

Progetto Ecosistema dell'innovazione ECS0000043
“Interconnected Nord-Est Innovation Ecosystem (iNEST)”
CUP F43C22000190006
BANDO PER IL FINANZIAMENTO DI PROGETTI DI RICERCA
destinato a giovani ricercatori

RELAZIONE FINALE

Nome e Cognome PI	Tommaso Diociaiuti
Titolo del progetto	(IF-MA) Implementazione della Flowcam per lo studio della comunità Microplanctonica del Nord Adriatico

Descrizione delle attività di progetto

Introduzione

Negli ultimi decenni, l'imaging analysis si è affermata come uno degli approcci più innovativi e promettenti nelle scienze biologiche e ambientali, grazie alla sua capacità di convertire osservazioni visive in dati quantitativi strutturati, riproducibili e scalabili. L'evoluzione delle tecnologie ottiche, unita all'incremento della capacità computazionale e allo sviluppo di algoritmi avanzati di elaborazione delle immagini, ha consentito la realizzazione di sistemi automatizzati in grado di acquisire e analizzare grandi volumi di dati con elevata risoluzione spaziale e temporale [1,2].

In questo contesto, questa metodica ha progressivamente superato il ruolo di semplice supporto alla microscopia tradizionale, affermandosi come strumento quantitativo a pieno titolo. L'estrazione automatizzata di descrittori morfometrici e ottici ha aperto la strada ad un approccio trait-based nello studio degli organismi: dimensione, forma, trasparenza e struttura diventano variabili ecologiche misurabili e utilizzabili per interpretare le strutture delle comunità e i processi ecosistemici [3]. Tuttavia, recenti studi evidenziano come una delle principali sfide rimanga la standardizzazione dei metodi e delle impostazioni informatiche da utilizzare durante la raccolta delle immagini e la produzione del dato, infatti, nonostante il loro grande potenziale, la mancanza di standardizzazione nelle pipeline di analisi dei dati può compromettere la comparabilità tra studi e strumenti differenti [1]. Questo a sottolineare come l'efficacia dell'imaging analysis dipenda non solo dalle prestazioni hardware, ma anche dalla robustezza dell'intero workflow analitico.

L'applicazione dell'imaging analysis allo studio del plancton, rappresenta uno dei campi in cui tali tecnologie hanno trovato maggiore applicazione. Il plancton costituisce una componente fondamentale degli ecosistemi marini, svolgendo un ruolo chiave nei cicli biogeochimici e nei flussi di energia tra i diversi livelli trofici. In particolare, il microplancton (20–200 μm) include una vasta gamma di organismi autotrofi, eterotrofi e mixotrofi, tra cui diatomee, dinoflagellati, ciliati e larve di metazoi, che contribuiscono in modo significativo alla produzione primaria e al riciclo della materia organica. Le diatomee, ad esempio, sono responsabili di una quota sostanziale della produzione primaria marina globale, mentre le componenti eterotrofe e mixotrofe regolano i processi di trasferimento del carbonio e il funzionamento della rete trofica microbica [4,5].

La complessità strutturale e funzionale delle comunità planctoniche, unita alla loro elevata variabilità spaziotemporale, rende particolarmente difficile il loro studio mediante tecniche tradizionali. La microscopia ottica, pur rappresentando il metodo di riferimento per l'identificazione tassonomica, richiede tempi di analisi elevati ed è soggetta a variabilità inter-operatore, mentre le tecniche molecolari, più rapide, non forniscono informazioni quantitative affidabili sulla biomassa e sulla struttura dimensionale delle comunità [6]. In questo contesto, le tecnologie di imaging automatizzato si configurano come un approccio intermedio in grado di coniugare rapidità, standardizzazione e contenuto informativo, consentendo l'analisi quantitativa di grandi volumi di campione [2].

Tra queste tecnologie, FlowCAM rappresenta una delle piattaforme più diffuse e consolidate per l'analisi image-based del plancton. Il sistema combina i principi della citometria a flusso con quelli della microscopia digitale, acquisendo immagini ad alta risoluzione delle particelle sospese mentre queste transitano in una cella di flusso. Lo strumento consente di ottenere in modo automatico informazioni su dimensioni, forma e caratteristiche ottiche degli organismi, e, grazie all'integrazione con librerie di immagini e algoritmi di classificazione, permette una prima identificazione tassonomica automatizzata [7,8].

Numerosi studi hanno dimostrato l'elevata efficienza di FlowCAM nel rilevamento e nella quantificazione di singole specie in condizioni controllate, in particolare in colture monospecifiche di microalghe: l'omogeneità del campione e la ridotta variabilità morfologica consentono di ottenere elevate performance di classificazione e una buona correlazione con i metodi tradizionali [9,10]. Studi più recenti che integrano diverse tecniche di machine learning evidenziano come sia possibile raggiungere livelli di accuratezza molto elevati nella discriminazione di specie algali, soprattutto quando i modelli sono addestrati su dataset ben definiti e rappresentativi [11].

A tutt'oggi, la trasposizione di questi approcci allo studio delle comunità naturali rappresenta una sfida ancora aperta. Nei campioni ambientali, l'elevata diversità tassonomica, la presenza di specie rare, la sovrapposizione morfologica tra taxa e la presenza di particolato non biologico possono ridurre significativamente l'accuratezza dei sistemi di classificazione automatica. Studi recenti sottolineano come le prestazioni dei classificatori dipendano fortemente dalla qualità e dalla rappresentatività delle librerie di immagini utilizzate per l'addestramento, ed evidenziano l'importanza di sviluppare dataset regionali specifici e ben curati [12,13]. Inoltre, l'integrazione di metadati ambientali e l'utilizzo di approcci avanzati di apprendimento automatico rappresentano strategie promettenti per migliorare la discriminazione tra taxa e la capacità di identificare specie rare [12].

In questo contesto di rapida evoluzione metodologica si è inserito il progetto IF-MA, col proposito di testare e validare l'utilizzo della tecnologia FlowCAM imaging analysis per lo studio delle comunità microplanctoniche del Nord Adriatico. Quest'area rappresenta un sistema particolarmente complesso e dinamico, caratterizzato da forti gradienti ambientali e da una significativa influenza antropica, rendendola un banco di prova ideale per valutare l'efficacia di approcci innovativi di imaging analysis.

Il progetto IF-Ma mira a colmare il divario tra applicazioni consolidate su colture monospecifiche e utilizzo su comunità naturali complesse, attraverso lo sviluppo di protocolli operativi, la creazione di librerie di immagini

rappresentative delle specie e dei morfotipi caratteristici del Nord Adriatico e la validazione dei risultati mediante confronto con tecniche di microscopia classica.

L'implementazione di tali strumenti consentirà di ottenere dati ad alta risoluzione sulla biodiversità e sulla struttura della comunità microplanctonica e contribuirà a migliorare la comprensione dei flussi di carbonio e dei processi ecologici che regolano il funzionamento dell'ecosistema pelagico.

Il progetto IF-MA si inserisce pienamente nel contesto delle moderne strategie di osservazione ambientale ad alta risoluzione, contribuendo allo sviluppo di strumenti avanzati per il monitoraggio e la gestione sostenibile degli ecosistemi marini costieri, nonché al potenziamento di modelli integrati quali il Digital Twin del Nord Adriatico.

Attività svolte

Le attività sono state avviate con una fase preliminare di studio e ottimizzazione del funzionamento della strumentazione FlowCAM 8000. È stato analizzato in dettaglio il manuale operativo dello strumento [14], al fine di comprenderne le specifiche tecniche e le potenzialità applicative. Successivamente, sono state condotte una serie di corse di acquisizione preliminari finalizzate alla definizione dei parametri ottimali di acquisizione, con particolare attenzione alla densità del campione, alla velocità di flusso e alla scelta dell'obiettivo ottico. Tali parametri risultano determinanti per la qualità delle immagini acquisite e influenzano direttamente il fuoco, la risoluzione e la capacità di discriminare correttamente gli organismi microplanctonici.

Queste prime operazioni hanno consentito la raccolta di un set iniziale di immagini, utilizzato per la costruzione delle librerie di riferimento. Complessivamente sono state sviluppate 22 librerie, rappresentative dei principali morfotipi osservati nei campioni appositamente raccolti nel golfo di Trieste, che costituiscono la base per i processi di classificazione automatica.

Una volta completata la costruzione delle librerie, si è proceduto allo sviluppo di un modello per il riconoscimento tassonomico degli organismi. In questa fase sono emerse alcune criticità legate al software proprietario della FlowCAM: in particolare, lo strumento risultava limitato nella capacità di classificazione automatica, in quanto permetteva la predizione simultanea di un numero troppo ristretto di categorie (fino a cinque classi), insufficiente per descrivere la complessità delle comunità naturali. Inoltre, il formato proprietario delle immagini non permetteva un'agevole esportazione dei dati, limitandone la possibilità di integrazione con altri strumenti di analisi. Tali limitazioni sono state superate con l'implementazione di una pipeline alternativa basata sull'utilizzo del software ZooProcess [15], sviluppato presso l'Osservatorio Oceanologico di Villefranche-sur-Mer, che consente la conversione delle immagini in formato standard (JPEG) corredato da metadati. Le immagini così processate sono state successivamente importate nella piattaforma EcoTaxa, una repository internazionale per l'analisi e la classificazione di immagini planctoniche, che integra strumenti di machine learning per il riconoscimento tassonomico assistito [15]. Questa soluzione ha permesso di estendere la classificazione all'intera comunità, superando le limitazioni del software proprietario e migliorando la flessibilità e la scalabilità dell'analisi.

Una volta definita la pipeline di elaborazione del dato, si è passati alla fase sperimentale. I campioni sono stati raccolti nell'ottobre 2024 in 4 stazioni lungo un gradiente longitudinale dalla foce del fiume Isonzo (Fig. 1), in condizioni di elevato regime di scarico fluviale. Il disegno sperimentale ha previsto il campionamento mediante bottiglie Niskin, con successiva suddivisione dei campioni per analisi parallele: 1 L destinato alla microscopia classica e 2 L all'analisi mediante FlowCAM. Questo approccio ha consentito di confrontare le due metodologie per analizzare le variazioni strutturali della comunità planctonica lungo un gradiente ambientale.

Al fine di valutare l'influenza delle tecniche di campionamento sulla rappresentatività della comunità osservata, sono stati inoltre effettuati in prossimità della stazione IN4SBis (Fig. 1), prelievi mediante strumenti diversi (bottiglia

Niskin e retino orizzontale), permettendo così di testare la sensibilità dell'analisi rispetto alle modalità di raccolta del campione.

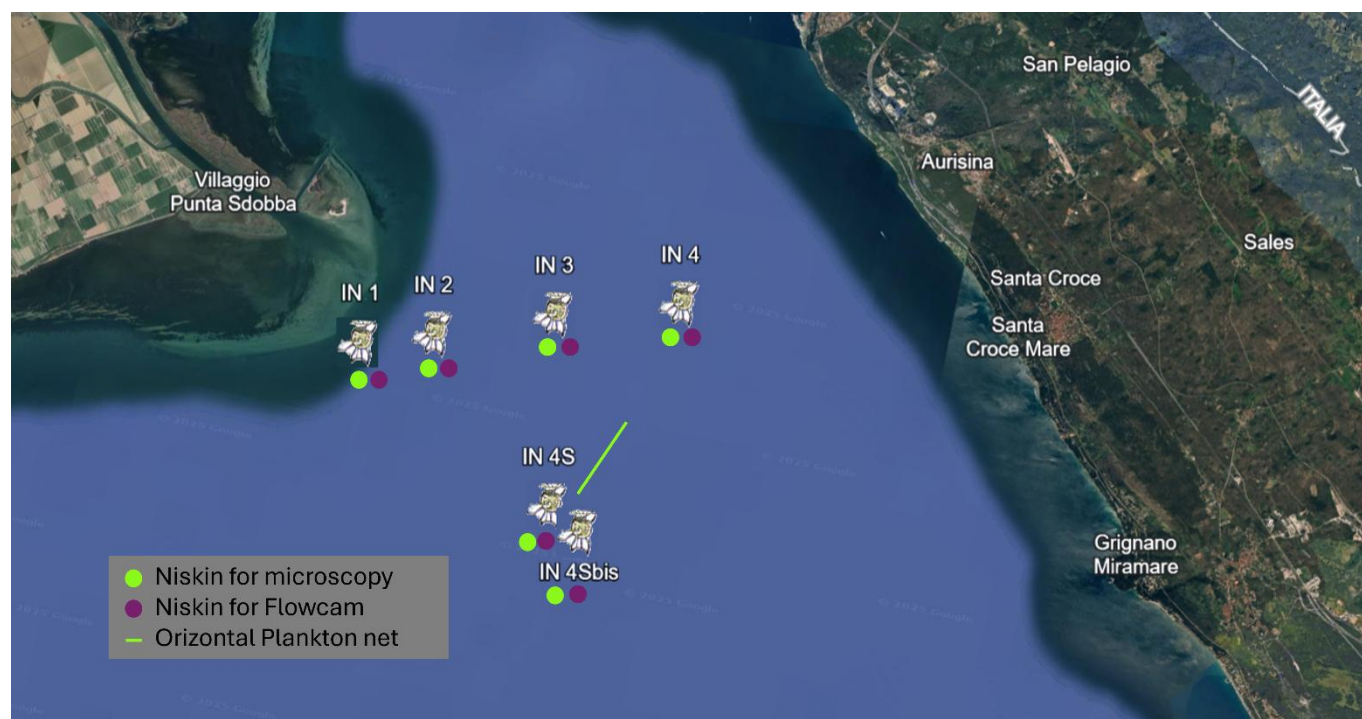


Fig. 1- Area di studio

I campioni destinati alla microscopia sono stati analizzati secondo il metodo di sedimentazione di Utermöhl [16], che rappresenta il riferimento standard per la quantificazione del microplancton. I campioni destinati all'analisi mediante FlowCAM sono stati invece sottoposti a una fase di pre-trattamento mediante concentrazione e filtrazione su rete da 10 μm , seguita da risospensione nel volume ottimale per l'acquisizione delle immagini.

Le immagini ottenute con FlowCAM sono state quindi elaborate mediante ZooProcess e successivamente caricate su EcoTaxa, dove è stato avviato il processo di classificazione tassonomica assistita da algoritmi di intelligenza artificiale. Al termine di questa fase, i dati sono stati esportati e sottoposti ad analisi statistica mediante approcci tradizionali e multivariati, al fine di confrontare i risultati ottenuti con le diverse metodologie e valutare l'affidabilità del nuovo approccio.

Collaborazioni e attività di disseminazione

Nel corso del progetto sono state inoltre sviluppate diverse attività di collaborazione e disseminazione scientifica. In particolare, sono stati organizzati quattro seminari di formazione sull'utilizzo della FlowCAM, rivolti al personale di laboratorio, con l'obiettivo di diffondere le conoscenze relative alla metodologia di imaging analysis e promuoverne l'utilizzo.

L'attività progettuale ha inoltre favorito l'avvio di collaborazioni con l'Area Marina Protetta di Miramare, nell'ambito di iniziative di divulgazione scientifica e di supporto alla ricerca. In questo contesto, lo strumento è stato

utilizzato anche a supporto di attività di ricerca nell'ambito del dottorato di Lara Fumarola (Università del Salento), finalizzate allo studio delle variazioni delle comunità microzooplanctoniche in presenza e assenza di bloom della medusa *Rhizostoma pulmo*.

Queste attività hanno contribuito a testare ulteriormente le potenzialità della metodologia in contesti ecologici differenti, confermando la versatilità ed affidabilità dello strumento e favorendo la diffusione di approcci innovativi basati sull'imaging analysis nello studio del plancton marino.

Risultati finali e impatto del progetto

Di seguito si riportano i risultati ottenuti confrontando le composizioni di comunità ottenute con il metodo di microscopia classica e con flowCAM, testando la sensibilità dello strumento ai diversi metodi di campionamento.

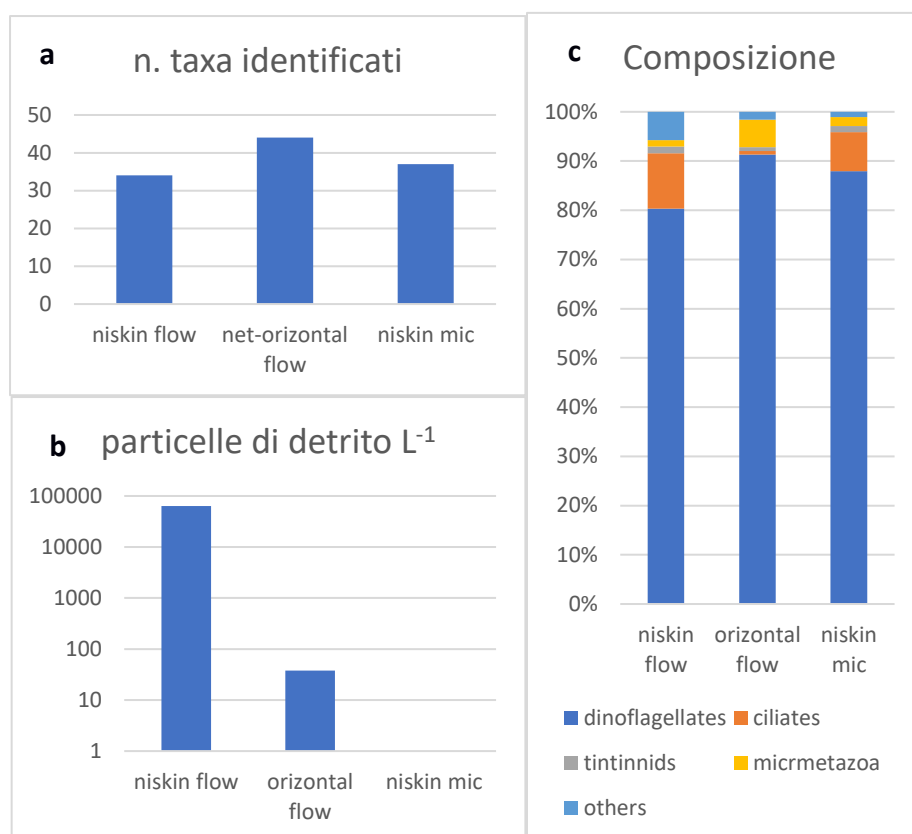


Fig. 2- Risultati ottenuti con diversi strumenti di campionamento negli studi preliminari in stazione IN4s

I campioni raccolti mediante bottiglia Niskin e analizzati con FlowCAM hanno evidenziato un contenuto di particellato (materiale di diverse matrici sospeso presente in colonna d'acqua che non viene conteggiato durante le analisi di microscopia) significativamente più elevato (Fig. 2b) rispetto ai campioni ottenuti mediante retino orizzontale e analizzati con FlowCAM (63616 e 38 Particelle L⁻¹ rispettivamente). Questo risultato è verosimilmente attribuibile alla turbolenza generata durante il traino del retino, che sembra favorire la frammentazione della materia organica in sospensione e una conseguente "pulizia" del campione, riducendo la quantità di detrito e

particelle sospese rilevate dallo strumento. L'elevato carico di particelle non biologiche nei campioni Niskin ha inoltre influenzato la qualità dell'analisi mediante FlowCAM, poiché la maggior parte delle immagini generate risultava costituita da aggregati o detrito, piuttosto che da organismi identificabili, rischiando di compromettere la rappresentatività del campione. In Fig. 2a si riporta il numero di taxa identificati con le differenti metodologie e si può notare come i campioni niskin analizzati con FlowCam e microscopia perentino rispettivamente 34 e 37 taxa identificati con un lieve decremento nel numero che potrebbe essere attribuito all'elevata presenza di detrito mentre il retino orizzontale, utilizzando volumi molto maggiori di acqua per la raccolta del campione, identifica 44 taxa. Per quanto riguarda la composizione della comunità, i risultati ottenuti dai campioni Niskin analizzati mediante FlowCAM e quelli derivanti dalla microscopia classica hanno mostrato una buona concordanza, indicando come i due approcci forniscano una descrizione coerente della comunità quando applicati allo stesso tipo di campione. Al contrario, i campioni raccolti mediante retino orizzontale hanno evidenziato una struttura di comunità distinta. Questa divergenza riflette le differenze intrinseche tra le metodologie di campionamento: il retino orizzontale tende, infatti, a danneggiare o a sottocampionare organismi fragili e di piccole dimensioni, quali ciliati aloricati e dinoflagellati nudi. Di conseguenza, tali gruppi risultano verosimilmente sottorappresentati o assenti nei campioni raccolti con retino rispetto a quelli misurati con tecniche di microscopia, determinando una possibile distorsione nella caratterizzazione della comunità planctonica.

Per l'applicazione in campo si è quindi scelto di analizzare in parallelo, mediante flowCAM e microscopia, campioni raccolti con bottiglie Niskin aumentando il numero di immagini catturate in ogni campione per garantire una rappresentatività del risultato.

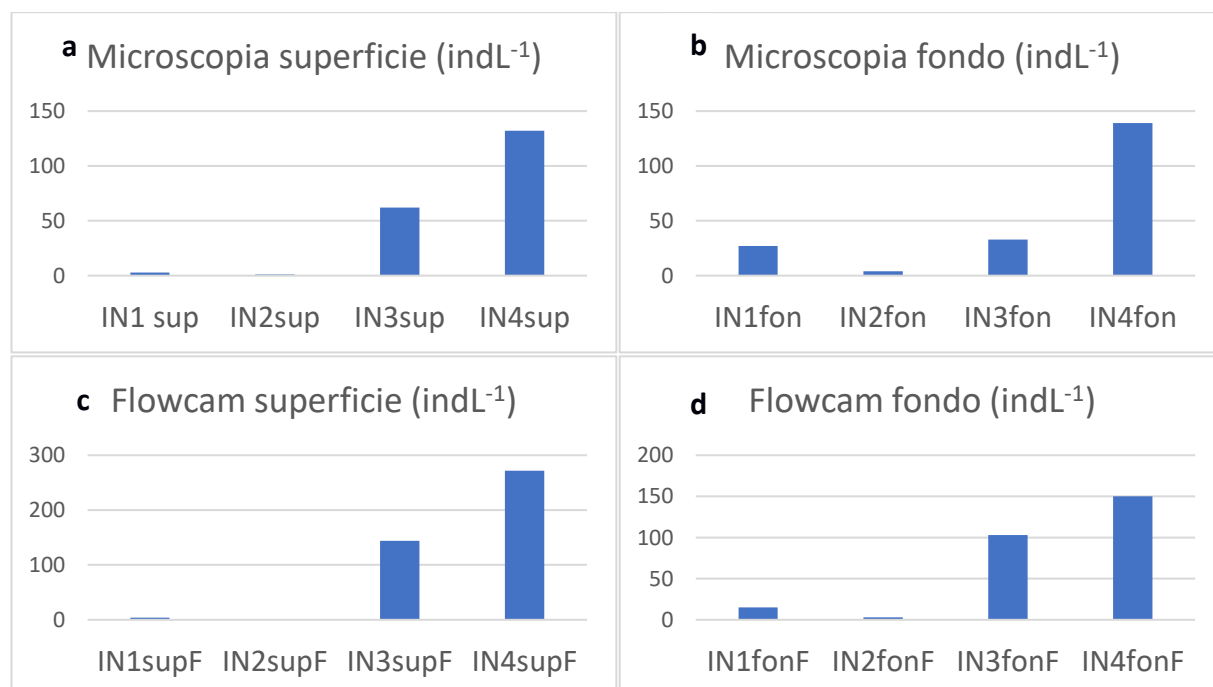


Fig. 3 – Abbondanza totale ottenuta in corrispondenza del transetto con metodo analitico di microscopia in superficie (a) e al fondo (b) e con FlowCAM in superficie (c) e al fondo (d)

Confrontando i grafici delle abbondanze totali (Fig.3) si può notare come i campioni raccolti lungo il transetto e analizzati con le 2 diverse metodiche, seguano lo stesso andamento. I valori minimi vengono misurati in stazione IN2 dove entrambi gli strumenti restituiscono, in superficie, il valore minimo assoluto di 1 IndL⁻¹ mentre sul fondo le abbondanze misurate sono state di 3 e 4 IndL⁻¹ per FlowCAM e microscopia rispettivamente. I valori massimi allo stesso modo si registrano in stazione IN4: in superficie FlowCAM restituisce il valore di 272 IndL⁻¹ e il microscopio 132 IndL⁻¹ mentre sul fondo rispettivamente 150 e 139 IndL⁻¹. In generale si notano abbondanze più alte misurate dallo strumento FlowCAM rispetto a quelle restituite dalla microscopia: questo può essere legato all'utilizzo di moltiplicatori molto più alti per calcolare le abbondanze litro nei campioni FlowCAM.

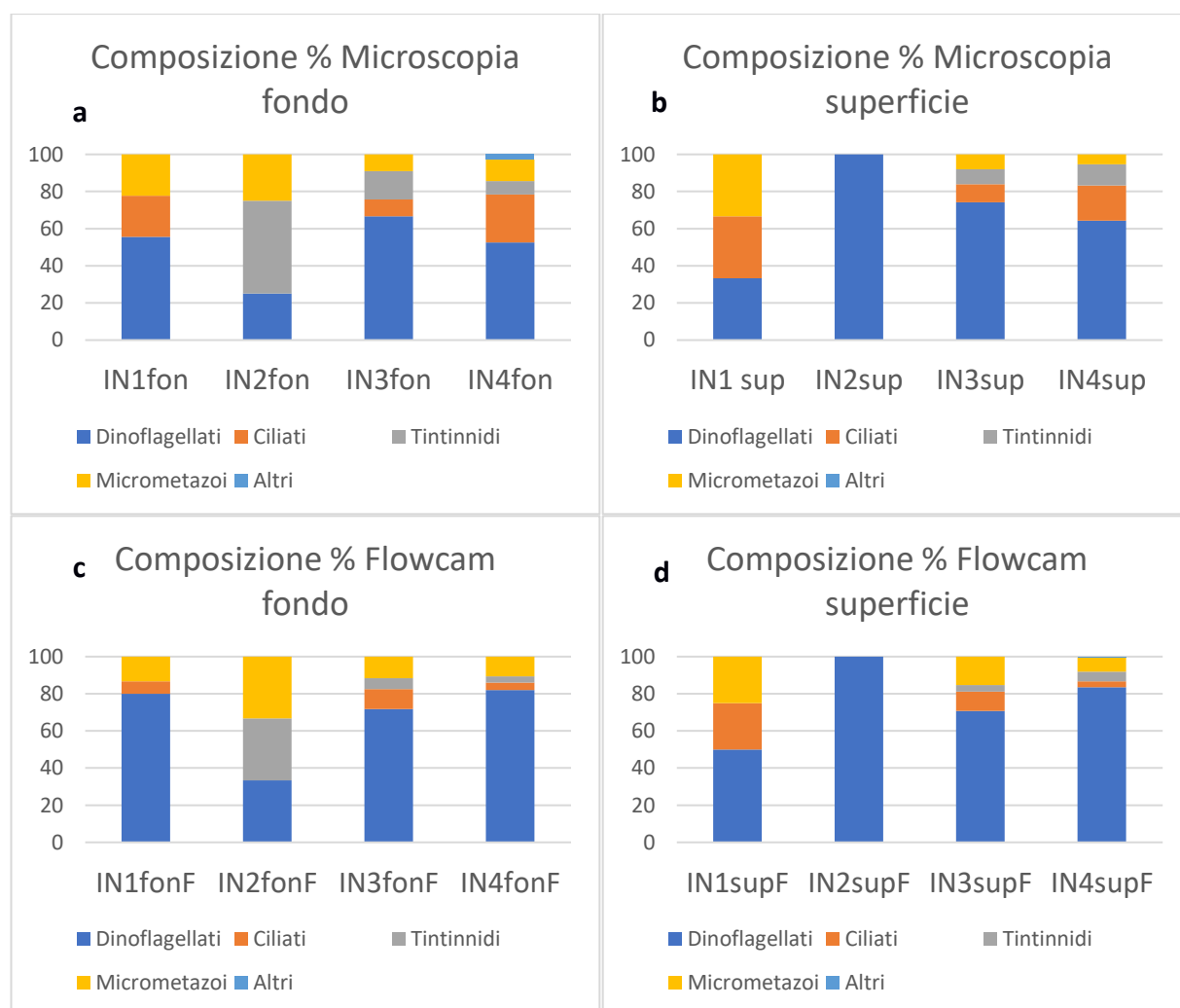


Fig. 4 - Composizione percentuale delle comunità ottenute in corrispondenza del transetto con metodo analitico di microscopia in superficie (a) e al fondo (b) e con FlowCAM in superficie (c) e al fondo (d)

Come per le abbondanze, le composizioni misurate nelle comunità dei diversi campioni, risultano seguire gli stessi andamenti (Fig. 4). Tuttavia, con l'unica eccezione per i ciliati in stazione IN3 superficie, le componenti a ciliati e a tintinnidi risultano sempre più importanti in percentuale nei campioni di microscopia; di conseguenza, si nota un incremento delle percentuali relative ai dinoflagellati nei campioni FlowCAM. Questo può essere legato a difficoltà del software di riconoscimento automatico che non riesce a distinguere efficientemente organismi che presentano forme, dimensioni e colorazioni troppo simili tra loro: nella fattispecie nelle corse di acquisizione preliminari si è notato come i ciliati e piccoli tintinnidi come *Tintinnopsis nana* venissero spesso riconosciute come detrito organico. Con la finalità di analizzare statisticamente le similarità e diversità tra le comunità ottenute con i 2 strumenti, le matrici di dati di abbondanza sono state plottate in una nmMDS (Fig.5): i risultati nei grafici mostrano come i campioni si raggruppano seguendo un fattore geografico di distanza dalla foce (Fig. 5a e Fig. 5c) piuttosto che un gradiente di profondità (Fig. 5b) e mettono in luce come nella distribuzione gli stessi campioni analizzati con le due diverse metodologie si distribuiscano sempre vicini l'uno all'altro mostrando quindi alti valori di similarità tra loro.

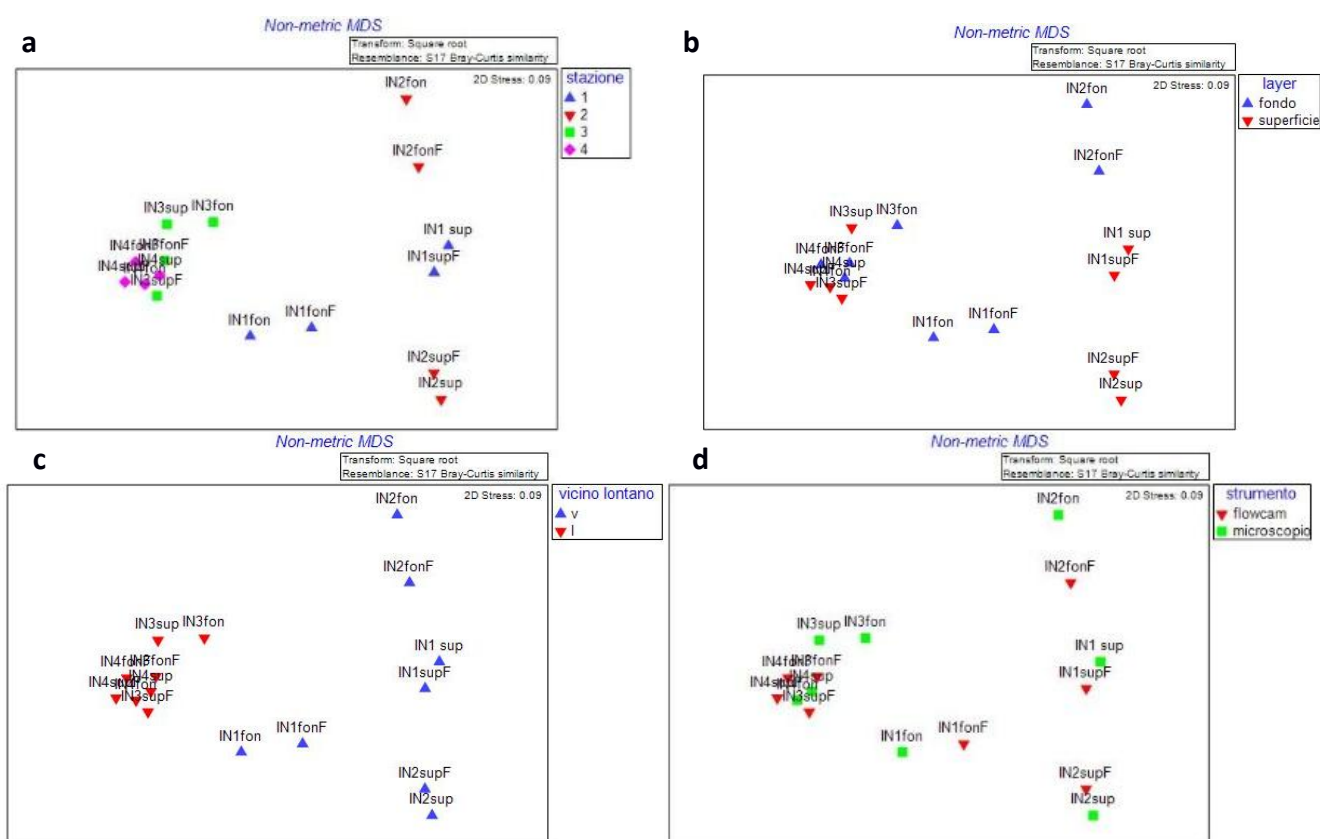


Figura 5 – nmMDS effettuata sulla matrice di abbondanza delle specie i 4 plot esplicitano le differenze tra stazioni (a), strato (b) distanza dalla foce (c) e strumento di analisi (d)

Con PERMANOVA si è testata la significatività della diversità tra i campioni analizzati con FlowCam e microscopia:

l'analisi ha restituito l'assenza di differenze statisticamente significative tra i 2 metodi (Pseudo-F=0,41505, p -perm = 0,8683) e come l'assenza di significatività si verifichi anche testando il fattore "Strumento" nested in "stazione". Nel complesso, i risultati evidenziano come la tecnologia FlowCAM sia in grado di identificare gradienti di variabilità delle comunità microplanctonica in ambiente marino in modo coerente con le tecniche di microscopia classica, restituendo strutture di comunità che non risultano significativamente differenti tra i due approcci. Ciò conferma il potenziale dell'imaging analysis come strumento applicabile allo studio del microplancton in ambienti naturali.

Tuttavia, l'affidabilità dei risultati dipende in modo critico dalla corretta calibrazione dell'intera pipeline analitica. Le impostazioni dei diversi software utilizzati (FlowCAM, ZooProcess ed EcoTaxa) devono essere definite con estrema attenzione e mantenute costanti, poiché variazioni nei parametri possono compromettere la rappresentatività del campione e la qualità del dato prodotto.

Dal punto di vista operativo, il tempo risparmiato nella fase di acquisizione delle immagini viene in parte assottigliato dall'elevato impegno richiesto per la validazione del dato. In campioni caratterizzati da elevata presenza di detrito e bassa densità di organismi, il processo di selezione e validazione delle classificazioni automatiche può risultare particolarmente oneroso, fino a eguagliare o superare i tempi richiesti dalla microscopia tradizionale.

L'imaging analysis rappresenta un ambito in rapido sviluppo, con continui miglioramenti tecnologici e software che stanno progressivamente semplificando le pipeline di analisi. In tale contesto, è fondamentale proseguire il confronto con queste metodologie: sebbene offrano già vantaggi in termini di rapidità e standardizzazione, allo stato attuale non garantiscono ancora, in tutti i casi, un livello di precisione e affidabilità pari a quello della microscopia classica, che rimane il riferimento metodologico.

Bibliografia

1. Barth, A., & Stone, J. (2024). Understanding the picture: the promise and challenges of in-situ imagery data in the study of plankton ecology. *Journal of Plankton Research*, 46(4), 365-379.
2. Bachimanchi, H., Pinder, M. I., Robert, C., De Wit, P., Havenhand, J., Kinnby, A., & Volpe, G. (2024). Deep-learning-powered data analysis in plankton ecology. *Limnology and Oceanography Letters*, 9(4), 324-339.
3. Orenstein, E. C., Ayata, S. D., Maps, F., Becker, É. C., Benedetti, F., Biard, T., & Irisson, J. O. (2022). Machine learning techniques to characterize functional traits of plankton from image data. *Limnology and oceanography*, 67(8), 1647-1669.
4. Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *science*, 281(5374), 200-206.
5. Worden, A. Z., Follows, M. J., Giovannoni, S. J., Wilken, S., Zimmerman, A. E., & Keeling, P. J. (2015). Rethinking the marine carbon cycle: factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science*, 347(6223), 1257594.
6. Lombard, F., Boss, E., Waite, A. M., Vogt, M., Uitz, J., Stemann, L., & Appeltans, W. (2019). Globally consistent quantitative observations of planktonic ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 6, 196.
7. Sieracki, C. K., Sieracki, M. E., & Yentsch, C. S. (1998). An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 168, 285-296.
8. Buskey, E. J., & Hyatt, C. J. (2006). Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae*, 5(6), 685-692.
9. Álvarez, E., López-Urrutia, Á., Nogueira, E., & Fraga, S. (2011). How to effectively sample the plankton size spectrum? A case study using FlowCAM. *Journal of Plankton Research*, 33(7), 1119-1133.

10. Sosik, H. M., & Olson, R. J. (2007). Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5(6), 204-216.
11. Khan, F., Gincley, B., Busch, A., Tolofari, D. L., Norton Jr, J. W., Varga, E., & Pinto, A. J. (2025). Integrating Machine Learning with Flow-Imaging Microscopy for Automated Monitoring of Algal Blooms. *Environmental Science & Technology*, 59(37), 19885-19898.
12. Masoudi, M., Giering, S. L., Eftekhari, N., Massot-Campos, M., Irisson, J. O., & Thornton, B. (2024). Optimizing plankton image classification with metadata-enhanced representation learning. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*, 17, 17117-17133.
13. Lacoursiere-Roussel, A., McLean, L., Aubry, C., Maps, F., Finnis, S., Arseneau, J., ... & Guyondet, T. (2025). Contrasting the efficiency of imaging systems for mesozooplankton indicators across Pacific and Atlantic coastal ecosystems. *Ecological Informatics*, 103372.
14. Yokogawa Fluid Imaging Technologies. (2020). FlowCAM 8000 User Manual.
15. Picheral, M., Colin, S., & Irisson, J. O. (2017). *EcoTaxa, a tool for the taxonomic classification of images*.
16. Utermöhl, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Mitteilungen*, 9(1), 1-38.

Data 23/03/2025

Firma digitale del proponente