

## 9040. Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI)

### Introduzione

La conta diretta delle cellule al microscopio ad epifluorescenza permette la misura delle abbondanze cellulari con affidabilità e relativa velocità e rappresenta uno strumento necessario per studiare la dinamica delle popolazioni batterioplanctoniche. Tale tecnica consente inoltre di distinguere facilmente le cellule microbiche dal detrito inerte. Le abbondanze cellulari così ottenute sono generalmente superiori a quelle stimate tramite diversi metodi indiretti (conta su piastra e MPN), affetti da errori causati dai fenomeni legati alla vitalità cellulare (la selettività del mezzo di coltura, le diverse velocità di crescita degli organismi e l'aggregazione).

Dall'abbondanza così ottenuta è possibile stimare la biomassa, espressa in termini di carbonio, utilizzando fattori di conversione tra cui il più utilizzato attribuisce 20 fg C per cellula. Questa elaborazione, pur fornendo in prima approssimazione una stima di biomassa, non tiene conto del volume delle singole cellule che può variare significativamente in diverse condizioni ambientali. Quindi stime più accurate sono ottenibili dalla misura del biovolume cellulare determinato attraverso il metodo fotografico associato all'uso di un modello di conversione.

### 1. Principio del metodo

Le cellule colorate con un fluorocromo specifico e raccolte su un filtro a porosità 0,2  $\mu\text{m}$  sono successivamente contate attraverso l'osservazione diretta al microscopio ad epifluorescenza. Il fluorocromo, legato al DNA cellulare, produce fluorescenza in seguito all'eccitazione con luce di appropriate lunghezze d'onda. Le cellule di dimensioni inferiori al limite di risoluzione del microscopio ottico (generalmente  $<1 \mu\text{m}$ ) possono essere così visualizzate. L'operatore potrà quindi agevolmente distinguere, dal fondo scuro del filtro, le cellule colorate in blu e il materiale di origine detritica colorato in giallo.

Il campione colorato e raccolto su filtro comprende tutti gli organismi di dimensioni superiori a 0,2  $\mu\text{m}$ , includendo sia organismi a metabolismo autotrofo che eterotrofo. Quindi, sebbene i procarioti acquatici morfologicamente siano riconducibili a poche e semplici forme (bastoncelli, sfere e filamenti), il loro metabolismo si differenzia in maniera significativa. La stima delle abbondanze cellulari tramite conta diretta su filtro si intende totale, in quanto non permette il riconoscimento delle cellule su base tassonomica o metabolica né fornisce indicazioni sulla vitalità delle cellule.

### 2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali (superficiali o sotterranee). L'intervallo di abbondanze batteriche misurabile dipende dal volume di acqua filtrata. Il volume varia a seconda delle caratteristiche trofiche delle acque o della profondità di prelievo (vedi Capitolo 4 e Paragrafo 7.2).

### 3. Interferenze e cause di errore

Diminuzioni significative di cellule nei campioni sono causate da una cattiva conservazione

del campione o da fenomeni di aggregazione o adesione delle cellule al materiale in sospensione di diversa origine (neve marina, presenza di materiale particolato di origine fecale o detritica). Questi fenomeni sono causa sia di una irregolare deposizione delle cellule sul filtro che di una stratificazione delle stesse che rendono inadeguato il metodo di conteggio esposto. Poiché questi casi non sono frequenti si rimanda alla letteratura specializzata per ottenere informazioni sulla corretta procedura da seguire per ottenere un buon preparato. Particolari cure devono essere riservate alla manipolazione del campione al fine di evitare contaminazioni.

La specificità del fluorocromo per il DNA impedisce la discriminazione all'interno del campione tra cellule autotrofe ed eterotrofe. Nonostante questo limite, la conta delle cellule colorate con il DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro) è generalmente riferibile a cellule eterotrofe, in grado cioè di ossidare i substrati organici, poiché il loro contributo numerico generalmente domina nel batterioplancton. È possibile però identificare le cellule a metabolismo autotrofo sfruttando la proprietà di autofluorescenza dei pigmenti fotosintetici e sottrarre la loro abbondanza dal totale.

#### 4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento può essere effettuato con le normali procedure, utilizzando bottiglie a chiusura comandata del tipo Niskin.

Il volume di campione necessario per l'analisi varia tra 0,5 mL, sufficienti per acque ad elevata trofia, a più di 20 mL per acque oligotrofiche o di profondità. Il volume prescelto deve infatti garantire in fase di osservazione al microscopio un'adeguata densità cellulare (da 20 a 50 cellule per campo). In fase di prelievo è necessario prevedere un volume di campione sufficiente per consentire almeno una replica del preparato.

Entro 3 ore dal prelievo il campione deve essere fissato con formalina (concentrazione finale 2%) precedentemente filtrata su filtri a porosità 0,2  $\mu\text{m}$ . Dopo l'aggiunta il campione va agitato energicamente e conservato al buio e in frigorifero. I campioni devono essere filtrati entro 24 ore dal prelievo e montati su vetrini da microscopio. I preparati possono così essere conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ , senza subire alterazioni, fino ad un massimo di 70 giorni.

#### 5. Apparecchiature

##### 5.1 Normale attrezzatura da laboratorio

Tutta la vetreria che entra in contatto con il campione deve essere accuratamente lavata e sterile.

5.2 *Provette sterili* da 20 mL e da 2 mL a tenuta.

5.3 *Apparato di filtrazione*: completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro e imbuto da filtrazione (diametro 25 mm), pinze a molla per fissare l'imbuto alla base e pinzetta per filtri.

5.4 *Siringa completa di supporto per filtri e filtri sterili* a porosità 0,2  $\mu\text{m}$ .

5.5 *Filtri a membrana*: filtri di supporto (porosità 0,45  $\mu\text{m}$ , diametro 25 mm), filtri neri in policarbonato (porosità 0,2  $\mu\text{m}$ , diametro 25 mm). I filtri in policarbonato si trovano in commercio già colorati e con un basso livello di fluorescenza. In alternativa possono essere utilizzati filtri bianchi da colorare successivamente con Irgalan black (ad 1 litro di acqua distillata filtrata su 0,2  $\mu\text{m}$  aggiungere 2 g di Irgalan black, 20 mL di acido acetico, 5,7 mL di formalina al 37%).

5.6 *Micropipette e puntali sterili*

- 5.7 *Vetrini da microscopio* completi di coprioggetti.
- 5.8 *Olio da immersione* per microscopia non fluorescente.
- 5.9 *Congelatore e frigorifero* per la conservazione dei campioni e delle soluzioni.
- 5.10 *Autoclave*
- 5.11 *Guanti monouso*
- 5.12 *Microscopio ad epifluorescenza*, dotato di lampada a vapori di mercurio (100 W), combinazione di filtri (eccitazione 340-380 nm, lamina dicromatica 400 nm, filtro di sbarramento 425 nm), oculari 10X di cui uno dotato di reticolo quadrettato, micrometro oggetto, obiettivo ad immersione 100X.

## 6. Reattivi

- 6.1 *Formaldeide al 37%* filtrata attraverso filtri da 0,2  $\mu\text{m}$ .

Per campioni di acqua dolce è necessario utilizzare formaldeide tamponata a pH=7,5, ottenuta aggiungendo, con pipetta Pasteur, alla soluzione (6.2) alcune gocce di NaOH 2 M.

- 6.2 *Soluzione di 4'6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, 0,5 mg/mL)*

Tutte le operazioni devono essere condotte al riparo dalla luce per evitare il decadimento della fluorescenza del prodotto. Sciogliere 10 mg di sale in 20 mL di acqua distillata. Porre la soluzione in una provetta e agitare fino alla completa solubilizzazione del sale. Utilizzando una siringa e relativo portafiltro sterile filtrare la soluzione su un filtro a porosità 0,2  $\mu\text{m}$ . Distribuire il filtrato in provette sterili da 2 mL con tappo a tenuta. La soluzione conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$  mantiene inalterate a lungo le proprie caratteristiche. Ogni preparazione va osservata al microscopio prima della conservazione per verificarne l'effettiva sterilità.

**Nota:** *il DAPI è un composto mutageno per l'elevata specificità di legame nei confronti del DNA. Si consiglia pertanto di evitare accuratamente il contatto diretto e l'inalazione.*

## 7. Procedimento

- 7.1 *Colorazione e filtrazione*

Predisporre l'apparato di filtrazione ponendo con le apposite pinze il filtro nero da 0,2  $\mu\text{m}$  sovrapposto a quello di supporto da 0,45  $\mu\text{m}$ . Il filtro di supporto può essere utilizzato per numerose preparazioni. Evitare accuratamente il contatto delle dita con i filtri. Fissare l'imbuto da filtrazione alla base con le pinze a molla. Agitare energicamente il campione, introdurre un'aliquota nell'imbuto da filtrazione e aggiungere 2  $\mu\text{L}$  di soluzione DAPI per ogni mL di campione da filtrare. Attendere 4 minuti, mantenendo il campione al buio. Il campione così colorato è stabile per ore. Procedere alla filtrazione esercitando una pressione di vuoto non superiore a 80 mm Hg. Non lasciare essiccare completamente il filtro per evitare la compromissione delle cellule.

- 7.2 *Preparazione del vetrino*

Poggiare il filtro al centro del vetrino portaoggetto su cui è stata precedentemente posta una piccola goccia di olio (5.8). Porre un'altra goccia di olio sulla superficie del filtro e montare il coprioggetti esercitando una leggera pressione fino a che l'olio abbia ricoperto il filtro. L'u-

so di una quantità eccessiva di olio determina la fuoriuscita delle cellule dal vetrino e la distribuzione delle cellule su più piani focali. Nel caso in cui il preparato debba essere conservato si consiglia di verificare al microscopio la qualità dell'immagine, controllando, in particolare, che l'immagine giaccia su un solo piano focale e che le cellule siano uniformemente distribuite sul filtro.

### 7.3 Osservazione al microscopio

Osservare da 20 a 40 campi distribuiti con criterio di casualità su tutta l'area del filtro e contare un minimo di 600 cellule per filtro. Un'adeguata densità cellulare sul filtro è data da un numero di cellule approssimativamente compreso tra 20 e 50 per campo. Se le cellule sono troppo numerose è necessario ridurre il volume da filtrare. È utile tenere presente che la fluorescenza delle cellule decade con il tempo durante l'osservazione.

## 8. Calcoli

Il numero di cellule batteriche nel campione può essere così calcolato:

$$L = \frac{X_n \cdot A_c}{A_b \cdot V_c}$$

dove:

$X_n$  = numero totale di cellule/numero dei campi esplorati (ai fini del calcolo un campo senza cellule va considerato come un campo esplorato);

$A_b$  = area (mm<sup>2</sup>) del filtro su cui sono state raccolte le cellule;

$A_c$  = area (mm<sup>2</sup>) del reticolo quadrettato, ottenuta dalla misurazione con il micrometro oggetto;

$V_c$  = volume (mL) di campione filtrato/1,06 (\*).

## 9. Qualità del dato

Seguendo le indicazioni fornite nel metodo la precisione della misura è di ±10% al 95% di intervallo di confidenza. Per una migliore precisione è raccomandabile la lettura di due preparati per ogni campione. Se non è richiesta una precisione elevata è sufficiente contare un totale di 200 cellule per filtro.

## BIBLIOGRAFIA

HOBBIE J.E., DALEY R. & JASPER S. (1977): "Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy", *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228.

LEE S. & FUHRMAN J.A. (1987): "Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton", *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, (6), 1298-1303

NORLAND S., HELDAL M. & TUMYR O. (1987): "On the relation between dry matter and volume of bacteria", *Microb. Ecol.*, **13**, 95-101.

PORTER G.K. & FEIG S.Y. (1980): "The use of DAPI for identifying and counting aquatic mi-

---

(\*) fattore di correzione per la presenza nel campione del fissativo, alle condizioni sopraesposte.

croflora", *Limnol. Oceanogr.*, **25** (5), 943-948.

SHERR B., SHERR E. & DEL GIORGIO P. (2001): "Enumeration of total and highly active bacteria" In: *Methods in Microbiology. Marine Microbiology*, H. Paul ed. Academic Press, London, UK, **30**, 129-159.

TURLEY C.M. & HUGHES D.J. (1994): "The effect of storage temperature on the enumeration of epifluorescence-detectable bacterial cells in preserved sea-water samples", *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **74**, 259-262.

VELJI M.I. & ALBRIGHT L.J. (1993): "Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria", In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 139-142.