

## Σύγκριση μεθόδων για την εκτίμηση της αφθονίας και βιομάζας του μεταζωοπλαγκτού

Γρηγοράτου, Μ.<sup>1</sup>, Φραγκούλης, Κ.<sup>2</sup>, Σιώκου, Ι.<sup>2</sup>, Ζούλιας, Θ.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, ΠΜΣ: Περιβαλλοντική Βιολογία, Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων, [mariaqrigoratu1@yahoo.gr](mailto:mariaqrigoratu1@yahoo.gr)

<sup>2</sup>Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, [cfrangoulis@hcmr.gr](mailto:cfrangoulis@hcmr.gr), [isiokou@hcmr.gr](mailto:isiokou@hcmr.gr), [tzoulias@hcmr.gr](mailto:tzoulias@hcmr.gr)

### Περίληψη

Στη παρούσα εργασία έγινε σύγκριση των τιμών αφθονίας και βιομάζας δειγμάτων μεταζωοπλαγκτού συλλεγμένων με δίχτυα πόρου γάζας 45, 200 και 500 μm και χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους (στερεοσκόπιο, ανάλυση εικόνας, ξηρό βάρος). Μεταξύ της μεθόδου ανάλυσης εικόνας και του στερεοσκοπίου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αφθονία των ζελατινοειδών οργανισμών. Η ανάλυση εικόνας επέτρεψε την εκτίμηση όλης της βιομάζας του μεταζωοπλαγκτού με συνδυασμό των μετρήσεων από τα τρία δίχτυα, και μόνο των μεταζώων, ενώ με τη μέθοδο του ξηρού βάρους εκτιμάται η βιομάζα και των μη μεταζώων με συνέπεια τη σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών των δειγμάτων που συλλέχθηκαν με δίχτυ πόρου γάζας 200 μm.

**Λέξεις κλειδιά:** κωπήποδα, ξηρό βάρος, ανάλυση εικόνας

### Methods' comparison in order to estimate the metazooplankton abundance and biomass.

Grigoratou, M.<sup>1</sup>, Frangoulis, C.<sup>2</sup>, Siokou, I.<sup>2</sup>, Zoulias, T.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>University of Crete, Department of Biology, MSc: Management of Terrestrial and Marine Resources, [mariaqrigoratu1@yahoo.gr](mailto:mariaqrigoratu1@yahoo.gr)

<sup>2</sup>Institute of Oceanography, Hellenic Center for Marine Science, [cfrangoulis@hcmr.gr](mailto:cfrangoulis@hcmr.gr), [isiokou@hcmr.gr](mailto:isiokou@hcmr.gr), [tzoulias@hcmr.gr](mailto:tzoulias@hcmr.gr)

### Abstract

The aim of present study is the comparison of different methods (stereoscopic, image analysis, dry weight) for the estimation of metazooplankton abundance and biomass from samples collected using nets with different mesh sizes (45, 200, 500μm). Between stereoscopic and image analysis there was a statistical significant difference in the abundance of gelatinous organisms. Image analysis allowed to estimate the total biomass of metazoans only, by combining the results of the three nets, while, biomass estimation by dry weight includes also non-metazoans, explain the significant difference between the values of samples collected from net with mesh size 200 μm.

**Keywords:** copepods, dry weight, image analysis

### 1. Εισαγωγή

Στο μεταζωοπλαγκτόν εντάσσονται οργανισμοί με φάσμα μεγέθους ≈50μm- 200cm (Sieburth et al., 1978). Συνεπώς, για την ποσοτική και ποιοτική μελέτη της πλειονότητας των οργανισμών του μεταζωοπλαγκτού είναι απαραίτητη η συλλογή με περισσότερα από ένα δίχτυα τα οποία έχουν διαφορετικό πόρο γάζας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση μεθόδων για την καλύτερη προσέγγιση της αφθονίας και της βιομάζας του συνόλου του μεταζωοπλαγκτού, καθώς και των επιμέρους ταξινομικών ομάδων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρία δίχτυα διαφορετικού πόρου γάζας (45, 200, 500 μm), για τη συλλογή δειγμάτων του μεταζωοπλαγκτού, προσέγγιση που εφαρμόζεται πρώτη φορά στην Ανατολική Μεσόγειο. Η εκτίμηση της αφθονίας και της βιομάζας έγινε μέσω συμβατικών μεθόδων (στερεοσκόπιο και ξηρό βάρος αντίστοιχα) και της ανάλυσης εικόνας, μέθοδος με την οποία προσεγγίζεται ταυτόχρονα η συνολική αφθονία και βιομάζα του

μεταζωοπλαγκτού. Τέλος, έγινε σύγκριση των μετρήσεων της αφθονίας και της βιομάζας που προκύπτουν από την μέθοδο ανάλυσης εικόνας με αυτές από το στερεοσκόπιο και το ξηρό βάρος αντίστοιχα. Η εργασία εντάχθηκε στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος Medex ([www.marinera-medex.eu](http://www.marinera-medex.eu)).

## 2. Υλικά και μέθοδοι

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν το Δεκέμβριο 2009, και τον Ιανουάριο, Μάρτιο, Απρίλιο, Μάιο 2011, ΒΑ της Λήμνου στους σταθμούς MD1, MD2, MD3. Τα δείγματα συλλέχθηκαν με κάθετη σύρση δίχτυων WP-2 (45  $\mu\text{m}$  και 200  $\mu\text{m}$ ) από τον πυθμένα (MD1, MD2) ή τα 50 μέτρα (MD3) ως την επιφάνεια και διαγώνια σύρση δίχτυου WP-3 (500  $\mu\text{m}$ ), από τα 50-60 μέτρα ως την επιφάνεια. Κάθε δείγμα χωρίστηκε αμέσως σε δύο υποδείγματα, εκ των οποίων το ένα τοποθετήθηκε στη κατάψυξη για την εκτίμηση της βιομάζας με την μέθοδο του ξηρού βάρους, και το άλλο συντηρήθηκε με διάλυμα 4% ουδετεροποιημένης φορμαλδεΐδης, για την εκτίμηση της αφθονίας (ατ.  $\text{m}^{-3}$ ) (μέσω στερεοσκοπίου και ανάλυσης εικόνας) και της βιομάζας (μέσω ανάλυσης εικόνας). Οι μονάδες ξηρού βάρους μετατράπηκαν σε μονάδες άνθρακα βάση την αναλογία άνθρακα προς ξηρό βάρος ίση με 0.4 (Gorsky et al., 1988). Στα δείγματα από το δίχτυ 45  $\mu\text{m}$  δεν έγινε η εκτίμηση της βιομάζας με ξηρό βάρος λόγω της υψηλής παρουσίας μη μεταζώων (αιωρούμενα σωματίδια, φυτοπλαγκτόν, πρωτόζωα).

Για την επεξεργασία των δειγμάτων με τη μέθοδο ανάλυσης εικόνας έγινε λήψη της εικόνας του δείγματος μέσω του σαρωτή Epson Perfection 4990 (2400 dpi για τα δίχτυα 200 και 500  $\mu\text{m}$ , 4800 dpi για το δίχτυ 45  $\mu\text{m}$ ). Οι εικόνες των δειγμάτων αναλύθηκαν με το λογισμικό Image Pro Plus το οποίο προσφέρει αυτόματα διάφορες μετρήσεις (π.χ. μήκος, πλάτος) για κάθε οργανισμό.

Η εκτίμηση της βιομάζας ( $\mu\text{gC m}^{-3}$ ) πραγματοποιήθηκε μέσω εξισώσεων μήκους- βάρους για τα Κωπήποδα, τα Χαϊτόγναθα, τους Κωπηλάτες, τις Σάλπες και τα Κλαδοκεραιωτά (Uye 1982; Alcaraz et al., 2003; Lombard et al., 2009). Για τους Ναύπλιους, τα Οστρακώδη, τα Αμφίποδα, τις προνύμφες Δεκαπόδων και Ευφασεωδών, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση των Κωπηπόδων. Στις υπόλοιπες ομάδες έγινε μόνο μέτρηση της αφθονίας και του μεγέθους τους.

Η σύγκριση μεταξύ του στερεοσκοπίου και της ανάλυσης εικόνας για τα αποτελέσματα της αφθονίας, έγινε σε 14 κοινά υποδείγματα από το δίχτυ 200  $\mu\text{m}$  και σε 8 από το δίχτυ 500  $\mu\text{m}$ . Ο στατιστικός έλεγχος για τις διαφορές στην αφθονία και τη βιομάζα μεταξύ των δύο μεθόδων (ανάλυση εικόνας προς στερεοσκόπιο και ανάλυση εικόνας προς ξηρό βάρος) έγινε μέσω paired t-test σε λογαριθμισμένες τιμές με το στατιστικό πακέτο SPSS. Στη παρούσα εργασία, βάση του μεγέθους των οργανισμών θεωρούμε ως μικρομεταζωοπλαγκτόν τους οργανισμούς που συλλέχθηκαν με το δίχτυ 45  $\mu\text{m}$ , ως «μεσοζωοπλαγκτόν» και «μακροζωοπλαγκτόν» τους οργανισμούς που συλλέχθηκαν με τα δίχτυα 200 και 500  $\mu\text{m}$  αντίστοιχα (Sieburth et al., 1978).

## 3. Αποτελέσματα/Συζήτηση

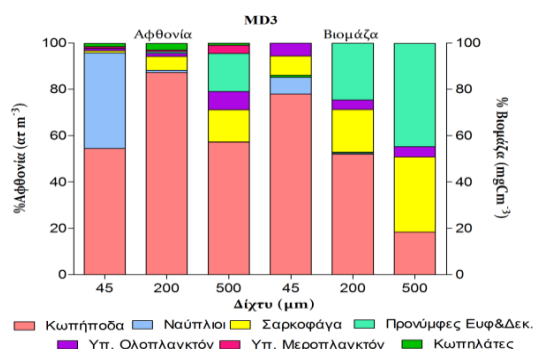
Σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα δείγματα διαφορετικών δίχτυων έγινε στον MD3 γιατί μόνο σε αυτό το σταθμό τα τρία δίχτυα συνέλεξαν δείγμα από το ίδιο βάθος (0-50 m). Το δίχτυ 200  $\mu\text{m}$  συνέλεξε τις περισσότερες ταξινομικές ομάδες, ενώ το δίχτυ 45  $\mu\text{m}$  τις λιγότερες. Το μικρομεταζωοπλαγκτόν είχε τη μεγαλύτερη αφθονία, ενώ αυτή του μεσοζωοπλαγκτού ήταν η μικρότερη (Πίνακας 1). Το μακροζωοπλαγκτόν είχε τη μεγαλύτερη βιομάζα (Πίνακας 1).

Τα Κωπήποδα κυριαρχούσαν στην αφθονία όλου του μεταζωοπλαγκτού και στη βιομάζα του μικρομεταζωοπλαγκτού και μεσοζωοπλαγκτού (Εικ. 1). Στο μακροζωοπλαγκτόν κυρίαρχες ομάδες στη βιομάζα ήταν οι προνύμφες Δεκαπόδων και Ευφασεωδών και τα σαρκοφάγα (Χαιτόγναθα, Μέδουσες, Σιφονοφόρα). Αντίστοιχα αποτελέσματα ως προς την συνολική αφθονία και την βιομάζα καθώς και των επιμέρους ταξινομικών ομάδων έχουν δείξει και άλλες μελέτες με χρήση δίχτυων αντίστοιχου πόρου γάζας (π.χ Andersen et al. 2001; Horcroft et al., 2005).

Από τη παρούσα εργασία φάνηκε πως η συλληπτική ικανότητα του κάθε δίχτυου καλύπτει ένα συγκεκριμένο εύρος μεγέθους του μεταζωοπλαγκτού (Εικ. 2). Βάση των αποτελεσμάτων, τα όρια του μήκους (φάσμα μεγέθους), που επιλέχθηκαν για το κάθε δίχτυ στη παρούσα εργασία, με σκοπό να γίνει η εκτίμηση της συνολικής αφθονίας και βιομάζας από την ένωση μετρήσεων των τριών δίχτυων, ήταν τα ακόλουθα: για το δίχτυ 45  $\mu\text{m}$  < 0.5 mm, για το δίχτυ 200  $\mu\text{m}$  από 0.7 ως 4.8 mm και για το δίχτυ 500  $\mu\text{m}$  > 6.3 mm (Εικ. 2).

**Πίνακας 1.** Αφθονία ( $\text{at m}^{-3}$ ) και βιομάζα ( $\text{mgC m}^{-3}$ ) του μεταζωοπλαγκτού στο σταθμό MD3 όπως εκτιμήθηκαν από την ανάλυση εικόνας.

Δίχτυ ( $\mu\text{m}$ )	Αφθονία ( $\text{at m}^{-3}$ )	Βιομάζα ( $\text{mgC m}^{-3}$ )
45	6570 $\pm$ 3183	1.67 $\pm$ 0.92
200	903 $\pm$ 499	3.05 $\pm$ 1.89
500	40 $\pm$ 31	1.86 $\pm$ 1.70
Συνδυασμός δίχτυων	6677 $\pm$ 3148	3.80 $\pm$ 2.75

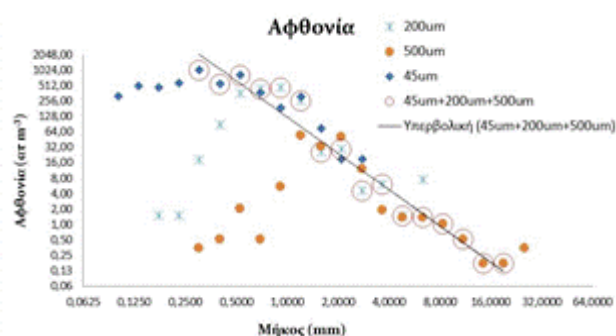


**Εικ. 1.** Σχετική αφθονία (%) και βιομάζα (%) των ομάδων του μεταζωοπλαγκτού στο σταθμό MD3, όπως εκτιμήθηκαν από την ανάλυση εικόνας.

Συγκρίνοντας την βιομάζα από τη μέθοδο του ξηρού βάρους και της ανάλυσης εικόνας, φαίνεται πως με το δίχτυ 200  $\mu\text{m}$  υπάρχει μεγαλύτερη τιμή από το ξηρό βάρος σε σχέση με αυτή της ανάλυσης εικόνας, διαφορά η οποία είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0.001$ ) (Εικ. 3α). Η παραπάνω διαφορετική εκτίμηση στη βιομάζα οφείλεται στο γεγονός πως η συλλογή μη μεταζών (π.χ φυτοπλαγκτόν, αιωρούμενων σωματιδίων) αυξάνεται όσο μειώνεται το άνοιγμα του πόρου γάζας στο δίχτυ, οδηγώντας σε υπερεκτίμηση της βιομάζας όταν αυτή εκτιμάται με τη μέθοδο ξηρού βάρους. Αντίθετα, με τη μέθοδο ανάλυσης εικόνας υπάρχει υποεκτίμηση εξαιτίας της έλλειψης στη βιβλιογραφία, εξισώσεων μήκους- βάρους για την εκτίμηση της βιομάζας για μερικές ομάδες του μεταζωοπλαγκτού, που δεν είναι όμως κυρίαρχες σε αφθονία. Η συλλογή λίγων μη μεταζών στο δίχτυ 500  $\mu\text{m}$  εξηγεί τη μικρή διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων (Εικ. 3α), η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p = 0.851$ ).

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα paired t-test ( $p$  value) για τη σύγκριση της αφθονίας από την ανάλυση εικόνας και από το στερεοσκόπιο σε κοινά δείγματα\* =σημαντική διαφορά.

Ομάδες	$p$ δίχτυ 200 $\mu\text{m}$	$p$ (δίχτυ 500 $\mu\text{m}$ )
Ολική αφθονία	0.081	0.018*
Μέδουσες	0.101	0.004*
Βυτιοειδή& Σάλπες	0.021*	0.041*
Σιφονοφόρα	0.001*	0.001*
Χαιτόγναθα	0.132	0.459
Κωπηλάτες	0.033*	0.060
Κωπήποδα	0.119	0.852

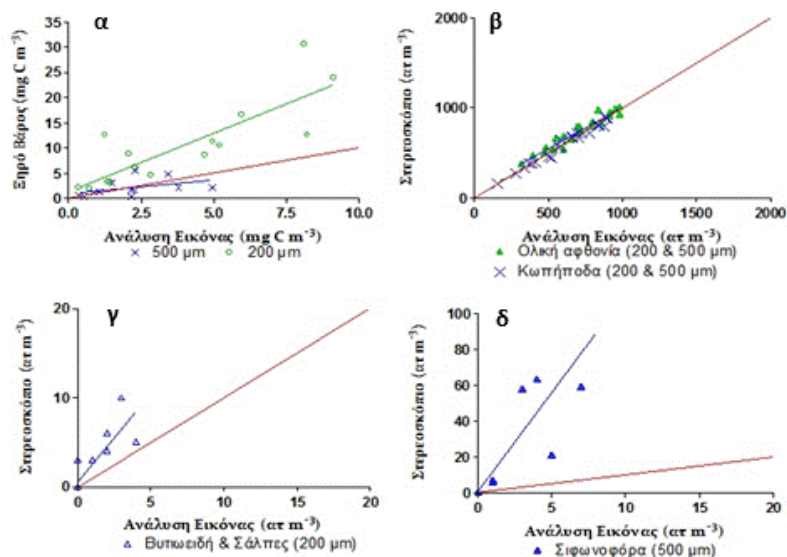


**Εικ. 2.** Διακύμανση της αφθονίας (όπως εκτιμήθηκε από την ανάλυση εικόνας) από τα τρία δίχτυα και της ολικής αφθονίας από την ένωση των δίχτυων ανά τάξη μεγέθους των οργανισμών.

Σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων υπήρξε στην εκτίμηση της αφθονίας των ζελατινοειδών οργανισμών (Βυτιοειδή, Σάλπες, Σιφονοφόρα, Μέδουσες) και στους Κωπηλάτες. (Πίνακας 2, Εικ. 3β-δ). Στην αξιολογή παρουσία τους οφείλεται και η σημαντική στατιστική διαφορά

στην ολική αφθονία από το δίκτυο 500  $\mu\text{m}$ . Η διαφορά αυτή οφείλεται στην ανάλυση (resolution) της εικόνας και την εμπειρία του χρήστη στη ταξινομική.

Συμπερασματικά, η μέθοδος ανάλυσης εικόνας μπορεί να παρέχει αξιόπιστες εκτιμήσεις για την αφθονία του μεταζωπλαγκτού. Μέσω της ανάλυσης εικόνας γίνονται αυτόματα μετρήσεις διαστάσεων για κάθε άτομο με αποτελέσματα να είναι εφικτή η εκτίμηση αφθονίας και της βιομάζας των ομάδων. Επίσης με την δημιουργία φάσματος μεγέθους μπορούν να συνδυαστούν οι αφθονίες και οι βιομάζες από δίκτυα με διαφορετικό πόρο γάζας, εκτιμώντας έτσι τη συνολική αφθονία και βιομάζα του μεταζωπλαγκτού (Εικ. 2). Μειονεκτήματα της ανάλυσης εικόνας είναι η μη ικανοποιητική απεικόνιση των ζελατινοειδών οργανισμών και η έλλειψη τρισδιάστατης εικόνας που δυσκολεύει την αναγνώριση σε επίπεδο είδους.



**Εικ. 3.** Σύγκριση (α) βιομάζας ( $\text{mgC m}^{-3}$ ) ξηρού βάρους και ανάλυση εικόνας (δίκτυα 200 & 500  $\mu\text{m}$ ), (β) ολικής αφθονίας ( $\text{at m}^{-3}$ ) και αφθονίας κωπηπόδων (δίκτυα 200 & 500  $\mu\text{m}$ ), (γ) βυτιοειδών & σάλπων (δίκτυο 200  $\mu\text{m}$ ), (δ) σιφονοφόρων (δίκτυο 500  $\mu\text{m}$ ) μεταξύ της μεθόδου ανάλυσης εικόνας και του στερεοσκοπίου σε κοινά δείγματα. Μπλέ και πράσινη γραμμή: γραμμική παλινδρόμηση των σχέσεων τιμών ξηρού από τις δύο μεθόδους. Κόκκινη γραμμή: γραμμική παλινδρόμηση θεωρητικών ίδιων τιμών από τις δύο μεθόδους.

#### 4. Βιβλιογραφία

- Alcaraz, M., Saiz, Z.E., Calbet, Z.A., Trepas, Z.I. and Broglio, Z.E. 2003. Estimating zooplankton biomass through image analysis. *Marine Biology*, 143, 307-315.
- Andersen, V., Nival, P., Caparrou, P. and Gubanov, A., 2001. Zooplankton community during the transition from spring bloom to oligotrophy in the open NW Mediterranean and effects of wind events. 1. Abundance and specific composition. *Journal of Plankton Research*, 23 (3), 227-242.
- Gorsky, G., Dallot, S., Sardou, J., Fenaux, R., Carre, C. et al. 1988. C and N composition of some northwestern Mediterranean zooplankton and micronekton species. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 124, 133-144.
- Hopcroft, R.R., Clarke, Z.C., Nelson, Z.R.J. and Raskoff, K.A. 2005. Zooplankton communities of the Arctic's Canada Basin: the contribution by smaller taxa. *Polar Biology*, 28, 198-206.
- Lombard, F., Renaud, F., Sainsbury, C., Sciandra, A. and Gorsky, A. 2009. Appendicularian ecophysiology I Food concentration dependent clearance rate, assimilation efficiency, growth and reproduction of *Oikopleura dioica*. *Journal of Marine Systems*, 78, 606-616.
- Sieburth, J., Smetacek, V. and Lenz, J. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, 23, 1256-1263.
- Uye, S. 1982. Length-Weight Relationships of Important Zooplankton from the Inland Sea of Japan. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 38, 149-158.