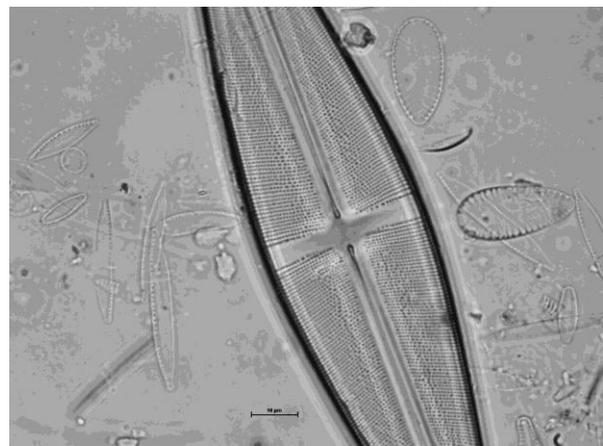




**PROVA VALUTATIVA INTERLABORATORIO
ISPRA-IC030**
“Identificazione tassonomica delle diatomee bentoniche –
Metodo ICMi”

C. Martone, S. Balzamo, S. Barbizzi, P. De Zorzi
Servizio di Metrologia Ambientale
Roma, 30 novembre 2015



Gruppo di Progetto :

Stefania Balzamo (ISPRA, AMB-LAB)

Sabrina Barbizzi (ISPRA, AMB-LAB)

Paolo de Zorzi (ISPRA, AMB-LAB)

Teresa Guagnini (ISPRA, AMB-LAB)

Cristina Martone (ISPRA, AMB-LAB)

Maia Gabriella Simeone (ISPRA, AMB-LAB)

Hanno partecipato come esperti al Progetto:

Camilla Puccinelli, Laura Mancini (ISS, Dipartimento Ambiente e connessa prevenzione primaria)

Maurizio Battezzatore (ARPA Piemonte, Dipartimento di Cuneo)



Normativa di riferimento

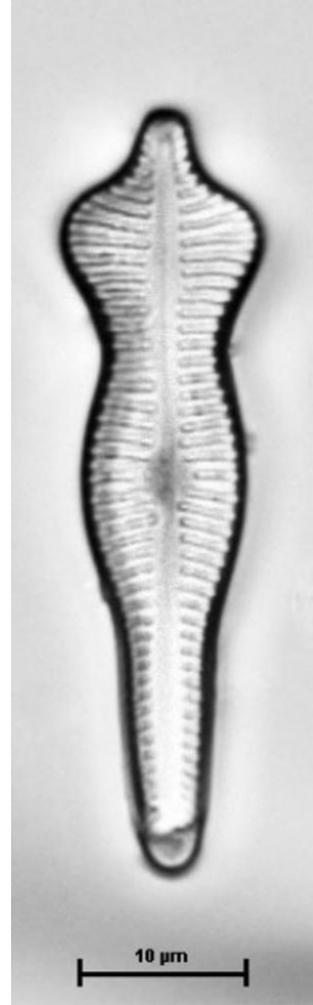
Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Official Journal L327 del 22 Dicembre 2000:1-72.

Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 e decreti attuativi

ISO 13528:2005 (E) "Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparisons"

ISO/IEC 17043:2010 "Conformity assessment – general requirements for proficiency testing"

EN 14996:2006 "Qualità dell'acqua – Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment".



Normativa di riferimento

UNI EN 14996 - Qualità dell'acqua - Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

Variabili:

- caratteristiche dei gruppi tassonomici
- n° di osservazioni e misurazioni e loro distribuzione statistica
- rappresentatività spaziale e temporale dei campioni
- accuratezza delle guide di identificazione
- Etc

Applicabile a:

- monitoraggio e campionamento
- analisi ed identificazione
- validazione
- interpretazione dei dati e reporting
- formazione del personale

Riferibilità dei risultati dei metodi biologici

- Organizzazione interconfronti (giornate di intercalibrazione regionali, nazionali ed europee)
- Studi collaborativi
- Eventi formativi regionali e nazionali
- Produzione di atlanti per l'identificazione
- Scambio di campioni con gli esperti per referaggio

Obiettivi

Monitoraggio delle acque interne

Obiettivo generale per i metodi biologici

Garantire la comparabilità nel tempo dei dati prodotti dai diversi laboratori tramite utilizzo di metodi analitici ufficiali, uso di materiali di riferimento e partecipazione a circuiti di interconfronto

... in particolare

valutare le prestazioni degli operatori nell'applicazione della fase finale della metodica di analisi della comunità diatomea dei corsi d'acqua, in particolare sull'identificazione tassonomica delle diatomee bentoniche delle acque superficiali e sull'applicazione del Metodo ICMi.

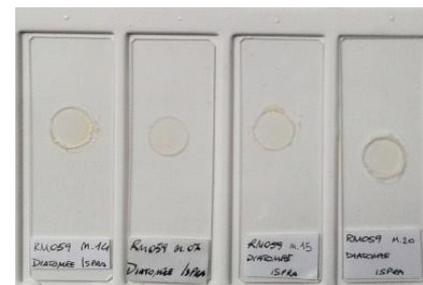
Percorso effettuato per rispondere all'obiettivo

- Pubblicazione della metodica ufficiale di campionamento ed analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua 'Metodi Biologici per le acque superficiali interne'. ISPRA, Manuali e Linee Guida 111/2014. Metodo ICMi Rapporto ISTISAN 2009.
- Primo esercizio effettuato a Roma presso ISS nel 2011 "Interconfronto sull'identificazione tassonomica delle diatomee bentoniche delle acque superficiali e sull'applicazione del Metodo ICMi (Intercalibration Common Metric Index)". ISPRA, Rapporti 157/2012
- Sito web tematico e pubblicazione 'Atlante delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua italiani'. ISPRA, Manuali e Linee Guida 110/2014.
- Confronto Interlaboratorio 2015

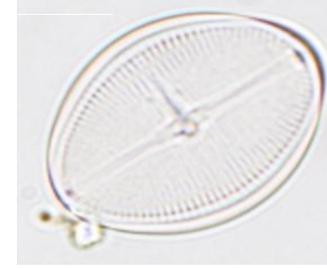


IC030_Materiale di prova

- Il Servizio di Metrologia Ambientale di ISPRA, per la prima volta nell'ambito dei Circuiti interlaboratorio, ha prodotto un materiale di riferimento specifico per le analisi nel campo del monitoraggio biologico dei fiumi che è stato messo a disposizione a titolo gratuito al sistema delle agenzie ambientali per poter partecipare al confronto interlaboratorio IC030.



- Tale materiale di prova, denominato ISPRA-RM059 è costituito da frustuli di diatomee fissati su vetrini permanenti, montati con una resina ad alto indice di rifrazione. Ciascun vetrino è stato identificato univocamente da un codice numerico progressivo.



IC030_Materiale di prova

- Le procedure di campionamento e preparazione del campione hanno seguito le indicazioni riportate nella metodica ufficiale (MLG 111/2014). Le analisi di laboratorio sono state eseguite nel rispetto delle procedure per il controllo di qualità.
- Tutti i vetrini permanenti utilizzati per l'esercizio sono stati preparati a partire da un'unica diluizione del campione ossidato



IC030_ Disegno sperimentale

- Distribuzione del materiale di prova e del protocollo ai laboratori partecipanti
Al confronto hanno partecipato 27 laboratori, a ciascuno dei quali è stato consegnato un vetrino, debitamente codificato, facente parte della serie costituente il materiale RM059.
- I dati sperimentali, costituiti dalle liste tassonomiche e dai valori calcolati di ICMi, unitamente ad alcune informazioni relative alle procedure di misura utilizzate (microscopi, software utilizzato per il calcolo dell'ICMi, guide di identificazione), sono stati restituiti dai laboratori partecipanti all'organizzatore mediante la "Scheda dei Risultati".

IC030_ Valutazione dei dati

Il valore assegnato a ciascuno dei 27 vetrini corrisponde al valore calcolato di ICMi basato sui dati di identificazione e conteggio di un totale di circa 400 taxa di diatomee per ogni vetrino.

$$ICMi = \frac{(RQE_IPS + RQE_TI)}{2}$$

$$IPS_5 = \frac{\sum_{j=1}^n a_j \cdot I_j \cdot S_j}{\sum_{j=1}^n a_j \cdot I_j}$$

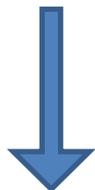
$$TI = \frac{\sum_{j=1}^n a_j \cdot G_j \cdot TW_j}{\sum_{j=1}^n a_j \cdot G_j}$$

I valori di riferimento ICMi dei singoli vetrini sono stati ottenuti sulla base delle letture condotte da tre operatori esperti ISPRA/ISS/ARPA Piemonte

IC030_ Valutazione dei dati

Valori Laboratori

Problematiche emerse con dati originali



Ricalcolo valori di ICMi da parte degli organizzatori delle 27 liste tassonomiche in base ai valori di IPS e TI con il software OMNIDIA (2015) corretto

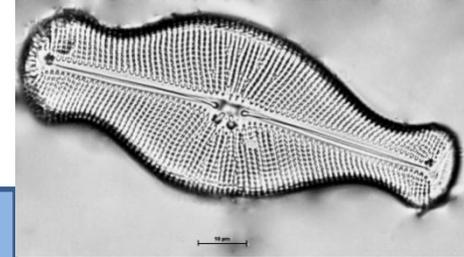
Classe di qualità

ICMi Laboratori 19 scarso, 4 limite, 3 sufficiente

Valore assegnato ICMi=0.54, Scarso

Tabella 6. Limiti di classe per gli stati Elevato e Buono (E/B), Buono e Sufficiente (B/S) Sufficiente e Scarso (S/S) e Scarso e Cattivo (S/C) per i diversi macrotipi fluviali

Macrotipi	E/B	B/S	S/S	S/C
A1	0,87	0,70	0,60	0,30
A2	0,85	0,64	0,54	0,27
C	0,84	0,65	0,55	0,26
M1-M2-M3-M4	0,80	0,61	0,51	0,25
M5	0,88	0,65	0,55	0,26



IC030_ Elaborazione statistica e criteri di valutazione dell'accettabilità dei risultati

La valutazione dell'accettabilità dei dati di ciascun operatore è stata effettuata sulla base dei punteggi di z-score calcolati secondo l'Equazione 1.

z-score

$$\frac{X_{LAB} - X_{RM}}{\hat{\sigma}}$$

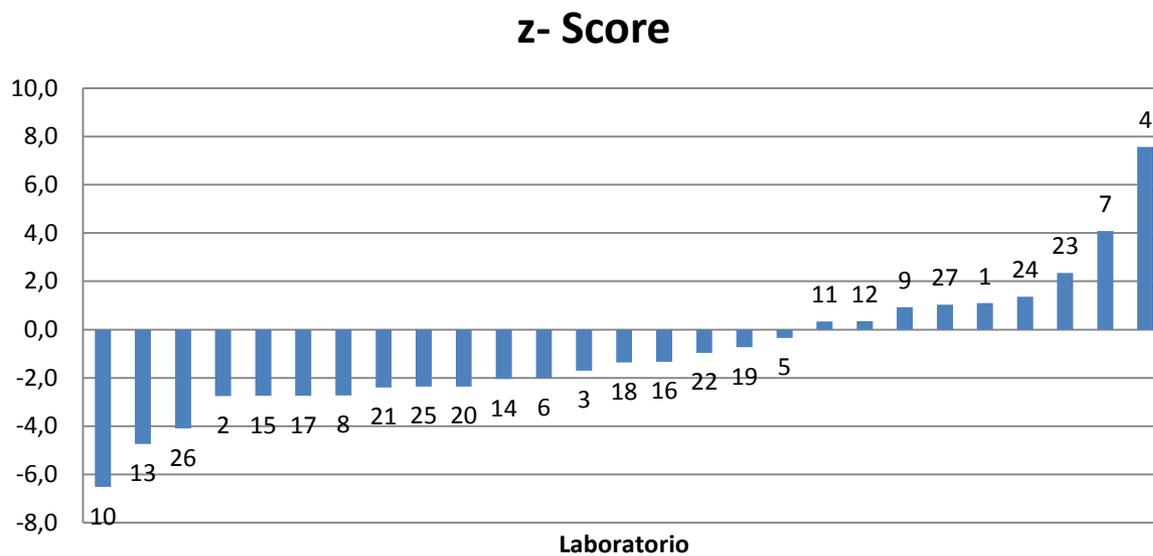
(Equazione 1)

criteri di accettabilità degli z-score
norma ISO 13528:2005

$ z $	≤ 2	Accettabile
$2 < z $	≤ 3	Discutibile
$ z $	> 3	Non Accettabile



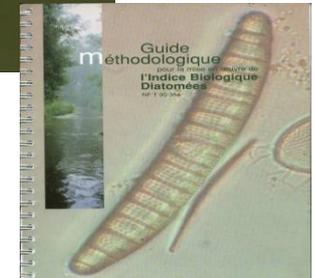
valori z- score conseguiti da ciascun operatore/laboratorio partecipante



Stato dell'arte su metodi di misura e strumentazione

Metodi di misura e strumentazione

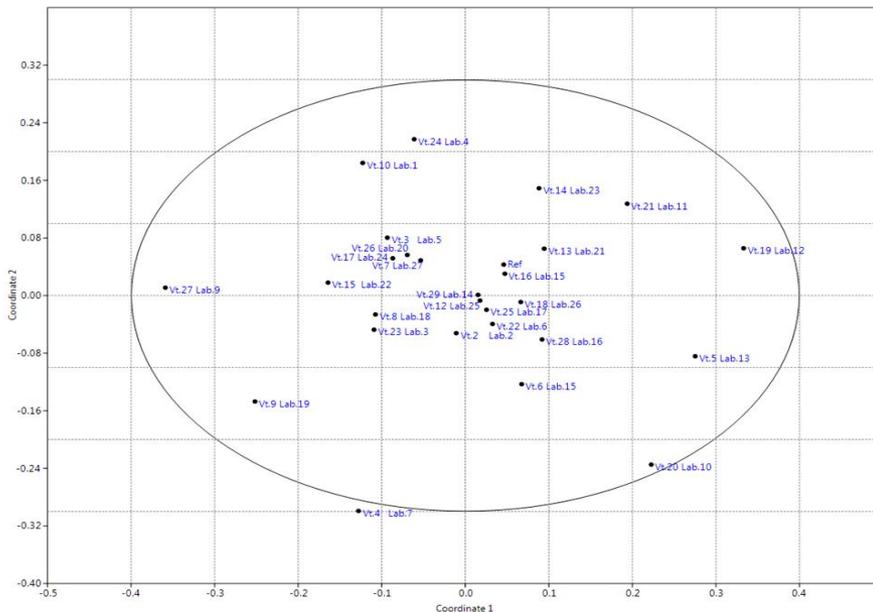
Microscopio	Nikon Eclipse E600, Leitz dialux 20, Zeiss Axio Scope A1 (software acquisizione e misurazione: Zeiss Axio Vision 4.0), Nikon Eclipse E400 (obiettivo 100x plan 1,25), Lietz Orthoplan, Nikon Eclipse 80i (obiettivo 100X Plan 1.25), Zeiss Imager A1 con DIC - Obiettivo Plan - Apo 1,4, Olympus BX60, Leica DMLS, LEICA DM2500, Motic BA4.
Ingrandimenti	1000x 100x
Contrasto di fase	Si, per 25 laboratori su 27
Guide di identificazione	<p>Hoffmann, Werum & Lange-Bertalot (2013). <i>Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa</i>. Krammer & Lange-Bertalot H. (1991a,1991b,1986,1988,2000, 2003). Bey M.-Y. & Ector L. (2013) Atlas des diatomées des cours d'eau de la région Rhône-Alpes. ISBN 978-2-11-129817-0.</p> <p>Manuale e Linea Guida ISPRA n. 100, 2014.</p> <p>Krammer: Die cymbelloiden Diatomeen, Bibliotheca Diatomologica, Cramer 1997 Lange-Bertalot H., 2001, 2002.</p> <p>Falasco, Piano, Bona. 2013. Guida al riconoscimento e all'ecologia delle principali diatomee fluviali dell'Italia nord occidentale.</p> <p>Trobajo R., Rovira L., Ector L., Wetzel C.E., Kelly M., & Mann D.G. 2013. Morphology and identity of some ecologically important small <i>Nitzschia</i> species. <i>Diatom Research</i> Vol. 28, No. 1: 37–59.</p> <p>Taylor J.C., Harding W.R. & Archibald C.G.M. (2006) An Illustrated Guide to Some Common Diatom Species from South Africa ;</p> <p>Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de L'indice biologique Diatomées NF T 90-354.</p> <p>Diatoms of Europe, 2000-2001-2002.</p> <p>Guide d'identification des diatomees des rivieres de l'est du Canada, 2008.</p> <p>Tudesque, Rimet, Ector, 2008 . A new taxon of the section <i>Nitzschiae lanceolatae</i> Grunow: <i>Nitzschia costei</i> sp. nov. Compared to <i>N.fonticola</i> Grunow, <i>N.macedonica</i> Hustedt, <i>N.tropica</i> Hustedt and related species. <i>Diatom Research</i>, Vol.23 (2), 483-501.</p> <p>Kelly M., Trobajo R., Rovira L. & Mann D.G. , 2014. Charaterizing the niches of two very similar <i>Nitzschia</i> species and implications for ecological assessment. <i>Diatom Research</i> "</p>
Foglio di calcolo	<p>Foglio calcolo interno predisposto dal laboratorio utilizzando l'elenco delle diatomee fornito da ISS (aggiornamento 2012); Foglio di calcolo interno predisposto dal laboratorio ed elaborato sulla base dei valori indicatori per IPS e TI di Omnidia 5.3 aggiornamento 2014; Software ISS 2013; Software ISS 2013; OMNIS 7 Versione 8.1 (Database Lista Specie aggiornato al 2014); OMNIDIA 2015; OMNIDIA Versione 5.3 - aggiornamento data base 2015; OMNIDIA Versione 5.4 aggiornamento data base 2015; OMNIDIA 2014 Versione 5.5; OMNIDIA 2015 Versione 5.5; OMNIDIA Versione 5.5 - aggiornamento data base 01/03/2014.</p>



12 laboratori hanno utilizzato il software OMNIDIA con differenti aggiornamenti;
11 laboratori hanno utilizzato il software ISS con differenti aggiornamenti;
4 laboratori hanno utilizzato fogli di calcolo da loro predisposti.

Composizione tassonomica

L'analisi multivariata di ordinamento N-mDS ha mostrato che la maggior parte dei laboratori ha effettuato identificazioni e conteggi simili tra loro e vicini alla lista di riferimento



-156 taxa di diatomee, di cui il 28% costituito rappresentato da taxa osservati una tantum da singoli operatori

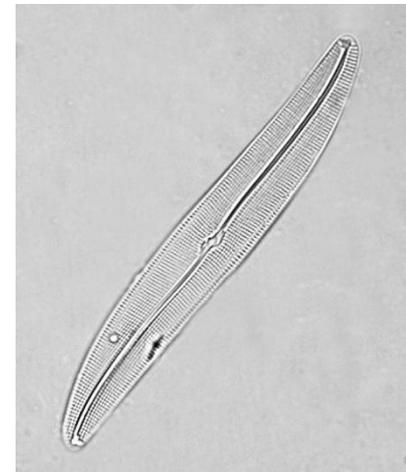
-Il numero di specie identificate da ciascun operatore durante il conteggio è variato da un minimo di 19 ad un massimo di 43.

-La quasi totalità dei partecipanti, in accordo con i risultati della lista di riferimento, ha riconosciuto come dominanti le due specie *Sellaphora semilunum* e *Eolimna minima*.

-Altre specie più abbondanti nel campione e conteggiate dalla maggior parte degli operatori sono: *Rhoicosphenia abbreviata*, *Mayamaea permitis*, *Planothidium frequentissimum*, *Planothidium lanceolatum*

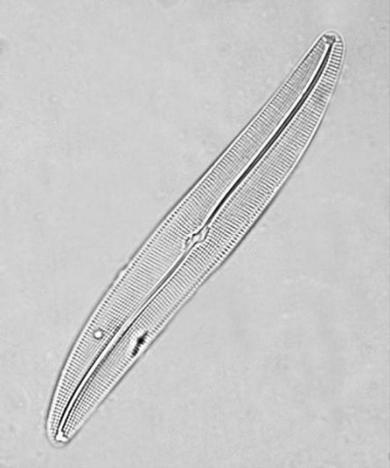
Conclusioni

- Il giudizio sulle prestazioni degli operatori partecipanti è generalmente positivo, essendo maggioritario il numero di operatori che ha raggiunto un valore di z-score inferiore a 3, con 14 risultati che rientrano nei limiti di 'accettabilità', 8 rientrano tra i 'discutibili' e 5 risultano 'non accettabili'
- azioni di aggiornamento e condivisione continui sia per quanto riguarda le guide iconografiche che per i software di calcolo nell'ottica di ottenere una standardizzazione e garantire una effettiva comparabilità del dato finale.



Conclusioni

- ISPRA indicherà su SINTAI qual è l'ultima versione disponibile
- A valle di questo primo CI, organizzato seguendo lo schema classico ISPRA/ARPA/APPA e basato sulla valutazione della prestazione degli operatori tramite z-score, si ritiene opportuno prevedere lo sviluppo di una valutazione finale dei risultati integrata da elaborazioni applicabili alle indagini biologiche.



Grazie per l'attenzione

