

Un metodo sperimentale per il conteggio delle cellule di *Microcystis aeruginosa*: dati preliminari

Chiara Defrancesco¹, Silvia Costaraoss¹, Catia Monauni¹, Giovanna Pellegrini^{1*}, Sabrina Pozzi¹

¹ APPA Trento, U.O. Qualità dell'ambiente, Laboratorio di Idrobiologia, viale Rovereto 146, 38066 Riva del Garda (TN)

* autore referente per la corrispondenza (fax 0464/521970; e-mail giovanna.pellegrini@provincia.tn.it)

Pervenuto il 21.12.01; accettato il 1.2.02

Riassunto

Viene descritta una metodica di conta delle cellule del cianobatterio *Microcystis aeruginosa*: dopo l'isolamento delle colonie al microscopio stereoscopico, le cellule vengono separate sciogliendo la glia con una base forte e successivamente contate utilizzando una camera contaglobuli.

PAROLE CHIAVE: Cyanophyceae / *Microcystis aeruginosa* / Metodica di conteggio / Salute pubblica

Abstract

An approach to *Microcystis aeruginosa* cell count

A procedure to count *Microcystis aeruginosa* cells is described: colonies are isolated using stereoscopic microscopy, cells are separated by melting their gelatinous matrix with sodium hydroxide and are counted using a counting cell or chamber that limits the volume and area for ready calculation of cell densities.

KEY WORDS: Cyanophyceae / *Microcystis aeruginosa* / Counting method / Public health

INTRODUZIONE

Il conteggio delle cellule fitoplanctoniche è il punto di partenza per la stima del biovolume e della biomassa algale, parametri attualmente considerati fondamentali nell'analisi della qualità delle acque di un lago (ROTT, 1981; HILLEBRAND *et al.*, 1999).

In particolare, lo studio e il conteggio dei cianobatteri, o alghe verdi-azzurre, rappresenta una problematica di grande attualità nell'analisi limnologica. Questi organismi possono produrre fioriture consistenti nelle acque lacustri e marine con problemi di eutrofizzazione, alterando gli equilibri all'interno dei popolamenti fitoplanctonici e costituendo inoltre un pericolo per la salute pubblica (ISTISAN, 2000). Alcune specie di cianobatteri, infatti, possono produrre tossine che hanno effetti nocivi sull'uomo, agendo a livello dei neurotra-

smettitori (neurotossine), delle cellule epatiche (epatotossine), del sistema gastro-enterico (enterotossine) e dell'epidermide (dermatotossine) (CARMICHAEL *et al.*, 1985; SKULBERG *et al.*, 1984; VOLTERRA, 1989).

Il Decreto del Ministero della Sanità del 17 giugno 1988 "Criteri per la definizione dei programmi di sorveglianza per la rilevazione di alghe aventi possibili implicazioni igienico-sanitarie", collegato al DPR 470/82 "Attuazione della Direttiva CEE n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione", aggiunge all'analisi dei normali parametri chimico-fisici e microbiologici anche l'analisi quali-quantitativa dei popolamenti fitoplanctonici responsabili di fioriture algali.

Per una migliore interpretazione di quest'ultimo Decreto, il MINISTERO DELLA SANITÀ (1988) ha emanato

una circolare con alcune considerazioni che consentono di delineare i criteri di formulazione di soglia numerica nelle fioriture algali. In particolare, studi approfonditi hanno individuato la dose soglia di tossine prodotte da *Microcystis aeruginosa* ingeribili dall'uomo senza effetti acuti o cronici in 0,84 mg/L, corrispondenti in media a 5.000 cellule per mL (FALCONER *et al.*, 1994); viene quindi consigliata, in attesa dei risultati dell'analisi tossicologica, una concentrazione di 5.000 cellule/mL come soglia per vietare la balneazione in acque con fioriture algali da cianobatteri in atto.

Non tutti i cianobatteri, comunque, producono tossine e anche nei gruppi in cui il potenziale tossico è dimostrato, esso si esprime solo in caso di fioriture di una certa consistenza di ceppi tossigeni (GORHAM *et al.*, 1980) in particolari condizioni. Nella tabella I è riportato un elenco delle principali specie potenzial-

mente tossiche.

Il genere *Microcystis* è, tra quelli elencati in tabella, il più difficile da contare, in quanto le cellule sono di dimensioni molto ridotte (pochi μm) e si presentano raggruppate in colonie tridimensionali, di forma molto irregolare. Il metodo di conta comunemente impiegato prevede una stima delle cellule in base a dei riferimenti fissi: ad esempio si contano le cellule presenti in un'area definita della griglia dell'oculare microscopico, si conta il numero di aree occupate dalla colonia e si moltiplica per il numero dei piani occupati dalla colonia. Il metodo, tuttavia, presenta un errore elevato, poiché le colonie possono avere una forma geometrica spesso molto complessa, con diramazioni nelle tre dimensioni spaziali; inoltre, non sempre gli individui sono perfettamente uniti l'uno all'altro, ma possono restare tra loro degli spazi vuoti, in particolare se si tratta di colonie

Tab. I. Elenco dei cianobatteri tossici italiani (da: Circolare del Ministero della sanità del 9 aprile 1998, n. 400.4/13.1/3/562. Aggiornamento delle metodiche analitiche per la determinazione dei parametri previsti nel decreto interministeriale 17 giugno 1988 concernente i criteri per la definizione del programma di sorveglianza di cui all'art. 1 del D.L. 14 maggio 1988 n. 155 convertito con legge del 15 luglio 1988 n. 271., 9 pp.).

Specie algali	Effetto sull'uomo delle tossine prodotte
<i>Anabaena circinalis</i> RABENH.	dermigeno, neuro-epatotossico
<i>Anabaena flos-aquae</i> (LYN.) BRÉB.	dermigeno, neuro-epatotossico
<i>Anabaena hassallii</i> (KÜTZ.) WITTR.	neuro-tossico
<i>Anabaena lemmermannii</i> RICH.	neuro-tossico
<i>Anabaenopsis milleri</i> WOR.	neuro-tossico
<i>Anabaena spiroides</i> var. <i>contracta</i> KLEB.	neuro-epatotossico, dermigeno
<i>Anabaena variabilis</i> KÜTZ.	neurotossico
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (L.) RALFS	neurotossico
<i>Cylindrospermum</i> sp. KÜTZ.	neurotossico
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (WOL.) RAJU	epato-tossico
<i>Coelosphaerium kuetzingianum</i> NÄG.	neuro-epatotossico
<i>Fischerella epiphytica</i> GH.	neuro-epatotossico
<i>Gloeotrichia echinulata</i> (SM.) RICH.	neuro-epatotossico
<i>Gomphosphaeria lacustris</i> CHOD.	neuro-epatotossico
<i>Gomphosphaeria naegeliana</i> (UNG.) LEMM.	neuro-epatotossico
<i>Hapalosiphon fontinalis</i> (AG.) BORN.	neuro-epatotossico
<i>Microcystis aeruginosa</i> KÜTZ.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Microcystis botrys</i> TEIL.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Microcystis viridis</i> (A. BR.) LEMM.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Microcystis wesenbergii</i> KOM.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Nostoc linckia</i> (ROTH) BORN. & FLAH.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Nostoc paludosum</i> KÜTZ.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Nostoc rivulare</i> KÜTZ.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Nostoc zetterstedtii</i> ARES.	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Oscillatoria acutissima</i> KUFF.	dermigeno
<i>Oscillatoria agardhii-rubescens</i>	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Oscillatoria formosa</i> BORY	dermigeno, gastro-enterico, epato-tossico
<i>Pseudanabaena catenata</i> LAUT.	neurotossico
<i>Scytonema ocellatum</i> LYNGB.	neuro-epatotossico
<i>Scytonema pseudohofmanni</i> BHAR.	neuro-epatotossico
<i>Tolypothrix byssoidea</i> (HASS.) KIRCHN.	neuro-epatotossico

mucillaginose (MORABITO, 1997). REYNOLDS e JAWORSKI (1978) riportano un metodo di stima basato sul calcolo della regressione lineare tra il numero medio di cellule per colonia ed il diametro medio delle colonie; il limite di questo metodo è essenzialmente riconducibile alla difficoltà di stima dei diametri delle colonie dipendente dall'irregolarità della forma, della densità cellulare e delle dimensioni delle cellule delle singole colonie. La soglia definita di 5.000 cellule/mL consigliata dal Ministero della Sanità crea quindi notevoli difficoltà, soprattutto nei casi in cui la stima di conta si avvicina a questo valore.

In bibliografia sono riportate prove di disgregazione delle colonie di *Microcystis* utilizzando il calore (HUMPHRIES e WIDJAJA, 1979), l'idrolisi alcalina a 90°C e l'applicazione degli ultrasuoni (REYNOLDS e JAWORSKI, 1978). Questi metodi sono stati saggiati su popolazioni pure di *Microcystis* e sul campione non fissato. Dal confronto fatto da REYNOLDS e JAWORSKI (1978) sui tre metodi (regressione lineare, idrolisi alcalina e sonicazione), l'idrolisi alcalina risulta essere quello che consente di ottenere una stima migliore.

Scopo di questo lavoro è presentare un metodo sviluppato per rendere più semplice ed attendibile il conteggio di *Microcystis aeruginosa* (specie con cellule relativamente grandi). Il metodo è fondato sulla dissoluzione dell'involucro gliale delle colonie, in modo da liberare le singole cellule algali e procedere alla loro enumerazione in cella contaglobuli.

Il metodo proposto può servire anche a rendere più precisa le stime del biovolume algale nei laghi in cui il genere *Microcystis* risulta dominante.

MATERIALI E METODI

Nel periodo estate 2000 - autunno 2001 da 4 laghi del Trentino sono stati raccolti nello strato 0-50 cm 11 campioni di 2000 mL di acqua.

Da ogni campione, fissato con Lugol acetico, sono state prelevate 3-7 aliquote di 10-25 mL, poste a sedimentare in altrettante camere cilindriche secondo il metodo di UTERMÖHL (1958) per tempi di circa 3 ore per ogni centimetro d'altezza della colonna d'acqua nella camera (Fig. 1).

Identificate al microscopio inverso a 100x le colonie di *Microcystis aeruginosa*, la camera è stata aperta e si è proceduto alla raccolta delle colonie, una ad una, per aspirazione con pipetta Pasteur sotto osservazione al microscopio stereoscopico a 40x.

Tutte le colonie di ciascuna aliquota sono state poste per almeno un'ora in una provettina a fondo conico graduata da 2 mL contenente 1 ml di NaOH 0,1 M (in modo da arrivare, con l'aggiunta delle colonie in acqua, ad una concentrazione compresa tra 0,1 e 0,05 M). L'idrossido di sodio scioglie la glia gelatinosa,

disperdendo le singole cellule. Una frazione del contenuto della provettina, opportunamente mescolata, è stata posta su una camera contaglobuli di Fuchs-Rosenthal e si è proceduto alla conta delle cellule al microscopio ottico a 200x, riportando i risultati a numero di cellule/mm³.

Per stimare la variabilità insita nella fase di conteggio, da ciascuna delle quattro provettine del campione n.11 sono state effettuate 6-7 repliche, ripetendo sia le fasi di trasferimento dalla provettina alla camera contaglobuli, sia la relativa conta microscopica.

Il volume della camera di sedimentazione da riempire con il campione iniziale deve consentire di raccogliere un numero adeguato di colonie (20-30) in maniera da arrivare, nella camera contaglobuli, ad una conta di almeno un centinaio di cellule in 1 mm³.

Il numero di cellule per mL di campione è stato determinato applicando la seguente formula:

$$N = \frac{(n * v) * 1000}{V}$$

dove:

n = numero cellule contate in un mm³

v = volume contenuto nella provettina (mL)

V = volume di campione sedimentato (mL).

Il contenuto residuo della provetta è stato, infine, esaminato al microscopio per verificare l'effettivo scioglimento di tutte le colonie.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La sperimentazione preliminare ha mostrato che la concentrazione minima di NaOH in grado di disgregare completamente le colonie è 0,05 M. Non sono state rilevate differenze significative tra conteggi effettuati dopo un'ora e conteggi effettuati il giorno successivo, a dimostrazione che NaOH, alla concentrazione usata, non danneggia le cellule.

Nella tabella II sono riportati i risultati di una serie di prove effettuate utilizzando 11 campioni d'acqua provenienti da laghi diversi e prelevati in tempi differenti. Va osservato che, tenuto conto del tipo di indagine, dell'eterogenea dimensione e distribuzione delle colonie di *Microcystis* nelle acque, della delicatezza delle operazioni manuali richieste e della imprecisione insita in esse, i coefficienti di variazione (CV) ottenuti, variabili dal 7% al 32%, sono da considerare accettabili.

Questo errore ha due componenti principali: l'errore intrinseco a ciascuna replica, relativo alla conta delle cellule di *Microcystis* di una provettina, e l'errore tra le diverse repliche, ottenute dalla sedimentazione di diverse aliquote di ciascun campione e dall'isolamento delle colonie e loro trasferimento nella pro-

vettina (distribuzione non omogenea delle colonie di *Microcystis* nei subcampioni sedimentati, imprecisione nella raccolta e trasferimento in provettina delle colonie).

Per verificare l'imprecisione dovuta esclusivamente alla prima componente d'errore, nelle quattro aliquote della prova 11 sono state effettuate delle conte prelevando 6-7 subcampioni dalla stessa provettina. I risultati sono riportati in tabella III. Il coefficiente di variazione risulta compreso tra 3,7% e 8,7%.

I risultati ottenuti si basano su un numero limitato di

conteggi e vanno confermati con ulteriori prove, anche per poter effettuare un'analisi statistica più solida sui dati raccolti.

La metodica proposta comporta una serie di difficoltà oggettive, essendo relativamente laboriosa e richiedendo una discreta manualità per la raccolta delle colonie. Tuttavia è da ritenersi più affidabile del metodo tradizionale in cui ciascuna fase (stima del numero di piani della colonia, del numero di cellule per piano e della superficie della colonia) è soggetta ad un errore rilevante (MORABITO, 1997).

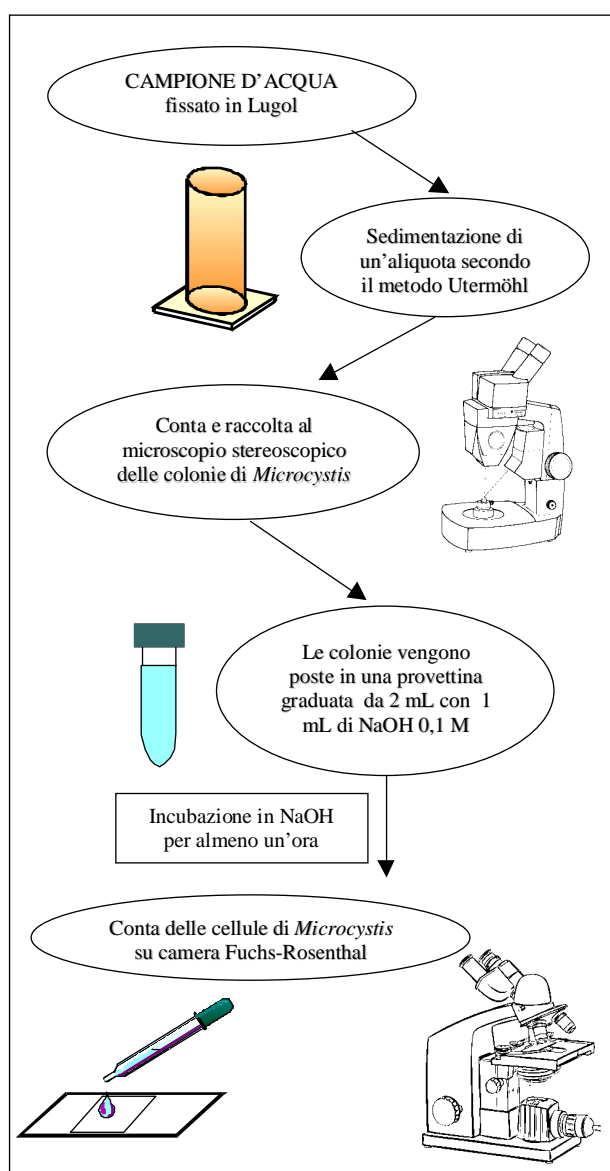


Fig. 1. Schema grafico del procedimento di conteggio delle cellule di *Microcystis aeruginosa* isolate da campioni d'acqua lenticia superficiale.

Tab. II. Risultati ottenuti dalle prove di conta di cellule di *Microcystis aeruginosa* effettuate su quattro diversi laghi trentini nel periodo estate 2000-autunno 2001.

campione n°	n° aliquote	media conteggio (cell/mL)	dev. standard	CV(%)
1	5	50.878	6.191	12,2
2	5	60.427	4.981	8,2
3	5	39.960	2.910	7,3
4	6	20.000	6.344	31,7
5	7	189.143	35.381	18,7
6	6	396.000	75.025	18,9
7	4	10.353	2.813	27,2
8	4	7.290	1.043	14,3
9	6	77.648	6.825	8,8
10	3	6.920	901	13,0
11	4	6.945	496	7,0

Tab. III. Risultati dei conteggi effettuati su subcampioni prelevati in ciascuna delle quattro aliquote del campione n. 11, con lo scopo di evidenziare l'errore di conteggio intrinseco a ciascuna aliquota.

Replica n.	11a cellule/mL	11b cellule/mL	11c cellule/mL	11d cellule/mL
1	6.680	5.240	7.132	7.436
2	6.940	6.012	7.712	7.930
3	7.380	6.464	7.256	6.994
4	7.320	6.516	6.576	7.306
5	7.240	6.436	7.384	7.002
6	7.560	6.888	7.080	6.474
7	7.520	5.880	-	6.734
Media	7.260	6.205	7.190	7.125
Dev. standard	270	541	376	481
CV %	3,7%	8,7%	5,2%	6,7%

CONCLUSIONI

Questo metodo di conteggio nasce dall'esigenza pratica di contare, e non più stimare, il numero di cellule formanti colonie del tipo *Microcystis aeruginosa*.

Le prime prove sperimentali sembrano dare risultati incoraggianti, anche tenuto conto che l'attuale criterio di conta basato sulla stima visiva è considerato sensibilmente impreciso e soggettivo (MORABITO, 1997). La sperimentazione dovrà proseguire confrontando direttamente i vari metodi di conteggio. Molto resta ancora da fare per migliorare la ripetibilità dei singoli passaggi.

La dissoluzione della glia coloniale, rendendo indipendenti le singole cellule algali, apre la possibilità di sostituire il conteggio in camera contaglobuli con un

contatore elettronico di particelle, del tipo di quelli abitualmente impiegati in ematologia, riducendo in questo modo il lavoro necessario per il conteggio stesso ed aumentandone la precisione.

Il metodo proposto può risultare utile quando è necessario effettuare una stima il più possibile precisa, come nel caso di un campione analizzato ai fini del controllo di balneazione con un numero di cellule/mL vicino al limite consigliato, oppure quando il genere *Microcystis* è numericamente dominante nel campione.

Il metodo, finora saggiato su *Microcystis aeruginosa*, è attualmente in fase di sperimentazione anche su specie del genere *Anabaena*.

BIBLIOGRAFIA

- CARMICHAEL W.W., JONES C.L.A., MAHMOOD N.A., THEISS W.C. 1985. Algal toxins and water-based diseases. In *Critical Reviews in Environmental control*, vol. 15, 3: 275-313.
- CIRCOLARE DEL MINISTERO DELLA SANITÀ DEL 09 APRILE 1998, N. 400.4/13.1/3/562. Aggiornamento delle metodiche analitiche per la determinazione dei parametri previsti nel decreto interministeriale 17 giugno 1988 concernente i criteri per la definizione del programma di sorveglianza di cui all'art. 1 del D.L. 14 maggio 1988 n. 155 convertito con legge del 15 luglio 1988 n. 271, 9 pp.
- MINISTERO DELLA SANITÀ, DECRETO 17 GIUGNO 1988. Criteri per la definizione dei programmi di sorveglianza per la rilevazione di alghe aventi possibili implicazioni igienico-sanitarie. *G.U. Serie generale*, 145 del 27/06/88: 7-8.
- DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA N. 470/82. Attuazione della Direttiva CEE n. 76/160 relativa alla qualità delle acque di balneazione. *G. U.*, 203 del 26/07/82: 5239-5245.
- FALCONER I.R., BURCH M.D., STEFFENSEN D.A., CHOICE M. and COVERDALE O.R., 1994. Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as animal model for human injury and risk assessment. *Env. Toxic. and Wat. Qual.*, 9: 131-139.
- GORHAM P.R. and CARMICHAEL W.W., 1980. Toxic substances from Freshwater Algae. *Progress in Water Technology*, vol. 12, 2: 189-198.
- HILLEBRAND H., DURSELEN C.D., KIRSCHTEL D., POLLINGER U. and ZOHARY T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35: 403-424.
- HUMPHRIES S.E., WIDJAJA F., 1979. A simple method for separating cells of *Microcystis aeruginosa* for counting. *Br. Phycol. J.* 14: 313-316.
- ISTISAN (ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ), 2000. Workshop. Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 16-17 dicembre 1999. Atti a cura di Enzo Funari, *Rapporti ISTISAN 00/30*, 151 pp.
- MORABITO G., 1997. Dinamica stagionale delle comunità algali e analisi microscopica del fitoplancton. *Biologia Ambientale*, 2: 3-18.
- REYNOLDS C.S., JAWORSKI G. H. M., 1978. Enumeration of natural *Microcystis* populations. *Br. Phycol. J.* 13: 269-277.
- ROTT E., 1981. Some results from phytoplankton counting intercalibration. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43: 34-62.
- SKULBERG O.M., CODD G.A., CARMICHAEL W.W., 1984. Toxic blue-green algae blooms in Europe: a growing problem. *Ambio*, 13, 244.
- UTERMÖHL H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 9: 38 pp.
- VOLTERRA L., 1989. Alghe produttrici di biotossine. *Biologia Ambientale*, 5: 5-18.