

M. TARGUSI, V. MARUSSO, S. PORRELLO, F. BERTASI, T. BACCI, L. LATTANZI, D. VANI, B. LA PORTA, L. GROSSI, P. TOMASSETTI

ISPRA-Centro Nazionale Laboratori- Via del Fosso di Fiorano 64 - 00100 Roma  
monica.targusi@isprambiente.it

## **CONFRONTI INTERLABORATORIO: UNO STRUMENTO PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ DEI DATI DI MONITORAGGIO NAZIONALI**

### **INTERLABORATORY COMPARISONS: A TOOL FOR QUALITY CONTROL OF NATIONAL MONITORING DATA**

**Abstract** - *In the absence of specific national intercalibration programs, in 2019 and 2020, the Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) organized the first national interlaboratory comparison (CI) for the Regional Agencies for Environmental Protection (ARPA). The goal was to increase the robustness of data and scientific methods by providing a contribution to improve the quality of data produced in the context of environmental monitoring. This activity is aimed at assessing the ecological status of Italian coastal marine waters in accordance with the EU Marine Directives*

**Keywords:** *macrozoobenthos, interlaboratory comparisons, marine monitoring*

**Introduzione** – La valutazione dello stato ecologico attraverso l'analisi delle comunità macrozoobentoniche viene effettuata da operatori specializzati ed avviene attraverso la raccolta degli organismi dai sedimenti campionati (smistamento o sorting) e la successiva identificazione e conteggio degli esemplari raccolti. Tali analisi presentano elementi di soggettività legati per lo più all'esperienza degli operatori; ne consegue che la corretta esecuzione delle suddette analisi ha un'influenza determinante sull'attendibilità della classificazione dello stato ecologico di tali ambienti. Per garantire e controllare la qualità dei dati prodotti ogni Laboratorio dovrebbe dotarsi di strumenti di controllo, sia interni che esterni. I Confronti Interlaboratorio (CI) sono uno degli strumenti fondamentali di controllo esterno della qualità dei dati (UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010). In Italia, contrariamente a quanto avviene in alcuni Paesi del Nord Europa ([www.nmbaqcs.it](http://www.nmbaqcs.it); Shilling *et al.*, 2006), non esistono iniziative tecniche o programmi per il controllo e l'assicurazione di qualità dei dati di macrozoobenthos marino prodotti dai laboratori. In tale contesto nel 2019 (e anche nel 2020) il Laboratorio di Ecologia del Benthos (LEB) dell'ISPRA ha organizzato il primo confronto interlaboratorio (CI) nazionale per le Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA) con l'obiettivo, oltre che testare le capacità analitiche dei laboratori coinvolti, anche di armonizzare i sistemi di monitoraggio nazionali, come richiesto dalla legge istitutiva del Sistema Nazionale Protezione dell'Ambiente (Legge SNPA 132/2016) (ISPRA, 2020; 2022). Il D.Lgs 152/06 e s.m.i. individua nelle comunità macrozoobentoniche di fondi mobili uno degli Elementi di Qualità Biologica (EQB) per classificare lo stato ecologico degli ambienti marino costieri e la valutazione e il monitoraggio nazionale utile ai fini di tale classificazione sono affidati agli Operatori delle ARPA.

In questo lavoro vengono riportati e discussi il protocollo sviluppato per l'organizzazione dei due CI (rispettivamente ISPRA IC046 e ISPRA IC052) e la metodologia applicata alla valutazione e comparazione dei risultati ottenuti dai partecipanti. Scopo del lavoro è individuare le criticità associate all'organizzazione di un CI e identificare e quantificare

efficacemente diverse tipologie di errori che possono insorgere durante l'analisi dei campioni di macrozoobenthos negli studi di monitoraggio ambientale.

**Materiali e metodi – a) Protocollo:** In entrambe i CI le prove di smistamento ed identificazione sono state tenute separate tra loro, così come le prove di identificazione di ciascuno dei 4 *taxa* principali (molluschi, policheti, crostacei ed echinodermi). Il primo CI (ISPRA IC046) si è tenuto in presenza, a Roma presso il LEB. Ad ogni partecipante è stato fornito uno stereomicroscopio 40X e un microscopio ottico 1000X. Per eseguire la prova di smistamento (prelievo e conteggio di organismi da un campione di sedimento marino appositamente preparato) gli operatori hanno avuto a disposizione 45 minuti e, per l'identificazione tassonomica, 60 minuti per ciascun *taxon*. Gli operatori hanno potuto utilizzare la propria letteratura di riferimento e i propri strumenti per manipolare o sezionare gli organismi. Per il secondo CI (ISPRA IC052), i campioni per lo smistamento e l'identificazione sono stati inviati agli operatori, che hanno avuto a disposizione 3 mesi per analizzare i campioni nei propri laboratori. In entrambi i CI, ad ogni operatore è stato assegnato un codice di identificazione (ID) che ha permesso di associare in modo univoco e anonimo i risultati prodotti. Sia per l'ISPRA IC046 che per l'ISPRA IC052 i campioni di macrozoobenthos sono stati preparati dal personale del LEB di ISPRA.

**b) Metodologia** - Per valutare la capacità dell'operatore di rimuovere gli organismi dal sedimento durante il sorting, sono stati preparati campioni uguali di sedimenti marini (campione *spike*). In ogni campione è stato aggiunto lo stesso numero di organismi, appartenenti a policheti, molluschi, crostacei ed echinodermi. Per l'analisi dei dati, il numero totale di organismi estratti da un operatore (NOP) è stato confrontato con il numero di riferimento (NR), quindi sono state calcolate le deviazioni percentuali (D%) espresse in valore assoluto (Castelli *et al.*, 2003) secondo la seguente formula:

$$D\% = |[(NOP - NR)/NR]| * 100$$

Per valutare la capacità dell'operatore di identificare correttamente gli organismi, sono stati utilizzati campioni ciechi. Per ciascuno dei quattro *taxa* macrozoobentonici indagati il LEB ha preparato un campione di prova composto da 5 specie, un esemplare per specie. Le specie selezionate avevano ampia distribuzione geografica (Relini, 2008; 2010), stesso sesso (se presente dimorfismo sessuale) e stesso stadio di sviluppo e dimensione, per fornire agli operatori campioni il più possibile simili. Per standardizzare la nomenclatura, agli operatori è stato chiesto di utilizzare il database del World Register of Marine Species (WoRMS) ([www.marine-species.org](http://www.marine-species.org)) Per l'analisi dei dati dei campioni ciechi la differenza tra le specie di riferimento (LR) fornite dal LEB e le specie identificate da ciascun operatore (LOP) è stata misurata con l'Indice di Dissimilarità Tassonomica  $\Gamma^+$  (Clarke *et al.*, 2006), secondo la seguente formula:

$$\Gamma^+ = \left( \sum_{i=1}^{S_{LR}} \min_j \{ \omega_{ij} \} + \sum_{j=1}^{S_{LOP}} \min_i \{ \omega_{ij} \} \right) / (S_{LR} + S_{LOP})$$

$S_{LR}$  = numero di specie in LR,  $S_{LOP}$  = numero di specie in LOP,  $i$  =  $i$ -esima specie di  $S_{LR}$ ,  $j$  =  $j$ -esima specie di  $S_{LOP}$ ,  $\omega_{ij}$  = distanza tassonomica tra le specie  $i$  e  $j$ .

Questo indice permette di misurare la dissimilarità tra due liste di specie e di confrontare il loro disaccordo tassonomico, sulla base della presenza/assenza dei *taxa*. Questo disaccordo, derivante da un diverso grado di errori di identificazione, può assumere

valori da 0 (nessuna differenza) a 100 (differenza completa). Le distanze tassonomiche sono state calcolate per ogni *taxon* secondo il numero di livelli tassonomici presenti in WoRMS. Il valore della distanza tassonomica  $w_{ij}$  è massimo (100) in caso di massima distanza filogenetica tra le specie del LR e quelle del LOP, mentre è minimo (zero) in caso di perfetto accordo. L'indice di dissimilarità  $\Gamma^+$  è stato calcolato utilizzando il software Primer 6.1. In questo lavoro, il disaccordo tassonomico dei dati oggetto di valutazione viene calcolato mediante l'indice  $\Gamma^+$  indipendentemente per ciascuna specie. Il valore medio tra i valori di  $\Gamma^+$  ottenuti è utilizzato nel controllo di qualità dei risultati ottenuti nell'identificazione. Per ogni indice selezionato sono state identificate soglie di accettabilità sulla base del giudizio esperto, della letteratura (Castelli *et al.*, 2003) e di altri confronti interlaboratorio (Hall, 2010). In Tab. 1 sono riportate le soglie di accettabilità di ciascun CI.

Tab. 1 - Soglie di accettabilità per le prove di smistamento e identificazione tassonomica nei CI ISPRA  
*Acceptability thresholds for sorting and taxonomic identification tests in ISPRA CIs*

	<b>ISPRA IC046</b> <b>Valore indice</b>	<b>ISPRA IC052</b> <b>Valore indice</b>	<b>Risultato valutazione</b>
Prova di smistamento	D% ≤ 10	D% ≤ 10	Accettabile
	10 < D% ≤ 20	10 < D% ≤ 15	Discutibile
	D% > 20	D% > 15	Non accettabile
Prova di identificazione	$\Gamma^+ \leq 10$	$\Gamma^+ \leq 10$	Accettabile
	$10 < \Gamma^+ \leq 20$	$10 < \Gamma^+ \leq 15$	Discutibile
	$\Gamma^+ > 20$	$\Gamma^+ > 15$	Non accettabile

**Risultati** - Per la prova di smistamento, in ISPRA IC046 solo il 9,1% degli operatori ha ottenuto un risultato accettabile, mentre in ISPRA IC052 l'83,4% ha ottenuto un risultato accettabile. Per la prova di identificazione in ISPRA IC046 i gruppi tassonomici più critici sono stati i crostacei (60% Accettabile; 40% Discutibile) e gli echinodermi (44,4% Accettabile, 33,3% Discutibile, 22,2% Non accettabile). In ISPRA IC052 tutti gli operatori coinvolti hanno ottenuto risultati accettabili nella prova di identificazione. Dai risultati dei CI sono stati identificati tre diversi tipi di errori: 1) errata identificazione tassonomica a livello uguale o superiore alla Famiglia (es: *Echinocyamus pusillus* (O.F. Müller, 1776) identificato come *Neolampas rostellata* A. Agassiz, 1869); 2) mancanza di risoluzione tassonomica (es: *Pseudoleiocardia fauveli* Harmelin, 1964 identificata come Capitellidae sp.); 3) errata identificazione tra specie congeneriche (es: *Ampelisca typica* (Spence Bate, 1857) identificata come *Ampelisca anophthalma* Bellan-Santini & Kaim-Malka, 1977).

**Conclusioni** - I diversi risultati ottenuti nei due CI possono essere attribuiti al tempo limitato concesso per l'esecuzione delle prove in ISPRA IC046. La scelta di tenere separati smistamento e identificazione ha permesso ai partecipanti di scegliere la combinazione di prove a cui partecipare il più possibile aderenti all'effettivo lavoro di analisi svolto presso il laboratorio. Ciò ha inoltre consentito di adottare indici specifici per ciascuna prova che permettessero di quantificare le prestazioni dei partecipanti secondo obiettivi predefiniti. Nella prova di sorting è stata scelta la Deviazione percentuale (D%) come indice quantitativo per rilevare le discrepanze nelle prestazioni degli operatori nell'estrarre dal sedimento gli organismi per la successiva identificazione.

Nella prova di identificazione è stato scelto l'indice di dissimilarità tassonomica  $\Gamma^+$ . Questo indice è una naturale estensione della dissimilarità di Bray-Curtis applicata ai dati di presenza/assenza e si propone come un indice valido per confrontare i risultati qualitativi tra due campioni che differiscono per l'identificazione tassonomica non coerente. L'indice  $\Gamma^+$  permette di attribuire un peso diverso agli errori commessi nell'identificazione in base alla distanza tassonomica dalla specie di riferimento e di evidenziare a quale livello tassonomico sorgono i problemi, consentendo di affrontarli con precisione. Poiché in ISPRA IC052 gli operatori disponevano di condizioni più agevoli per analizzare i campioni rispetto ad ISPRA IC046, sono stati adottati valori soglia più conservativi. Gli errori commessi nella prova di sorting, di sovrastima e sottostima degli organismi, possono essere imputati per lo più alla mancanza di esperienza. Per quanto riguarda la prova di identificazione, la letteratura obsoleta o carente, la mancanza di esperienza e di formazione tecnico-scientifica specifica sono le principali cause dei risultati osservati. Per questi motivi, e sulla base di una discussione diretta con gli operatori, ISPRA ha avviato l'organizzazione di corsi di formazione specifici relativi sia all'attività di sorting degli organismi macrozoobentonici che all'identificazione dei principali *taxa*. I Confronti Interlaboratorio organizzati dall'ISPRA rappresentano la prima esperienza nazionale di armonizzazione dei metodi di analisi delle comunità macrozoobentoniche di fondi mobili e hanno permesso di individuarne i punti di forza e di debolezza e di attuare azioni correttive specifiche a vantaggio della qualità dei dati prodotti nell'ambito dei programmi di monitoraggio marino.

#### Bibliografia

- CASTELLI A., LARDICCI C., TAGLIAPIETRA D. (2003) - Il macrobenthos di fondo molle. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds), *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo*. *Biol. Mar. Mediterr.*, **10** suppl: 109-144.
- CLARKE K.R., SOMERFIELD P.J., CHAPMAN M.G. (2006) - On resemblance measures for ecological studies, including taxonomic dissimilarities and a zero-adjusted Bray-Curtis coefficient for denuded assemblages. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.*, **330**: 55-80.
- HALL D.J. (2010) - National Marine Biological Analytical Quality Control Scheme. Description of Scheme Standards for the Benthic Invertebrate Component from Scheme Year 8 (2001/02). Report to the NMBAQC (NE Atlantic Marine Biological Analytical Quality Control) Scheme participants: 4pp.
- ISPRA (2020) - Macroinvertebrati bentonici marini: primo Confronto Interlaboratorio Nazionale in ambito SNPA (ISPRA-IC046). Rapporto ISPRA 332/2020: 1-56.  
<https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/macroinvertebrati-bentonici-marini-primo-confronto-interlaboratorio-nazionale-in-ambito-snpa>
- ISPRA (2022) - Macroinvertebrati bentonici marini: secondo Confronto Interlaboratorio Nazionale in ambito SNPA (ISPRA-IC052). Rapporto ISPRA 376/2022: 1-68.  
<https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/macroinvertebrati-bentonici-marini-secondo-confronto-interlaboratorio-nazionale-in-ambito-snpa-ispra>
- RELINI G. (2008) - Checklist della flora e della fauna dei mari italiani. Prima Parte. *Biol. Mar. Mediterr.*, **15** (suppl. 1): 1-385.
- RELINI G. (2010) - Checklist della flora e della fauna dei mari italiani. Seconda Parte. *Biol. Mar. Mediterr.*, **17** (suppl.1): 387-828.
- SCHILLING P., POWILLEIT M., UHLIG S. (2006) - Macrozoobenthos interlaboratory comparison on taxonomical identification and counting of marine invertebrates in artificial sediment samples including testing various statistical methods of data evaluation. *Accred. Qual. Assur.* **11**: 422- 429. DOI 10.1007/s00769-006-0139-3
- UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 Valutazione della conformità - Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio.