione, tra gli altri, di idrogeno solforato (H_2S) e di metano, tossici agli individui se presenti in acqua con elevata quantità. A tale modificata situazione ambientale fa seguito una moria di pesci e di altri organismi che, in tal modo, vanno a loro volta ad aumentare il carico di sostanza organica da rigenerare; la situazione trofica dell'ambiente, quindi, peggiora ulteriormente. Da qui la necessità di un continuo monitoraggio delle lagune soprattutto di quelle sul cui equilibrio si fonda un'attività di piscicoltura, per evitare i processi di distrofia ora descritti, cagionati, come sottolineato, dalle caratteristiche ambientali tipiche della lagune cioè l'elevato carico nutritivo, la bassa profondità e, spesso, gli scarsi ricambi idrici con il mare che non consentono alla laguna di avere il necessario apporto di acque più ossigenate e con meno nutrienti.

Gli studi riguardanti le lagune sono molti, ma pochissimi di essi affrontano le problematiche della loro fragilità ambientale e la correlano con la dimensione e la diversità dei popolamenti planctonici ed in particolare microzooplanctonici. Alcuni di essi, svolti da Sorokin (comunicazione personale), hanno affrontato le problematiche connesse ad un allevamento intensivo di pesci in laguna. Tra essi se ne richiama uno in particolare (Valle Cà Pisani, azienda agricola Ravagnan) svolto nel 1993 ed incluso in un progetto dell'ICRAP, dove vengono fornite indicazioni sugli indicatori biologici dello stato trofico lagunare; sono stati così analizzati sia i fattori fisico-chimici (ossigeno disciolto nell'acqua, carbonio organico disciolto, solfuri), sia quelli biologici (la produzione primaria, la conta al microscopio dei fitoflagellati e del microzooplancton). E' stato così possibile verificare che cambiamenti dello stato trofico dell'ambiente acquatico, connesso alle variazioni di fertilizzazione dovute alla coltura di pesci, implicano modifiche delle comunità pelagiche. Va sottolineato che lo stato trofico di un tratto di acqua (sempre secondo Sorokin) viene definito non solo in base alla quantità di sostanza organica ed alla presenza di nutrienti, ma anche dai livelli di produttività primaria e dalla biomassa totale del plancton nonché dalla composizione del popolamento di Ciliati; tali fattori tra loro correlati consentono di individuare alcuni parametri per definire lo stato trofico di una laguna. In particolare:

a) *stato ipereutrofico giovane* (appena instaurato): la produzione primaria (P_p in mg C/m^3 giorno) è <5 ; i Ciliati eterotrofi (C_e in biomassa, mg/m^3) sono >500 ; i Ciliati simbiotici (*Mesodinium*, C_s in biomassa, mg/m^3) sono pari a 0;

b) *stato ipereutrofico maturo* (instaurato da un certo tempo: le diverse specie hanno trovato un equilibrio tra loro e con l'ambiente), per cui: $P_p >500$; $C_e <100$; $C_s = 0$;

c) *stato eutrofico giovane*: $P_p >50$; $C_e >300$; $C_s = 0$;

d) *stato eutrofico intermedio*: $P_p >200$; $C_e >150$; $C_s = 0$;

e) *stato eutrofico maturo*: $P_p >50$; $C_e <10$; $C_s = 0$;

f) *stato mesotrofico giovane*: $P_p <10$; $C_e >50$; $C_s = 0$;

g) *stato mesotrofico intermedio*: $P_p >15$; $C_e <10$; $C_s >100$;

h) *stato mesotrofico maturo*: $P_p >15$; $C_e <10$; $C_s <4000$.

E' stato così possibile osservare che nelle zone a maggior fertilizzazione ed eutrofizzazione (quelle sopra descritte con le lettere a e b, di ipertrofia) la decomposizione della biomassa

algale è molto alta, analogamente al contenuto di detrito (2 mg C/l), e la comunità planctonica è costituita per la maggior parte da fitoflagellati e da Ciliati batteriofagi quali *Tintinnopsis* e *Strombilidium* (Ciliati saprofitici che si nutrono cioè di sostanza organica in decomposizione) con concentrazioni fino a $15\text{-}30 \cdot 10^3$ cellule/l (i Protozoi predominano rispetto ai Metazoi).

Nelle zone di eutrofizzazione (quelle sopra indicate alle lettere c, d, e), vi sono alte concentrazioni batteriche ed il microplancton, sempre molto abbondante, è formato da molte specie del genere *Strombilidium*, che comprende organismi sia fitofagi che batteriofagi. Alte concentrazioni ($110 \cdot 10^3$ cellule/l) di *Tintinnopsis* e di *Strombilidium* sono state pure ritrovate in aree di bassa profondità con alta fertilizzazione ed in particolare in zone con il fondale ricoperto da *Ulva* (un'alga pluricellulare) e con sedimenti di colore nero con processi riduttivi.

Nelle aree più lontane dall'influenza della fertilizzazione causata dall'acquacoltura intensiva si instaura la condizione di mesotrofia (indicate con la lettera h nell'elenco che precede). In esse la produzione primaria non è molto elevata ed è presente una limitata biomassa fitoplanctonica; caratteristica è però la presenza di *Mesodinium rubrum* (il Ciliato autotrofo la cui sopravvivenza non dipende dalla presenza di sostanza organica) e la maggior presenza di Metazoi (Rotiferi e larve tipo trocofora). Via via che ci si avvicina dalla sorgente di fertilizzazione (alle aree cioè indicate alla lettera g), *Mesodinium* diminuisce la sua concentrazione e viene sostituito da Ciliati di piccole dimensioni quali *Strombilidium*.

E' possibile così affermare che anche in ambiente lagunare salmastro la composizione del plancton ed in particolare del microzooplancton riflette le caratteristiche trofiche dello specchio d'acqua ove questo stesso si trova. La già descritta funzione di parametro ambientale di tale componente è così confermata, dimostrando la sua valenza in qualsivoglia ambiente acquatico (marino, dulciacquicolo o salmastro).

Al fine di confermare tali asserzioni, e, quindi, per fornire una prospettazione più esaustiva possibile della componente microzooplanctonica nei differenti ambienti si ritiene necessario riportare alcune considerazioni derivanti da campionamenti effettuati nella Laguna di Venezia negli anni 1993 e 1994 (Fig. 7.4-1), e nelle Lagune Pontine (Fig. 7.4-2) negli anni 1995 e 1996 (per una dettagliata descrizione di tale campagna si rinvia a: Grenni & Creo *-in press*).

Con riferimento alla Laguna di Venezia si è riscontrato che in essa sono presenti zone a diversa trofia in dipendenza della maggiore o minore loro vicinanza dalla bocca di porto, e, quindi, a seconda della diversa ossigenazione e ricambio dell'acqua. E' così emersa la conferma che i popolamenti microzooplanctonici sono strettamente correlati con le masse

d'acqua ed i loro spostamenti, tanto da variare a seconda delle maree. In momenti di bassa marea prevalgono i Ciliati non loricati; in condizioni invece di alta marea (quindi in presenza di una corrente di acqua marina in entrata) prevalgono i Tintinnidi (che privilegiano le acque più pulite) ed in particolar modo le specie a lorica agglutinata che, come già sottolineato, prevalgono in zone costiere con elevato detrito in sospensione e elevati contenuti di sostanze nutritive (analoghe differenziazioni a seconda della marea, sono state riscontrate nelle due stazioni specie per i sedimenti, accumulatori di nutrienti provenienti dal bacino scolante; Izzo et al., 1995).

Con riferimento alle Lagune Pontine, costituite dai Laghi di Fogliano e Caprolace, si è rilevato che sono caratterizzate da una bassa profondità, da una elevata variabilità delle caratteristiche fisico-chimiche (salinità, temperatura, concentrazione di nutrienti, ossigeno disciolto), da un'elevata produttività biologica. Quest'ultima è data da un alto contenuto di nutrienti. In tali laghi, si sono rinvenute poche specie con molti individui, solo quelli cioè in grado di sopportare gli stress ambientali di ampio "range" (specie euriecie). Come già sottolineato, per tale studio sono state

sperimentate con successo due nuove tecniche: la concentrazione mediante filtrazione a flusso tangenziale e le tecniche di auto- ed epifluorescenza. Ciò ha consentito di operare un monitoraggio completo dei laghi esaminati.

Per quanto riguarda Fogliano, i Ciliati non Tintinnidi sono risultati presenti in tutte le stagioni (ad esclusione del mese di marzo) e prevalenti nettamente rispetto alle altre frazioni, costituendo circa il 90% del microzooplancton totale; i Tintinnidi sono stati ritrovati solo in 5 campionamenti mensili e sono risultati prevalenti percentualmente rispetto alle altre frazioni planctoniche (50%) solo in dicembre. I Metazoi si sono manifestati per tutto l'arco dell'anno, e sono stati prevalenti numericamente rispetto al resto del microzooplancton nella stagione autunnale (settembre e ottobre) ed a marzo.

Per quanto riguarda Caprolace, caratterizzato da un maggior numero di individui e da più specie rispetto a Fogliano, l'andamento annuale del microzooplancton ha presentato due picchi di abbondanza in primavera, in particolare ad aprile ed a giugno (mentre per Fogliano analoghi picchi si sono manifestati a maggio e ad ottobre). I Ciliati non Tintinnidi sono risultati presenti in tutti i campionamenti ad esclusione di quello di ottobre e di marzo (dove prevalgono i Metazoi), mentre i Tintinnidi sono stati ritrovati in tutti i campionamenti mensili, ad esclusione di quello di marzo.

Dalle correlazioni effettuate è risultato evidente che l'andamento annuale è poco legato all'andamento della temperatura e della salinità come fattori presi singolarmente, in quanto negli ambienti in esame si sono selezionate comunità di individui adattabili a condizioni instabili di temperatura e salinità; tale andamento sembra più correlato alle diverse clorofille (per i Tintinnidi, alla clorofilla *a*, con i carotenoidi e con la clorofilla *c*; per i Ciliati non Tintinnidi con la clorofilla *b*) e quindi alle prede presenti ed alla loro quantità.

8- Conclusioni

- Nel presente lavoro si è dimostrato il ruolo di indicatore ambientale del microzooplancton nei diversi ambienti acquatici, siano essi marini, lacustri o salmastri.

Essendo infatti un componente fondamentale della catena trofica, in quanto trasferisce l'energia e la biomassa presente nel fitoplancton ai successivi anelli (della catena trofica) cioè a tutti gli organismi consumatori, la determinazione sia qualitativa che quantitativa di tale componente è fondamentale per evidenziare lo stato trofico di un tratto di mare, di uno specchio d'acqua, di un fiume, con moltissime e rilevanti implicazioni sotto il profilo della tutela dell'ambiente in rapporto agli insediamenti umani.

- Per la migliore determinazione possibile della componente microzooplanctonica, sono state descritte oltre alle tecniche tradizionali -confermatesi affidabili- nuove tecniche sperimentali dimostrate anche più affidabili e funzionali perchè realizzabili in minor tempo. In particolare per la concentrazione del microzooplancton, la tecnica della filtrazione a flusso tangenziale si è dimostrata di facile impiego e di ottimi risultati. Il campione è concentrato in minor tempo (1 ora invece che 72 ore) e in maniera più riproducibile rispetto a quello concentrato con il metodo tradizionale della sedimentazione; contenendo poi una minore quantità particellato in sospensione, consente una migliore osservazione al microscopio ed una minore perdita di individui rispetto al metodo di filtrazione con il retino. La tecnica sperimentata, limitatamente alla determinazione del microzooplancton, può essere ulteriormente migliorata con l'utilizzo di filtri a porosità maggiore; sono state, infatti, già eseguite prove con filtri da 0,65 µm nelle quali si è ridotto ulteriormente il tempo di concentrazione e migliorata l'osservazione al microscopio, vista la minor quantità di particellato presente. Anche la tecnica della conta in epifluorescenza mediante l'uso di FITC è molto promettente per la determinazione della componente microplanctonica (ed anche nanoplanctonica), altrimenti difficilmente determinabile; tale tecnica è sicuramente suscettibile di ulteriore sviluppo, e ciò consentirà di avere progressivamente a disposizione dati relativi agli ambienti monitorati, attualmente inesistenti.

- La funzione di indicatore ambientale -nel senso già descritto nel primo capitolo e cioè nel senso di indicatore di uno stato trofico di un ambiente, soprattutto se posto in correlazione con altre componenti planctoniche, in particolare con il fitoplancton- della componente microzooplanctonica è stata così accertata sotto molteplici aspetti.

Negli ambienti acquatici la sua quantità, nonché il numero ed il tipo di specie presenti sono direttamente correlati allo stato trofico dell'ambiente medesimo ed al tipo di ambiente studiato, permettendo una classificazione molto precisa degli ecosistemi acquatici. D'altro canto la correlazione di tale componente con le masse d'acqua, consente di individuare gli spostamenti di queste stesse (in particolare in ambiente marino) e di poter così più facilmente individuare il percorso delle correnti.

Lo studio della dinamica delle popolazioni per periodi determinati (nel corso dell'anno, e/o in più anni) di uno stesso ecosistema, permette poi di seguire l'evoluzione dell'ecosistema stesso verso forme più o meno marcate di degrado ambientale. A tal fine è di ausilio la individuazione della quantità di fitoplancton presente in quel dato ambiente, che in generale deve corrispondere a predefiniti quantitativi di microzooplancton; se ciò non si verifica (come si è accertato per i laghi pontini), esiste una difficoltà di trasferimento dell'energia ai livelli superiori della catena trofica, probabilmente dovuta alle caratteristiche di distrofia dell'ambiente stesso. In questo caso, l'elevata quantità di biomassa fitoplanctonica prodotta non supporta, se non in minima parte, la crescita dei consumatori primari, ma passa direttamente alla catena del detrito, aumentando l'accumulo di sostanza organica nei sedimenti.

Ringraziamenti

Si ringrazia il dott. Giulio Izzo e tutti i suoi collaboratori per l'ospitalità all'interno del laboratorio; la dott.ssa Lucia Naviglio, *tutor* della Borsa di studio nonché la Prof. Serena Fonda Umani dell'Università di Trieste per i preziosi suggerimenti. Un particolare ringraziamento al dott. Stefano Gattamelata per l'incoraggiamento profuso nelle varie fasi della stesura di questo rapporto tecnico.

BIBLIOGRAFIA

AA. VV., 1993 - *Progetto mare. Ricerca sullo stato geologico chimico e fisico dell'Alto Tirreno Toscano*. Regione Toscana, Università di Firenze: 157-260.

ABBOUD-ABI SAAB M., 1989 - Distribution and ecology of Tintinnids in the plankton of Lebanese coastal waters (Eastern Mediterranean). *J. Plankton Res.*, 11 (2): 203-222.

ALBERGONI V., CASSINI A., COPPELLOTTI O., FAVERO N., PICCINNI E., TALLANDINI L., TURCHETTO M., 1992 - Heavy metals and antioxidant enzymes in anctartic Protozoa and fish. *Atti del II Convegno di Biologia Antartica*. Edizioni Universitarie Patavine: 267-290.

ALBERGONI V., PICCINNI E., CASSINI A., TALLANDINI L., TURCHETTO M., COPPELLOTTI O., FAVERO N., GUIDOLIN L., IRATO P., 1989 - Studio degli aspetti fisiologici e tossicologici della contaminazione da metalli in organismi antartici, delle risposte fisiologiche e biochimiche a metalli pesanti e degli aspetti fisiologici e biochimici dell'adattamento all'aumento di ossigeno disciolto. *Atti del I Convegno di Biologia Antartica*, Roma, CNR. Edizioni Universitarie Patavine (NS): 275-297.

ANDERSON D.M., MOREL R.M.M., 1978 - Copper sensitivity of *Gonyaulax taurarens*. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 283.

ANDERSON O.R., 1980 - Radiolaria. *Biochemistry and physiology of Protozoa*. 2nd ed. Levandovsky M., Hutner S.H. (eds). Academic Press, 3: 1-42.

ANDERSON O.R., 1983 - *Radiolaria*. Springer-Verlag, New York Inc.: 355 pp.

ANTIPA G.A., 1977 - Use of commensal Protozoa as biological indicators of water quality and pollution. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 96: 482-489.

BALECH E., 1959 - Tintinnoinea del Mediterraneo. *Trabajos Inst. Esp. Ocean.*, 28: 1-88.

BALECH E., 1968 - Algunas especies nuevas o interesantes de Tintinnidos del Golfo de Mexico y Caribe. *Revta Mus. Argent. Cienc. Nat. Bernardino Rivadavia*, (Hidrobiol.), 2: 163-197.

BALECH E., 1971 - Microplancton de la Campaña oceanografica Productividad III. *Rev. Mus. Argentina de Cencias naturales "Bernardino Rividavio"*, Inst. Nac. Inv. Ciencias Natur. Hidrobiologia, Buenos Aires, Impronta CONIS. A. C. I. F.I.,3 (1): 684.

BALECH E., 1972 - Los Tintinnidos indicadores de afloramientos de aguas (Ciliata). *Physis T., Buenos Aires*, 31 (83): 519-528.

BALECH E., 1975 - La familia Undellidae (Protozoa, Ciliophora, Tintinnida). *Physis, Buenos Aires*, (seccion A), 34 (89): 377-398.

BEAVER J.R., CRISMAN T.L., 1981 - Acid precipitation and the response of Ciliated Protozoans in Florida lakes. *Verh. Int. Verein Limnol.*, 21: 353-358.

BEE MM.G., VIOGET P., 1989 - Qualità biologica e chimica dei corsi d'acqua. *Ambiente, Risorse e Salute*, anno VIII, 1: 42-44.

BEERS J.R., 1978 - About microzooplankton. *Phytoplankton Manual*. Sournia A. (Ed.), UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology: 288-296.

BEERS J.R., STEWART G.L., 1967 - Microzooplankton in the photic zone at five locations across the California Current. *J. Fish. Res. Bd Canada*, 24: 2053-2067.

BEERS J.R., STEWART G.L., 1971 - Microzooplankters in the communities of the upper waters of the eastern tropical Pacific. *Deep Sea Res.*, 18: 861-883.

BEERS J.R., STEWART G.L., HOSKINS K.D., 1977 - Dynamics of micro-zooplankton population treated with copper: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.*, 27 (1): 66-79.

BENOVIC A., 1981 - Plankton Podobiokovskog Podrucja. *Acta Biokovica*, 1: 219-231.

BERGQUIST B.L., BOVEE E.C., 1975 - Cadmium quantitative methodology and study of its effects on the locomotor rate of *Tetrahymena piriformis*. *Acta Protozool.*, 15: 471-483.

BERK S.G., BROWNLEE D.C., HEINLE D.R., KLING H.J., COLWELL R.R., 1977 - Ciliates as food source for marine planktonic Copepods. *Microbial Ecol.*, 4: 27-40.

BERNATZKY G., FOISSNER W., SCHUBERT G., 1981 - Rasterelektronenmikroskopische und biometrische Untersuchungen über die Variabilität der Form, Struktur und Grosse des Gehäuses einiger limnischer Tintinnina (Protozoa, Ciliophora). *Zoologica scripta*, 10: 81-90.

BERNINGER U.G., FINLAY B.J., KUUPPO-LEINIKKI P., 1991 - Protozoan control of Bacterial abundances in freshwater. *Limnol. Oceanol.*, 36 (1): 139-147.

BICK H., 1963 - A review of central european methods for the biological estimation of water pollution levels. *Bull. Wld. Hlth Org.*, 29: 401-413.

BLACKBOURN D.J., TAYLOR F.J.R., BLACKBOURN J., 1973 - Foreign organella retention by Ciliates. *J. Protozool.*, 20: 286-288.

BLOEM J., ELLENBROEK F.M., BÄR-GILISSEN M.J.B., CAPPENBERG T.E., 1989 - Protozoan grazing and bacterial production in stratified lake Vechten estimated with

fluorescently labeled Bacteria and by thymidine incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (7): 1787-1795.

BLUNDO C., FUSCO P. (a cura di), 1982 - Indicatori biologici della qualità dell'ambiente. *Promozione della qualità dell'ambiente*. CNR

BOLTOVSKOY D., ALDER V.A., 1992 - Microzooplankton and Tintinnid species-specific assemblage structures: patterns of distribution and year-to-year variations in the Weddell Sea (Antarctica). *J. Plankton Res.*: 1405-1423.

BOLTOVSKOY D., ALDER V.A., SPINELLI F., 1989 - Summer Weddell Sea microplankton: assemblage structure, distribution and abundance, with special emphasis on the Tintinnina. *Polar Biol.*, 9: 447-456.

BOLTOVSKOY D., DINOFRIO E., ALDER V.A., 1990 - Intraspecific variability in Antarctic Tintinnids: the *Cymatocylis affinis/convallaria* species group. *J. Plankton Res.*, 12: 403-413.

BORROR A.C., 1975 - Environmental requirements of selected estuarine Ciliate Protozoa. *Ecol. Res. Ser.*, EPA-660/3-74-031.

BOTTAZZI MASSERA E., 1963 - Rivalutazione del genere *Quadrastaurus* Popofsky 1906 (Protozoa-Acantharia). *Boll. Zool.*, 30: 1-7.

BOTTAZZI MASSERA E., 1964 a - Gli Acantari dell'Oceano Atlantico. Osservazioni sistematiche ed ecologiche. *Boll. Zool.*, 31: 1115-1123.

BOTTAZZI MASSERA E., 1964 b - Un nuovo genere *Dendracantha* della famiglia "Stauracanthidae"- Haeckel (Protozoa-Acantharia). *Atti Soc. Ital. Sci. nat.*, 103: 376-379.

BOTTAZZI MASSERA E., 1978 - Systematic-ecological aspects of Radiolaria with special reference to Acantharia. *Boll. Zool.*, 45: 133-144.

BOTTAZZI MASSERA E., ANDREOLI M.G., 1971 - Ulteriori ricerche sugli Acantari (Protozoa) del Mar Tirreno. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiolog.*, 26: 87-107.

BOTTAZZI MASSERA E., VANNUCCI A., 1964 - Acantharia in the Atlantic Ocean. A systematic and ecological analysis of plankton collections made during Cruises Chain 17 and Chain 21 of the Woods Hole Oceanographic Institution. 1nd Contribution. *Arch. Oceanogr. Limnol.*, 13: 315-385.

BOVEE E.C., BERGQUIST B.L., WYTTEBACH E., KEGLEY D., STERNSEIN D., 1979 - The alleviation of the toxic effects of copper on the growth and locomotion of *Tetrahymena pyriformis* by nontoxic iron. *Kansas Sci. Bull.*, 51: 680-689.

BOVEE E.C., O'BRIEN T.L., 1982 - Some effects of selenium, vanadium and zirconium on the swimming rate of *Tetrahymena pyriformis*: a bioassay study. *Kansas Sci. Bull.*, 52: 39-44.

BRANDT K., 1906 - Die Tintinnodeen der Plankton Expedition. Tafelerklarungen nebst Kurzer Diagnose der neuen Arten. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped, Humboldt-Stift.*, 3: 33pp.

BRANDT K., 1907 - Die Tintinnodeen der Plankton Expedition. Systematischer Teil. *Ergebn. Plankton Exped.*, 3 La, 499 pp.

BRINGMANN G., KUHN R., 1980 - Determination of the biological effect of water pollutants in Protozoa-II. Bactivorous Ciliates. *Zeit. Wass. Abwass. Forsch.*, 13: 26-31.

BUCK K.R., GARRISON D.L., 1983 - Protists from the water column of the Weddel Sea (Antarctic Ocean). *Sarsia*, 76: 141-151.

BURKILL P.K., 1982 - Ciliates and other microplankton components of a nearshore food-web: standing stocks and production processes. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 335-350.

BURKOVSKII I.V., 1976 - Nouye dannye po Tintinnidam (Tintinnida, Ciliata) arktiki i reviziya fauny. *Zool. Zhurn.*, 55: 325-350.

BURNEY C.M., DAVIS P.G., JOHNSON K.M., SIEBURT J.McN., 1981 - Dependence of dissolved carbohydrate concentrations upon small scale nanoplankton and bacterioplankton distributions in Western Sargasso Sea. *Mar. Biol.*, 65: 289-296.

CABRINI M., MILANI L., FONDA UMANI S., HONSELL G., 1989 - Relazioni trofiche tra fitoplancton e microzooplancton nel Golfo di Trieste. *OEBALIA*, 15 (I), N.S.: 383-395.

CAIRNS J.Jr., 1969 - The response of freshwater Protozoan communities to heated waste waters. *Chesapeake Sci.*, 10: 177-185.

CAIRNS J.Jr., 1978 - Zooperiphyton (especially *Protozoa*) as indicators of water quality. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 97: 44-49.

CAPRIULO G.M., 1982 - Feeding of Field Collected Tintinnid micro-Zooplankton on Natural Food. *Mar. Biol.* 71: 73-86.

CAPRIULO G.M., CARPENTER E.J., 1980 - Grazing by 35 to 202 μ m Micro Zooplankton in Long Island Sound. *Mar. Biol.*, 56: 319-326.

CAPRIULO G.M., CARPENTER E.J., 1983 - Abundance, species composition and feeding impact of Tintinnid micro-zooplankton in Central Long Island Sound. *Mar. Ecol Prog. Ser.*, 10: 277-288.

CAPRIULO G.M., GOLD R., ORUBO A., 1982 - Evolution of the lorica in Tintinnids: a possible selective advantage. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S):319-324.

CARON D.A., 1983 - Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (4): 491-498.

CARON D.A., 1991 - Evolving role of Protozoa in aquatic nutrient cycles. *Protozoa and their role in marine processes*. Reid, P.C., Turey, C.M., Burkill, P.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin: 387-415.

CARRICK H., FAHENSTIEL G.L., TAYLOR W.D., 1992 - Growth and production of planktonic Protozoa in Lake Michigan: in situ versus in vitro comparisons and importance to food web dynamics. *Limnol. Oceanogr.*, 37 (6): 1221-1235.

CARTER J.W., CAMERON I.L., 1973 - Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena piriformis*. *Water Res.*, 7: 951-961.

CATTANI O., CORNI M.G., 1992 - The role of zooplankton in eutrofication, with special reference to the Northern Adriatic Sea. *Marine Coastal Eutrophication*. Vollenweider R.A., Marchetti R., Viviani R. (Eds.) Elsevier: 137-158.

CHISOLM S., OLSON R.J., ZETTLER E.R., GOERICKE R., WATERBURY J.B., WELSCHMEYER N.A., 1988 - A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* (London), 334: 340-343.

CHRZANOWSKI T.H., SIMEK K., 1990 - Prey-size selection by freshwater flagellated Protozoa. *Limnol. Oceanogr.*, 35 (7): 1429-1436.

CIRILLO M.C., LA SALA E., PALMA D., 1996 - Indicatori e risanamento ambientale: problemi locali e problemi globali. *Atti del convegno dell'informazione statistica per il governo per l'ambiente*. 29-30 Gennaio 1996. ISTAT-SIS.

COATS D.W., HEINBOKEL J.F., 1982 - A study of reproduction and other life cycle phenomena in planktonic Protists using an Acridine Orange fluorescence technique. *Mar. Biol.*, 67: 71-79.

COLOMBO A.G., 1996 - Indicatori per la valutazione di impatto ambientale. *Atti del convegno dell'informazione statistica per il governo per l'ambiente*. 29-30 Gennaio 1996. ISTAT-SIS.

CONOVER J.R., 1982 - Interrelations between microzooplankton and other plankton organisms. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 31-46.

COPPELLOTTI O., 1989 - Glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* cells exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94C (1): 35-40.

COPPELLOTTI O., 1994 - Effects of cadmium on *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida) from Antarctica. *Acta Protozool.*, 33: 159-167.

COPPELLOTTI O., ALBERGONI V., 1990 - Response of *Uronema marinum* from Antarctica to cadmium exposure. *ENEA, Progetto Antartide*. Casaccia, Roma: 189.

CORLISS J.O., 1979 - *The Ciliated Protozoa: characterization, classification and guide to the literature*, 2nd ed. Pergamon Press, 455 pp.

CURDS C.R., 1982 - Pelagic protists and pollution - a review of the past decade. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 117-136.

DALE T., BURKILL P.H., 1982 - "Live counting" - a quick and simple technique for enumerating pelagic ciliates. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 267-276.

DALE T., DAHL E., 1987 - Mass occurrence of planktonic oligotrichous ciliates in a bay in southern Norway. *J. Plankton Res.*, 9 (5): 871-879.

DAVIS C.C., 1978 - Variations of the lorica in the genus *Parafavella* (Protozoa: Tintinnida) in the northern Norway waters. *Can. J. Zool.*, 56: 1822-1827.

DAVIS P.G., 1982 - Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton populations in marine waters by epifluorescence microscopy. *Ann. Inst. Océanogr. Paris*, 58 (S): 249-260.

DI BRIZIO M., CINGOLANI L., GIORGI P., MARSILI G., MANNUCCI E., 1993 - Osservazioni della microfauna nel controllo dei depuratori a fango attivo. *Inquinamento*, anno XXXV, 2: 44-50.

DINI D., 1982 - Relationship between breeding systems and resistance to mercury in *Euplotes crassus* (Ciliophora: Hypotrichida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4: 195-202.

DIVE D., LECLERC H., 1975 - Standardized test method using Protozoa for measuring water pollutant toxicity. *Water Technol.*, 7: 67-72.

DIVE D., LECLERC H., PERSOONE G., 1980 - Pesticide toxicity on the Ciliate Protozoa *Colpidium campylum*. Possible consequences of the effect of pesticides in the aquatic environment. *Ectotoxicol. Environ. Safety*, 4: 129-134.

DIVE D., PERSOONE G., 1984 - Protozoa as test organisms in marine ecotoxicology: luxury or necessity? *Ectotoxicol. Environ. Safety*, 1: 281-305.

DODGE J.D., 1982 - Marine Dinoflagellates of the British Isles. Her Majesty's Stationery office London, 303 pp.

ELBRÄCHTER M., 1991 - Food uptake mechanisms in phagotrophic dinoflagellates and classification. *The biology of free-living heterotrophic flagellates*, Patterson D.J. & Larsen J. (eds), Clarendon Press, Oxford. The systematics Association, Special volume n° 45: 303-312.

ENTZ, 1884 - Über Infusorien des Golfes von Neapel. *Mitt. Zool. Stat. Neapel*, 5: 289-444.

EPA, 1990 - *Ecological indicators for the environmental monitoring and assessment program*, EPA 600/3-90/060. Hunsaker C.T., Carpenter D.E. (eds.) U.S. Environmental Protection Agency, Office for Research and Development, Research Triangle Park, NC.

EPSTEIN S.S., BURKOVSKY I.V., SHIARIS P., 1992 - Ciliate grazing on Bacteria, Flagellates, and microalgae in a temperate zone sandy tidal flat: ingestion rates and food niche partitioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 165: 103-123.

FAURE-FREMIET E., 1969 - Remarques sur la systematique des Cilies Oligotrichida. *Protistologica*, 3: 345-352.

FENCHEL T., 1980. Relation between particle size selection and clearance in suspension feeding Ciliates. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 733-738.

FENCHEL T., 1987 - *Ecology of Protozoa: the Biology of free Living Phagotrophic Protists*. Berlin- Springer-Verlag: 197pp.

FENCHEL T., HARRISON P., 1976 - The significance of Bacterial grazing and mineral cycling for the decomposition of particulate detritus. *The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition process*. Anderson & Mac Fayden (eds), 285-299.

FERNANDEZ-LEBORANS G., NOVILLO A., 1995 - The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater Protozoa community. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 31: 29-36.

FERNANDEZ-LEBORANS G., NOVILLO-VILLAJOS A., 1993 - Changes in trophic structure of a freshwater Protozoan community subject to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 25: 271-279.

FERRIER C., RASSOULZADEGAN F., 1991 - Density-dependent effects of Protozoans on specific growth rates in pico- and nanoplanktonic assemblages. *Limnol. Oceanogr.*, 36 (4): 657-669.

FINLAY B.J., 1985 - Nitrate respiration by Protozoa (*Luxodes* spp.) in the hypolimnetic nitrate maximum of a productive freshwater pond. *Freshwater Biol.*, 15: 333-346.

FONDA UMANI S., 1989 - *Le catene alimentari*. Quaderni del Laboratorio. Società Editoriale Libreria.

FONDA UMANI S., 1991 - General features of planktonic system in the Gulf of Trieste and their variations in the last decade. *MAP Tech. Rep. s.*, 47: 82-101.

FONDA UMANI S., GHIRARDELLI E., 1988 - Caratteristiche chimiche e biologiche del sistema pelagico del Golfo di Trieste. *Hydrores*, Anno V, 6: 71-82.

FONDA UMANI S., GHIRARDELLI E., MILANI L., SPECCHI M., 1989 - Zooplankton dell'Adriatico Settentrionale e Centrale. *Boll. Oceanogr. Teor. appl.*, N.S., 127-137.

FONDA UMANI S., HONSELL G., CABRINI M., MILANI L., 1985 - A Tintinnid "bloom" in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *OEBALIA*, 11 (N.S.): 149-156.

FONDA UMANI S., MILANI L., 1990 - Microzooplankton. Metodi nell'ecologia del plancton marino. *Nova Thalassia*, 11: 251-256.

FONDA UMANI S., MONTI M., 1993 - Microzooplankton del Tirreno Settentrionale: risultati di sette crociere stagionali. *Atti della Società Toscana di Scienze naturali, memorie - Serie A. Atti del convegno "Lo stato degli ecosistemi marini del Tirreno toscano", Grosseto 2-4 Dicembre 1993*.

FONDA UMANI S., MONTI M., SICHENZE S., 1988 - Tuscan Northern Tyrrhenian microzooplankton: Autumn 1986. *Comm. Int. Mer. Médit.*, 31, 2.

FROST B.W., 1987 - Grazing control of phytoplankton stock in the open subarctic Pacific Oceans: a model assessing the role of mesozooplankton, particularly the large calanoid copepods *Neocalanus* spp.. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*

GAINS G., ELBRÄCTER M., 1987 - Eterotrophic nutrition. *The biology of dinoflagellates*. Taylor F.J.R. (ed), Vol. 21 (6): 225-268.

GARRISON D.L., BUCK K.R., 1989 - Protozooplankton in the Weddel Sea, Antarctica: abundance and distribution in the ice- edge zone. *Polar Biol.*, 9: 341-351.

GASOL J.M., 1993 - Benthic Flagellates and Ciliates in fine freshwaters sediments: calibration of a live counting procedure and estimation of their abundances. *Microbial Ecol.*, 24: 227-242.

GRAY J.S., VENTILLA R.F., 1973 - Growth rates of sediment-living marine Protozoans as a toxicity indicator for heavy metals. *Ambio*, 2: 118-120.

GEORGE D.B., BERK S.G., ADAMS V.D., TING R.S., ROBERTS R.O., PARKS L.H., LOTT R.C., 1995 - Toxicity of alum sludge extracts to a freshwater Alga, Protozoan, fish, and marine Bacterium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 149-158.

GHIRARDELLI E., 1981 - *La vita nelle acque*. UTET: 610 pp.

GHIRARDELLI E., FONDA UMANI S., SPECCHI M., 1989 - Lo zooplankton dell'Adriatico. *Il Mare Adriatico: problemi e prospettive*. Sogesta, Urbino, 47-74.

GOLD K., 1969 - The preservation of Tintinnids. *J. Protozool.* 16 (1): 126-128.

GOLD R., 1979 - Scanning electron microscopy of *Tintinnopsis parva*: studies on particle accumulation and the striae. *J. Protozool.* 26, 3: 415-419.

GOLD R., MORALES E. A., 1976 a - Studies on Tintinnida using scanning electron microscopy. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95 (4): 707-711.

GOLD R., MORALES E. A., 1976 b - Studies on the sizes, shapes, and the development of the lorica of agglutinated Tintinnida. *Biol. Bull.*, 150: 377-392.

GOLD R., MORALES E. A., 1976 c - Observations on the nature and significance of the particles used by Tintinnida during lorica-building. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95 (1): 69-72.

GOLDMANN J.C., CARON D.A., 1985 - Experimental studies on an omnivorous microflagellate: implications for nutrient regeneration in the marina microbiol food chain. *Deep. Sea Res.* 32: 899-915.

HAAS L.W., 1982 - Improved epifluorescence microscopy for observing planktonic micro-organisms. *Ann. Inst. Océanogr., Paris*, 58(S): 261-266.

HALME E., 1958 - Planktologische Untersuchungen in der Pojo-Bucht and angrenzenden Gewässern. IV. Zooplankton. *Ann. Zool. Soc. "Vanamo"*, 19: 1-62.

HARRISON W.G., 1980 - Nutrient regeneration and primary production in the sea. *Primary productivity in the sea*, Falkowski P.G.(ed). Plenum Press N. Y. : 433-460.

HAWKES H.A., 1977 - Biological classification of rivers: conceptual basis and ecological validity. *Alabaster*: 55-67.

HEDIN H., 1974 - Tintinnids on the Swedish West Coast. *ZOON* 2: 123-133.

HEDIN H., 1975 - On the ultrastructure of *Favella ehrenbergii* (Claparède & Laachmann) and *Parafavella gigantea* (Brandt), (Protozoa, Ciliata, Tintinnida). *ZOON*, 3: 11-18.

HEINBOKEL J.F., 1978 a - Studies on the Functional Role of Tintinnids in the Southern California Bight. I - Grazing and Growth Rates in Laboratory Cultures. *Mar. Biol.*, 47: 177-189.

HEINBOKEL J.F., 1978 b - Studies on the Functional Role of Tintinnids in the Southern California Bight. II - Grazing rates of field populations. *Mar. Biol.*, 47: 191-197.

HEINBOKEL J.F., 1982 - Growth, reproduction and life cycles in marine planktonic Protozoa. *Ann. Inst. Océanogr., Paris*, 58 (S): 213-222.

HEINBOKEL J.F., BEERS J.R., 1979 - Studies on the functional role of Tintinnids in the Southern California Bight. III. Grazing impact of natural assemblages. *Mar. Biol.* 52: 23-32.

HOFKER J., 1931 - Studien über Tintinnoiden. *Arch. Protistenk.*, 75 (3): 315-402.

HUTNER S.H., 1964 - Protozoa as toxicological tools. *J. Protozool.*, 11: 1-6.

ISSEL R., 1934 - Ciclo annuale del microplancton di superficie del Golfo di Napoli (Golfo interno). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 14: 1-50.

IZZO G., ALLEGRO A., CREO C., FAUSTINI N., GRENNI P., SIGNORINI A., 1995 - Nutrienti nei sedimenti di due siti della Laguna di Venezia. *Atti del VI Congresso Nazionale S.I.T.E. Venezia, 26-29 Settembre 1994*.

JACK J.D., WICKHAM S.A., TOALSON S., GILBERT J.J., 1993 - The effect of clays on a freshwater plankton community: an enclosure experiment. *Arch. Hydrobiol.*, 127 (3): 257-270.

JOHANNES R.E., 1968 - Nutrient regeneration in lakes and oceans. *Adv. Microbiol. of the Sea*.

JONSSON P.R., 1987 - Photosynthetic assimilation of inorganic carbon in marine Oligotrich Ciliates (Ciliophora, Oligotrichina). *Mar. microb. Ed Webs*. 2: 55-68.

JÖRGENSEN E., 1924 - Mediterranean Tintinnidae. *Rep. Dan. oceanogr. Exed. Meditterr.*, 2 (J3): 1-110.

JUCHELKA C.M., SNELL T.W., 1995 - Rapid toxicity test assessment using ingestion rate of ciliates and Ciliates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28: 508-512.

JÜTTNER I., PEITHER A., LAY J.P., KETTRUP A., ORMEROD S.J., 1995 - An outdoor mesocosm study to assess ecotoxicological effects of atrazine on a natural plankton community. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 435-441.

KAHL A., 1940 - Ciliata libera et ectocommensalia. *Die Tierwelt der Nord-und Ostsee*. Grimpe G. e Wagler E., (Eds.) IIC3: 25-146.

KARNOWSKY M.J., 1965 - A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Abst. Ann. Meeting Am. Soc. Cell. Biol.*, 27: 137A-138A.

KIMMERER W.J., MCKINNON A.D., 1986 - Glutaraldehyde fixation to maintain biomass of preserved plankton. *J. Plankton Res.*, 8 (5): 1003-1008.

KING F.D., CUCCI T.L., TOWNSED D.W., 1987 - Microzooplankton and macrozooplankton glutamate dehydrogenase as indices of the relative contribution of these fractions to ammonium regeneration in the Gulf of Maine. *J. Plankton Res.*, 9 (2): 277-289.

KOFOID C.A., CAMPBELL A.S., 1929 - A conspectus of the marine and fresh-water Ciliata belonging to the suborder Tintinninea, with descriptions of new species principally from the Agassiz Expedition to the Eastern Tropical Pacific, 1904-1905. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 34: 403 pp.

KOFOID C.A., CAMPBELL A.S., 1939 - Reports on the scientific results of the expedition to the Eastern Tropical Pacific. The Ciliata: the Tintinninea. *Bull. Mus. Comp. Zool., Harv.*, 84: 473pp.

KOLKWIZ R., 1950 - Okologie der saprobien. Schriftenreihe des Vereins wasser. *Boden und Lufthygiene*, 4.

KOLKWIZ R., MARSSON M., 1908 - Okologie der Pfälzlichen saprobien. *Report of German Botanical Society*, 26a: 505 pp.

KRAWCYNska W., PIVOVARONA N.N., SOBOTA A., 1989 - Effects of cadmium on growth, ultrastructure and content of chemical elements in *Tetrahymena pyriformis* and *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozool.*, 28: 245-252.

KRSINIC F., 1977 - Kvalitativna i kvantitativna istraživanja Tintinida uz istocnu obalu Jadranskog mora. Doktorska disertacija. *Prir. mat. fakultet Sveucilista u Zagrebu*: 130 pp.

KRSINIC F., 1979 a - Cruises of the Research Vessel "Vila Velebita" in the Kvarner Region of the Adriatic Sea - XI Microzooplankton. *Thalassia jugos.*, 15 (3/4): 179-192.

KRSINIC F., 1979 b - The Tintinnids (Ciliata) from the Coastal Waters of the Southern Adriatic in the Year 1975/76. *Nova Thalassia* 3 (S): 199-211.

KRSINIC F., 1980 - Kvalitativna i kvantitativna istraživanja Tintinida uz istocnu obalu Jadranskog mora. *Acta Adriat.*, 21 (1): 19-104.

KRSINIC F., 1981 - Microzooplankton in the Rijeka Bay. *Thalassia jugoslavica*, 17 (3/4): 275-284.

KRSINIC F., 1982 - Mikrozooplankton Kastelanskog Zaljeva okolnog područja. *Acta Adriat.*, 23 (1/2): 89-96.

KRSINIC F., 1987 a - Tintinnines (Ciliophora, Oligotrichida Tintinnina) in Eastern Adriatic Bays - *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 24: 527-538.

KRSINIC F., 1987 b - On the Ecology Tintinnines in the Bay of Mali Ston (Eastern Adriatic). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 24: 401-418.

KRSINIC F., 1988 - The familie *Xystonellidae* (Ciliophora Tintinnina) in the Adriatic Sea. *J. Plankton Res.*, 10 (3): 413-429.

KRSINIC F., VILICIC D., 1989 - Microzooplankton in the Kotor Bay (the Southern Adriatic) - Mikrozooplankton u Kotorskom zaljevu (Juzni Jadran). *Studia Marina*, 20: 3-20.

KUTT E.C., MARTIN D.F., 1974 - Effect of selected surfactants on the growth characteristics of *Gymnodinium breve*. *Mar. Biol.*, 28: 253.

LANDRY M.R., HASSET R.P., 1982 - Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Mar. Biol.* 67: 283-288.

LAVAL PEUTO M., 1981 - Construction of the lorica in Ciliata Tintinnina. In vivo study of *Favella ehrenbergii*: variability of the phenotypes during the cycle, biology, statistics, biometry. *Protistologica*, 17: 249-272.

LAVAL-PEUTO M., 1982 - Methods of taxonomy and selection of criteria for determination of marine planktonic Protozoa. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 151-168.

LAVAL-PEUTO M., BROWNLEE D.C., 1986 - Identification and systematics of the Tintinnina (Ciliophora): evaluation and suggestions for improvement. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 62 (1): 69-84.

LAVAL-PEUTO M., SALVANO P., GAYOL P., GRENET C., 1988 - Mixotrophy in marine planktonic study of *Tontonia appendiculariformis* (Ciliophora, Oligitrichina). *Mar. Microb. Food Webs*, 1: 81-104.

LAYBOURN-PARRY J., ROGERSON A., 1993 - Seasonal patterns of Protozooplankton in Lake Windermere, England. *Arch. Hydrobiol.*, 129 (1): 25-43.

LAYBOURN-PARRY J., ROGERSON A., CRAWFORD D.W., 1992 - Temporal patterns of Protozooplankton abundance in the Clyde and Loch Striven. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 35: 533-543.

LEE J.J., 1980 - Nutrition and physiology of Foraminifera. *Biochemistry and physiology of Protozoa*. 2nd ed. Levandovsky M., Hutner S.H. (eds). Academic Press, 3: 43-66.

LEE J.J., SMALL E.B., LYNN D.H., BOVEE E.C., 1985 - Some techniques for collecting, cultivating and observing Protozoa. *An illustrate guide to the Protozoa*. Lee J.J., Hutner S.H., Bovee E.C. (eds.). Soc. Protozool. Special Publ. Allen Press. Lawrence, Kansas: 1-7.

LIEBMAN H., 1962 - Handbuch der frishwasser und abwasserbiologie. *Bd.*, 1: 2.

LINDMRK D.G., 1981 - Activation of polynuclear aromatic hydrocarbons to mutagens by the marine Ciliate *Parauremona acutum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 (5): 1238-1242.

LOEBLICH A.R.Jr., TAPPAN H., 1968 - Annotated Index to genera, subgenera and suprageneric taxa of the Ciliated order Tintinnida. *J. Protozool.*, 15: 185-192.

LOVEGROVE T., 1960 - An improved form of sedimentation apparatus for use with an inverted microscope. *J. Cons. CIESM*, 25: 279-284.

LYNN D.H., MONTAGNES D.J.S., SMALL E.B., 1988 - Taxonomic descriptions of same conspicuous species in the family *Strombidiidae* (Ciliophora: Oligitrichida) from the Isles Shoals, Gulf of Maine. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 68: 259-276.

MADONI P., 1981 - *I Protozoi Ciliati degli impianti biologici di depurazione*. C.N.R. AQ/1/167, Roma, 134pp.

MADONI P., 1988 - *I Protozoi Ciliati nel controllo di efficienza dei fanghi attivi*. C.I.S.B.A., Reggio Emilia, 82pp.

MADONI P., 1991 - I Protozoi Ciliati come bioindicatori. *Biologi Italiani*, Anno XXI, n°9: 27-31.

MANCINI L., BERNABEI S., VOLTERRA L., 1993 - Evoluzione dell'ecosistema fluviale. Parte prima: Gli indici biologici. *Ambiente, Risorse e Salute*, Anno XII, 17: 13-18.

MARGALEF R., 1963 - Role des Cilies dans le cycle de la vie pelagique en Mediterranee. *Rapp. Proc. Verb. reun. CIESM*, 17 (2): 511-512.

MARGALEF R., 1982 - Some thought on the dynamics of populations of Ciliates. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58(S): 15-18.

MARGALEF R., DURANT M., 1953 - Microplankton de Vigo. Oct. 1952 - Sept. 1952. *Publ. Inst. Biol. Appl. Barc.*, 13: 5-78.

MARSHALL S.M., 1969 - Protozoa: Tintinnida. Fiches d'identification du zooplankton. *Cons.Int. Explor. Mer*: 117-127.

MASSANA R., STUMM C.K., PEDROS-ALIO C., 1994 - Effects of temperature, sulfide and food abundance on growth and feeding of anaerobic Ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (4): 1317-1324.

MATTHEWS R.A., BUIKEMA A.L. Jr, CAIRNS J.Jr., RODGERS J.H., 1982 - Biological monitoring. Part IIA- Receiving system functional methods, relationships and indices. *Water Res.*, 16: 129-139.

McMANUS J.W., PAULY D., 1990 - Measuring ecological stress: variations on a theme by R.M. Warwick. *Mar. Biol.*, 106: 305-308.

MENZEL D.W., CASE J., 1977 - Concept and design: Controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.*, 27: 1-7.

MICHAELS A.F., 1988 - Vertical distribution and abundance of Acantharia and their symbionts. *Mar. Ecol.*, 97: 559-569.

MILANI L., CABRINI M., FONDA UMANI S., HONSELL G., 1989 - Analisi delle variazioni temporali dei popolamenti planctonici nel Golfo di Trieste. *Nova Thalassia*, 10 (S1): 105-123.

MILANI L., CABRINI M., MARTECCHI E., BRAUN E., FONDA UMANI S., 1991-1994 - Il microzooplancton in una stazione del Golfo di Trieste da ottobre 1988 a dicembre 1990. *Nova Thalassia*, 12: 311-369.

MONTAGNES D.J.S., LYNN D.H., 1988 - A new species of *Tontonia* (Ciliophora, Oligotrichina) from the Isles of Shoals, Maine (U.S.A.). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 107 (3): 305-308.

MONTAGNES D.J.S., LYNN D.H., ROFF J.C., TAYLOR W.D., 1988 - The annual cycle of heterotrophic planktonic Ciliates in the waters surrounding the Isle of Shoals, Gulf of Maine: an assessment of their trophic role. *Mar. Biol.*, 99: 21-30.

MONTI M., FONDA UMANI S., 1995 - Tintinnids in Terra Nova Bay-Ross Sea during two austral summers (1987/88 and 1989/90). *Acta Protozool.*, 34: 193-201.

MURRAY J.W., 1971 - *An Atlas of British Recent Foraminiferids*. Heinemann educational books Ed., London: 244pp.

NICOLAI P., 1992 - *La scienza della bioindicazione: guida introduttiva alle metodologie di valutazione della qualità ambientale mediante monitoraggio biologico*. ENEA, serie trattati.

OECD, 1994 - *Environmental indicators*. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

PACE M.L., 1982 - Planktonic Ciliates: their distribution, abundance, and relationship to microbial resources in a monomictic lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 1106-1116.

PACE M.L., GLASSER J.E., POMEROY L.R., 1984 - A simulation analysis of continental shelf food Webs. *Mar. Biol.*, 82: 47.

PACE M.L., GLASSER J.E., POMEROY L.R., 1984 - A simulation analysis of continental shelf food Webs. *Mar. Biol.*, 82: 47.

PARANJAPÉ A., GOLD K., 1982 - Cultivation of marine Protozoa. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58: 143-150.

PARANJAPÉ M., 1980 - Occurrence and significance of resisting cysts in a hyaline Tintinnid *Helicostomella subulata* (Ehr.) Jörgensen. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 48: 23-33.

PARANJAPÉ M.A., 1987 - The seasonal cycles and vertical distribution of Tintinnines in Bedford Basin, Nova Scotia, Canada. *Can. J. Zool.* 65: 41-48.

PERRISS S.J., LAYBOURN-PARRY J., JONES R.I., 1994 - Chlorophyll contents and photosynthetic rates of the freshwater mixotrophic Ciliate *Strombidium viridae* (Ciliophora: Oligotrichida). *Arch. Hydrobiol.*, 130 (4): 473-483.

PERSOONE G., DIVE D., 1978 - Toxicity test on Ciliates-a short review. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 2: 105-114.

PILLING E. R., LEA KEY R. J. G., BURKILL P. H., 1988 - *Protozoa and their role in marine processes*. Nato Advanced Study Institute-Plymouth.

PORTER K.G., 1984 - Natural Bacteria as food sources for zooplankton. *Current perspectives in microbial ecology*. Klug M.J., Reddy C.A. (eds). American Society for Microbiology, Washington DC: 340-345.

PORTER K.G., 1990 - Heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic nanoflagellates: seasonal abundances and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 948-951.

PORTER K.G., PACE M.L., BATTEY J.F., 1979 - Ciliate Protozoans as links in freshwater planktonic food Webs. *J. Proto-zool.* 32: 409-415.

POSTA A., 1963 - Relation entre l'evolution de quelques Tintinnides de la rad de Villefranche e la temperatura de l'eau. *Cah. Biol. mar.*: 201-210.

PREVOT P., 1982 - Some applications of electron microscopy in ecotoxicological studies. *Acute aquatic ecotoxicological tests: Methodology - standardization and significance*. Leclerc H., Dive D. (eds.) Editions INSERM, Paris 106: 235-244.

PREVOT P., SOYER M.O., 1978 - Cadmium action on a free living Dinoflagellate *Prorocentrum micans*. B. growth, cadmium adsorption, cell modification. *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.* D287: 833-835.

PUTT M., 1990 - Metabolism of photosynthate in the chloroplast-retaining Ciliate *Laboea strobila*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 271-282.

RAMPI L., 1948 - I Tintinnoidi delle acque di San Remo. II. Osservazioni e conclusioni. *Boll. Pesca, Piscic. Idrobiol.*, 3 (1): 50-56.

RAMPI L., 1950 - I Tintinnoidi delle acque di Monaco raccolti dall'Eider nell'anno 1913. *Bull. Inst. océanogr.* Monaco.

RAMPI L., ZATTERA A., 1982 - *Chiave per la determinazione dei Tintinnidi mediterranei*. ENEA-RT/BIO 28: 104pp.

RASMUSSEN L., 1973. On the role of food vacuole formation in the uptake of dissolved nutrients by *Tetrahymena*. *Exp. Cell. Res.*, 82: 192-196.

RASSOULZADEGAN F., 1977 - Evolution annuelle des Ciliés pélagiques en Méditerranée nord-occidentale. Ciliés Oligotriches, "non Tintinnides" (Oligotrichina). *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 53: 125-134.

RASSOULZADEGAN F., 1978 - Dimensions et taux d'ingestion des particules consommées par un Tintinnide: *Favella ehrembergii* (Clap. et Lachm.) Jörg., Cilié pélagique marin. *Ann. Inst. océanogr. Paris*, 54 (1): 17-24.

RASSOULZADEGAN F., 1982 a - Dependence of grazing rate, gross growth efficiency and food size range on temperature in a pelagic Oligotrichous *Lohmaniella spiralis* Leeg., feed on naturally occurring particulate matter. *Ann. Inst. océanogr. Paris*, 58 (2): 177-184.

RASSOULZADEGAN F., 1982 b - Feeding in marine planktonic Protozoa. *Ann. Inst. océanogr. Paris*, 58 (S): 191-206.

RASSOULZADEGAN F., ETIENNE M., 1981 - Grazing rate of the Tintinnid *Stenosemella ventricosa* (Clap. and Lachm.) Jörg. on the spectrum of the naturally occurring particulate matter from a Mediterranean neritic area. *Limnol. Oceanogr.*, 26 (2): 258-270.

RAVERA O., 1986 - Gli indicatori ambientali: il punto di vista dell'ecologo. *Gli indicatori ambientali: valori, metri e strumenti nello studio dell'impatto ambientale* (a cura di

Schmidt di Friedberg P.), Atti del convegno di Milano, Maggio 1984. Franco Angeleri (ed): 43-53.

REID P.C., 1982 - Patterns of spatial and temporal variability of marine planktonic Protozoa. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 170-190.

REID P.C., 1987 - Mass encystment of a planktonic Oligotrich Ciliata. *Marine Biology*, 95: 221-230.

REID P.C., BOALCH G.T., 1987 - A new method for identification of dinoflagellate cysts. *J. Plankton Res.*, 9 (1): 249-253.

REVELANTE N., 1981 - Preliminary investigation of the importance of Oligotrich Ciliates other than Tintinnids in the Northern Adriatic Sea. *Rapp. Comm. int Mer Medit.*, 27 (7): 145-146.

REVELANTE N., 1981 - Preliminary investigation of the importance of Oligotrich Ciliates other than Tintinnids in the Northern Adriatic Sea. *Rapp. Comm. int Mer Medit.*, 27 (7): 145-146.

REVELANTE N., GILMARTIN M., 1983 - Microzooplankton distribution in the Northern Adriatic Sea with emphasis on the relative abundance of Ciliated Protozoans. *Oceanol. Acta*, 6 (4): 407-415.

REVELANTE N., GILMARTIN M., 1987 - Seasonal cycle of the Ciliated Protozoan and micrometazoan biomass in a Gulf of Maine estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 25: 581-598.

REVELANTE N., GILMARTIN M., 1990 - Vertical water column resource partitioning by a Ciliated Protozoa population under stratified conditions in the Northern Adriatic. *J. Plankton Res.*, 12 (1): 89-107.

REVELANTE N., GILMARTIN M., SMODLAKA N., 1985 - The effects of Po River induced eutrophication on the distribution and community structure of Ciliated Protozoa and micrometazoan populations in the Northern Adriatic sea. *J. Plankton Res.*, 7 (4): 461-471.

RODHE W., VOLLENWEIDER R. A., NAUWERCK A., 1958 - The primary production and standing crop of phytoplankton. *Prospectives in Marine Biology*. Buzzati-Traverso A. (Ed.), Univ. Calif. Press, Los Angeles, 299-322.

ROGERSON A., FINLAY B. J., BERNINGER U.G., 1989 - Sequestered chloroplasts in the freshwater Ciliate *Strombidium viridae* (Ciliophora Oligotrichida). *Trans. Am. microsc. Soc.*, 108: 117-126

ROPER M., MARSHALL K.C., 1978 - Biological control agents of sewage bacteria in marine habitats. *Aust. J. mar Freshwat. Res.*, 29: 335-344.

SANDERS R.W., 1987 - Tintinnids and other microzooplankton - seasonal distributions and relationships to resources and hydrography in a Maine estuary. *J. Plankton Res.*, 9 (1): 65-77.

SCHÄFER H., HETTLER H., FRITSCH U., PITZEN G., RADERER G., WENZEL A., 1994 - Biotests using unicellular Algae and Ciliates for predicting log-term effects of toxicans. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 27: 64-81.

SCHULTZ T.W., ARNOLD L.M., WILKE T.S., MOULTON M.P., 1990 - Relationships of quantitative structure-activity for normal aliphatic alcohols. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 19: 243-253.

SCOTT J.M., 1985 - The feeding rates and efficiencies of a marine Ciliate, *Strombidium* sp., Grown under chemostat steady-state condition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 90: 81-95.

SCOTTO di CARLO B., TOMAS C.R., IANORA A., MARINO D., MAZZOCCHI M.G., MODIGH M., MONTRESOR M., PETRILLO L., RIBERA d'ALCALA' M., SAGGIOMO V., ZINGONE A., 1985 - Uno studio integrato dell'ecosistema pelagico costiero del Golfo di Napoli. *Nova Thalassia*, 7 (suppl.3): 99-128.

SEIGLIE G.A., 1971 - A preliminary study on the relationship between foraminifers and pollution in two Puerto-Rico bays. *Caribbean Sci.*, 11: 93.

SEKKAT N., LE D.A., JOUANY J.M., GUERBET M., 1992 - Study of the interactions between copper, cadmium, and ferbam using the Protozoa *Colpidium campylum* bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 24: 294-300.

SHERR B., SHERR E., 1983 - Enumeration of heterotrophic microprotozoa by epifluorescence microscopy. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 16: 1-7.

SHERR E.B., SHERR B.F., FALLON R.D., NEWELL S.Y., 1986 - Small aloricate ciliates as major component of the marine heterotrophic nanoplankton. *Limnol. Oceanol.*, 31 (1): 177-183.

SIEBURTH J.McN., 1982 - Status and perspectives of marine pelagic protozoology: a synthesis of the workshop at Villefranche-Sur-Mer, France, 1981. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 243-248.

SIERACKI M.E., RIECHENBACH S.E., WEBB K.L., 1989 - Evaluation of automated threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 799-810.

SIERACKI M.E., WEBB K.L., 1991 - Applications of image analyzed fluorescence microscopy for quantifying and characterizing planktonic Protist communities. *Protozoa and their role in marine processes*. Reid, P.C., Turey, C.M., Burkill, P.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin: 77-100.

SIME-NGANDO T., HARTMANN H.J., GROLIERE C.A., 1990 - Rapid quantification of planktonic Ciliates: comparison of improved live counting with other methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (7): 2234-2242.

SKOGSTAD A., GRANSKOG L., KLAVENESS D., 1987 - Growth of freshwater Ciliates offered planktonic Algae as food. *J. Plankton Res.*, 9 (3): 503-512.

SLÀDECEK V., 1961 - Classification of waste waters from the biological point of view. *Vodni hospodarstvi*, 12: 197-199.

SLÀDECEK V., 1973 - System of water quality from the biological point of view. *Arch. Hydrobio. Berth.*, 7: 1-218.

SMRELKOV A.A., 1955 - Tintinninea. *Atlas bespozvono chnich dal 'nevostochnich morei S.S.S.R.* Pavlovskii E.N.(ed.): 39-44.

SOLDO A.T., GODY G.A., LARIN F., 1978 - Purine-excretory nature of retractile bodies in the marine Ciliate *Parauremonema acutum*. *J. Protozool.*, 25: 416-418.

SOLDO A.T., MERLIN E.J., 1977. The nutrition of *Parauremonema acutum*. *J. Protozool.*, 24: 556-562.

SOROKIN Yu.I., 1977 - The heterotrophic phase of plankton succession in the Japan Sea. *Mar. Biol.*, 41: 107-117.

SOROKIN Yu.I., 1981 - Microheterotrophic organisms in marine ecosystems. *Analysis of marine ecosystem*. Longhurst A.R. (ed). Academic Press, N.Y.: 293-342.

SPARLA M.P., GUGLIELMO L., 1992 - Distribuzione del microzooplankton nello Stretto di Messina (estate 1990). *Atti 10° Congresso A.I.O.L. 1992*: 307-325.

SPERO H.J., 1988 - Ultrastructural examination of chamber morphogenesis and biomineralization in the planktonic Foraminifer *Orbulina universa*. *Mar. Biol.*, 99: 9-20.

STIRN J., 1981 - Manual of methods in aquatic environment research. Part 8. *Ecological assessment of pollution effects*. FAO Fish. Tech. Paper, 209: 1-70.

STOECKER D.K., DAVIS L.H., PROVAN A., 1983 - Growth of *Favella* sp. (Ciliata: Tintinnina) and other microzooplankters in cages incubated in situ and comparison to growth in vitro. *Mar. Biol.*, 75: 293-302.

STOECKER D.K., McDOWELL CAPUZZO J., 1990 - Predation on Protozoa: its importance to zooplankton. *J. Plankton Res.*, 12 (3): 891-980.

STOECKER D.K., SILVER M.W., 1987 - Chloroplast retention by marine planktonic Ciliates. *Endocytobiology* III. Ann. N.Y. Acad. Sci., 503: 562-565.

STOECKER D.K., SILVER M.W., 1990 - Replacement and aging of chloroplasts in *Strombidium capitatum* (Ciliophora: Oligotrichida). *Mar. Biol.*, 107: 491-502.

STOECKER D.K., SILVER M.W., MICHAELS A.E., DAVIS L.H., 1988 - Obligate mixotrophic in *Laboea strobila*, a Ciliate which retains chloroplasts. *Mar. Biol.*, 99: 415-423.

STOECKER D.K., SILVER M.W., MICHAELS A.E., DAVIS L.H., 1988/1989 - Enslavement of Algal chloroplasts by four *Strombidium* spp. (Ciliophora Oligotrichida). *Mar. Microbiol. Ed. Webs*, 3: 79-100

STOECKER D.K., TONIGUCHI A., MICHAELS A.E., 1989 - Aboundance of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic planktonic Ciliates in shelf and slope waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 50: 241-254.

STOUT J.D., 1980 - The role of Protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Adv. Micro. Ecol.*, 4: 1-50.

TAYLOR F.J.R., 1982 - Symbiosis in marine microplankton. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 61-90.

TAYLOR G.T., 1982 - The role of pelagic heterotrophic Protozoa in nutrient cycling: a review. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, 58 (S): 227-241.

TRAVERS A., TRAVERS M., 1963 - Contribution a l'etude du microplancton du canal de Corse. *Rap. Proc. Veb. CIESM*, 17 (2): 478-493.

TRAVERS A., TRAVERS M., 1971 - Catalogues des Tintinnides (Cilies Oligotriches) récoltés dans le Golfe de Marseille de 1962 a 1964. *Tethys*, 2(3): 639-646.

TRAVERS A., TRAVERS M., 1975 - Catalogue du Microplancton du Guolfe de Marseille. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 60 (2): 251-276.

TRAVERS M., 1972 a - Le microplancton du Golfe de Marseille: matériel et methods générales d'etude. *Tethys*, 4(2): 313-338.

TRAVERS M., 1972 b - Le microplancton du Golfe de Marseille: methods d'etude microscopique des organismes. *Tethys*, 4: 535-558

TRAVERS M., 1973. Le microplancton du Golfe de Marseille: variations de la composition systematique et de la densité des populations. *Tethys*, 5: 31-53.

TRAVERS M., 1975 - Inventarie des Protistes du Golfe de Marseille et de ses parages. *Ann. Inst. océanogr.*, 51 (1): 51-75.

TRAVERS M., 1978 - Résultats de la mission Hydratlante I du N.O. Jean Charcot (au large des côtes atlantiques Françaises). I. Dénombrement des population microplanctoniques. *Int. Revue ges. Hydribiol.*, 63 (5): 663-684.

TRÉGOUBOFF G., ROSE M., 1957 - *Manuel de planctonologie méditerranéenne*. C.N.R.S. Paris, I: 587 pp.; II: 207 pl.

TURNER J.T., TESTER P.A., 1992 - Zooplankton feeding ecology: bacteriovory by metazoan microzooplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 160: 149-167.

UNESCO, 1968 - Zooplankton sampling. *Monographs on oceanographic methodology*. Tranter D.J. & Fraser J.H. (eds), 296 pp.

UTERMÖHL H., 1958 - Zur Vervollkommnung der qualitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. int. Verein. *Theor. angew. Limnol.* 1-38.

VERITY P.G., 1987 - Abundance, community composition, size distribution, and production rates of Tintinnids in Narragansett Bay, Rhode Island. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 24: 671-690.

VERITY P.G., 1991 - Measurement and simulation of prey uptake by marine planktonic Ciliates fed plastidic and aplastodic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 36 (4): 729-750.

VEZINA A. F., PLATT T., 1988 - Food web dynamics in the ocean. Best-estimates of flow networks using inverse method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 42: 269-287.

VILES C.L., SIERACKI M.E., 1992 - Measurement of marine picoplankton cell size by using a cooled, charge-coupled device camera with image-analyzed fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (2): 584-592.

VILLALTE F., 1991 - Annual cycle of zooplankton community in the Abra Harbur (Bay of Biscary): abundance, composition and sizespectra. *J. Plankton Res.*, 13 (4): 691-706.

VITIELLO P., 1964 - Contribution à l'étude des Tintinnides de la baie d'Alger. *Pelagos*, 2: 5-18.

WATSON S.W., NOVITSKY T.J., QUINBY H.L., VALOIS F.W., 1977 - Determination of bacterial numbers and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 940-946.

YENTSCH C.M., HORAN P.K., MURHEAD K., DORTCH Q., HAUGEN E., LEGENDRE L., MURPHY L.S., PERRY M.J., PHINNEY D.A., POMPONI S.A., SPINRAD R.W., WOOD M., YENTSCH C.S., ZAHURANEC B.J., 1983 - Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 1275-1280.

ALLEGATO

FIGURE E TABELLE

Tabella 7.1.1-1

LISTA FAUNISTICA

ARCIPELAGO TOSCANO

NOVEMBRE 86, MARZO 87, APRILE, LUGLIO, NOVEMBRE 88, FEBBRAIO 89

TINTINNIDA

*	<i>Acanthostomella conicoides</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Acanthostomella lata</i> Kofoid & Campbell
@ *	<i>Acanthostomella minutissima</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Acanthostomella norvegica</i> (Daday) Jorgensen
@ *	<i>Acanthostomella obtusa</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Acanthostomella</i> spp. Jorgensen
*	<i>Amphorella amphora</i> (Clap. & Lach.) Kofoid & Campbell
	<i>Amphorella laackmanni</i> Jorgensen
*	<i>Amphorella quadrilineata</i> (Clap. & Lach.) Jorgensen
*	<i>Amphorella quadrilineata minor</i> Jorgensen
*	<i>Amphorella</i> spp. Daday
@	<i>Amphorellopsis acantharus</i> Kofoid & Campbell
	<i>Amphorellopsis tetragona</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
*	<i>Amphorellopsis</i> spp. Kofoid & Campbell
	<i>Amplectella tricollaria</i> (Laack.) Balech
*	<i>Canthariella brevis</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Canthariella pyramidata</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
*	<i>Canthariella</i> spp. Kofoid & Campbell
@	<i>Climacocylis digitula</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Climacocylis elongata</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Climacocylis scalaria</i> (Brandt) Jorgensen
*	<i>Climacocylis scalaroides</i> Kofoid & Campbell
	<i>Climacocylis</i> spp. Jorgensen
@	<i>Codonaria australis</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Codonaria cistellula</i> (Fol) Kofoid & Campbell
*	<i>Codonella acuta</i> Kofoid & Campbell
	<i>Codonella amphorella</i> Bieder
	<i>Codonella apicata</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Codonella aspera</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Codonella brevicollis</i> (Daday) Brandt
*	<i>Codonella galea</i> Haeckel
@	<i>Codonella pacifica</i> Kofoid & Campbell
	<i>Codonella perforata</i> Entz Sr.
*	<i>Codonella</i> spp. Haeckel
*	<i>Codonellopsis monacensis</i> (Rampi) Balech
@	<i>Codonellopsis morchella</i> (Cleve) Jorgensen

*	<i>Codonellopsis orthoceras</i> (Haeck.) Jorgensen
*	<i>Codonellopsis pusilla</i> (Cleve) Kofoid & Campbell
*	<i>Codonellopsis schabi</i> (Brandt) Kofoid & Campbell
@	<i>Codonellopsis tuberculata</i> (Daday) Jorgensen
*	<i>Codonellopsis</i> spp. Jorgensen
	<i>Coxliella laciniosa</i> (Brandt) Brandt
	<i>Coxliella</i> spp. Brandt
*	<i>Craterella armilla</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Craterella oxyura</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
@	<i>Craterella protuberans</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Craterella torulata</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
	<i>Craterella urceolata</i> (Ostenfeld) Kofoid & Campbell
*	<i>Craterella</i> spp. Kofoid & Campbell
*	<i>Cyttarocylis cassis</i> (Haeck.) Fol
*	<i>Cyttarocylis eucecryphalus</i> (Haeck.) Fol
*	<i>Cyttarocylis magna</i> (Brandt) Kofoid & Campbell
@	<i>Cyttarocylis mucronata</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Cyttarocylis</i> spp. Fol
*	<i>Dadayiella ganymedes</i> (Entz Sr.) Kofoid & Campbell
	<i>Dadayiella pachytecus</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
*	<i>Dictyocysta elegans</i> Ehrenberg
*	<i>Dictyocysta elegans lepida</i> (Ehr.) Balech
*	<i>Dictyocysta elegans speciosa</i> Jorgensen
*	<i>Dictyocysta entzi</i> Jorgensen
	<i>Dictyocysta lepida</i> Ehrenberg
*	<i>Dictyocysta mitra</i> Haeckel
	<i>Dyctyocysta mulleri</i> (Imhof) Jorgensen
	<i>Dyctyocysta obtusa</i> Jorgensen
	<i>Dyctyocysta extensa</i> Kofoid & Campbell
@	<i>Dyctyocysta tiara</i> Haeckel
*	<i>Dictyocysta</i> spp. Ehrenberg
*	<i>Epicancella</i> spp. Kofoid & Campbell
*	<i>Epiplocylis acuminata</i> (Daday) Jorgensen
@	<i>Epiplocylis constricta</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Epiplocylis</i> spp. Jorgensen
*	<i>Eutintinnus apertus</i> Kofoid & Campbell
	<i>Eutintinnus birictus</i> Kofoid & Campbell
	<i>Eutintinnus elegans</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
	<i>Eutintinnus elongatus</i> Jorgensen
*	<i>Eutintinnus fraknoi</i> (Daday) Kofoid & Campbell
*	<i>Eutintinnus lusus undae</i> (Entz Sr.) Kofoid & Campbell
	<i>Eutintinnus medius</i> Kofoid & Campbell
	<i>Eutintinnus perminutus</i> Kofoid & Campbell
@	<i>Eutintinnus pinguis</i> Kofoid & Campbell
	<i>Eutintinnus stramentus</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Eutintinnus tubulosus</i> (Ostenfeld) Kofoid & Campbell
*	<i>Eutintinnus</i> spp. Kofoid & Campbell
	<i>Favella campanula</i> (Schmidt) Kofoid & Campbell
*	<i>Favella ehrembergi</i> (Clap. & Lachm.) Jorgensen

*	<i>Favella serrata</i> (Mob.) Jorgensen
*	<i>Favella</i> spp. Jorgensen
*	<i>Helicostomella edentata</i> Faur?-Fremiet
@	<i>Helicostomella longa</i> (Brandt) Kofoid & Campbell
*	<i>Helicostomella subulata</i> (Ehrm.) Jorgensen
*	<i>Helicostomella</i> spp. Jorgensen
	<i>Metacylis jorgenseni</i> (Cleve) Kofoid & Campbell
	<i>Metacylis</i> spp. Jorgensen
@	<i>Ormosella apsteini</i> Kofoid & Campbell
@ *	<i>Ormosella bresslaui</i> Kofoid & Campbell .
	<i>Ormosella haeckeli</i> Kofoid & Campbell
	<i>Ormosella trachelium</i> (Jorg.) Kofoid &
*	<i>Ormosella</i> spp. Kofoid & Campbell
*	<i>Parundella aculeata</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
*	<i>Parundella aculeata longa</i> Jorgensen
*	<i>Parundella lohmanni</i> (Jorg.) Kofoid#& Campbell
	<i>Parundella messiniensis</i> (Brandt) Jorgensen
*	<i>Parundella</i> spp. Jorgensen
*	<i>Petalotricha ampulla</i> (Fol) Kent
*	<i>Petalotricha</i> spp. Kent
@	<i>Ptychocylis obtusa</i> Brandt
	<i>Ptychocylis</i> spp. Brandt
*	<i>Protorhabdonella curta</i> (Cleve) Jorgensen
@	<i>Rhabdonella chiliensis</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Rhabdonella conica</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Rhabdonella cuspidata</i> (Zacherias) Brandt
@	<i>Rhabdonella exilis</i> Kofoid & Campbell
	<i>Rhabdonella inflata</i> Kofoid & Campbell
@	<i>Rhabdonella lohmanni</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Rhabdonella spiralis</i> (Fol) Brandt
*	<i>Rhabdonella</i> spp. Brandt
	<i>Salpingacantha ampla</i> Kofoid & Campbell
@ *	<i>Salpingacantha crenulata</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingacantha unguiculata</i> (Brandt) Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingacantha</i> spp. Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella acuminata</i> (Clap. & Lachm.) Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella curta</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella decurtata</i> Kofoid & Campbell
@ *	<i>Salpingella faurei</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella glockentogeri</i> (Brandt) Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella gracilis</i> Kofoid & Campbell
@	<i>Salpingella laackmanni</i> Kofoid & Campbell
@ *	<i>Salpingella minutissima</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella rotundata</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella subconica</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Salpingella</i> spp. Jorgensen
	<i>Steenstrupiella gracilis</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
*	<i>Steenstrupiella steenstrupii</i> (Clap. & Lachm.) Kofoid & Campbel
*	<i>Steenstrupiella</i> spp. Kofoid & Campbell

*	<i>Stenosemella nivalis</i> (Maunier) Kofoid & Campbell
*	<i>Stenosemella ventricosa</i> (Clap. & Lachm.) Kofoid & Campbell
	<i>Stenosemella</i> spp. Jorgensen
@	<i>Tintinnidium incertum</i> Brandt
	<i>Tintinnidium mucicula</i> (Clap. & Lach.) Daday
	<i>Tintinnidium</i> spp. Kent
*	<i>Tintinnopsis acuminata</i> Daday
	<i>Tintinnopsis angulata</i> Daday
@	<i>Tintinnopsis aperta</i> Brandt
@	<i>Tintinnopsis amphora</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Tintinnopsis beroidea</i> Stein
*	<i>Tintinnopsis butschlii</i> Daday
*	<i>Tintinnopsis campanula</i> (Ehr.) Daday
*	<i>Tintinnopsis cincta</i> (Clap. & Lachm.) Kofoid & Campbell
*	<i>Tintinnopsis compressa</i> (Daday) Laackmann
*	<i>Tintinnopsis cyathus</i> Daday
	<i>Tintinnopsis cylindrica</i> Daday
	<i>Tintinnopsis fennica</i> Kofoid & Campbell
	<i>Tintinnopsis gracilis</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Tintinnopsis karajacensis</i> Brandt
*	<i>Tintinnopsis levigata</i> Kofoid & Campbell
	<i>Tintinnopsis lindeni</i> Daday
*	<i>Tintinnopsis lobiancoi</i> Daday
@	<i>Tintinnopsis loricata</i> Brandt
	<i>Tintinnopsis minuta</i> Wailes
*	<i>Tintinnopsis nana</i> Lohmann
	<i>Tintinnopsis nucula</i> (Fol) Brandt
*	<i>Tintinnopsis parvula</i> Jorgensen
*	<i>Tintinnopsis plagiostoma</i> Daday
	<i>Tintinnopsis radix</i> (Imhof) Brandt
*	<i>Tintinnopsis rotundata</i> Jorgensen
	<i>Tintinnopsis tregouboffii</i> Balech
@	<i>Tintinnopsis tubulosa</i> Lavander
*	<i>Tintinnopsis</i> spp. Stein
*	<i>Undella angustior</i> (Jorg.) Kofoid & Campbell
*	<i>Undella claparedei</i> (Entz Sr.) Daday -
*	<i>Undella clevei</i> Jorgensen
@	<i>Undella hemispherica</i> Laackmann
*	<i>Undella hyalina</i> Daday
	<i>Undella minuta</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Undella ostenfeldi</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Undella perpusilla</i> (Kof. & Cam.) Balech
	<i>Undella subcaudata subcaudata</i> Jorgensen
@	<i>Undella turgida</i> Kofoid & Campbell
*	<i>Undella</i> spp. Daday
*	<i>Undellopsis marsupialis</i> (Brant) Kofoid & Campbell
*	<i>Undellopsis</i> spp. Kofoid & Campbell
*	<i>Xystonella lohmanni</i> Brandt
	<i>Xystonella lonaicauda</i> Brand

*	<i>Xystonella treforti</i> (Daday) Laackmann
*	<i>Xystonella</i> spp. Brandt
	<i>Xystonellopsis brandti</i> (Laack.) Jorgensen
	<i>Xystonellopsis scyphium</i> Jorgensen
*	<i>Xystonellopsis spicata</i> (Brandt) Jorgensen
	<i>Xystonellopsis</i> spp. Jorgensen

* Le specie contrassegnate dall'asterisco sono state campionate anche nel periodo invernale (febbraio 1989)

@ Le specie contrassegnate dalla chiocciolina non sono state ancora segnalate in Mediterraneo secondo i seguenti autori:

Abboud-Abi Saab, 1989; Balech, 1959, 1975; Benovic, 1981; Brandt/ 1906; Cabrini, Milani, Fonda Umani, Honsell, 1989; capriulo, 1982; Davis, 1977; Gold e Morales, 1876a e b; #Hedin, 1974; Jorgevsen, 1924; Kofiod e Campbell, 1929, 1939; -Krsinic, 1977, 1979a e b, 1980, 1982, 1987a e b, 1988; Krsinic e Vilcic, 1989; Laval-Peuto, 1986; Milani, Cabrini, Fonda Umani e Honsell, 1987-88, Lynn, Montagnes, Small, 1988; Orsi, 1936; Paranjape, 1978; Paulmier, 1986; Posta, 1963; Rampi, 1948, 1950; Rampi e Zattera, 1983; Revelante e Gilmartin, 1983, 1990; Taniguchi, 1983; Teodoro, 1922a e b; Travers e Travers, 1963, 1971, 1973, 1975; Tregouboff e Rose, 1957; Vitiello, 1964.

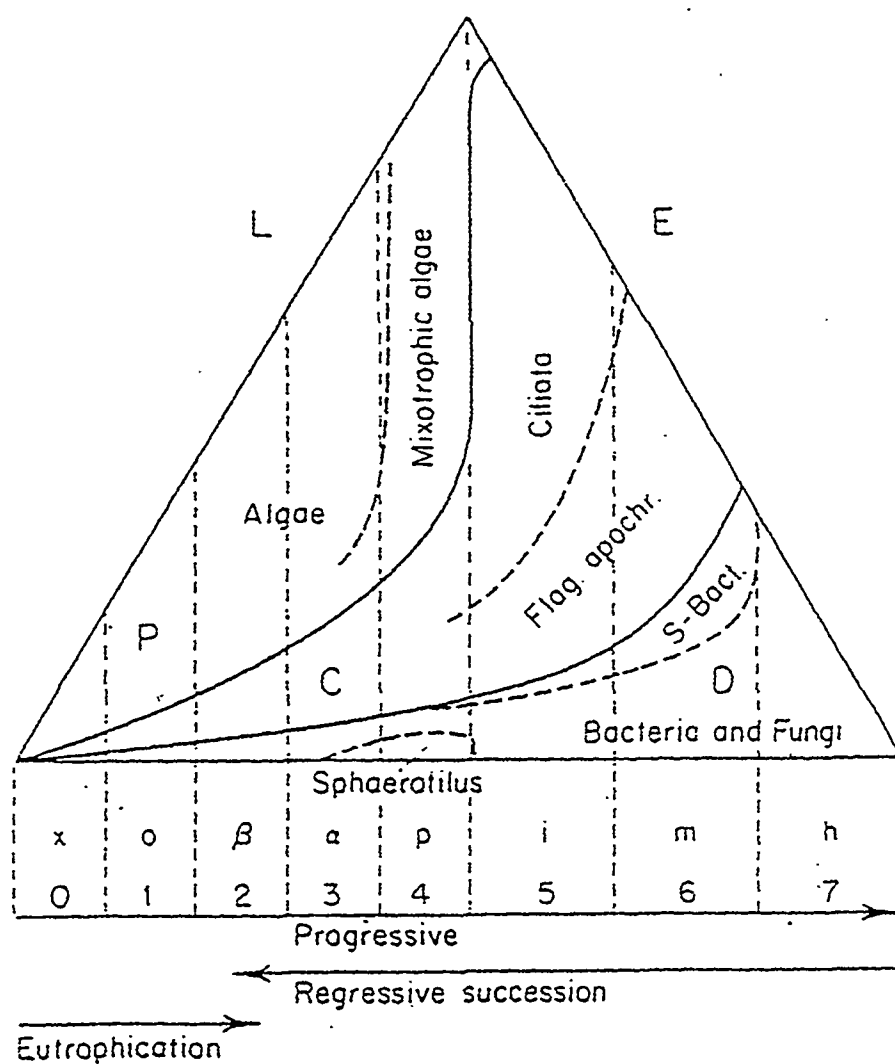


Fig. 6.1 -1 – Il triangolo saprobiologico: i livelli saprobiotici sono indicati da abbreviazioni e dal valore dell'indice saprobiotico.

P = Produttori, C = Consumatori, D = Decompositori. La linea verticale più lunga mostra il confine tra le condizioni aerobica ed anaerobica. (da SLÁDECEK, 1973)

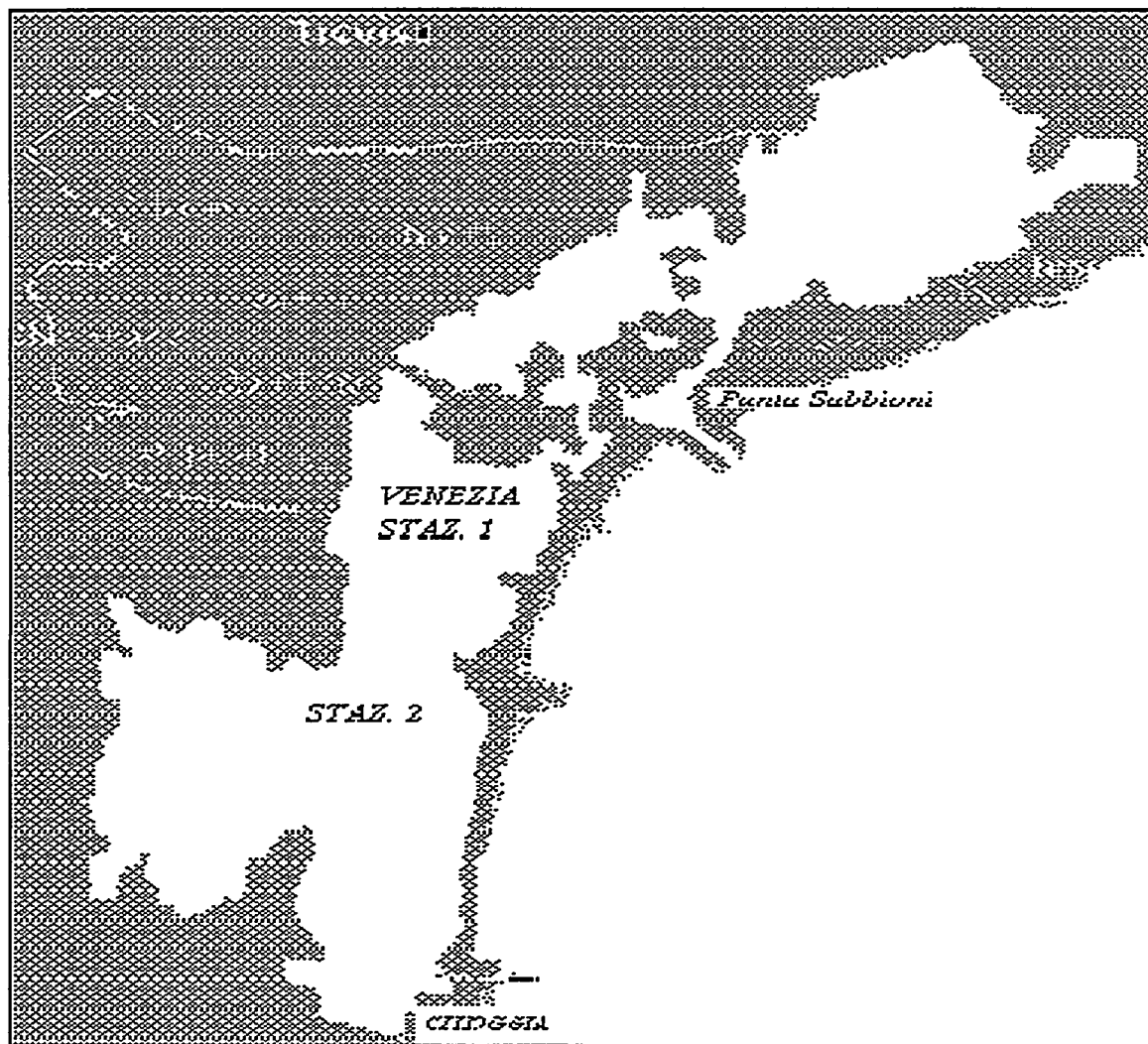


Fig.7.4-1: Laguna di Venezia e le due stazioni di prelievo dei campioni

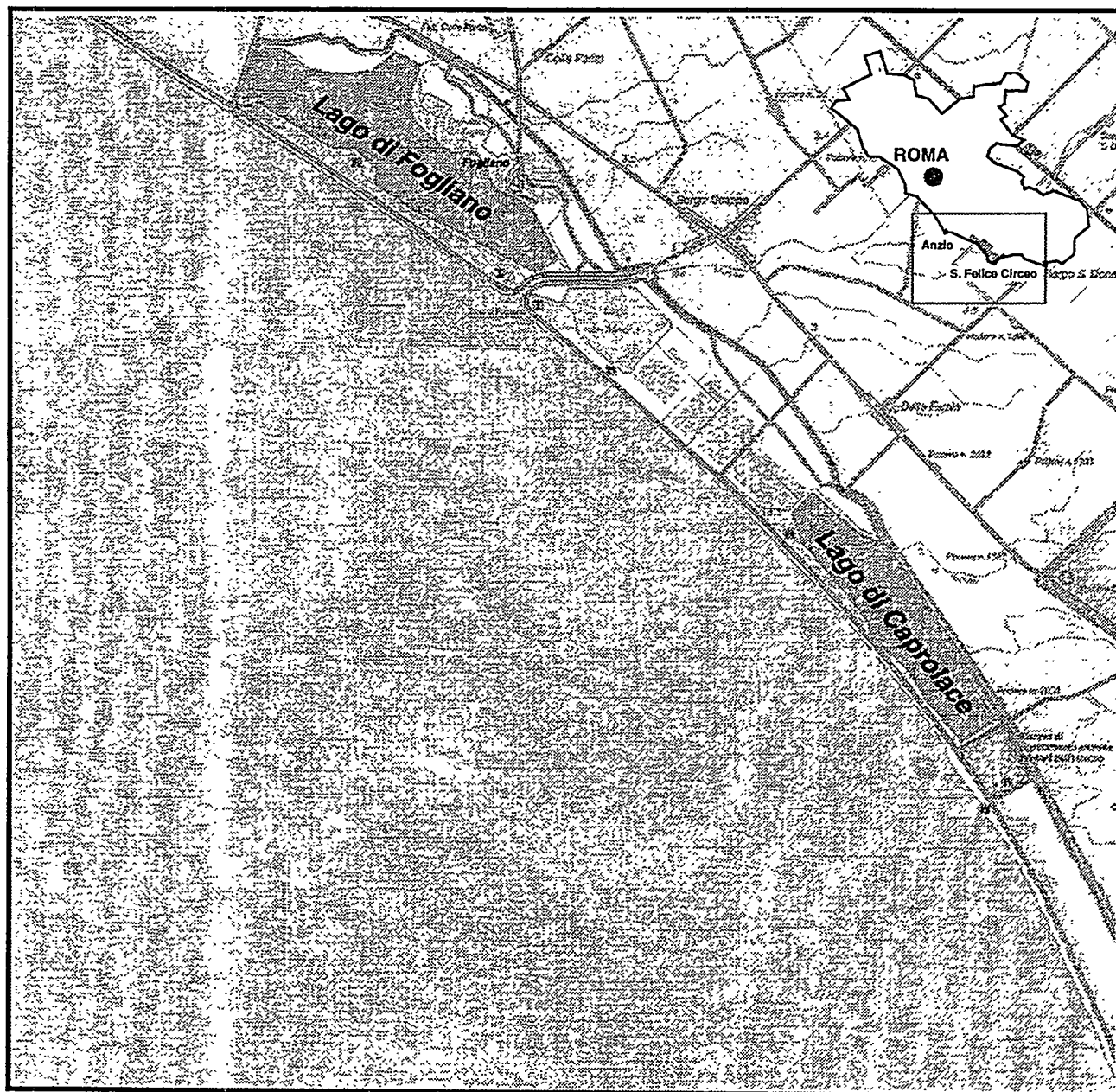


Fig.7.4-2: Localizzazione geografica delle Lagune Pontine.