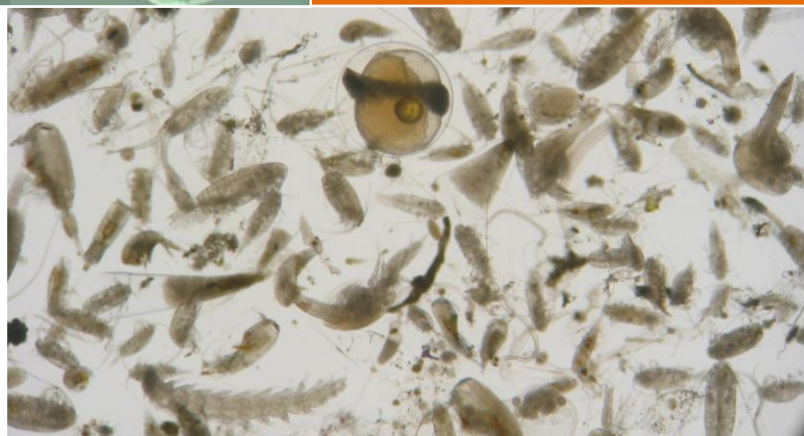
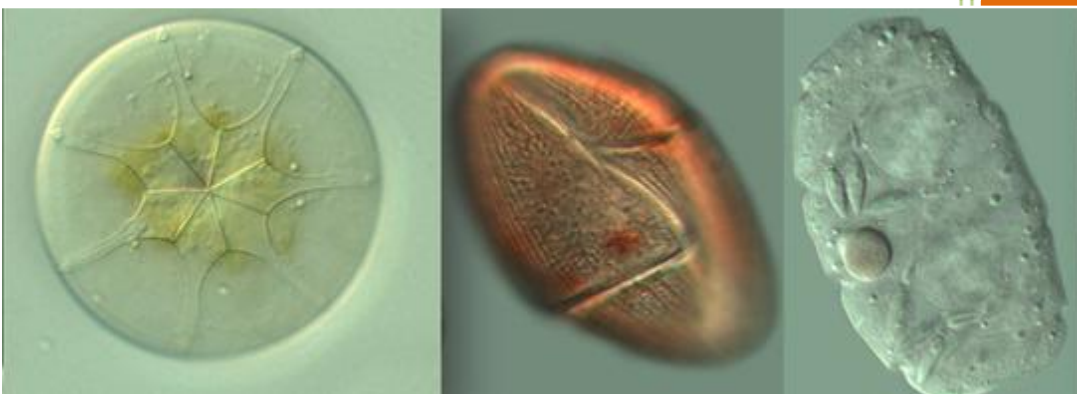


Procedure di controllo qualità del plancton



a cura di

Iole Di Capua, Maria Grazia Mazzocchi,
Isabella Percopo, Diana Sarno e
Adriana Zingone



Controllo di qualità del plancton (fitoplancton e mesozooplancton)

I dati di biodiversità planctonica vengono prodotti attraverso l'osservazione diretta e il conteggio del campione. Il controllo di qualità relativo ad eventuali errori di raccolta e trattamento del campione avviene già nella fase di osservazione del campione e produzione del dato, mentre gli errori, derivanti principalmente da limiti nelle conoscenze generali o degli operatori stessi, sono difficilmente identificabili 'a posteriori'. Ai dataset biologici sono inoltre difficilmente applicabili i metodi statistici che vengono abitualmente utilizzati per i dati oceanografici, anche per la mancanza di repliche. Inoltre, l'intervallo di variazione delle concentrazioni planctoniche è molto ampio e la definizione stessa di outlier, normalmente utilizzato per evidenziare valori che si discostano troppo dalla media, non è facilmente applicabile.

Quindi, piuttosto che controlli successivi della qualità del dataset, è opportuno seguire procedure controllate nel corso della produzione del dato. In fase di condivisione del dato, dovranno poi essere fornite contestualmente tutte le informazioni relative all'attendibilità dei conteggi e delle identificazioni, che permetteranno una fruizione corretta dei dati prodotti da parte di utenti diversi.

Vengono di seguito riportate delle linee guida, ispirate a indicazioni fornite da rapporti e pubblicazioni recenti sull'argomento (Hötzel G, Croome 1999, Ospar 2002). Tali linee guida rispecchiano i due aspetti di cui si compone la garanzia di qualità per le componenti fitoplanctonica e zooplanctonica: il controllo interno di qualità e la valutazione esterna della qualità.

Controllo interno di qualità

Documentazione dei metodi

È necessaria la stesura di protocolli relativi a tutte le fasi delle attività svolte, dalla raccolta alla conservazione, fino al trattamento dei campioni e all'analisi dei dati. Attualmente alcuni dei protocolli utilizzati per LTER-MC sono disponibili sul sito web (<http://szn.macisteweb.com/>).

I protocolli relativi alle metodologie impiegate per la stima delle abbondanze e della composizione del fitoplancton marino sono in corso di adeguamento allo Standard Europeo CSN EN (1520), mentre quelli relativi alle metodologie di studio dello zooplancton sono redatti in accordo con le procedure standard riportate nell'ICES Zooplankton Methodology Manual (Harris et al., 2000).

È in fase di elaborazione un manuale dei metodi dettagliato dove saranno riportate singolarmente le metodologie relative alle singole componenti studiate e riguardanti:

- campionamento
- trattamento ed analisi dei campioni
- Procedure utilizzate per assicurare la qualità del trattamento e delle analisi dei dati.

Di seguito sono riportate due tabelle, rispettivamente per il fitoplancton (Tab. 2) e per lo zooplancton (Tab. 3) nelle quali viene sintetizzata la documentazione dei metodi attualmente impiegati, dei fattori critici e degli interventi prioritari atti a garantire un controllo di qualità, che saranno maggiormente approfonditi nel manuale.

Tabella 2. Sintesi dei fattori critici nei singoli step metodologici, e delle azioni volte ad assicurare la qualità dei dati di fitoplancton.

Fasi	Metodologia	Fattori Critici (QA)	Azioni prioritarie (QA)
Campionamento	Bottiglia Niskin	Possibile sedimentazione degli organismi all'interno della Niskin	Raccolta del campione entro pochi minuti dalla risalita della bottiglia Niskin
Trattamento e conservazione dei campioni	Fissazione del campione in formalina neutra, conservazione in bottiglie di vetro scuro e in frigorifero	Possibile deterioramento e conseguente perdita di cellule	Conteggio del campione in tempi brevi
Concentrazione del campione	Acclimatazione del campione	Insufficiente tempo di acclimatazione	Acclimatazione del campione alla temperatura ambiente.
	Omogenizzazione	Parziale omogenizzazione	Agitazione del campione almeno 150 volte
	Sedimentazione	Distribuzione non omogenea nella camera di conteggio durante la sedimentazione Incompleta sedimentazione delle cellule	Rimozione di bolle d'aria, posizionamento della camera di conteggio su un piano orizzontale non soggetto a vibrazioni Rispetto dei tempi di sedimentazione raccomandati
Analisi del campione	Microscopio ottico invertito	Fattore di ingrandimento, potere di risoluzione	Conteggio del campione ad un ingrandimento di 400X
		Qualità dell'ottica	Manutenzione dei microscopi e controllo della qualità ottica
	Conteggio con metodo Utermöhl	Precisione e limite di rilevabilità nella stima delle densità cellulari	Conteggio su transetti o campi di almeno 200 cellule per le specie più abbondanti
		Ripetibilità	Riconteggio dello stesso campione da parte dello stesso analista
	Identificazione delle specie	Riproducibilità intralaboratorio e interlaboratori	Conteggio dello stesso campione da parte di altri operatori del laboratorio Esercizi di intercalibrazione esterni
Esperienza tassonomica		Formazione e aggiornamento degli operatori	
Trattamento dei dati	Calcolo delle densità cellulari	Utilizzo di nomenclatura tassonomica aggiornata	Lista tassonomica di riferimento validata (con indicazione dei sinonimi)
		Errori nel calcolo	Verifica di dati anomali per presenza e/o concentrazione di specie.
	Stesura delle liste di specie	Errori di nomenclatura e cambiamenti tassonomici	Controllo di nomenclatura e sinonimie tramite confronto con database tassonomici di riferimento (WoRMS, Algaebase)

Tabella 3. Sintesi dei fattori critici nei singoli step metodologici, e delle azioni volte ad assicurare la qualità dei dati di zooplankton.

Fasi	Metodologia	Fattori Critici (QA)	Azioni prioritarie (QA)
Campionamento	Retino Nansen (113 cm, maglia 200µm) Pescata verticale (0-50 m)	Deriva dell'imbarcazione Velocità di risalita del retino	Zavorrare il retino Salpare a velocità costante Calcolare l'angolo del cavo verricello Risciacquare bene il retino Calcolare l'efficienza di filtrazione
Conservazione dei campioni	Campione per il conteggio fissato con formalina al 4%	Buona conservazione degli animali	Controllare il pH della formaldeide Controllare la percentuale di formalina Controllare il pH del campione
	Campione per la misura di biomassa non fissato	Morte e decomposizione degli animali	Conservazione del campione a 4°C fino al momento del trattamento
Preparazione del campione fissato	Concentrazione a volume noto (200 ml)	Dimensione e tipologia degli organismi (es. gelatinosi)	Calibrazione del materiale utilizzato prt ls concentrazione (coppette, pipette etc.)
	Sub-campionamento con pipetta graduata	Omogenizzazione del campione	Standardizzazione delle procedure di sub-campionamento
Conteggio	Stereomicroscopio Fattore di ingrandimento $\geq 10X$	Qualità dell'ottica	Manutenzione degli stereomicroscopi e controllo della qualità ottica
	Conteggio di 2-3 sub-campioni (5 ml ognuno)	Numero di organismi contati	Conteggio di un numero minimo di individui (limite di confidenza al 95%)
	Identificazione delle specie	Esperienza tassonomica Utilizzo di nomenclatura tassonomica aggiornata	Conteggio dello stesso campione da parte di altri operatori del laboratorio Formazione e aggiornamento degli operatori
Preparazione del campione non fissato (peso secco)	Concentrazione del materiale	Composizione del campione (es. presenza di fitoplancton e di grossi gelatinosi)	Riportare la presenza di gelatinosi e/o di bloom fitoplanctonici. Rimuovere grossi gelatinosi
		Presenza di materiale abiotico	Rimuovere plastica etc.
	Risciacquo con acqua distillata	Campione igroscopico	Eliminare acqua interstiziale
	Asciugatura in forno a 60°C	Parziale asciugatura	Controllo della temperatura del forno
	Pesata alla bilancia elettronica analitica	Assorbimento di umidità Errori strumentali Errori analitici	Trasporto del campione dal forno alla bilancia in essiccatore con silicagel Pulizia, taratura e manutenzione della bilancia Effettuare un numero di pesate sufficienti fino al raggiungimento di un peso costante
Trattamento dei dati	Calcolo dell'abbondanza	Errore di calcolo	Verifica di dati anomali per presenza e/o abbondanza di specie.
	Stesura delle liste di specie	Errori di identificazione delle specie	Controllo finale della nomenclatura e delle sinonimie delle specie tramite confronto con database tassonomici di riferimento (WoRMS)

Strumentazione ed apparecchiature

La strumentazione e le attrezzature utilizzate a mare ed in laboratorio (es. retini, bottiglie Niskin, camere di sedimentazione) sono oggetto di regolare manutenzione. Microscopi e stereomicroscopi sono sottoposti a manutenzione annuale da parte del personale tecnico delle case fornitrici.

Impiego di personale adeguatamente formato

Tutti gli operatori SZN coinvolti nelle diverse fasi dell'attività, dal campionamento fino al conteggio delle specie fito- e zooplanctoniche possiedono una competenza qualificata acquisita negli anni.

Al personale meno esperto, in fase di formazione, viene sempre fornita supervisione adeguata. La competenza individuale del personale in formazione, inoltre, viene migliorata attraverso la partecipazione periodica a workshop e/o corsi di specializzazione.

Almeno due membri del personale sono competenti nelle diverse attività.

Analisi dei campioni fito- e zooplanctonici

Ogni campione biologico raccolto a mare rappresenta un'entità diversificata, costituita da un insieme di specie particolare per quel campione. Per questa ragione, la competenza nella identificazione tassonomica è il primo ed indispensabile aspetto che determina la qualità finale dei dati prodotti.

- Gli operatori impegnati nei conteggi effettuano abitualmente lavoro di gruppo e consultazione per l'identificazione di specie incerte o nuove.
- Per molti gruppi planctonici, soprattutto quelli oggetto di studi tassonomici approfonditi, è già disponibile una collezione di riferimento. In particolare, per il fitoplancton è stato creato nel tempo un database che contiene immagini di specie presenti nel Golfo di Napoli ed in altre aree del Mediterraneo. Per lo zooplancton è in fase di allestimento una collezione di organismi-tipo per le specie di copepodi presenti in Mediterraneo, conservati in formalina.
- L'identificazione delle specie viene condotta prendendo in considerazione la letteratura specialistica di riferimento e con un continuo aggiornamento delle competenze tassonomiche. Gli elenchi di specie prodotti sono sottoposti a controllo della nomenclatura e delle sinonimie riportate dal World Register of Marine species <http://www.marinespecies.org/>.

In fase di conteggio, le procedure di assicurazione di qualità prevedono:

- Una verifica, da parte di altri colleghi, della validità dei risultati in termini di determinazioni tassonomiche e di precisione dei conteggi e delle procedure impiegate.
- Un riconteggio dello stesso campione da parte dell'analista al fine di testare la ripetibilità dei conteggi.
- Per ogni campione, il conteggio di un numero di cellule ed individui statisticamente significativi, con limiti di confidenza al 95% (CL₉₅) secondo quanto riportato da Lund *et al.* (1958).
- Il riconteggio del 5% dei campioni da parte di almeno un altro operatore (in parallelo, sullo stesso sub-campione) al fine di testare la riproducibilità intra-laboratorio.
- La corretta immissione dei dati nei file (Access, Excel) e la sua verifica confrontando una stampa dei dati inseriti con il log originale dei conteggi.
- Nonostante quanto premesso sulla difficoltà di applicare i metodi statistici che vengono abitualmente utilizzati per i dati oceanografici, procedure standardizzate di

controllo di qualità possono comunque evidenziare valori anomali che si discostano in maniera significativa dal complesso dei dati. Sulla matrice dei dati vengono pertanto effettuate procedure di controllo, basate sulla verifica di presenza e abbondanza delle specie evidenziando dati anomali rispetto a concentrazione e/o stagionalità delle stesse.

Nella fase di produzione del dataset per la condivisione, si prevede di:

- fornire, per ogni campione, indicazioni che permettano di risalire all'effettivo numero di individui conteggiati per ogni specie, e quindi ai limiti di confidenza dei dati.
- produrre liste di specie per i due set di dati (fitoplancton e mesozooplancton) che contengano flag specifici sull'affidabilità delle identificazioni delle singole specie, sulla base delle metodologie applicate (microscopia ottica, elettronica, metodi molecolari) e dello stato attuale delle conoscenze.

1.1.1 Controllo esterno della qualità

Questa fase comprende sia il conteggio da parte di laboratori esterni e che esercizi di intercalibrazione. Generalmente si raccomanda che il 5% dei campioni venga ricontato da un diverso laboratorio, come consigliato dalle procedure standard di controllo di qualità (APHA, 1995).

Attualmente, per il comparto fitoplanctonico la dott.ssa Diana Sarno ha partecipato ad un esercizio di intercalibrazione per analisi qualitativa e quantitativa dei campioni, organizzato dal Marine Institute-IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, nell'ambito delle iniziative di NMBAQC-BEQUALM (National Marine Biological Analytical Quality Control-Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes, <http://www.nmbaqcs.org>). La partecipazione al test ha incluso l'invio dei campioni da parte del Marine Institute, l'analisi di campioni da parte dell'analista e la trasmissione dei risultati all'ente organizzatore. Il superamento dell'esame determinerà l'accreditamento ISO, che attesta la conformità delle metodiche analitiche utilizzate agli standard internazionali.

Per il comparto zooplanctonico il NMBAQC ed il Sir Alister Hardy Foundation for Ocean Science (SAHFOS, <http://www.sahfos.ac.uk>) hanno avviato, alla fine di Gennaio 2013, una consultazione fra i vari laboratori di ricerca marina per sviluppare uno schema di controllo di qualità per le analisi dei campioni di zooplancton. Attualmente non esiste, infatti, un protocollo standardizzato per garantire la qualità per le analisi dello zooplancton.

LETTERATURA

Addison, P. (2010). NMBAQC. Quality Assurance in Marine Biological Monitoring. A report prepared for the Healthy and Biologically Diverse Seas Evidence Group and the National Marine Biological Analytical Quality Control Scheme. Prue Addison, Environment Agency/Joint Nature Conservation Committee

APHA (1995) Standard methods. 19th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.

Hötzel G, Croome R (1999) A Phytoplankton Methods Manual for Australian Freshwaters. LWRRDC Occasional Paper 22/99

Harris RP, Wiebe PH, Lenz J, Skjoldal HR, Huntely M (2000) Zooplankton Methodology Manual, Academic Press, London.

Lund J.WG., 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.

OSPAR (2002) JAMP guidelines on quality assurance for biological monitoring in the OSPAR area Commission Monitoring guidelines, Ref. No. 2002-15

Zingone, A., Totti, C., Sarno, D., Cabrini, M., Caroppo, C., Giacobbe, M. G., Lugliè, A., Nuccio, C. & Socal, G. 2010. Fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa. In: Socal, G., Buttino, I., Cabrini, M., Mangoni, O., Penna, A. & Totti, C. [Eds.] Metodologie di studio del plancton marino. ISPRA, Roma, pp. 204-28.