

Metodi per lo Studio dello Zooplankton



Iole Di Capua

Maria Grazia Mazzocchi

INDICE

<u>1. CAMPIONAMENTO</u>	2
<u>2. COMPOSIZIONE TASSONOMICA ED ABBONDANZA</u>	3
<u>2.1 Fissazione del campione</u>	3
<u>2.2 Preparazione del campione</u>	5
<u>2.3 Conteggio</u>	6
<u>2.4 Calcolo dell'abbondanza</u>	8
<u>2.5 Analisi tassonomica</u>	9
<u>2.6 Controllo di qualità</u>	9
<u>2.7 Analisi del campione allo ZOOSCAN</u>	10
<u>3. BIOMASSA</u>	12
<u>3.1 Biomassa come peso secco</u>	12
<u>3.2 Biomassa come contenuto in carbonio</u>	
..... <u>3.2.1 Trattamento del campione</u>	14
<u>3.2.2 Analisi al CHN</u>	14
<u>4. BIBLIOGRAFIA</u>	15

Foto in copertina di Iole Di Capua

1. CAMPIONAMENTO

Alla stazione **LTER-MC** il meso-zooplankton viene raccolto con una rete da plancton di tipo Nansen, che ha la bocca di 1 m^2 di area (diametro 113 cm) ed un'apertura di maglia di $200 \mu\text{m}$ (Fig. 1). Viene effettuata una pescata verticale da -50 m di profondità alla superficie; la rete, zavorrata con un peso di 5 kg, viene recuperata ad una velocità di $0,7-1,0 \text{ m s}^{-1}$. Il volume di acqua filtrata dalla rete ($V = AxL, \text{ m}^3$) viene calcolato tenendo conto dell'area della bocca ($A, \text{ m}^2$) e della lunghezza del cavo rilasciato ($L, \text{ m}$). Per rispettare la profondità dello strato campionato (50 m), l'attenzione è rivolta a mantenere l'angolo fra il cavo e la superficie del mare inferiore a 10° e questo viene ottenuto con piccole manovre dell'imbarcazione. Al termine della pescata, la rete va risciacquata accuratamente per recuperare il materiale rimasto adeso alle sue pareti, con ripetuti getti d'acqua di mare dall'esterno della rete, facendo scivolare l'acqua dalla bocca verso il contenitore di raccolta. Il campione viene concentrato nel collettore posto al termine della rete, costituito da un bicchiere di 1 L in plexiglas dotato di una finestra chiusa con un retino della stessa maglia della rete (Fig. 2). Da lì il campione viene travasato in un barattolo di plastica e viene subito aggiunto il fissativo (Fig. 2).

La scelta di usare a LTER-MC una rete di tipo Nansen, che è più grande della rete WP-2 ($0,25 \text{ m}^2$) più comunemente utilizzata, è stata dettata dalla necessità di confrontare i dati della serie temporale con i dati di meso-zooplankton raccolti dalla Stazione Zoologica Anton Dohrn sin dagli anni '60 nel Golfo di Napoli e in altre regioni del Mediterraneo.

Per la serie LTER-MC vengono raccolti due campioni di meso-zooplankton: uno per l'analisi della composizione e la stima dell'abbondanza delle specie ed uno per la stima della biomassa.



Figura 1 - Rete da zooplancton di tipo NANSEN.



Figura 2 - Collettore applicato al fondo della rete barattolo per la raccolta del campione di zooplancton.

Tabella 1 - Fattori che influenzano il campionamento

<i>Fasi</i>	<i>Metodologia</i>	<i>Fattori Critici (QA)</i>	<i>Azioni prioritarie (QA)</i>
Campionamento	Rete Nansen (diametro 113 cm, maglia 200 µm) Pescata verticale nello strato 0-50 m	Deriva dell'imbarcazione Velocità di risalita della rete	Zavorrare la rete Mantenere la velocità di risalita a 0,7-1 m/sec Calcolare l'angolo del cavo del verricello. Risciacquare bene la rete per la raccolta di tutto il materiale. Calcolare l'efficienza di filtrazione della rete.

2. COMPOSIZIONE TASSONOMICA e ABBONDANZA

2.1 Fissazione del campione

Il conservante generalmente utilizzato per fissare lo zooplancton è la formalina (formaldeide in soluzione acquosa al 37-38%) tamponata con tetraborato di sodio. Il campione raccolto per l'identificazione tassonomica delle specie e la stima della loro abbondanza viene fissato a bordo immediatamente dopo la raccolta. Al campione in acqua di mare viene aggiunta formalina in modo da ottenere una soluzione al 4%. Per la conservazione a lungo termine degli organismi con guscio calcareo (es. molluschi pteropodi), è molto importante che il pH della soluzione sia mantenuto a circa 8-8,2. E' necessario un controllo frequente del pH della formalina tamponata con tetraborato di sodio per conservare bene il campione. La misura del pH del campione deve essere effettuata durante i primi giorni dopo la conservazione iniziale e dopo alcune settimane, per un periodo da 3 a 6 mesi.

Tabella 2 - Fattori che influenzano la fissazione del campione.

<i>Fasi</i>	<i>Metodologia</i>	<i>Fattori Critici (QA)</i>	<i>Azioni prioritarie (QA)</i>
Conservazione dei campioni	Campione per il conteggio fissato con formalina (formaldeide in soluzione acquosa al 37-38%) e conservato in una soluzione di acqua di mare e formalina al 4%	Buona conservazione degli animali	Tamponare la formalina con tetraborato di sodio. Controllare il pH della formalina tamponata usata. Controllare la percentuale di formalina nel campione. Controllare il pH del campione.

2.2 Preparazione del campione

Il campione fissato a bordo mediante aggiunta di formalina (Fig. 3 A), in laboratorio viene analizzato allo stereoscopio per effettuare l'analisi quali-quantitativa della comunità mesozooplanctonica.

Prima di procedere all'analisi, la soluzione di acqua di mare con formalina viene rimossa per evitare di respirarne i vapori tossici. Sotto cappa, il campione (Fig. 3 A) viene concentrato in un bicchiere il cui fondo è costituito da un retino con maglia di 200 μm (o più piccola) (Fig. 3 B). Il campione viene risospeso in una coppa graduata (Fig. 3 C) con acqua del rubinetto (filtrata se sono presenti particelle in sospensione) oppure acqua di mare filtrata (su filtri GF/F) e portato ad un volume noto (100 o 200 ml, secondo la ricchezza del campione). Il campione viene quindi rimescolato accuratamente per rendere omogenea la distribuzione degli animali nel volume d'acqua.

Mediante una siringa graduata (adeguatamente tarata) con bocca grande (Fig. 3 E) vengono effettuate rapidamente due rotazioni a destra e due a sinistra, seguite da una croce al cui centro viene prelevata un'aliquota del campione (5 ml) lungo tutta la profondità della coppa. Con la stessa siringa vengono prelevati, in successione, sub-campioni di 5 ml ognuno che vengono analizzati separatamente (generalmente 2-4 subcampioni). Questo tipo di sub-campionamento, simile all'utilizzo della "Pipetta di Hensen-Stempel", produce un coefficiente di variazione del 7-9%, inferiore rispetto ad altri tipi di sub-campionamento (tipo Folsom, 6-

18%). Inoltre, questo tipo di trattamento risulta più efficiente di altri sub-campionamenti quali, ad esempio, il metodo di frazionamento Huntsman (Van Guelpen et al., 1982) che è stato da noi utilizzato nei primi anni della serie. Il sub-campione di 5 ml viene collocato in una camera di conteggio Mini-Bogorov (da 10 ml) (Fig. 3 D), che contiene anche ulteriori 5 ml di acqua utilizzata per il risciacquo della pipetta. Al termine del conteggio, il campione viene nuovamente concentrato e risospeso nella soluzione originale di acqua di mare e formalina in un barattolo di plastica da 100 ml etichettato esternamente con il numero sequenziale del campionamento e la data, per essere archiviato (Fig. 3 F).

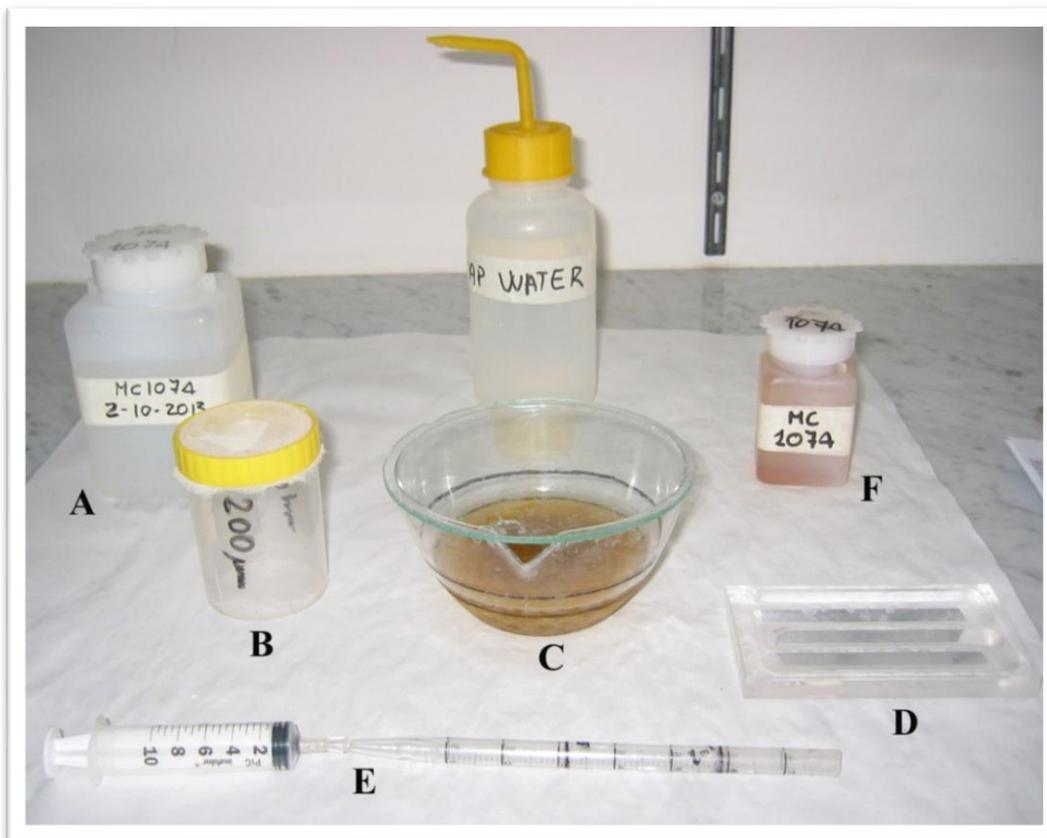


Figura 3 - Materiale da laboratorio utilizzato per il conteggio del meso-zooplankton.

2.3 *Conteggio*

Prima di procedere all'analisi del sub-campione e al conteggio degli individui, gli organismi che restano sospesi sulla superficie vengono delicatamente spinti sul fondo della

camera con una pinzetta. Il campione viene analizzato allo stereomicroscopio utilizzando vari ingrandimenti, generalmente il 4X con un obiettivo Leica PLANAPO 10X (Fig. 4 A). Le categorie tassonomiche ed il numero di individui contati per ciascuna di esse sono riportati in una scheda di conteggio cartacea (Fig. 4 C). Per le specie più abbondanti si utilizzano dei contatori meccanici da laboratorio (Fig. 4 B).



Figura 4 - Stereomicroscopio, contatori meccanici e scheda di conteggio cartaceo.

Come riportato da Postel et al. (2000), se tutti gli organismi sono distribuiti a caso, seguendo la distribuzione di Poisson, la precisione di un singolo conteggio dipende solo dal numero di esemplari contati (Cassier, 1971). I dati riportati nella Tabella 3 indicano il livello di precisione

che può essere raggiunto in termini percentuali in relazione al numero di individui contati. Si può notare come un raddoppio di precisione richieda un impegno quattro volte superiore nel numero di individui da contare. Ad esempio, per una precisione di $\pm 20\%$ basta il conteggio di 100 individui, mentre per raggiungere una precisione di $\pm 10\%$ è necessario contarne oltre 400 (Lund et al., 1958). I limiti di confidenza del 95% (CL95) possono essere calcolati dal numero di individui contati (n) con la seguente formula:

$$CL95 [\%] = \pm 2 (100 / \sqrt{n})$$

In pratica, uno o più sub-campioni (di uguale volume e presumibilmente uguale concentrazione di individui) dovrebbero essere analizzati fino a contare un minimo di 100 esemplari per ciascuno dei gruppi tassonomici più abbondanti. La stima dei rimanenti gruppi meno comuni e numerosi è meno precisa (Tabella 3).

Nel conteggio di ciascun campione vengono solitamente contate due aliquote da 5 ml ciascuna. Viene sempre contato un numero complessivo pari ad un minimo di circa 800 individui, il che garantisce un'alta precisione per la stima delle abbondanze, con un CL_[95] che vari dal 5% al 7%. Inoltre, la parte restante del campione viene accuratamente esaminata per la ricerca delle specie rare, che non sono state trovate nella fase di conteggio.

Tabella 3-Precisione ottenuta al 95% di confidenza per differenti numeri di individui contati (da Postel et al., 2000 basato su Lund et al., 1958 e Lenz, 1968).

<i>Organismi contati</i>	<i>Precisione % rispetto al numero contato</i>	<i>Range</i>
4	± 100	0-8
11	± 60	4-18
16	± 50	8-24
25	± 40	15-35
44	± 30	31-57
64	± 25	48-80
100	± 20	80-120
178	± 15	151-205
400	± 10	360-440
1600	± 5	1520-1680

2.4 Calcolo dell'abbondanza

Per ciascuna categoria tassonomica si risale all'abbondanza, cioè al numero di individui nel volume unitario di riferimento (ind. m⁻³) con una semplice formula che tiene conto del numero di individui contati nel sub-campione (n), della frazione di campione esaminata (k) e del volume di acqua filtrata dalla rete durante il campionamento (V, m³):

$$\text{ind. m}^{-3} = (n \times k) / V$$

A ciascuna alle specie rare identificate nel resto del campione viene attribuito un valore di abbondanza corrispondente alla presenza di almeno 1 individuo nell'intero campione.

2.5 Analisi tassonomica

Il riconoscimento tassonomico viene effettuato a livello di specie per copepodi, cladoceri, chetognati, dolioli e sifonofori, e a livello di classe, ordine, o genere per gli altri gruppi zooplanctonici. Per i copepodi, gli adulti di tutte le specie vengono identificati per sesso; solo per i generi *Calocalanus*, *Oithona*, *Oncaea* e *Triconia* i maschi sono identificati a livello di genere. Gli stadi copepoditi fino a CV (CII e CIII sono gli stadi più giovani che, a seconda delle specie, vengono efficientemente campionati con una rete da 200 µm) sono identificati a livello di specie nella maggior parte dei casi, o raggruppati a livello di genere (es., *Calocalanus*, *Oithona*) o famiglia (es. Oncaeidae, Corycaeidae).

2.6 Controllo di Qualità

L'identificazione tassonomica ed il conteggio, oltre ad una grande esperienza da parte dell'operatore, necessitano di esercizi di inter-calibrazione tra operatori.

In Tabella 4 sono riportate le varie fasi dell'analisi dei campioni di zooplancton ed i loro fattori critici, con le rispettive azioni prioritarie volte a migliorare la qualità del conteggio e a garantire la qualità dei dati prodotti.

Tabella 4 -Fattori che influenzano la preparazione ed il conteggio dei campioni.

<i>Fasi</i>	<i>Metodologia</i>	<i>Fattori Critici (QA)</i>	<i>Azioni prioritarie (QA)</i>
Preparazione e conteggio del campione fissato	Stereomicroscopi Concentrazione a volume noto (200 ml)	Fattore di ingrandimento almeno 4X Qualità dell'ottica Campo chiaro e scuro Ricchezza del campione Dimensione e tipologia degli organismi (es. animali gelatinosi)	Manutenzione degli stereomicroscopi e controllo della qualità ottica Calibrazione del materiale (coppette, pipette etc.)

	Sub-campionamento con pipetta graduata Conteggio di 2-3 sub-campioni (5 ml ognuno)	Omogenizzazione del campione prima del sub-campionamento	Standardizzazione delle procedure di sub-campionamento
	Identificazione delle specie	Ripetibilità Numero di organismi contati	Contare un numero minimo di individui con un limite di confidenza al 95%
		Esperienza tassonomica	Conteggio dello stesso campione da parte di altri operatori del laboratorio
		Utilizzo di nomenclatura tassonomica aggiornata	Formazione e aggiornamento degli operatori

2.7 Analisi dei campioni allo ZOOSCAN

I sub-campioni analizzati allo stereomicroscopio sono successivamente analizzati anche allo ZooScan (Fig. 3). Questo strumento di conteggio automatico, con il suo programma ZooProcess ed il software Plankton Identifier (PKID), costituisce un sistema per l'acquisizione e la classificazione delle immagini digitali prese dai campioni di zooplancton <http://www.obs-vlfr.fr/LOV/ZooPart/ZooScan> (Gorsky et al. , 2010). I campioni sono digitalizzati dallo ZooScan e trattati da ZooProcess e PKID al fine di individuare, contare, misurare e classificare gli organismi digitalizzati (Fig. 4). Lo strumento, dopo avere acquisito la scansione del campione, effettua misure automatiche delle dimensioni del corpo degli organismi (Fig. 5) e crea un archivio delle vignette dei diversi organismi (identificati secondo un training set preparato dall'operatore) e delle rispettive dimensioni (Gorsky et al., 2010). L'identificazione tassonomica viene effettuata dallo strumento secondo un training set di immagini di riferimento preparato dall'operatore, ma non raggiunge la precisione ed il dettaglio tassonomico osservabile allo stereomicroscopio. I campioni di LTER-MC sono analizzati allo ZooScan essenzialmente per integrare i dati di abbondanza e composizione tassonomica acquisiti con le analisi allo stereomicroscopio con le informazioni sugli spettri di taglia.

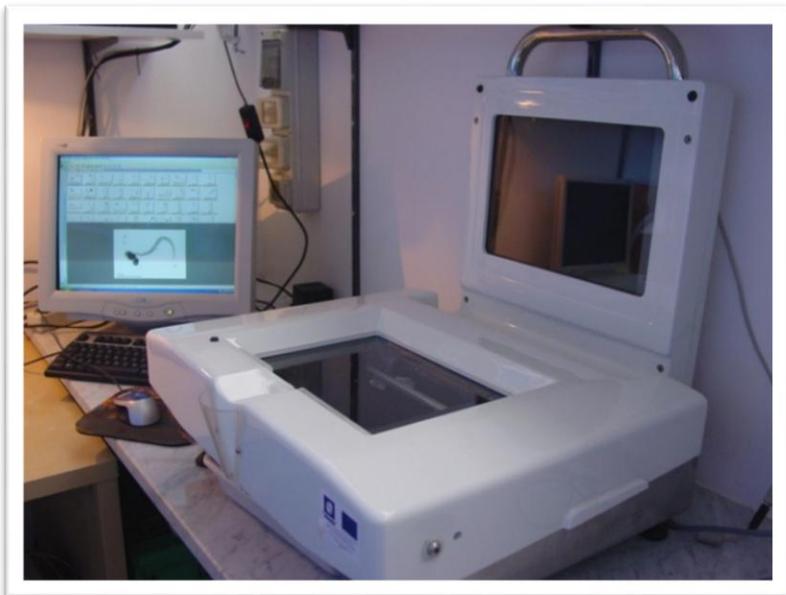


Figura 5 - Lo strumento ZooScan.



Figura 6- Vignetta ripresa allo ZooScan (es. larva di eufausiaceo).

3. BIOMASSA

3.1 Biomassa come peso secco

Il campione di meso-zooplankton , che non viene fissato a bordo, è mantenuto vivo e trasportato (in un contenitore al buio e al fresco) in laboratorio dove viene subito trattato per la misura della biomassa dell'intera comunità zooplanctonica.

La biomassa viene determinata dapprima come peso secco (dry mass), che rappresenta il contenuto di materia organica (incluse le ceneri) privata dell'acqua dei tessuti, e successivamente come contenuto in carbonio.

Innanzitutto, il campione di meso-zooplankton viene concentrato, per eliminare l'acqua di mare, su un pezzo di retino di maglia uguale o più piccola della rete di raccolta (200 μm), risciacquato rapidamente con acqua distillata (per eliminare i sali) e posto su carta da filtro per eliminare del tutto l'acqua interstiziale. Il campione viene poi raccolto su un foglio di alluminio prepesato e posto in un contenitore in stufa a 60 °C. Temperature più alte sono da evitare in quanto possono causare la perdita di alcuni componenti organici volatili, pari a più dell'8 % dei lipidi a 105 °C (Postel et al., 2000). Il campione viene pesato la prima volta dopo 24 ore ed ancora nel corso della settimana fino al raggiungimento di un peso costante.

Il peso finale, al netto della tara, viene espresso in mg m^{-3} .

Tabella 5 - Fattori che influenzano la misura della biomassa zooplanctonica.

<i>Fasi</i>	<i>Metodologia</i>	<i>Fattori Critici (QA)</i>	<i>Azioni prioritarie (QA)</i>
Preparazione del campione vivo	Peso secco: Tara del foglio di alluminio	Composizione del campione (es. presenza di fitoplancton e di grossi gelatinosi)	Riportare nelle note la presenza di gelatinosi e/o di condizioni particolari (bloom fitoplanctonici) Allontanare dal campione grossi gelatinosi
	Concentrazione del materiale	Presenza di materiale abiotico Campione igroscopico	Rimuovere plastica etc. Eliminazione di acqua interstiziale
	Rapido risciacquo con acqua distillata		Controllo regolare della temperatura del forno
	Asciugatura in forno a 60°C		Pulizia, taratura e manutenzione della bilancia
	Pesate alla bilancia elettronica analitica		Trasportare il campione dal forno alla bilancia dentro un essiccatore con silicagel Effettuare un numero di pesate sufficienti finchè il campione non avrà raggiunto un peso costante

3.2 Biomassa come contenuto in carbonio

Il carbonio è l'elemento utilizzato come proxy di biomassa organica e viene misurato nel meso-zooplancton a LTER-MC dal Maggio 2007. La zooplancton secco è composto per circa il 40% di carbonio, il contenuto di azoto ed idrogeno è intorno al 10%, mentre il fosforo organico rappresenta meno del 1%. Al di là di questi valori generali, la proporzione fra i tre elementi tende a variare nei diversi gruppi e nelle diverse comunità zooplanctoniche (Postel et al., 2000).

3.2.1. Trattamento del campione

Dopo aver misurato la biomassa zooplanctonica come peso secco, il campione essiccato viene trattato per l'analisi delle componenti elementari all'analizzatore CHN.

Dopo circa una settimana in stufa, il campione viene potterizzato e accuratamente omogenizzato con l'aiuto di azoto liquido, prima di essere posto in un nuovo foglio di alluminio in stufa per 24 ore. Per l'analisi se ne preleva una piccola quantità che va pesata e posta in una capsula di alluminio che viene poi inserita nel CHN.

3.2.2. Analisi al CHN

Le analisi sono effettuate con un analizzatore elementare CHN Flash EA112 della Thermo. Le capsule di stagno sono inserite in un autocampionatore a tamburo rotante, mediante il quale vengono introdotti in un reattore mantenuto alla temperatura di 1000°C. I gas prodotti della combustione sono separati mediante una colonna gascromatografica mantenuta alla temperatura di 60°C e, successivamente, rilevati attraverso un rivelatore di conducibilità termica (Thermal Conductivity Detectors - TCD). L'analizzatore fornisce la composizione percentuale di carbonio, idrogeno e azoto del campione di zooplancton. Per la quantificazione del carbonio e dell'azoto viene eseguita, prima di ogni sessione di analisi, una retta di taratura utilizzando come standard il cicloesanone 2-4 dinitrofenil idrazone (51,78% di C e il 20,14% di N).

4. BIBLIOGRAFIA

- Cassie M., Sampling and statistics. In a *Manual on the methods for assessment of secondary productivity in freshwater* (IBP Handbook) (1971), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh 358 pp
- Clarke A.J., Holmes L.J., Gore D.J., Proximate and elemental composition of gelatinous zooplankton from the Southern Ocean (1992) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155: 55-68.
- Gorsky G., Ohman M. D., Picheral M., Gasparini S., Stemmann L., Romagnan J-B., Cawood A., Pesant S., García-Comas C., and Prejger F. (2010) Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system, *J. Plankton Res.* 32 (3): 285-303.
- Harris R.P., Wiebe P.H., Lenz J., Skjoldal H.R., Huntely M. (2000) *Zooplankton Methodology Manual*, Academic Press, London.
- Hopkins T.L. (1982) The vertical distribution of zooplankton in the eastern Gulf of Mexico, *Deep Sea Res.* 29: 1069-1083.
- Larson R.J. (1986) Water content, organic content, and carbon and nitrogen composition of medusa from Northeast Pacific, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 99: 107-120.
- Lund J.W.G., Kipling C., LeCren E.D. (1958) The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimations by counting, *Hydrobiologia* 11: 143-169.
- Postel, L., Fock, H. and Hagen, W. (2000) *Biomass and abundance*, in Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Rune Skojdal, H. and Huntley, M. (eds), *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, Boston, pp. 83–192.
- Van Guelpen, L., Markle, D. F., Duggan, D. J. (1982) An evaluation of accuracy, precision, and speed of several zooplankton subsampling techniques, *Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 161: 45-47.