



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA



# Applicazione delle tecniche di Microscopia ad epifluorescenza e di Citometria a flusso allo studio del Materiale Particellare sospeso in atmosfera

**F. Marcovecchio<sup>1,2</sup> , C. Perrino<sup>2</sup> , S. Amalfitano<sup>3</sup>**

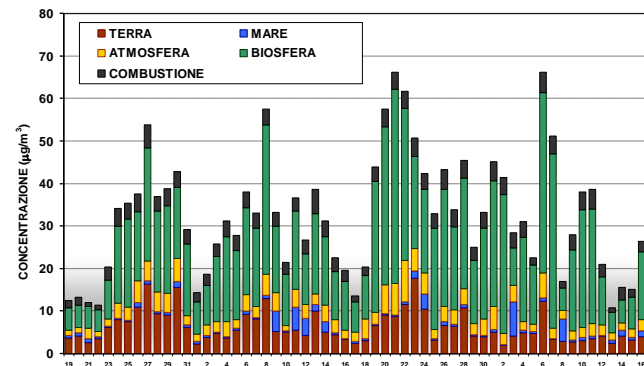
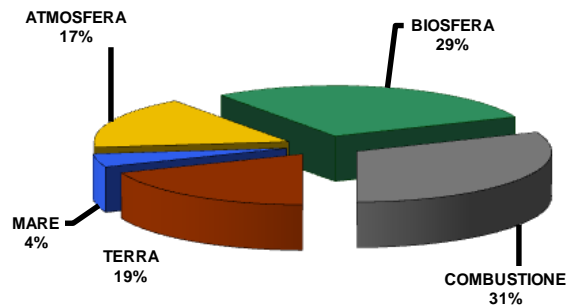
<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università di Roma “Sapienza”

<sup>2</sup>CNR- Istituto sull'Inquinamento Atmosferico, Montelibretti (RM)

<sup>3</sup>CNR- Istituto di Ricerca Sulle Acque, Montelibretti (RM)

# SPECIAZIONE DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO

- Ad oggi è possibile determinare con accuratezza tutte le **componenti inorganiche** del PM ed effettuare una stima delle loro macro-sorgenti



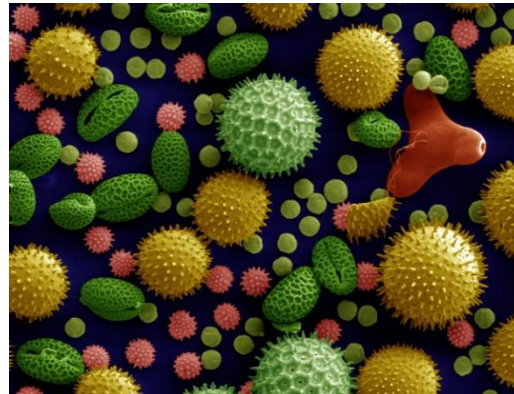
- Per le **specie organiche** è invece possibile solo la speciazione di una frazione pari al 15-20%
- In particolare, non è noto il contributo quantitativo del **bioaerosol** alla concentrazione del carbonio organico.

# IL BIOAEROSOL

La frazione di PM<sub>10</sub> di origine biologica comprende:



Spore fungine



Pollini



Batteri

Residui  
animali...



...e vegetali

# STATO DELL'ARTE

Fino ad oggi la valutazione quantitativa delle particelle di bioaerosol è stata effettuata mediante diversi approcci:

- Campionamento di funghi e batteri su piastre Petri, coltivazione, valutazione del numero di colonie tramite conteggio al microscopio.
- Misura della cellulosa (residui vegetali, foglie) mediante metodi enzimatici e successiva rivelazione fotometrica.
- Utilizzo di **biomarkers**: polisaccaridi (*funghi*), fosfolipidi (*funghi e pollini*), polioli (*spore di funghi*), proteine (*funghi e batteri*), ergosterolo (*funghi*). Ognuno di questi traccianti è correlato, mediante un **coefficiente di conversione**, a specifiche classi di microrganismi che contribuiscono al Bioaerosol.



# SCOPO DEL LAVORO

Mettere a punto un nuovo metodo specifico per il bioaerosol:

- in grado di fornire risultati semi-quantitativi
- valido ed efficace per tutte le componenti del bioaerosol
- rapido ed adatto ad analisi *di routine*



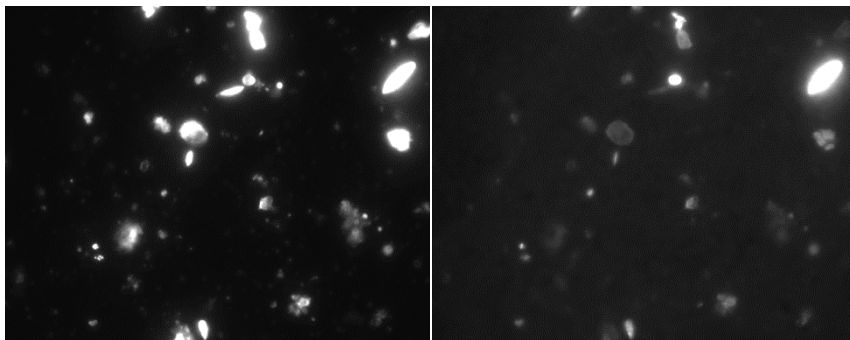
# IMPATTORE: METODO DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI

- **Campionamento** mediante impattore multistadio (10 Stadi)  
Supporto in Policarbonato (porosità:  $0.8 \mu\text{m}$ )  
Periodo: Luglio – Agosto 2013  
Durata dei campionamenti: 7 giorni  
Portata: 30L/min
- **Estrazione** del campione mediante agitazione meccanica e sonicazione in opportuna soluzione di distacco contenente NaCl, tampone fosfato, formaldeide, pirofosfato di sodio, tensioattivo Tween20<sup>®</sup> ed acqua.
- **Marcatura** del campione con fluorocromi specifici:  
**Ioduro Propidio**, **Sybr<sup>®</sup> Green** (specifici per acidi nucleici)
- **Analisi** del campione mediante **Microscopia ad Epifluorescenza**
- **Analisi** del campione mediante **Citometria a Flusso**



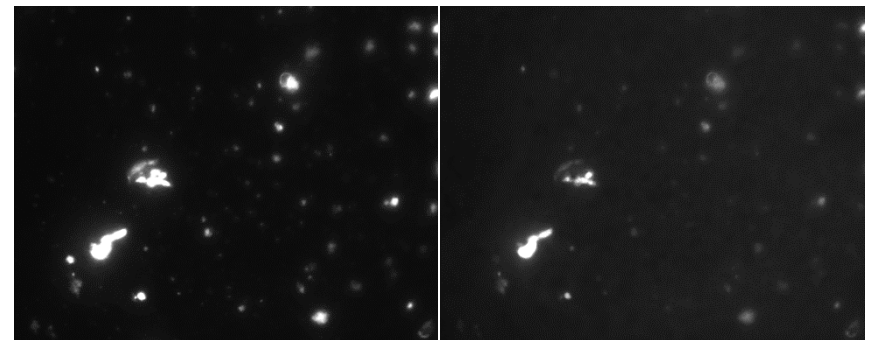
# ANALISI: MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA

- La soluzione è filtrata su membrana in policarbonato (porosità 0,2  $\mu\text{m}$ )
- La membrana è direttamente sottoposta ad analisi mediante microscopia ad epifluorescenza con acquisizione di immagini.
- Osservando con opportuni filtri ottici, il campione marcato con **Ioduro Propidio** mostra una fluorescenza rossa ben visibile. La fluorescenza verde data dal **Sybr<sup>®</sup> Green** invece, non è ben apprezzabile al microscopio.



Ioduro propidio

Sybr<sup>®</sup> Green

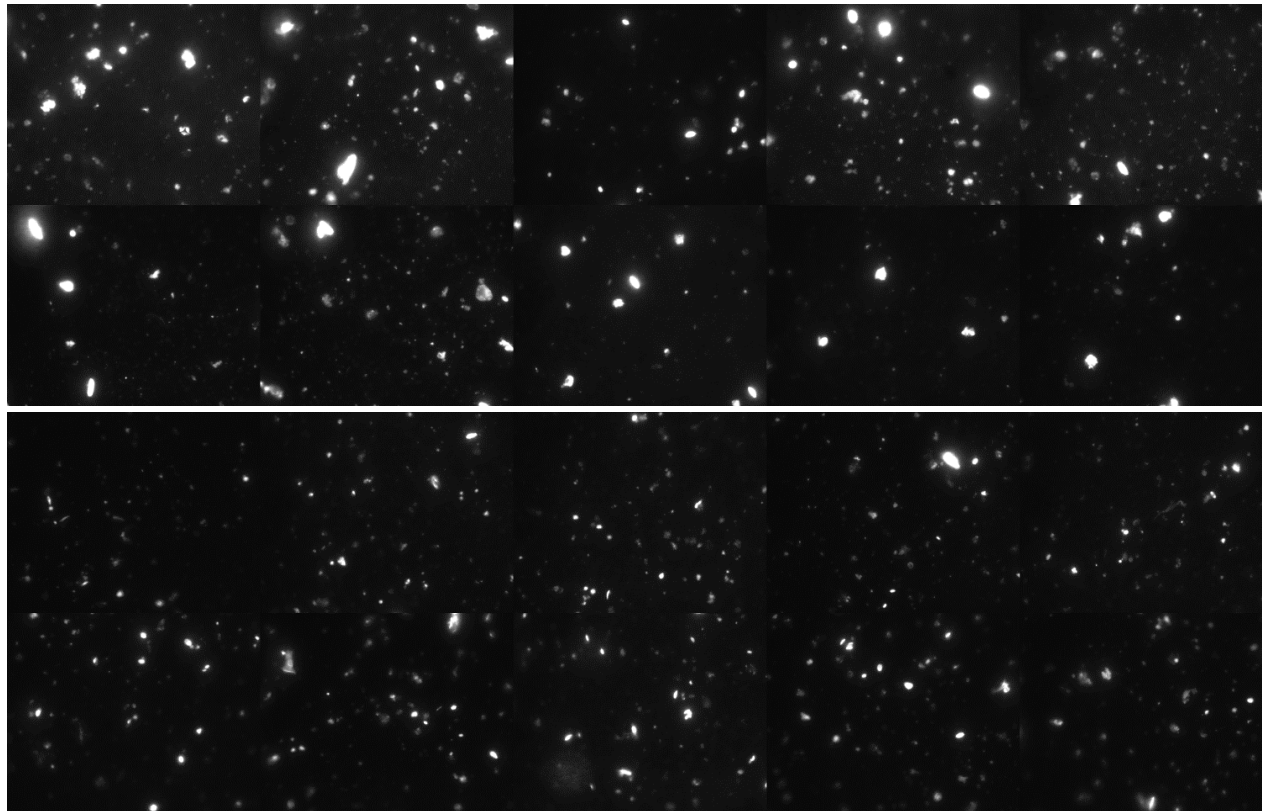


Ioduro propidio

Sybr<sup>®</sup> Green

# ANALISI: ACQUISIZIONE ED ELABORAZIONE IMMAGINI

- Si acquisiscono 10 immagini in zone diverse della membrana:



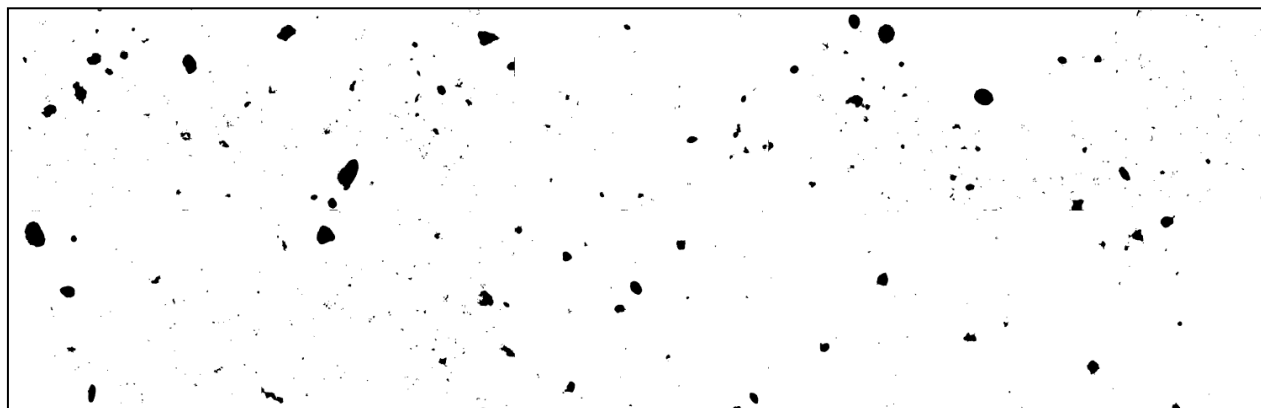
S2:  $10 < AD < 5,6 \mu\text{m}$

S4:  $3,2 < AD < 1,8 \mu\text{m}$

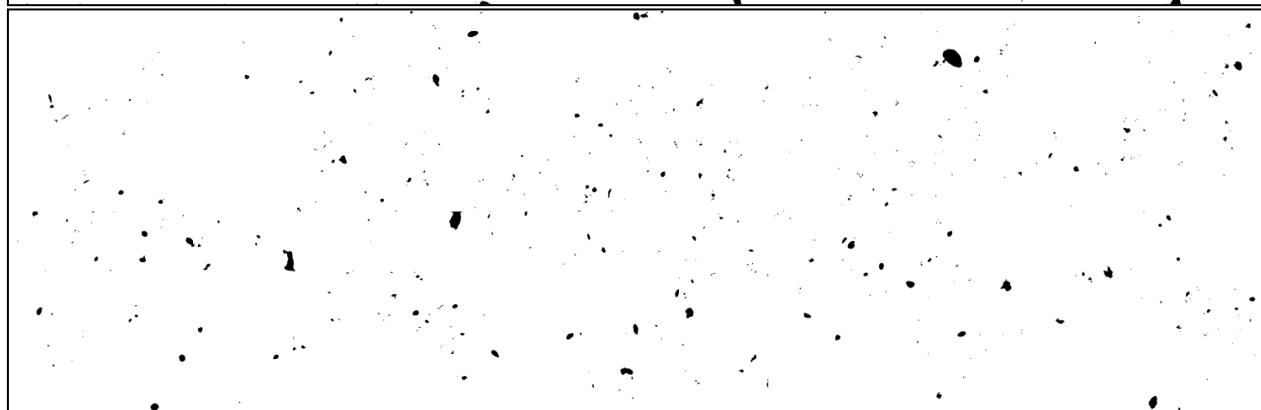


# ANALISI: ACQUISIZIONE ED ELABORAZIONE IMMAGINI

- Si acquisiscono 10 immagini in zone diverse della membrana:
- Le immagini sono elaborate mediante un software specifico (**ImageJ**) e trasformate in formato binario:



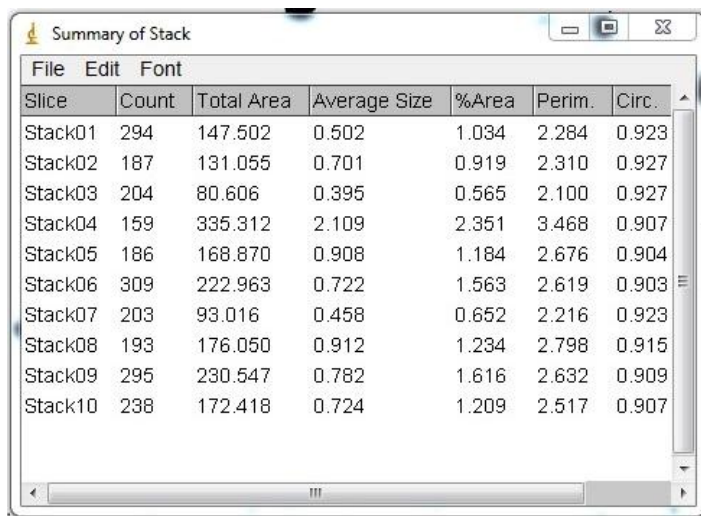
S2:  $10 < AD < 5,6 \mu\text{m}$



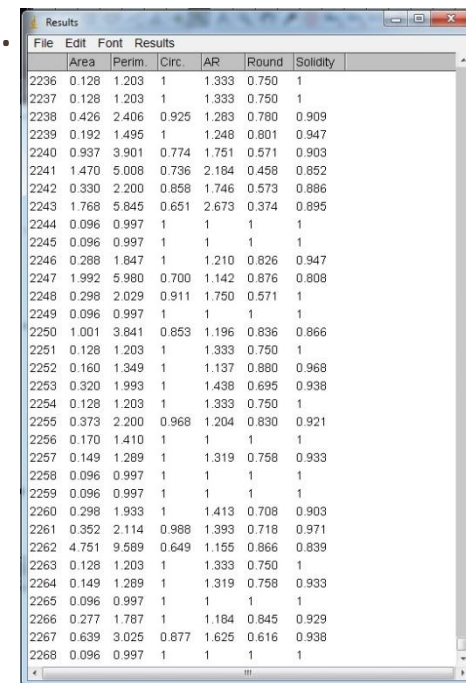
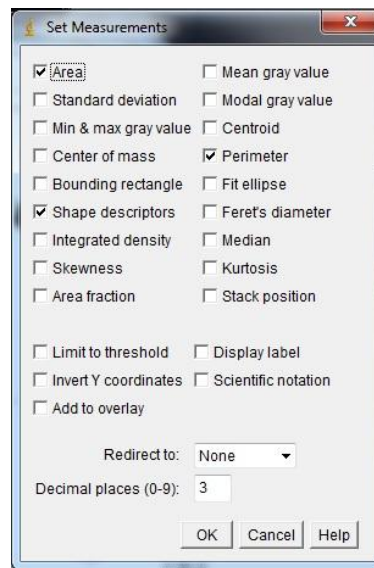
S4:  $3,2 < AD < 1,8 \mu\text{m}$

# ANALISI: ACQUISIZIONE ED ELABORAZIONE IMMAGINI

- Si acquisiscono 10 immagini in zone diverse della membrana:
- Le immagini sono elaborate mediante un software specifico (**ImageJ**) e trasformate in formato binario:
- Il software effettua il conteggio delle particelle e ne fornisce le dimensioni reali, il fattore di forma (sfericità), l'area superficiale, e molti altri parametri accessori.



Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Perim.	Circ.
Stack01	294	147.502	0.502	1.034	2.284	0.923
Stack02	187	131.055	0.701	0.919	2.310	0.927
Stack03	204	80.606	0.395	0.565	2.100	0.927
Stack04	159	335.312	2.109	2.351	3.468	0.907
Stack05	186	168.870	0.908	1.184	2.676	0.904
Stack06	309	222.963	0.722	1.563	2.619	0.903
Stack07	203	93.016	0.458	0.652	2.216	0.923
Stack08	193	176.050	0.912	1.234	2.798	0.915
Stack09	295	230.547	0.782	1.616	2.632	0.909
Stack10	238	172.418	0.724	1.209	2.517	0.907

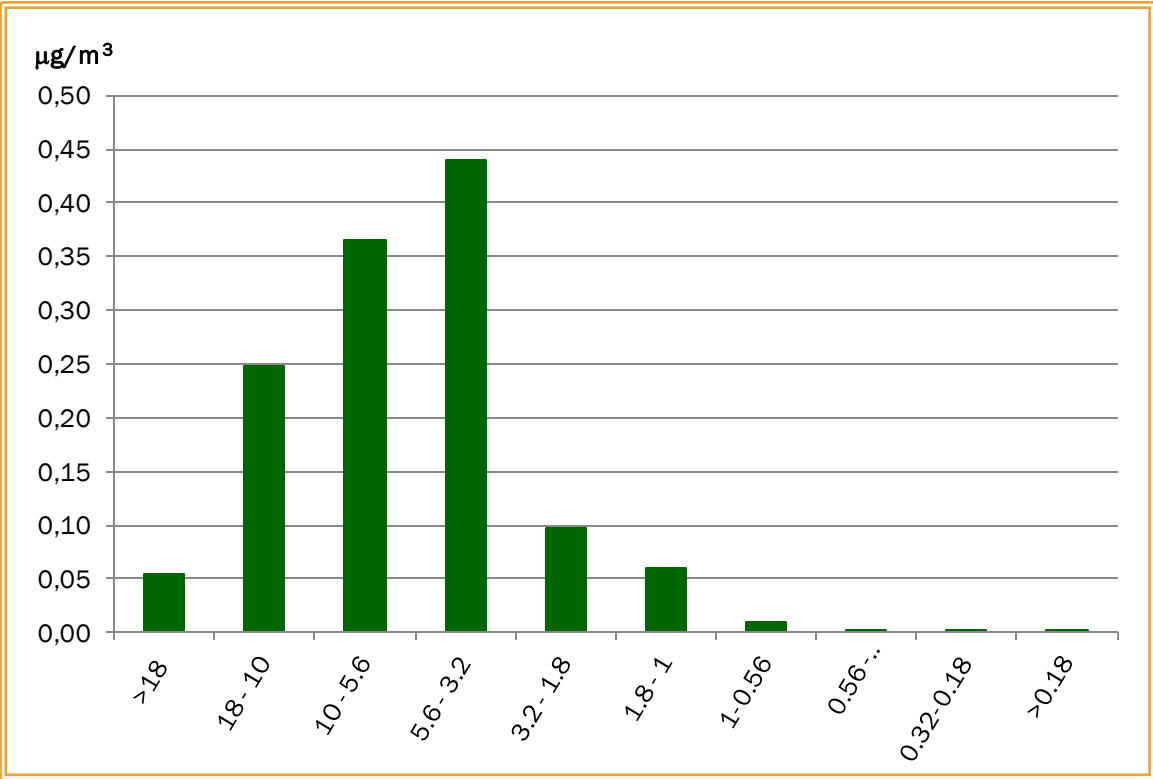


File	Edit	Font	Results						
Area	Perim.	Circ.	AR	Round	Solidity				
2236	0.128	1.203	1	1.333	0.750	1			
2237	0.128	1.203	1	1.333	0.750	1			
2238	0.426	2.406	0.925	1.283	0.780	0.909			
2239	0.192	1.495	1	1.248	0.801	0.947			
2240	0.937	3.901	0.774	1.751	0.571	0.903			
2241	1.470	5.008	0.736	2.184	0.458	0.852			
2242	0.330	2.200	0.858	1.746	0.573	0.886			
2243	1.768	5.845	0.651	2.673	0.374	0.895			
2244	0.096	0.997	1	1	1	1			
2245	0.096	0.997	1	1	1	1			
2246	0.288	1.847	1	1.210	0.826	0.947			
2247	1.992	5.980	0.700	1.142	0.876	0.808			
2248	0.298	2.029	0.911	1.750	0.571	1			
2249	0.096	0.997	1	1	1	1			
2250	1.001	3.841	0.853	1.196	0.836	0.866			
2251	0.128	1.203	1	1.333	0.750	1			
2252	0.160	1.349	1	1.137	0.880	0.968			
2253	0.320	1.993	1	1.438	0.695	0.938			
2254	0.128	1.203	1	1.333	0.750	1			
2255	0.373	2.200	0.968	1.204	0.830	0.921			
2256	0.170	1.410	1	1	1	1			
2257	0.149	1.289	1	1.319	0.758	0.933			
2258	0.096	0.997	1	1	1	1			
2259	0.096	0.997	1	1	1	1			
2260	0.298	1.933	1	1.413	0.708	0.903			
2261	0.352	2.114	0.988	1.393	0.718	0.971			
2262	4.751	9.589	0.649	1.155	0.866	0.839			
2263	0.128	1.203	1	1.333	0.750	1			
2264	0.149	1.289	1	1.319	0.758	0.933			
2265	0.096	0.997	1	1	1	1			
2266	0.277	1.787	1	1.184	0.845	0.929			
2267	0.639	3.025	0.877	1.625	0.616	0.938			
2268	0.096	0.997	1	1	1	1			

# ANALISI: ACQUISIZIONE ED ELABORAZIONE IMMAGINI

- Si acquisiscono 10 immagini in zone diverse della membrana:
- Le immagini sono elaborate mediante un software specifico (**ImageJ**) e trasformate in formato binario:
- Il software effettua il conteggio delle particelle e ne fornisce le dimensioni reali, il fattore di forma (sfericità), l'area superficiale, e molti altri parametri accessori.
- A seconda del fattore di sfericità (0 - 1), ogni particella viene approssimata ad un cilindro o ad una sfera, quindi se ne calcola il volume.
- Utilizzando il valore di densità più comunemente riportato in letteratura per il bioaerosol ( $1.2 \text{ g/cm}^3$ ), si ottiene una stima della massa e quindi della concentrazione finale di particelle positive alla fluorescenza.

# RISULTATI: IMPATTORE - MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA



μm	μg/m³
>18	<b>0.054</b>
18 - 10	<b>0.25</b>
10 - 5.6	<b>0.37</b>
5.6 - 3.2	<b>0.44</b>
3.2 - 1.8	<b>0.097</b>
1.8 - 1	<b>0.060</b>
1 - 0.56	<b>0.010</b>
0.56 - 0.32	<b>0.002</b>
0.32 - 0.18	<b>0.0005</b>
>0.18	<b>0.002</b>

**Concentrazione stadi PM<sub>10</sub>: 0.98 μg/m³**

**Concentrazione totale: 1,3 μg/m³**

Concentrazione media del PM<sub>10</sub> nel periodo: 25μg/m³



# METODO: CITOMETRIA A FLUSSO

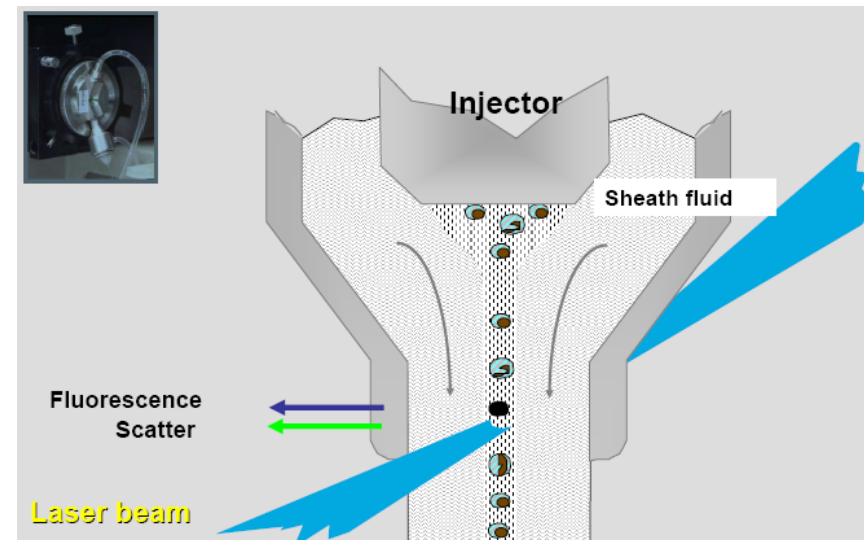


Apogee A50-micro

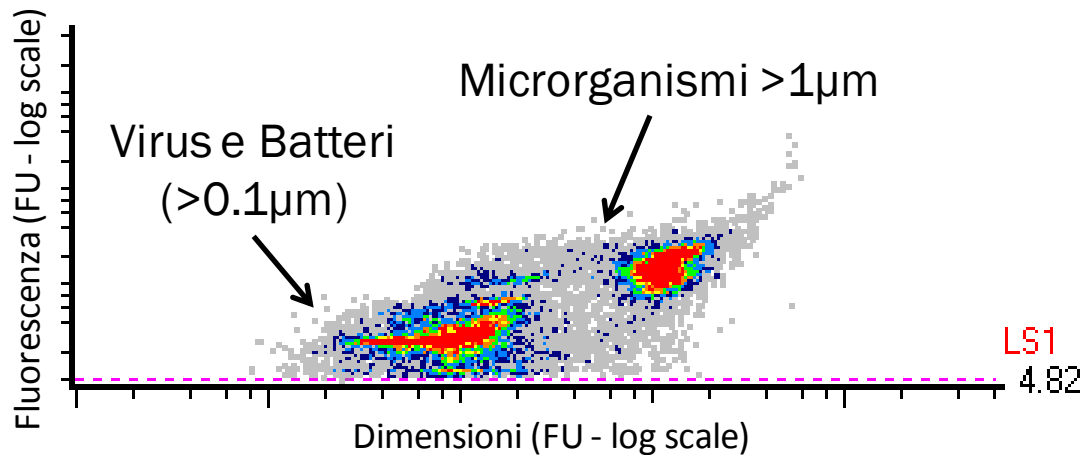
- Strumento da banco
- Portatile (<30Kg)
- Allineamento del laser stabile nel tempo
- Ampio intervallo dimensionale di rivelazione delle particelle (diametro 0.1-70  $\mu\text{m}$ )
- Rapida acquisizione del segnale (fino a 1000 eventi/secondo)

## Analisi multiparametrica

I segnali di fluorescenza e di scatter del laser permettono un conteggio accurato ed una rapida identificazione delle caratteristiche morfologiche delle singole cellule o particelle o disperse in soluzione.



# METODO: CITOMETRIA A FLUSSO

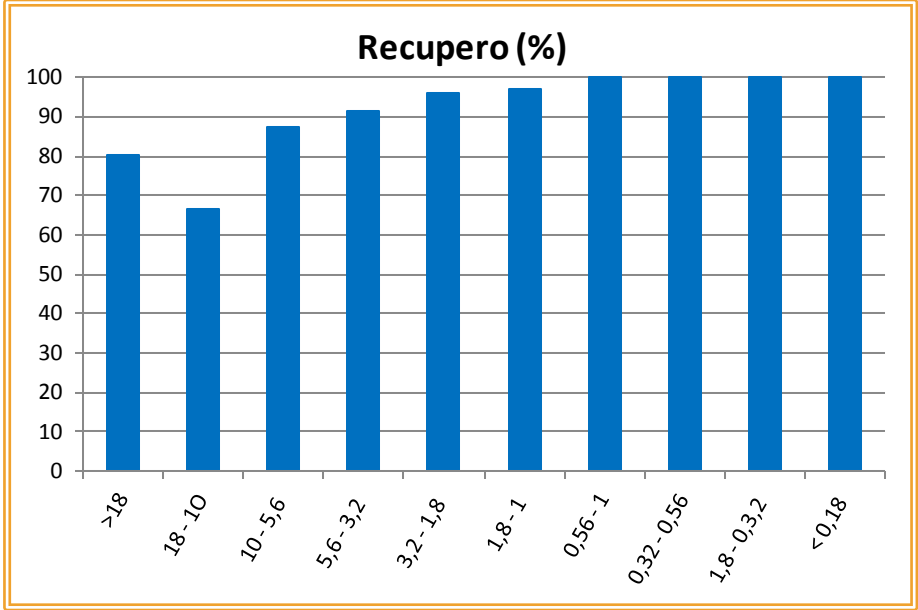
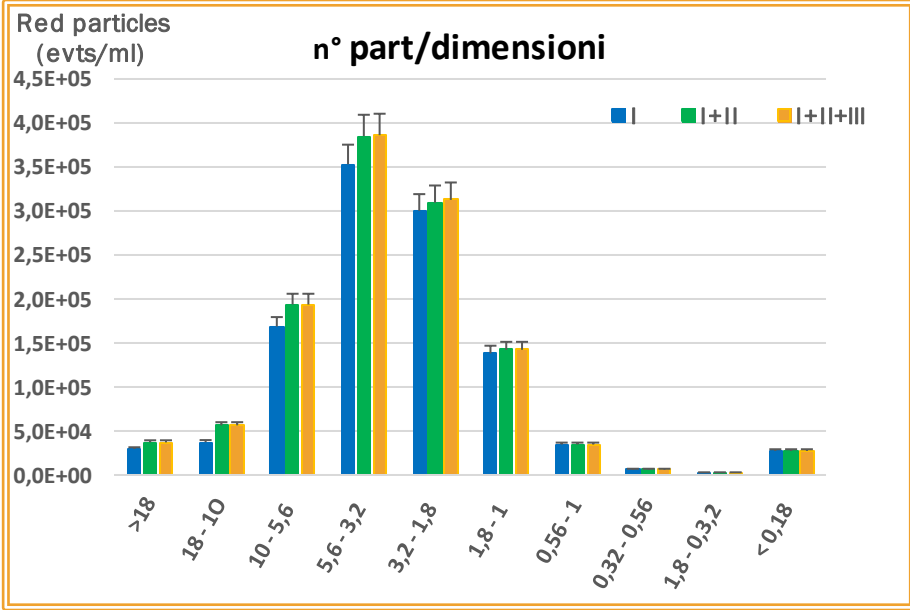


## Impostazioni strumentali:

- Lasers = 488 nm
- Fluorescenza *Green* (520/10 nm)
- Fluorescenza *Red* (610 nm LP)
- *Forward light scatter* (dimensioni particella)
- Volume iniettato: 100-400 µl
- Flusso: 1.4-38.9 µl/min

La tecnica consente l'identificazione di microrganismi e frammenti di varie dimensioni, in base ai segnali di fluorescenza (numero) e di light scatter

# RISULTATI: IMPATTORE - CITOMETRIA A FLUSSO

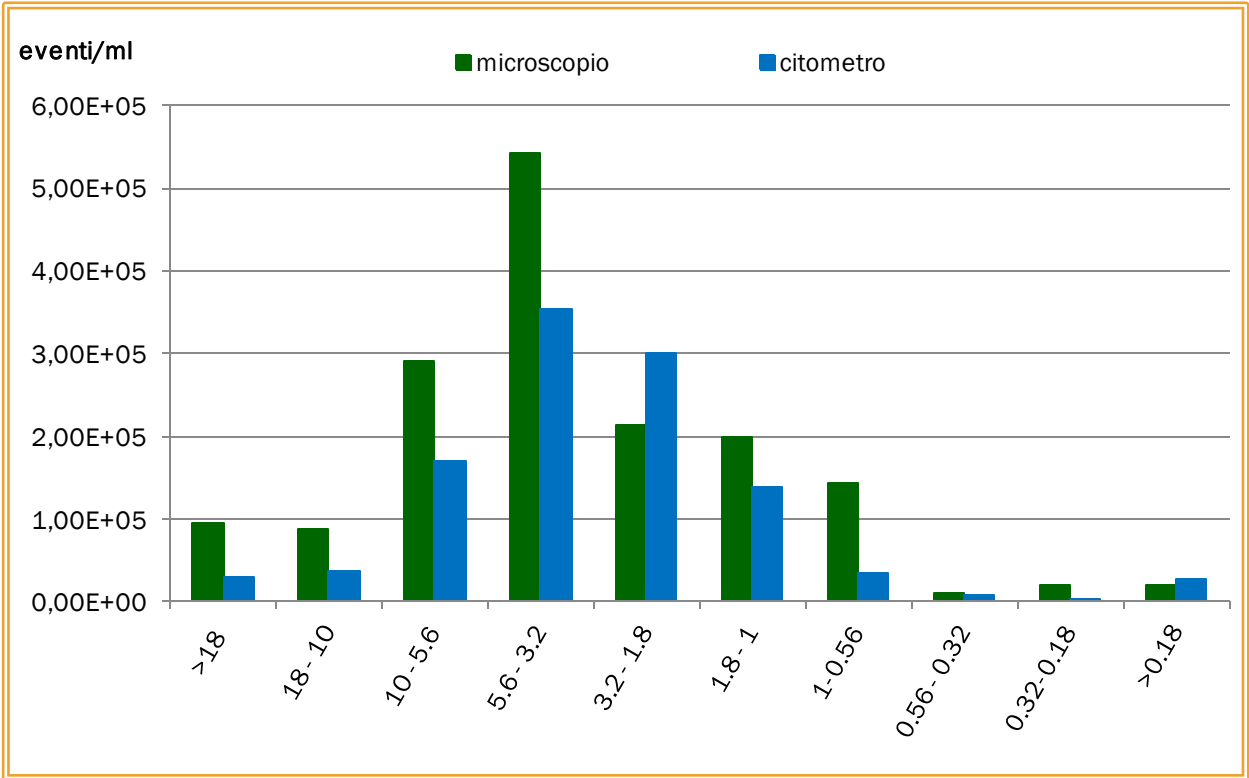


L'analisi citometrica su ogni stadio evidenzia che il **numero di particelle positive alla fluorescenza** presenta un massimo in corrispondenza dello stadio S3 (5.6<AD<3.2 µm).

L'efficienza di estrazione è risultata compresa tra il 70 ed il 100%. L'efficienza aumenta al diminuire delle dimensioni; per un distacco quantitativo delle particelle più grandi è necessaria una seconda estrazione.

# RISULTATI: CONFRONTO MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA – CITOMETRIA A FLUSSO -

Il confronto tra i dati ricavati dall'elaborazione delle immagini acquisite al Microscopio e quelli forniti dal Citometro mostra un buon accordo tra le due tecniche.

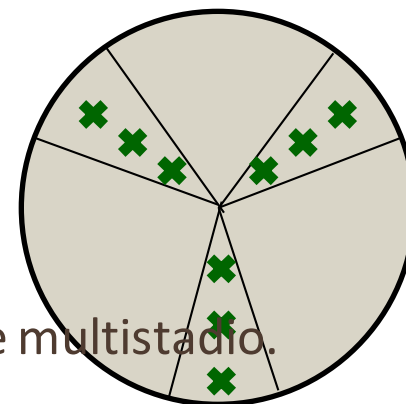


µm	Microscopio/ citometro
>18	<b>3,11</b>
18 - 10	<b>2,27</b>
10 - 5.6	<b>1,72</b>
5.6 - 3.2	<b>1,53</b>
3.2 - 1.8	<b>0,71</b>
1.8 - 1	<b>1,43</b>
1 - 0.56	<b>4,04</b>
0.56 - 0.32	<b>1,46</b>
0.32 - 0.18	<b>5,09</b>
>0.18	<b>0,74</b>

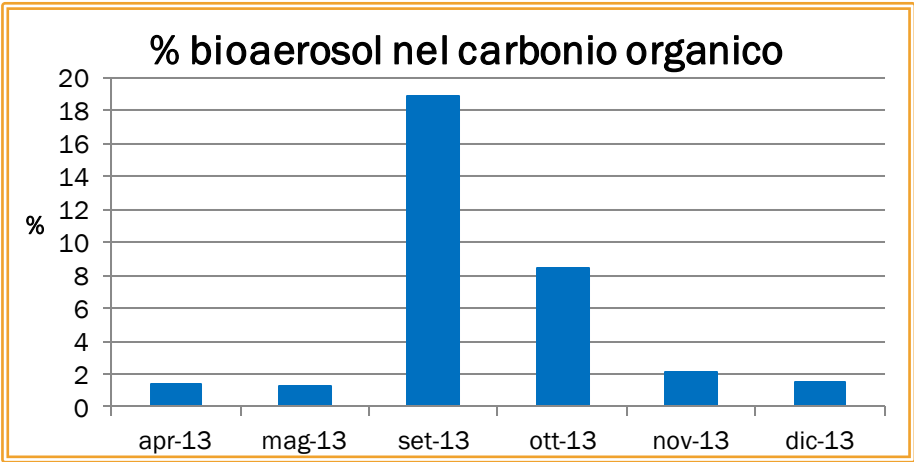
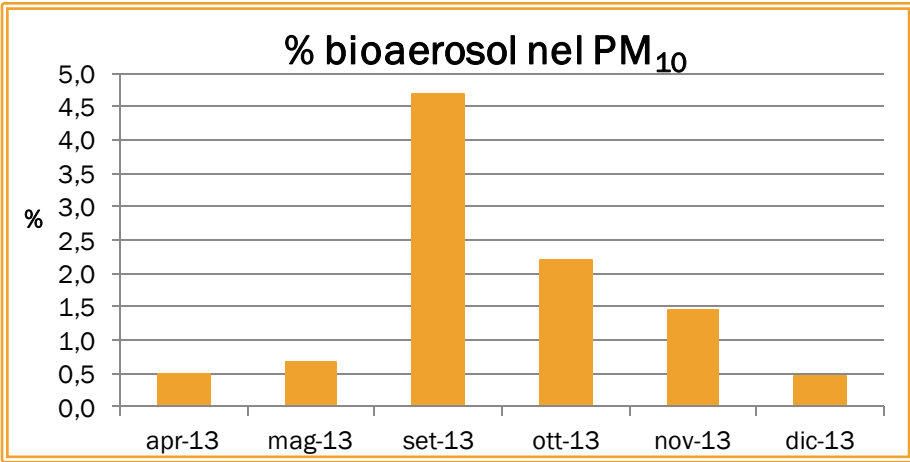
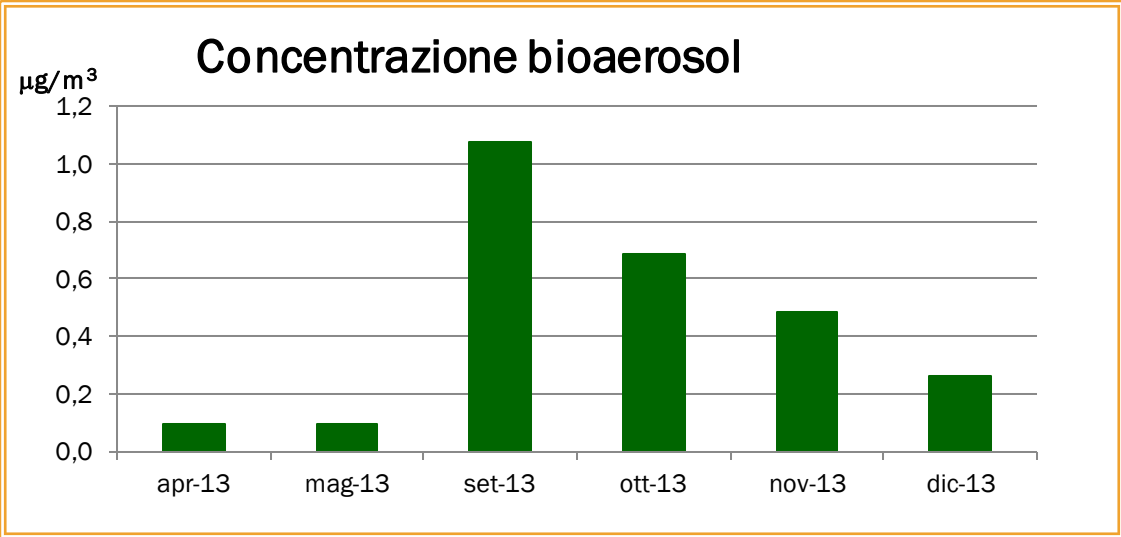


# CAMPIONI MENSILI: METODO DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI

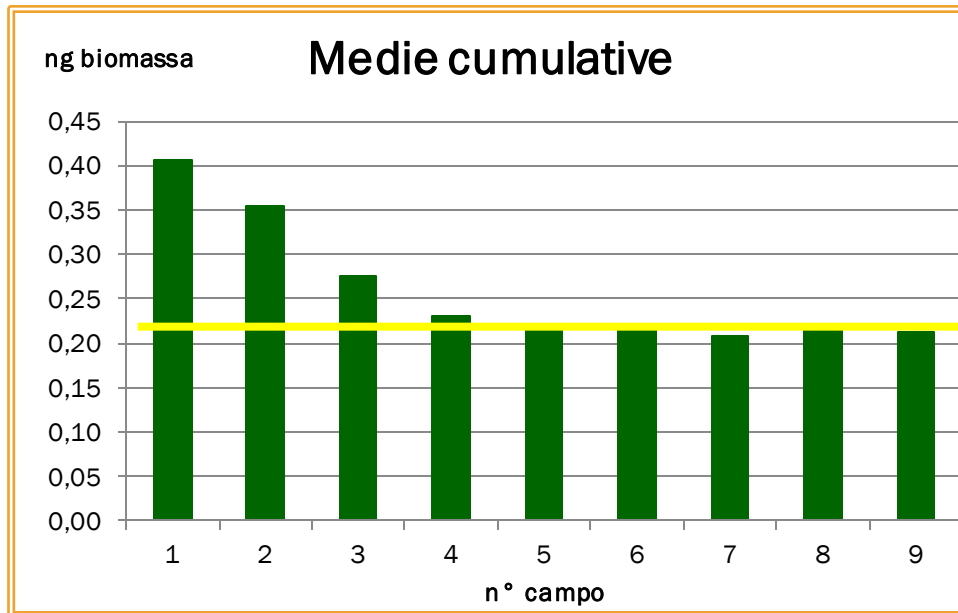
- Nel 2013 sono stati raccolti campioni di  $PM_{10}$  per la valutazione semi-quantitativa del contenuto di bioaerosol nel particolato atmosferico.
- I campioni sono stati raccolti in parallelo su membrane di quarzo e policarbonato, destinate rispettivamente all'analisi del carbonio organico mediante analizzatore termo-ottico e alla stima della concentrazione di bioaerosol mediante microscopia ad epifluorescenza.
- Il filtro in policarbonato viene marcato con una soluzione di Ioduro Propidio 1%, e direttamente sottoposto ad analisi mediante microscopio ad epifluorescenza.
- Vengono acquisite 9 serie di immagini in zone diverse del filtro. Ogni serie è costituita da 10 immagini adiacenti.
- L'elaborazione delle immagini mediante software è la stessa descritta per i campioni prelevati con impattore multistadio.



# RISULTATI: CAMPIONI MENSILI



# RISULTATI: CAMPIONI MENSILI



$\mu\text{m}$	ng biomassa
>18	<b>0.000</b>
18 - 10	<b>3.4</b>
10 - 5.6	<b>0.7</b>
5.6 - 3.2	<b>4.3</b>
3.2 - 1.8	<b>9.5</b>
1.8 - 1	<b>2.4</b>
1 - 0.56	<b>0.5</b>
0.56 - 0.32	<b>0.3</b>
0.32 - 0.18	<b>0.004</b>
>0.18	<b>0.00002</b>

Biomassa media su filtro: 21.2 ng

Circa l'84% della biomassa è inclusa nel contributo grossolano della polvere ( $\text{PM}_{10}$ - $\text{PM}_{2.5}$ ).

# CONCLUSIONI

- E' stato messo a punto un metodo per la valutazione semi-quantitativa del contributo di bioaerosol al PM.
- Il metodo è basato sulla marcatura di particelle contenenti acidi nucleici (DNA, RNA) mediante Ioduro propidio, analisi mediante microscopio ad epifluorescenza, elaborazione di immagini.
- Le analisi sono state effettuate anche mediante citometro a flusso. Le due tecniche hanno mostrato un buon accordo.
- La distribuzione dimensionale delle particelle di origine biologica è prevalentemente nella frazione dimensionale grossolana.
- Su campioni di PM<sub>10</sub>, il contributo di bioaerosol rappresenta fino al **20% del carbonio organico** e fino al **5% della polvere totale**.

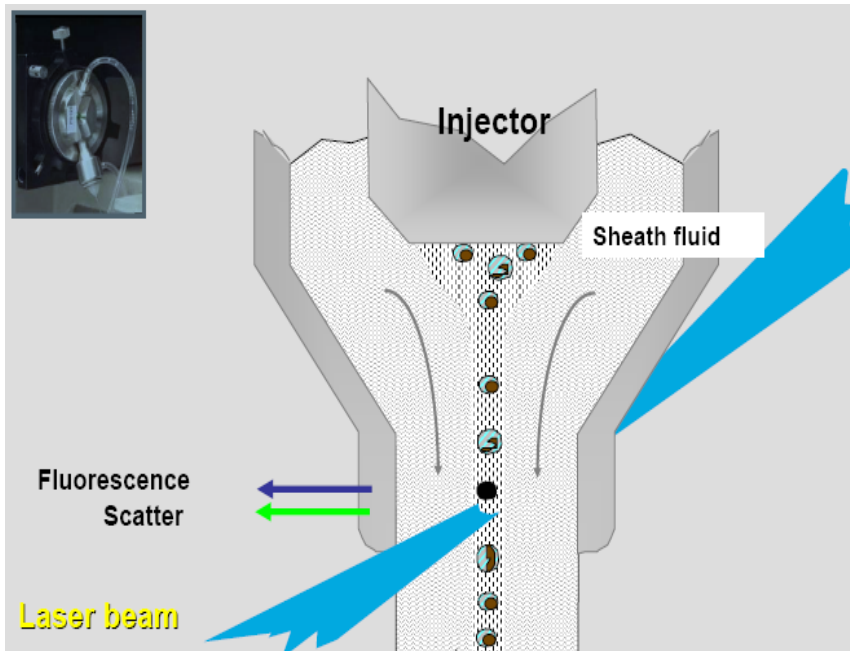


# *Grazie per l'attenzione*

...work in progress...

*marcovecchio@iia.cnr.it*

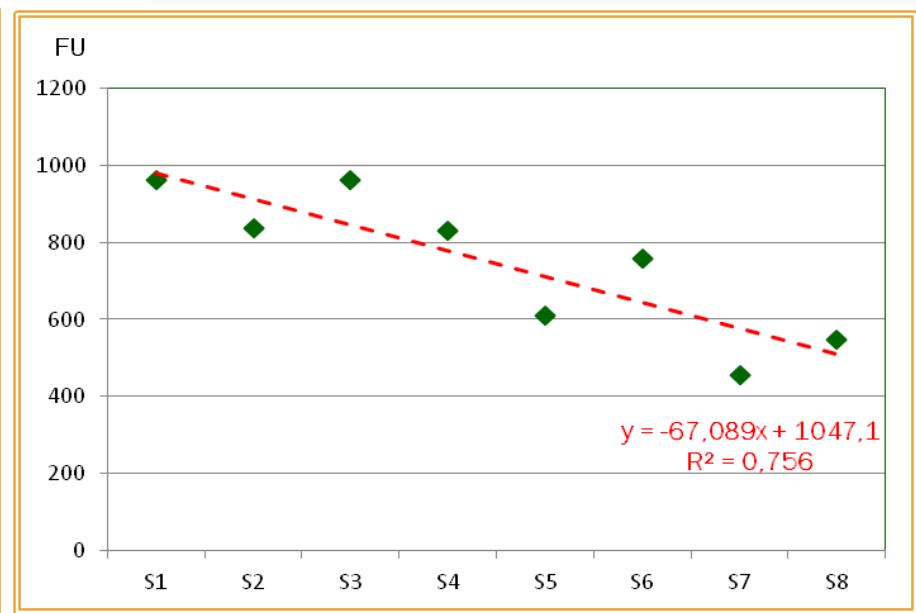
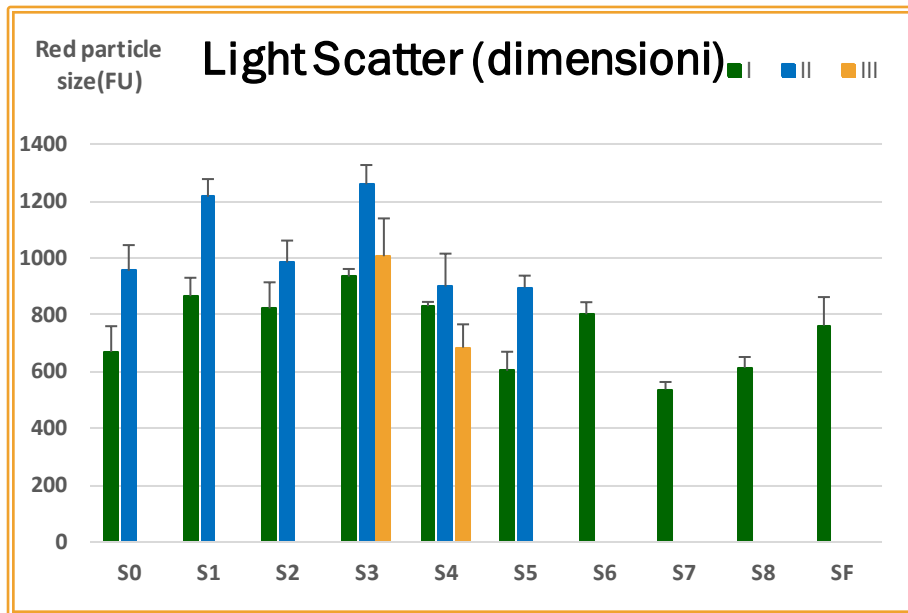
# METODO: CITOMETRIA A FLUSSO



Lo strumento è costituito da 3 componenti:

- **Sistema fluidico**, che controlla la captazione ed il flusso delle particelle.  
Le particelle vengono iniettate in singola fila nella camera di flusso.
- **Sistema ottico**, che conta ed analizza le particelle mentre attraversano il fascio di luce polarizzata del laser; ogni particella riflette la luce e genera segnali di fluorescenza e scatter.
- **Sistema elettronico**, che raccoglie ed analizza i dati, attraverso un software di interfaccia che converte i segnali in valori digitali e li invia al pc.

# RISULTATI: CITOMETRIA A FLUSSO



➤ Le particelle piccole in tutti gli stadi si staccano già alla prima estrazione, quelle più grandi, presenti nei primi stadi (S0 – S3) si staccano progressivamente nella seconda e terza estrazione.

➤ Al diminuire delle dimensioni diminuisce il segnale di fluorescenza.  
➤ Il citometro riconosce la variazione di dimensioni di particelle appartenenti a stadi diversi che forniscono segnali di FU decrescenti ( $R^2=0,76$ )