



METODI DI CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DELL' ITTIOPLANCTON



Stefania Russo, Carmelo Daniele Bennici

[stefania.russo@ismed.cnr.it](mailto:stefania.russo@ismed.cnr.it)

## Sommario

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>2 PIANO DI CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>6</b>
<b>3. CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>6</b>
3.1 BONGO 40 .....	7
3.2 BONGO 90 .....	9
3.3 WP2 .....	<b>ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.</b>
3.4 MULTI PLANKTON SAMPLER.....	10
3.5 CALVET .....	10
3.6 RETINI WM MANUALI.....	<b>ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.</b>
<b>PULIZIA E RACCOLTA DEL CAMPIONE</b> .....	<b>11</b>
<b>TIPI DI CONSERVAZIONE</b> .....	<b>11</b>
2.3 ANALISI DI LABORATORIO.....	11
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>12</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>12</b>

## Abstract

Lo studio delle popolazioni ittioplanctoniche è ormai riconosciuto su scala internazionale, quale indice di rilevanza fondamentale per l'analisi della biodiversità e per la qualità degli ecosistemi marini. Tale studio è fondamentale per comprendere le dinamiche delle popolazioni ittiche. La conoscenza della distribuzione e dell'abbondanza di uova e larve, ottenute attraverso campionamenti del plancton, può aiutare a migliorare la comprensione della distribuzione spaziale delle risorse alieutiche e dei processi che incidono sulle fluttuazioni degli stock, ponendo le basi per una migliore gestione di queste risorse. È dunque di fondamentale importanza riconoscere, classificare e analizzare in dettaglio l'ittioplancton, per identificare le aree di riproduzione delle specie ittiche al fine di tutelarle e preservarle. Numerose riserve naturali infatti fondano la loro esistenza proprio nelle zone di spawning o di nursery dove appunto le specie si riproducono e dove le larve e i giovanili trovano le condizioni ideali per accrescersi fino al momento della metamorfosi. Conoscere e preservare è quindi un processo fondamentale, specialmente in aree interessate da fenomeni come l'inquinamento o dove lo sforzo di pesca rischia di compromettere lo stato di salute delle comunità ittiche. Questo rapporto tecnico vuole offrire un contributo metodologico alla fase di raccolta e conservazione delle uova e larve dei pesci, che successivamente verranno identificate e adoperate per le diverse analisi a cui andranno incontro.

## 1. Introduzione

L' ittioplancton è composto dalla fauna ittica nelle sue prime fasi di vita, includendo sia uova che larve, ossia le fasi in assoluto più delicate e importanti per ogni organismo che le possiede.

La maggior parte delle specie dei pesci marini genera uova pelagiche, che si accumulano negli strati superficiali della colonna d'acqua e vengono trasportate dalle correnti. Queste daranno poi seguito a larve anch'esse pelagiche. Durante i primi giorni di vita, le larve non hanno capacità di opporsi al trasporto delle correnti, facendo dunque parte del plancton, anche se per un tempo limitato del loro ciclo vitale, che va da poche settimane ad alcuni mesi.

Questa fase termina con lo stadio giovanile, periodo in cui l'aspetto dell'organismo è più simile a ciò che sarà da adulto. La fase larvale è invece molto diversa a seconda dello stadio di sviluppo della larva e può cambiare drasticamente, rendendo spesso difficile il riconoscimento. Proprio per tale motivo le chiavi di riconoscimento sono sempre in continuo aggiornamento e il lavoro su questo tipo di matrice biologica è molto complesso e richiede tempi molto lunghi.

Specialisti tassonomi e illustratori scientifici, hanno da sempre applicato le loro competenze e sforzi nel cercare di descrivere al meglio quali siano le caratteristiche fondamentali nel riconoscere le specie allo stadio larvale e questo sforzo è fondamentale in quanto le specie ittiche a livello larvale non hanno livree o forme facilmente riconducibili agli adulti o per lo meno non in tutti i loro stadi di sviluppo. esistono poi specie particolarmente difficili da identificare, dette specie criptiche, che inducono i tassonomi spesso in errore in quanto cambiano drasticamente la loro morfologia durante il loro periodo di sviluppo e talvolta possono subire fenomeni di regressione pur avanzando verso la metamorfosi.

Per le uova purtroppo spesso questo sforzo non è stato seguito da buoni risultati, perché le uova sono quasi sempre simili tra loro e distinguerle è quasi impossibile, tranne per alcune specie con delle peculiarità specifiche e forme differenti.

Lo studio e l'analisi dell'ittioplancton, caratterizzandone specie e verificando dunque la struttura della popolazione ittioplanctonica, è uno strumento fondamentale nello studio di determinate regioni. Associando le specifiche condizioni oceanografiche, si possono fornire importanti informazioni sia sulle specie che si riproducono localmente, che su altre che depongono al di fuori dell'area di studio, infatti, numerose specie mesopelagiche e pelagiche che trascorrono gran parte del loro ciclo biologico in acque profonde o a largo, frequentemente scelgono per la riproduzione e per lo sviluppo delle uova e delle larve, determinate aree costiere che, grazie a particolari condizioni oceanografiche, costituiscono l'ambiente ideale alla conservazione e crescita dei prodotti della deposizione.

La conoscenza dell'ittioplancton è fondamentale perché, facendo parte della catena trofica pelagica, le larve di pesce sono un importante link tra i livelli trofici più bassi e il necton. Questa fase è anche importante perché influenza l'andamento del futuro stock ittico adulto. La sopravvivenza in queste fasi è molto bassa, e ogni piccola fluttuazione si ripercuote su quelli che saranno i futuri riproduttori.

Sempre più ricerche nel campo della pesca si concentrano sullo studio di queste prime fasi vitali, non solo per le molteplici informazioni che si possono ottenere, ma anche perché è un mezzo più economico per indagare su molte specie. Ad esempio, indagini sul tonno rosso, grande pelagico che raggiunge enormi dimensioni, sono più difficili da condurre sugli adulti, richiedono grandi finanziamenti per le campagne di pesca e sforzi notevoli per la cattura. Lo studio invece condotto sui loro stadi larvali, può dare risposte anticipate sullo stock futuro, sulle condizioni del presente e permette in modo più economico e meno impattante di dare risposte ai quesiti della scienza.

Lo scopo di questo report tecnico è di fornire una metodica affidabile per definire le fasi di campionamento, raccolta, conservazione e collezione dell'ittioplancton, utile a definire una buona programmazione del lavoro in laboratorio durante le fasi di riconoscimento e analisi e porre le basi per le successive analisi ecologiche, genetiche, molecolari, morfologiche e infine statistiche, necessarie nel campo della ricerca.

## 2 Piano di Campionamento

Il campionamento ittioplactonico segue per lo più le regole e i metodi di quello del mesozooplancton.

Il campionamento può essere focalizzato a campionare le uova o le larve ed anche ad identificare singole specie, o volto a caratterizzare l'intero popolamento.

Nel caso di studio di una specie in particolare, è necessario conoscere il periodo di picco riproduttivo per cercare di ottenere quanti più individui possibili ad ogni campionamento.

Nel caso dello studio di comunità ittioplanctonica è invece indicato selezionare con cura i periodi di campionamento, suggerendo cadenze stagionali, per poter così seguire il cambiamento della comunità lungo l'intero anno.

Vi sono molte metodiche e differiscono in base a ciò che si vuole andare a osservare (es. distribuzione verticale o se si vogliono stimare le biomasse degli adulti), qui ne riportiamo alcune tra le più comuni.

L'ubicazione delle stazioni di campionamento, deve essere legata all'oceanografia della zona da indagare. Infatti, la presenza di strutture permanenti o semi-permanenti come gyre e upwelling o specifiche masse d'acqua, possono modulare la disposizione delle stazioni, aumentandone o diminuendone la distanza a seconda dell'interesse nella zona da studiare.

Nella scelta delle stazioni da campionare, è fondamentale tenere conto dell'areale di riproduzione delle specie bersaglio dello studio, cercando di coprire anche le zone dove le larve e le uova possono concentrarsi a causa delle correnti. Per questo si predisporranno delle griglie di campionamento con uguale distanza tra loro.

Va anche considerato che l'ittioplancton non si distribuisce uniformemente sul piano orizzontale, è distribuito in paches. Queste sono dovute a fenomeni di aggregazione dati da correnti superficiali, fronti termo alini che fungono da barriera fisica invalicabile e in generale queste paches sono dovute anche alle scelte condotte dagli adulti riproduttori, che selezionano aree specifiche per effettuare spawning.

## 3. Campionamento

Per il campionamento, bisogna tenere conto che l'ittioplancton si trova principalmente negli strati superiori della colonna d'acqua (da 200 m di profondità alla superficie), dove è soggetto a dispersione spaziale, principalmente da parte delle correnti marine.

Esistono reti di due colorazioni, bianche o nere. La diversa colorazione permette di rendere le maglie meno visibili agli organismi obiettivo della cattura, a seconda che si campioni di giorno o di notte. In Fig XXX è ad esempio riportato un Bongo 90 con maglia nera, perfetto per la cattura di un maggior numero di larve nelle ore notturne.

Durante gli imbarchi viene compilato un logbook cartaceo in cui annotare tutti i dettagli delle operazioni effettuate, suddivise per strumento Fig. 1



Figura 1 - Campionatore Bongo 90

Bongo 40/90														
Campagna	Barca	Stazione	Ordine	Data	Ora Inizio	Ora Fine								
		Durata Campionamento		Bocca (1)			Bocca (2)							
Tempo	Minuti	Secondi	Maglia			Maglia								
Discesa rete			N° Flussom.			N° Flussom.								
Stabilizzazione			Iniziale			Iniziale								
Salita rete			Finale			Finale								
Totale			Differenza			Differenza								
			Coordinate		Profondità			Temp. Superficiale						
Latitudine		Longitudine		Fondo										
INIZ.		INIZ.		Profondimetro										
FIN.		FIN.												
		Metri	240	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20
Angolo cavo														
Cavo rilasciato (m)														

*Esempio di scheda di campionamento per singola stazione e attrezzo di campionamento*

### 3.1 BONGO 40

Il Bongo è composto da due cilindri chiamati “bocche” in acciaio inox, ciascuna di diametro 40 cm (Fig. 2), tenute insieme e parallele tra loro. In ognuna delle bocche è montato un retino a forma di cono lungo circa 2,5 m, con maglia da 200  $\mu$ . All'estremità di ogni retino è presente un cilindro in plexiglass chiamato “bicchiere” che serve da supporto per il montaggio di un piccolo spezzone di maglia sempre da 200  $\mu$ m nel quale si raccoglie il campione di plancton. Nella parte centrale di ogni bocca è montato un “flussimetro” in grado di misurare il volume d'acqua filtrato. Per far sì che lo strumento riesca a raggiungere la profondità desiderata viene montata una deriva idrodinamica in acciaio di 25 Kg chiamato depressore. Tra le due bocche viene fissato un profondimetro digitale (Fig. 2a), ad ogni cala viene poi segnata la profondità massima raggiunta.

Il Bongo viene trainato in orizzontale ad una velocità di 2 nodi e man mano fatto scendere in profondità con una velocità di 0,75 m/s; una volta arrivato alla profondità desiderata viene stabilizzato per 30 s, tempo sufficiente per permettere allo strumento di posizionarsi alla giusta profondità, dopodiché viene fatto risalire con una velocità di 0,33 m/s.

Le cale Bongo 40 pertanto, dalla combinazione della velocità orizzontale e verticale simultanea, risultano oblique e vengono effettuate da una profondità massima di -100 m, fino alla superficie.



Il cavo in acciaio che sostiene tutta la struttura deve mantenere sempre un angolo ideale con la superficie del mare di  $45^\circ$ . Rispettando tale angolo, che viene misurato ad ogni 20 m di cavo rilasciato e con l' utilizzo di un goniometro, è possibile calcolare con buona approssimazione la profondità a cui arriverà lo strumento.



*Figura 2 - Campionatore Bongo 40*



*Figura. 2a - Profondimetro*



### 3.2 BONGO 90

È un campionatore molto simile al Bongo 40, la differenza strutturale consiste nelle dimensioni delle bocche che in questo caso sono di 90 cm e per la larghezza della maglia rete che in questo caso è di 1700  $\mu\text{m}$ .

A differenza del Bongo 40, che viene fatto scendere fino in profondità, il Bongo 90 (Fig. 3), è caratterizzate da una densità più bassa, viene portato alla profondità del termoclino, fatto stabilizzare e poi fatto risalire. Le velocità di discesa e risalita sono uguali al Bongo 40. Il bicchiere per la raccolta del campione posto nella parte terminale di ogni rete presenta un retino incorporato da 800  $\mu\text{m}$  che serve a separare il campione dall'acqua. Anche in questo caso tra le due bocche viene fissato un profondimetro digitale, ad ogni cala viene poi segnata la profondità massima raggiunta.

In entrambe le tecniche di campionamento, la velocità dei campionatori permette a specie ittiche di adulti di poter scappare e fuori uscire dalle reti, l'ittioplancton ne rimane invece intrappolato.



Figura 3 - Campionatore Bongo 90.

### 3.3 Multi Plankton Sampler

Il campionatore MPS consente, a differenza di altri strumenti, di prelevare la frazione di zooplancton d'interesse con diverse modalità di campionamento: orizzontale, verticale e obliquo e, allo stesso tempo, permette di campionare a differenti quote di profondità.

Nel caso di studio della distribuzione verticale dell'ittioplancton, il Multi Plankton Sampler (MPS) è il più indicato. Questo strumento è composto da una "underwater unit" costituita da un campionatore elettromeccanico a 5 retini e da una "deck unit", alla quale la "under water unit" è connessa elettricamente. Quest'ultima serve per il controllo e il monitoraggio in remoto delle operazioni di cala. Tramite la "deck unit" è possibile comandare da remoto la chiusura/apertura di ogni singolo retino per far sì che esso campioni solo nello strato desiderato della colonna d'acqua. Le funzioni della "deck unit" sono accessibili anche da PC con l'utilizzo del software *Oceanlab* 3.5.3.0.

### 3.4 CALVET

La rete Calvet (Fig.4) ha una struttura molto simile al bongo 40, differisce anche in questo caso per diametro delle bocche, ovvero 25 cm. Viene utilizzata diversamente, con la nave ferma e calandola in verticale. La velocità di risalita è di 1mt/s e va da -100 m alla superficie. La maglia è di 150  $\mu\text{m}$ , dimensione questa indicata per raccogliere una vasta gamma di uova di diverse specie marine.



Figura 4 - Calvet

## PULIZIA E RACCOLTA DEL CAMPIONE

Alla fine delle operazioni di cala degli strumenti, il campione deve essere concentrato nel collettore finale, che spesso è un bicchiere. Questo viene fatto tramite una manichetta che getta acqua di mare, ripulendo tutta la lunghezza delle reti.

Una volta concentrato il campione sul fondo, questo viene trasferito in un secchio, una parte viene immediatamente separata per essere osservata al binocolare e verificare se è presente la specie target dello studio o in generale per dividere eventuali campioni che vanno identificati prima di essere congelati.

Il restante campione viene concentrato con una spruzzetta con acqua di mare e un retino di maglia uguale o più sottile di quella del bicchiere della rete. Viene poi prelevato e conservato in contenitori stagni con un mezzo di fissazione idoneo agli studi che dovranno fare seguito al campionamento. Su ogni contenitori verranno annotati, strumento, stazione e data. Questi saranno anche riportati sul tappo e a matita su un foglio di acetato che verrà lasciato all'interno del campione fissato.

## TIPI DI CONSERVAZIONE

La conservazione del campione cambia a seconda del tipo di analisi che si vogliono svolgere successivamente. I metodi più comuni sono, la formalina, l'etanolo e l'azoto liquido.

La formalina ha lo svantaggio di essere cancerogena, va dunque usata con cautela, sotto cappa e con le dovute protezioni. Si usa una soluzione di formalina tamponata al 5% e acqua di mare.

L'etanolo è un altro ottimo conservante, è facile nell'utilizzo perché non chiede particolari precauzioni nel maneggiarlo e può essere usato a vari gradi di concentrazione, ma preferibilmente dal 70% in su. Ha lo svantaggio di alterare leggermente le larve, tendendo a farle arricciare, permette però di svolgere analisi genetiche perché non va a intaccare il DNA. Infine l'azoto liquido, è un metodo che non permette di fare altri tipi di analisi tassonomiche, dunque il campione deve essere ben riconosciuto prima della conservazione. È utile in caso si analisi biochimiche.

### 2.3 Analisi di Laboratorio

I campioni prelevati durante il campionamento e conservati in alcool, vengono poi portati in laboratori siti a terra.

Ogni sito di campionamento avrà il suo codice identificativo riportato sulla bottiglia in cui è stato conservato il campione, sul tappo e su un foglio di carta acetata all'interno della bottiglia. In questo modo non si corre il rischio di perdere l'informazione per errore.

Per procedere alla fase di riconoscimento i campioni vanno prelevati e ri setacciati per concentrarli e poterli osservare al microscopio in una capsula Petri. Per fare ciò, i campioni vengono setacciati con delle maglie di dimensioni più piccole rispetto a quelle utilizzate per il campionamento in mare, lavati con acqua di mare e posti in vasetti sempre con acqua di mare. A questo punto possono essere posti

sulle capsule Petri per essere osservati allo stereoscopico. L'ingrandimento dipenderà dalla grandezza degli organismi presenti nel campione, ma va aumentato all'occorrenza per poter osservare strutture e pigmentazioni utili per discriminare le specie.

Se il campione è ricco di altro plancton o comunque presenta un numero elevato di larve e uova, si suggerisce di procedere diluendo il campione e osservandolo a sub-campioni. Spesso è utile utilizzare anche una griglia millimetrata sotto la capsula Petri per poter isolare ulteriormente il campione della capsula in sotto aree da osservare singolarmente.

Alcune specie sono poco abbondanti nei campioni di ittioplancton, dunque per gli studi di comunità come in questo caso, si consiglia di analizzare il campione per intero. In altri casi, dove si studiano delle specie molto presenti, basta anche il 50% del campione per avere un campione rappresentativo.

Durante la fase di osservazione, le larve e le uova che sono molto delicate, vanno spostate con puntali o pinzette a punta liscia, nel caso di isolamento in altra Petri di alcuni esemplari, si può usare una pipetta in vetro per prelevarli.

## Conclusioni

Questo rapporto tecnico riporta alcune delle metodiche più comunemente utilizzate nello studio delle comunità di ittioplancton, descrivendo in dettaglio quanto poi accade durante le fasi di laboratorio e di riconoscimento. C'è ancora molto da poter implementare in questo campo della scienza, non soltanto a livello tecnico, ma anche a livello di chiavi di identificazione e conoscenze sul mondo dell'ittioplancton. Molte specie ancora non sono state del tutto caratterizzate nella loro distribuzione e abbondanze e conoscere queste caratteristiche è fondamentale per proteggere non solo la singola specie, ma l'intero ecosistema a cui essa appartiene.

## Bibliografia

Rodriguez, J. M., Alemany, F., & Garcia, A. (2017). *A guide to the eggs and larvae of 100 common Western Mediterranean Sea bony fish species.*

Armeri G. M., Cuttitta A., Bennici C. D., Biondo G., Torri M., Quinci E. M., Patti C., Patti B., De Luca B., Di Maria A., Falco F., Maneiro I., Masullo T., Musco T., Mazzola S. *Rapporto tecnico sulla valutazione della biomassa ittioplanctonica mediante l'utilizzo del Multi Plankton Sampler (MPS).*

C. Pattia, A. Cuttittaa, M. Muscoa, A. Di Mariaa, B. De Lucaa, G. Gallia, P. Chircoa, A. Nicosiab, G. Giacalone a, I. Fontanaa, P. Calandrinoa, F. Placentia, L. Giaramitaa, M. Torria, E. M. Quincia, G. Biondoa, R. La Rosab, F. Piccolinb, F. Natalioc , G. Cangemi, V. Calandrino, V. Di Maria, E. Macaluso, M. V. Cani, S. Ala, E. Cusimano, S. Calò, G. Giannone, D. Sicurelli, B. Giraridd, A. Philippod, M. Talond, C. Loyend, M. Filoched, M. Dazzi-Plazziacd, B. Patti. *Rapporto tecnico sulle attività di campagna oceanografica "BANSIC 2013"*