

Procedure controllo di qualità dei dati



Indice

1	PREMESSA	2
2	DATABASE BIOGEOCHIMICO	3
2.1	METODICHE UTILIZZATE	3
2.1.1	Temperatura e salinità.....	3
2.1.2	Ossigeno disciolto	4
2.1.3	Nutrienti inorganici (NO ₂ , NO ₃ , NH ₄ , SiO ₄ , PO ₄)	4
2.1.4	Clorofilla <i>a</i>	5
2.2	QUALITY CONTROL	5
2.2.1	Temperatura	8
2.2.2	Salinità.....	8
2.2.3	Ossigeno disciolto	9
2.2.4	Nutrienti.....	9
2.2.5	Clorofilla <i>a</i>	10
2.3	LETTERATURA	11
3	DATA SET FITOPLANCTON E MESOZOOPLANCTON	13
3.1	METODICHE UTILIZZATE	13
3.1.1	Fitoplancton	13
3.1.2	Zooplancton	14
3.2	QUALITY CONTROL	15
3.2.1	Controllo interno di qualità.....	16
3.2.1.1	Documentazione dei metodi	16
3.2.1.2	Strumentazione ed apparecchiature	18
3.2.1.3	Impiego di personale adeguatamente formato.....	18
3.2.1.4	Analisi dei campioni fito- e zooplanctonici	19
3.2.2	Controllo esterno della qualità	20
3.3	LETTERATURA	20

1 Premessa

La valutazione della qualità dei dati attraverso procedure di controllo di qualità (QC) è un elemento indispensabile nella condivisione di dataset. Nel caso dei dati raccolti nel Golfo di Napoli, dal 1984 ad oggi, alla stazione LTER-MC, intorno alla quale sarà costruito un dimostratore di Osservatorio, le procedure di QC ad oggi sono consistite in operazioni di ‘pulizia dei dati’ sulla base dell’esperienza diretta dei ricercatori che li hanno prodotti negli anni e della loro conoscenza del sito, che hanno permesso l’uso di dati in pubblicazioni scientifiche prodotte dagli stessi ricercatori. Nella nuova fase di pubblicazione e condivisione dei dati, prevista nel caso di un Osservatorio, è necessario che questi siano corredati da informazioni che ne evidenzino la robustezza (o i limiti). In questo modo si permetterà la piena fruizione del dataset evitando possibili errori nel loro uso.

Nell’ambito dell’azione 2 dell’ SP5-RITMARE sono stati quindi individuati i criteri e le procedure idonee ad un QC basato su criteri largamente accettati dalla comunità scientifica, identificati sulla base di metodologie pubblicate o disponibili sul web, che vengono di seguito illustrati separatamente per il data set biogeochimico e per quello relativo al fitoplancton e al mesozooplancton. Tali procedure sono precedute da una descrizione sintetica dei dataset e delle metodologie applicate per l’acquisizione dei dati, che hanno subito alcune variazioni nel corso degli anni.

È importante sottolineare la differenza fra le due tipologie di dati. Per i dati biogeochimici, il controllo di qualità è volto ad individuare possibili errori nella raccolta, trattamento ed analisi dei campioni (ad esempio, inquinamento dei campioni con sostanze estranee), così come possibili malfunzionamenti delle strumentazioni o anche errori nei calcoli. Nel caso dei dati di biodiversità planctonica, dove è preponderante il ruolo dell’operatore che esegue il conteggio, un primo controllo di qualità relativo ad 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’.

I contenuti di seguito esposti faranno parte di un booklet disponibile sul sitoweb <http://szn.macisteweb.com/>.

Nella fase pratica di applicazione, le procedure QC descritte di seguito subiranno presumibilmente modifiche in relazione alla natura dei dati stessi, per cui il booklet sarà periodicamente aggiornato e integrato con informazioni aggiuntive.

2 DATABASE BIOGEOCHIMICO

Il database biogeochimico di pubblico accesso della LTER-MC include i seguenti parametri:

- Temperatura
- Salinità
- Ossigeno disciolto
- Nutrienti (NO₂, NO₃, NH₄, SiO₄, PO₄)
- Clorofilla *a* (Chl*a*).

I dati di temperatura, salinità, ossigeno disciolto e nutrienti sono stati acquisiti a 10 profondità (0,-2,-5,-10,-20,-30,-40,-50,-60 e -70m) mentre le misure di Chl *a* sono state effettuate su 7 quote (0,-2,-5,-10,-20,-40,-60m).

I campionamenti sono stati effettuati con cadenza quindicinale dal 26/01/1984 al 30/07/1991 e con cadenza settimanale dal 21/02/1995 ad oggi.

Informazioni sintetiche sulla strumentazione e le metodiche utilizzate sono riportate nel seguente paragrafo.

2.1 METODICHE UTILIZZATE

Margiotta F., Conversano F. e Ribera d'alcalà M.

Temperatura e salinità

Dal 26/01/1984 al 12/09/1995 la temperatura è stata misurata con termometri a rovesciamento. Per la salinità, i campioni sono stati raccolti dalle bottiglie Niskin da 5 litri in bottiglie di vetro 250 ml e analizzati successivamente in laboratorio.

La salinità è stata determinata con un Salinometro Beckman (mod. RS7C) utilizzando come metodo di riferimento Grasshoff (1983) e successivamente un salinometro Autosol della Guildline Instruments.

Dal 03/10/1995 al 17/12/2003, tutti i profili per l'acquisizione dei parametri fisici (pressione, temperatura, salinità) nello strato 0-70 metri sono stati ottenuti con un sonda multiparametrica della Sea-Bird Electronics modello 911plus. Per la raccolta dei campioni d'acqua è stato utilizzato un campionatore automatico con 10-12 bottiglie NISKIN da 10 litri ciascuna.

Per i dati del 2000, alcuni profili di temperatura e salinità mancanti, sono stati ricostruiti a partire dai valori di salinità e temperatura ottenuti dalle misure BTL riportati a 1 m di risoluzione adattando il metodo DINEOF (Data Interpolating Empirical Orthogonal Functions), descritto in Beckers and Rixen (2003), al dataset Marechiara. Il metodo di ricostruzione si basa sulla stima iterativa dei modi EOF che dominano la variabilità di un vettore di stato multivariato (normalizzato) di temperatura e salinità. La corrispondente matrice delle osservazioni è costruita a partire dalle misure CTD (1m di risoluzione verticale) e dalle misure su una o più quote fisse (BTL: 0 m, 2 m, 5 m, 10 m, 20 m, 30 m, 40 m, 50 m, 60 m, 70 m). Il calcolo iterativo permette di 'riempire' le quote non campionate con le bottiglie sfruttando la maggiore risoluzione dei dati CTD (Beckers & Rixen, 2003).

Dal 08/01/2004 ad oggi, tutti i profili per l'acquisizione dei parametri idrografici (pressione, temperatura, salinità), biogeochimici (fluorescenza e ossigeno disciolto) e ottici (PAR), sono stati ottenuti con una sonda multiparametrica della Sea-Bird Electronics modello 911plus®. La sonda acquisisce 24 dati al secondo con una accuratezza di 0.001 °C per la temperatura e 0.0003 S/m per la conducibilità. Il CTD è stato calibrato periodicamente presso l'OGS di Trieste. Per la raccolta dei campioni d'acqua è stato utilizzato un campionatore Carousel con 12 bottiglie NISKIN da 10 litri ciascuna.

Ossigeno disciolto

Dal 26/01/1984 al 17/12/2003 I campioni di acqua sono stati raccolti in bottiglie pirex dalle bottiglie Niskin. La concentrazione è stata determinata con il metodo Winkler (Carpenter, 1965) utilizzando sia una buretta manuale per il rilevamento degli endpoint che un titolatore automatico modello DMS 716 Titrino della Metrohm.

Dal 08/01/2004 ad oggi la concentrazione è stata determinata con il metodo Winkler (Carpenter, 1965) utilizzando un titolatore automatico modello 798 MPT Titrino della Metrohm. Nel 2009, in alcuni campionamenti non è stato possibile effettuare la determinazione dell'ossigeno disciolto con il metodo Winkler. Nel database sono stati riportati, quindi, i dati acquisiti con la sonda multiparametrica.

Nutrienti inorganici (NO₂, NO₃, NH₄, SiO₄, PO₄)

Dal 26/01/1984 al 14/02/2006, I campioni di acqua per la determinazione delle concentrazioni di nutrienti sono stati raccolti in fiale di polietilene da 20 ml direttamente dalle bottiglie Niskin. I campioni sono stati congelati subito dopo il prelievo ed analizzati successivamente in laboratorio. Le concentrazioni sono state determinate utilizzando un Autoanalyzer ed il metodo di riferimento è stato Grasshoff (1983).

Dal 23/02/2006 ad oggi, le concentrazioni sono state determinate utilizzando un AutoAnalyzer Flow Sys (SYSTEAS) utilizzando come base le metodiche descritte in Grasshoff (1983) in parte rivisitate come descritto in Saggiomo et al. (2010).

Clorofilla *a*

Dal 0/01/1984 al 01/08/2006 i campioni di acqua sono stati raccolti con bottiglie Niskin alle profondità 0-2-5-10-20-40-60 m. E' stato filtrato un volume variabile di acqua di mare (200-520 ml) su filtri Whatman GF/F (fibra di vetro) dal diametro di 25 mm. In laboratorio si è proceduti all'estrazione dei pigmenti in 10 ml di acetone al 90% neutralizzato. Le concentrazioni di Chl *a* e dei feopigmenti sono state determinate sia con uno spettrofotometro (Strickland and Parsons, 1972) e successivamente con uno spettrofluorimetro (Holm-Hansen *et al.*, 1965; Neveux and Panouse, 1987).

Dal 08/08/2006 ad oggi le concentrazioni sono state determinate utilizzando uno spettrofluorimetro RF-5301 PC (Shimadzu), utilizzando la metodica riportata in Holm-Hansen *et al.*, 1965 .

Al fine di stimare la precisione e l'accuratezza delle misure in corso, si provvederà ad effettuare quanto prima delle analisi su campioni replicati e si cercherà di partecipare a test di calibrazione internazionali (QUASIMEME).

2.2 QUALITY CONTROL

Per poter assegnare un quality flag ai dati acquisti (1984-2010), è stato identificato il seguente controllo di qualità, ottenuto rielaborando le procedure proposte durante il primo IODE Workshop (2010), nel WP15 di MyOcean (2011), in Segura-Noguera *et al.* (2011).

Tabella 1: Flag adottati nel Quality Control dei dati biogeochimici

QF	Significato
0	Non è stato eseguito nessun QC
1	Dato buono
2	Dato probabilmente buono
3	Dato probabilmente cattivo
4	Dato cattivo
5	Valore manipolato
6	Valore al di sotto del limite di detezione
7	Valore superiore al range individuato
8	Valore interpolato

Per ogni dato deve essere necessariamente assegnato almeno uno dei flag in grigio.

Il significato del QF può essere riassunto come segue:

- QF=0 prima di poter utilizzare il dato, l'utente dovrebbe effettuare un QC
- QF=1 Possono essere utilizzati senza ulteriori controlli
- QF=2 i dati potrebbero essere utilizzabili per alcune applicazioni, l'utilizzatore dovrebbe contattare il data manager per ottenere specifiche informazioni sul dato in questione
- QF=3 il dato non è utilizzabile ma potrebbe essere potenzialmente correggibile
- QF=4 dato non utilizzabile
- QF=5,6,7,8 dati utilizzabili per alcune specifiche applicazioni con le limitazioni del caso.

Come può dedursi dalla descrizione dei flag, esiste anche una componente soggettiva giustificabile in base all'esperienza dei produttori dei dati e alla loro consocenza del sito. Per ridurre al minimo la componente soggettiva sono stati elaborati dei criteri quantitativi basati sulle proprietà statistiche delle distribuzioni dei dati, e sui vincoli imposti alla loro covarianza dai processi oceanografici conosciuti. Questo secondo approccio, peraltro largamente utilizzato in oceanografia, contiene anch'esso una componente non oggettiva, in quanto ipotizza che la covarianza rifletta relazioni ricorrenti tra i valori dei parametri, che in ambiente costiero possono mostrare eccezioni. (v. nel seguito).

Per definire i test per l'assegnazione dei QF sono state effettuate tre analisi successive basate su:

- **Analisi visiva della distribuzione dei dati** (Appendice I-III);
- **Analisi della frequenza di distribuzione dei dati** (Appendice IV);
- **Analisi della climatologia** (Appendice V).

L'analisi visiva dei dati permette di identificare la distribuzione verticale dei parametri lungo la colonna d'acqua: temperatura, salinità, nutrienti e Chl *a* mostrano un marcato gradiente verticale che costituisce la base per la definizione dei range di variabilità dei singoli parametri e dei test per l'assegnazione dei QF.

Inoltre, è possibile identificare alcuni anni che presentano valori particolarmente anomali (vedi, p. es. PO₄ negli anni 1985 e 1988).

La frequenza di distribuzione mostra un andamento quasi-normale per alcuni parametri (es. ossigeno disciolto) e una distribuzione asimmetrica per altri (es. nutrienti). I valori estremi nella coda dell'istogramma potrebbero rappresentare degli outliers o dei dati non plausibili. Tuttavia, sebbene tali valori possano essere considerati degli errori, bisogna considerare che

le aree costiere presentano una variabilità ambientale estremamente elevata, tale da giustificare la presenza. Pertanto, applicare un approccio puramente statistico può risultare inappropriato. Molto spesso l'aumento di nutrienti e di Chl *a* è associato a input terrigeni che determinano una simultanea diminuzione della salinità. Saranno quindi effettuate delle verifiche di consistenza dei dati utilizzando un approccio multiparametrico (parameter relationship test).

Infine, l'analisi della climatologia ha evidenziato una marcata stagionalità per alcuni parametri (es. temperatura) di cui si terrà conto per la definizione dei test per l'attribuzione QF.

Sulla base di queste evidenze sono stati individuati i test da applicare che sono descritti sinteticamente nei paragrafi seguenti e più dettagliatamente in relazione ad ogni singolo parametro.

I test da applicare per il QC saranno effettuati indipendentemente e saranno volti ad assicurare che il dato in esame rientri in un intervallo prefissato (test 1-2) e che sia superiore al detection limit (test3). Saranno poi effettuati dei test per assicurare che i profili non presentino degli spike (test 4) o dei gradienti eccessivi (test 5). Quando possibile, saranno effettuati dei test correlando tra loro differenti parametri in modo da verificare ulteriormente la consistenza dei dati (test 6). Infine, si procederà ad effettuare un confronto tra le distribuzioni annuali per identificare degli anni anomali (test7).

Test per i quality flag:

- 1) Range di variabilità per ogni profondità: limite superiore
- 2) Range di variabilità per ogni profondità: limite inferiore
- 3) Detection limit test.
- 4) Spike test: Test Value = $|V2 - (V3 + V1)/2| - |(V3 - V1)/2|$, dove V1, V2 and V3 sono tre misure consecutive e V2 è il valore da testare come spike. Il valore è identificato come spike se il Test Value supera un threshold value.
- 5) Gradient test: identifica i punti con gradienti verticali eccessivi. È definito come: Test_value = $|V2 - (V3 + V1)/2|$, dove V1, V2 and V3 sono gli stessi dello spike test.
- 6) Parameter relationship test
- 7) Confronto tra le distribuzioni annuali per verificare l'esistenza di anni anomali

Ci si riserva di apportare modifiche ai test nella fase di controllo di qualità del database (deliverable D5.1.2.5).

Temperatura

Saranno individuati dei range stagionali di temperatura in tre differenti strati della colonna d'acqua (0-10m, 20-40m, 50-70m) in modo da poter effettuare i test 1-2.

Non sarà effettuato nessun detection limit test (test 3).

Saranno analizzati i profili verticali utilizzando i test 4 e 5.

Non sarà effettuato nessun controllo incrociato dei dati (test 6).

Sarà effettuata una verifica di massima con i dati di SST satellitare (test7).

I quality flag da assegnare saranno:

- 0: non sarà possibile eseguire il QC
- 1: se saranno superati tutti i test
- 3: se non è superato il test 7
- 4: se non sarà superato uno dei test range di variabilità, spike test e/o gradient test
- 8: valore interpolato (come nel caso dei profili del 2002 ricostruiti)
- 9: valore mancante.

Salinità

Anche in questo caso saranno individuati dei range stagionali di salinità in tre differenti strati della colonna d'acqua (0-10m, 20-40m, 50-70m) in modo da poter effettuare i test 1-2.

Non sarà effettuato nessun detection limit test (test 3).

Saranno analizzati i profili verticali utilizzando i test 4 e 5.

Anche in questo, in presenza di anni anomali, ovvero che mostrino un offset rispetto ad altri, si faranno confronti con le climatologie disponibili in Mediterraneo e con i risultati dei modelli per verificare se variazioni sistematiche sono state osservate anche su scala più larga (test7).

I quality flag da assegnare saranno:

- 0: non sarà possibile eseguire il QC
- 1: se saranno superati tutti i test
- 3 se non è superato il test 7
- 4: se non sarà superato uno dei test range di variabilità, spike test e/o gradient test

- 8: valore interpolato (come nel caso dei profili del 2002 ricostruiti)
- 9: valore mancante.

Ossigeno disciolto

Saranno individuati dei range stagionali di concentrazioni in tre differenti strati della colonna d'acqua (0-10m, 20-40m, 50-70m) e saranno effettuati i test 1 e 2.

La distribuzione verticale sarà testata con lo spike test (test 4) e il gradient test (test 5).

Sarà effettuato un parameter relationship test con Chl *a* nello strato 0-10m (test 6).

Sarà effettuato un controllo per individuare delle anomalie annuali (test7).

Non sarà effettuato nessun detection limit test (test2).

I quality flag da assegnare saranno:

- 0: non sarà possibile eseguire il QC
- 1: se saranno superati tutti i test
- 2: il valore è inferiore al range individuato ma supera gli spike e gradient test (strato 50-70).
- 3 se non è superato il test 7
- 4: se non sarà superato lo spike test e/o gradient test o se il campione sarà esterno al range di variabilità individuato ad eccezione dei casi previsti per l'assegnazione dei flag 2 e 7.
- 7: valore superiore al range individuato ma giustificato da elevati valori di biomassa (strato 0-10)
- 8: valore interpolato (dati 2009 ricavati dal sensore di ossigeno della sonda multiparametrica)
- 9: valore mancante.

Nutrienti

Anche in questo caso si procederà ad individuare dei range di concentrazioni stagionali per gli strati 0-10m, 20-40m, 50-70m in modo da poter effettuare i test 1 e 2.

Sarà effettuato il detection limit test (test 3).

Sarà verificata la distribuzione verticale applicando i test 4 e 5.

Saranno effettuati dei parameter relationship test con Chl *a*, salinità e nutrienti (per concentrazioni dei nutrienti superiori a 0.1 mmol m⁻³) (test 6).

Sarà verificata la variabilità interannuale (test7).

Le concentrazioni di nutrienti presentano un brusco gradiente verticale (soprattutto nello strato 0-10m), pertanto può capitare che il campione non superi lo spike test a causa del gradiente eccessivo. In questo caso falliranno entrambi i test, ma il dato non è da considerare di cattiva qualità. Se invece dovesse fallire solo uno dei due test il dato sarà di cattiva qualità.

I quality flag da assegnare saranno:

- 0: non sarà possibile eseguire il QC
- 1: se saranno superati tutti i test
- 2: se lo spike test e il gradient test falliscono contemporaneamente
- 3: non supera il test di variabilità interannuale e i parameter relationship test
- 4: se il campione sarà esterno al range di variabilità individuato ad eccezione del caso previsto per l'assegnazione del flag 7, o se non sarà superato lo spike test o il gradient test
- 6: il valore cade all'interno del range stagionale ma è inferiore al detection limit
- 7: valore superiore al range individuato ma giustificato dai parameter relation test
- 9: valore mancante.

Clorofilla a

Anche in questo caso si procederà ad individuare dei range di concentrazioni stagionali per gli strati 0-10m, 20-40m, 50-70m in modo da poter effettuare i test 1 e 2.

Sarà effettuato il detection limit test (test 3).

Sarà verificata la distribuzione verticale applicando i test 4 e 5.

Saranno effettuati dei parameter relationship test con salinità e nutrienti (per concentrazioni dei nutrienti superiori a 0.1 mmol m⁻³) (test 6).

Sarà effettuato un confronto con dati satellitari per avere un verifica di massima (test 7).

I quality flag da assegnare saranno:

- 0: non sarà possibile eseguire il QC
- 1: se saranno superati tutti i test
- 2: se lo spike test e il gradient test falliscono contemporaneamente

- 3: non supera il test di variabilità interannuale e i parameter relationship test
- 4: se il campione sarà esterno al range di variabilità individuato ad eccezione del caso previsto per l'assegnazione del flag 7, o se non sarà superato lo spike test o il gradient test
- 6: il valore cade all'interno del range stagionale ma è inferiore al detection limit
- 7: valore superiore al range individuato ma giustificato dai parameter relation test
- 9: valore mancante.

2.3 LETTERATURA

Beckers, J.M. and Rixen M. (2003) EOF Calculations and Data Filling from Incomplete Oceanographic Datasets. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology* 20, 1839-1856.

Carpenter, J.H. (1965). The Chesapeake Bay Institute. Technique for the Winkler oxygen method. *Limnol. Oceanogr.*, 10, 141–143.

First IODE Workshop on Quality Control of Chemical Oceanographic Data Collections. Workshop Report No.228; IOC Project Office for IODE, 2010.

Folkestad A., Sørensen K., Wehde H., Kaitala S., Durand D. (2011) Real Time Quality Control of biogeochemical measurements. My Ocean document, WP15

Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremung, K. (Eds.), 1983: *Methods of Seawater Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie.

Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 30, 3–15.

Neveux, J. and M. Panouse - 1987. Spectrofluorometric determination of chlorophylls and pheophytins. *Arch. Hydrobiol.*, 109: 567-581.

Saggiomo, V., Catalano, G., Corato, F., Ribera d'Alcalà, M., 2010. Metodi automatici per l'analisi dei nutrienti. In: Socal, G., Buttino, I., Cabrini, M., Mangoni, O., Penna, A. & Totti, C. [Eds.] Metodologie di studio del plancton marino Manuali e Linee Guida 56/2010, ISPRA, SIBM Roma, pp. 53-77.

Segura-Noguera M., Cruzado A., Blasco D. (2011) Nutrient preservation, analysis precision and quality control of an oceanographic database of inorganic nutrients, dissolved oxygen and chlorophyll a from the NW Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 75(2), 321-339

Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. – 1972. A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, 167: 1-310.

3 DATA SET FITOPLANCTON E MESOZOOPLANCTON

Il database biologico di pubblico accesso della LTER MareChiara comprende i dati di abbondanza e biomassa del fitoplancton e zooplancton, acquisiti dal 1984 ad oggi.

In particolare, i dati disponibili riguardano:

- l'abbondanza, nelle acque superficiali (0,5 m), espressa in cell ml⁻¹, delle diverse specie o categorie tassonomiche del fitoplancton totale
- la composizione specifica del microfitoplancton nelle acque superficiali
- La biomassa dello zooplancton nello strato 0-50 m, espressa come peso secco (mg C l⁻¹)
- L'abbondanza, nello strato 0-50 m, espressa in ind/m⁻³ delle diverse specie o categorie tassonomiche dello zooplancton.

Sono inoltre disponibili dati di fitoplancton relativi ad altre profondità raccolti per periodi limitati.

I campionamenti sono stati effettuati con cadenza quindicinale dal 26/01/1984 al 30/07/1991 e con cadenza settimanale dal 21/02/1995 ad oggi. Essi comprendono, per il fitoplancton:

- un campione superficiale vivo di retinata, per la stima qualitativa della diversità del microplancton;
- un campione superficiale raccolto con bottiglia Niskin, per il conteggio e la stima quantitativa del fitoplancton totale:

e per lo zooplancton

- un campione vivo di retinata verticale nello strato 0-50 m, per la determinazione della biomassa
- un campione fissato di retinata verticale nello strato 0-50 m, per l'identificazione e il conteggio del fitoplancton totale.

3.1 METODICHE UTILIZZATE

Fitoplancton

Percopo I., Sarno D. e Zingone A.

Per studi floristici o per la raccolta di organismi da portare in coltura per studi fisiologici, tassonomici o molecolari, vengono utilizzati campioni di retino. Il campionamento avviene trascinando il retino nelle acque di superficie a bassa velocità di traino. Il retino da fitoplancton è di forma conica e maglia da 20 µm. Il campione viene raccolto in barattoli di plastica da 500 ml e mantenuto in luogo fresco fino all'arrivo in laboratorio dove viene osservato al microscopio ottico e viene compilata una lista di specie.

Per le analisi quantitative della comunità fitoplanctonica vengono utilizzati i campioni di bottiglia. Il campione viene raccolto a 0 m con una bottiglia Niskin da 5 l collegata a un campionatore automatico (rosette o carosello). Subito dopo aver effettuato il campionamento, un sub-campione viene raccolto in tempi molto rapidi per evitare la sedimentazione nelle bottiglie di campionamento. Il sub-campione viene raccolto in bottiglie di vetro scuro da 500 ml contenente il fissativo (formalina). La bottiglia viene riempita ad un livello appena al di sotto dell'orlo, per consentire agitazione e omogeneizzazione prima dell'analisi in laboratorio.

Il campione raccolto, trasportato in laboratorio, viene conservato in frigorifero a 4 °C prima dell'analisi, che avviene a pochi giorni dal campionamento.

Prima di effettuare il conteggio cellulare il campione viene acclimatato a temperatura ambiente e agitato delicatamente 150 volte per omogeneizzarlo. Il passo successivo prevede la sedimentazione in apposite camere di conteggio. Dopo il riempimento la camera viene posizionata su un piano perfettamente orizzontale per un tempo sufficiente alla sedimentazione di tutte le cellule (3-5 ore per cm di altezza del cilindro di sedimentazione). L'analisi quantitativa viene effettuata con il metodo di conteggio Uthermöl al microscopio invertito (per dettagli vedi Zingone et al., 2010).

Successivamente viene calcolata l'abbondanza delle cellule fitoplanctoniche presenti nel campione con una semplice formula matematica. Il contenuto in carbonio delle singole specie viene poi calcolato a partire dal volume cellulare medio attraverso l'applicazione di formule di conversione derivate empiricamente (per dettagli vedi Zingone et al., 2010).

Zooplankton

Di Capua I. e. Mazzocchi M.G

Per la raccolta vengono effettuate due retinate, delle quali solo una viene fissata, con retino standard (mod. Nansen) con una bocca con superficie pari a 1 m² (diametro 113 cm) e apertura di maglia di 200 µm, munito di un collettore di Plexiglas da 1 Litro con finestra filtrante. La scelta di utilizzare tale retino (invece del più piccolo e comunemente usato WP2) è stata dettata da ragioni storiche. Si è pensato infatti a una migliore comparazione con dati acquisiti precedentemente dalla SZN utilizzando questo tipo di retino per la raccolta del mesozooplankton nel Golfo di Napoli e in acque aperte del Mediterraneo.

Il campione non fissato viene utilizzato per stimare la biomassa zooplanctonica come peso secco e successivamente per effettuare l'analisi del contenuto di carbonio al CHN. Il campione viene filtrato su un pezzo di retino di maglia uguale a quella della rete di raccolta (200 µm) e risciacquato con acqua distillata. Successivamente il campione viene raccolto, impacchettato in un pezzo di foglio di alluminio prepesato, avendo cura di lasciare un'apertura per facilitare l'evaporazione. È posto in stufa a 60 °C. Dopo 24h si pesa il campione alla bilancia analitica. Nei giorni successivi si effettuano 1-2 pesate addizionali, fino al raggiungimento di un valore (quasi) costante. Alla fine si procede al calcolo del peso secco espresso in mg m⁻³.

Dopo circa una settimana in stufa, i campioni di biomassa zooplanctonica vengono potterizzati ed omogenizzati e rimessi in stufa per 24h, prima di essere processati per l'analisi al CHN.

Il campione fissato con formalina viene utilizzato per le analisi quali- quantitative della comunità di zooplancton. Il campione viene filtrato sotto cappa e portato a volume noto concentrato in una coppa graduata con acqua di rubinetto, oppure acqua di mare filtrata (su filtri GF/F) e portato ad un volume noto (solitamente 200 ml).

Il campione viene poi rimescolato accuratamente mediante una siringa graduata tipo pipetta di Stempel, con la quale si effettuano i subcampioni.

Ogni sub-campione viene posto, con la pipetta, in una camera di conteggio mini-Bogorov da 10 ml. Per ogni sub-campione vengono identificati e contati tutti gli organismi zooplanctonici presenti. Viene contato un numero minimo di individui che sia statisticamente significativo per un intervallo di confidenza del 95% (generalmente ≥ 800 individui). Il resto del campione viene poi controllato per verificare la presenza di specie rare. 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. Alla fine si procede al calcolo dell'abbondanza della comunità espressa come individui metro cubo (ind. m⁻³). Lo stesso campione contato viene analizzato allo ZOOSCAN, per aggiungere all'informazione quali-quantitativa, anche quella relativa agli spettri di taglia degli organismi presenti nel campione.

3.2 QUALITY CONTROL

Come premesso, 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 and 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

3.2.1.1 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 i protocolli utilizzati per LTER-MC sono disponibili in forma sintetica 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 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 zooplancton.

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	Trasporto del campione dal forno alla bilancia in essiccatore con silicagel
Errori strumentali		Pulizia, taratura e manutenzione della bilancia	
Errori analitici		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)

3.2.1.2 *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.

3.2.1.3 *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.

3.2.1.4 *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% (CL_{95}) 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.

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 è stata richiesta la partecipazione ad esercizi di intercalibrazione per analisi qualitative e quantitative dei campioni, organizzati 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>). Queste organizzazioni sono preposte alla standardizzazione dei metodi per il Quality Assurance-Quality Control delle analisi di campioni biologici. La partecipazione al test include 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 è finalizzato all'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.

3.3 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. LWRDC 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.