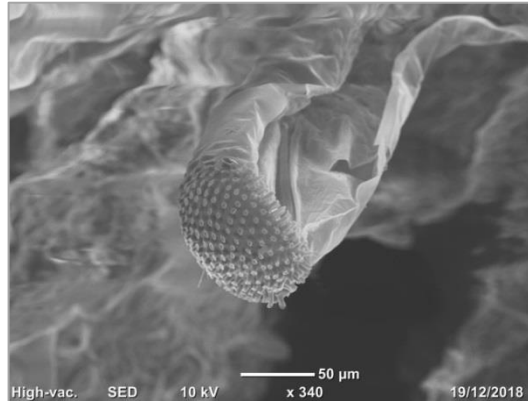
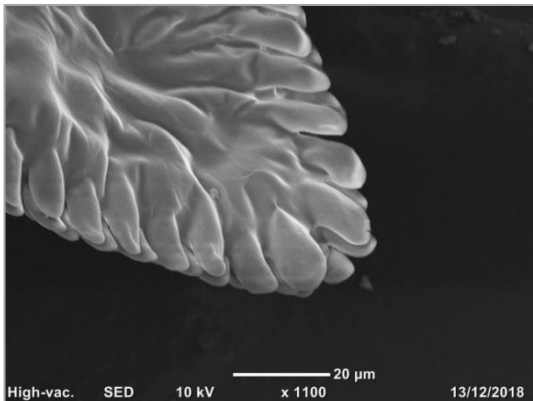


PROTOCOLLO OPERATIVO

per la preparazione dei campioni molli da osservare al microscopio elettronico a scansione (SEM)



Autori:

Rosalba Padula, Arpa Umbria (Centro "Cambiamento Climatico e Biodiversità degli Ambienti Lacustri e Aree Umide" Isola Polvese, Perugia), Claudia Benvenuti, CREA-DC Firenze (Centro di Difesa e Certificazione); Antonella Carosi, Università di Perugia (Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie)

Partecipanti:

Barbara Caldaroli, Valentina Della Bella, Gabriele Magara, Elena Mencaroni, Matteo Pallottini, Melissa Scoparo

Collaboratori:

Giulio Canonico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria-Marche (che si ringrazia per aver gestito tutte le fasi legate all'utilizzo del Liofilizzatore)

INTRODUZIONE:

Arpa Umbria dal 2017 ha avviato alcuni studi biologici per il miglioramento delle conoscenze su diversi organismi quali diatomee, pollini, spore fungine, crostacei, anche in collaborazione con ricercatori, professionisti, enti pubblici e privati. Per affrontare questi studi ci si è avvalsi, tra l'altro, del microscopio elettronico a scansione (SEM JEOL 6000Plus), disponibile presso il Laboratorio di Microscopia del Centro "Cambiamento climatico e Biodiversità degli Ambienti Lacustri e Aree Umide" sull'isola Polvese. Con il procedere delle attività, per migliorare l'osservazione morfologica al SEM, si è reso necessario studiare nuove tecniche di preparazione del campione.

Con il seguente "Protocollo" si vuole documentare quanto studiato durante il primo corso di formazione sulla preparazione dei campioni molli da osservare al SEM, che si è svolto sull'isola Polvese il 21 e il 22 novembre 2018, durante il quale si sono sperimentate sei (6) diverse tecniche di preparazione. Queste sono state testate su due crostacei: *Chirocephalus marchesonii* (Ruffo & Vesentini, 1957) e *Dikergammarus villosus* (Sowinsky, 1894).

Chirocephalus marchesonii: crostaceo branchiopode della famiglia Chirocephalidae, endemico del Lago di Pilato, piccolissimo specchio d'acqua di origine glaciale racchiuso nel massiccio del Monte Vettore, nel Parco Nazionale dei Monti Sibillini.

Dikergammarus villosus: noto anche come "gambero killer", crostaceo anfipode nativo dell'Europa orientale, ma diventato dilagante in tutta la parte occidentale del continente. Nelle zone che ha invaso, vive in una vasta gamma di habitat.

OBIETTIVI:

Le tecniche proposte ed eseguite durante la sperimentazione iniziata a novembre 2018, avevano come obiettivo il miglioramento dell'analisi morfologica per lo studio dei caratteri di interesse tassonomico dei crostacei. In particolare la sperimentazione è stata effettuata sul *Chirocephalus marchesonii* e sul *Dikergammarus villosus*.

Di seguito vengono descritte sei (6) diverse tecniche di preparazione, a cui se ne aggiungono due (vii e viii) di cui vengono fornite le istruzioni operative, ma non sono state provate:

- i) Preparazione con Glutaraldeide al 4% e successiva osservazione al SEM;
- ii) Preparazione con Karnovsky e successiva osservazione al SEM;
- iii) Preparazione con Glutaraldeide al 4% + zucchero 1,8% e successiva osservazione al SEM;
- iv) Preparazione con Glutaraldeide al 4%, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM;
- v) Preparazione con Karnovsky, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM;
- vi) Preparazione con Glutaraldeide al 4% + zucchero 1,8%, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM;
- vii) Preparazione semplice con scala di alcool e successiva osservazione al SEM;
- viii) Preparazione semplice con scala di alcool, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM

Una volta testate, si propone di estendere e sperimentare le stesse tecniche di preparazione anche ad altri organismi biologici.

AVVERTENZE:

Si consiglia, prima di procedere alla preparazione del campione, di:

- eliminare impurità grossolane (sedimento, pietrisco, alghe) che possono alterare la preparazione del campione;
- avere chiaro l'obiettivo di ricerca (cosa voglio studiare? Tutto l'organismo? Una parte?)

Considerando che alcuni prodotti necessari nelle varie fasi di preparazione, sono tossici o altamente inquinanti, è necessario prendere le dovute precauzioni di sicurezza personale (guanti, camice, mascherina, cappa chimica) e di trattamento dei rifiuti (stoccaggio materiale in ingresso/uscita, smaltimento dei liquidi/solidi).

STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA:

Embro dish (Saliera)	Etanolo (C ₂ H ₅ OH) 100%	Cappa chimica
Micropipetta	Alcool Tertbutilico	Frigorifero
Punte per micropipetta da 1ml	Glutaraldeide 4%	Congelatore
Guanti monouso	Tetrossido di Osmio 2%	Liofilizzatore
Camice	Cacodilato	
Contenitori tipo Falcon	Acqua bidistillata	

TAMPONI:

Le procedure di preparazione dei campioni molli illustrate in questo "Protocollo", si basano sull'uso ripetuto di tamponi. Di seguito indicazioni precise sulle loro caratteristiche ed usi. Nel nostro lavoro è stato utilizzato il tampone Cacodilato. Si propone la sperimentazione anche con tampone Fosfato.

Tampone CACODILATO	Tampone FOSFATO
Il tampone è tossico (contiene Arsenico As)	Il tampone non è tossico
Non subisce contaminazione nel tempo. Penetra velocemente nei tessuti	Si contamina rapidamente. Simile per composizione ad alcuni componenti dei fluidi cellulari
Cacodilato di Na 0,2M + HCl 0,2M	Fosfato bisodico 0,2M + Fosfato monosodico 0,2M (soluzione A+B)

FISSATIVI:

Nelle fasi di Fissazione e Post-fissazione, possono essere usati diversi fissativi, di seguito descritti nelle caratteristiche ed usi. Nella nostra sperimentazione sono stati utilizzati la Glutaraldeide al 4% e il Tetrossido di Osmio al 2%

GLUTARALDEIDE	KARNOVSKY	FORMALDEIDE	TETROSSIDO DI OSMIO
Si trova in commercio in soluzione acquosa al 25%	Si trova in commercio in soluzione acquosa	Si trova in commercio in soluzione acquosa	Si trova in commercio come sale o in soluzione acquosa al 4%

GLUTARALDEIDE	KARNOVSKY	FORMALDEIDE	TETROSSIDO DI OSMIO
Si conserva in frigorifero	Si conserva in frigorifero	Si conserva a temperatura ambiente	Si conserva in frigorifero
Si usa diluito in tampone al 4%	Si utilizza direttamente, senza diluizioni	Si usa anche in soluzioni composte con Glutaraldeide	Si usa a temperatura ambiente
Fissa in modo stabile la frazione proteica dei campioni	La stabilizzazione del campione è doppia	Ad alto grado di penetrazione	Fissa i lipidi presenti nel campione e lo colora perché precipita. E' meglio diluirlo con il tampone al momento dell'uso per evitare precipitazioni
E' tossica	E' tossico	E' tossico	E' tossico

PROCEDIMENTO:

Le tecniche di preparazione utilizzate sono state complessivamente sei (6); per le ultime due (2), vii e viii, si propone la sperimentazione. Per ognuna delle 8 tecniche è, comunque prevista una sequenza di fasi ben definita (vedi capitolo "Fasi di lavoro").

Di seguito si riassume la procedura per ogni diversa preparazione dettagliandola anche nei tempi minimi, proposti, necessari ad attuarla:

- i) Preparazione con Glutaraldeide al 4% e successiva osservazione al SEM
 Procedere con questa tecnica richiede almeno 16h per la fase di preparazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
45'	Lavaggio tampone	2a
120'	Fissativo	3a
45'	Lavaggio tampone	2a
600' (circa)	Post-fissativo (intera notte)	4a
45'	Lavaggio tampone	2a
80'	Scala alcool	5
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- ii) Preparazione con Karnovsky e successiva osservazione al SEM
 Procedere con questa tecnica richiede almeno 8h per la fase di preparazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
45'	Lavaggio tampone	2a
120'	Fissativo	3b
45'	Lavaggio tampone	2a
120'	Post-fissativo	4b
45'	Lavaggio tampone	2a
80'	Scala alcool	5
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- iii) Preparazione con Glutaraldeide al 4% + zucchero 1,8% e successiva osservazione al SEM
 Procedere con questa tecnica richiede almeno 8h per la fase di preparazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
45'	Lavaggio tampone	2b
120'	Fissativo	3c
45'	Lavaggio tampone	2b
120'	Post-fissativo	4c
45'	Lavaggio tampone	2b
80'	Scala alcool	5
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- iv) Preparazione con Glutaraldeide al 4%, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM
Procedere con questa tecnica richiede almeno 16h per la fase di preparazione, più il tempo della liofilizzazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
45'	Lavaggio tampone	2b
120'	Fissativo	3a
45'	Lavaggio tampone	2b
600' (circa)	Post-fissativo (intera notte)	4a
45'	Lavaggio tampone	2a
80'	Scala alcool	5
Come da programma	Liofilizzazione	6
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- v) Preparazione con Karnovsky, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM
Procedere con questa tecnica richiede almeno 8h per la fase di preparazione, più il tempo della liofilizzazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
45'	Lavaggio tampone	2a
120'	Fissativo	3b
45'	Lavaggio tampone	2a
120'	Post-fissativo	4b
45'	Lavaggio tampone	2a
80'	Scala alcool	5
Come da programma	Liofilizzazione	6
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- vi) Preparazione con Glutaraldeide al 4% + zucchero 1,8%, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM
Procedere con questa tecnica richiede almeno 8h per la fase di preparazione, più il tempo della liofilizzazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
45'	Lavaggio tampone	2b
120'	Fissativo	3c
45'	Lavaggio tampone	2b
120'	Post-fissativo	4c
45'	Lavaggio tampone	2b
80'	Scala alcool	5
Come da programma	Liofilizzazione	6
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- vii) Preparazione semplice con scala di alcool e successiva osservazione al SEM
Procedere con questa tecnica richiede almeno 2h per la fase di preparazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
80'	Scala alcool	5
///	Osservazione morfologica al SEM	///

- viii) Preparazione semplice con scala di alcool, liofilizzazione e successiva osservazione al SEM
Procedere con questa tecnica richiede almeno 2h per la fase di preparazione, più il tempo della liofilizzazione, ed operare secondo il seguente schema:

Tempo (' minuti)	Descrizione fase	Spiegazione fase (punto)
30'	Lavaggio acqua (bidistillata)	1
80'	Scala alcool	5
Come da programma	Liofilizzazione	6
///	Osservazione morfologica al SEM	///

FASI DI LAVORO:

Di seguito vengono descritte le diverse fasi di lavoro che sono comuni a tutte le preparative.

1) LAVAGGIO CON ACQUA

Il lavaggio in acqua distillata o, preferibilmente bidistillata, è previsto per tutti i campioni molli conservati in Formalina al 4%. Se invece, il campione è fresco, cioè immediatamente prelevato dal suo ambiente naturale, per la preparazione si consiglia di procedere passando direttamente all'esecuzione della fase spiegata al punto 2).

ADAGIARE il campione in una saliera;

COPRIRE il campione con acqua bidistillata per 10'

ELIMINARE l'acqua con una pipetta

RIPETERE l'operazione altre due(2) volte.

2) LAVAGGIO CON TAMPONE

Tra i diversi tipi di tampone proposti, tampone Fosfato o tampone Cacodilato (vedi Capitolo "Strumentazione e attrezzatura", Sezione "Tamponi"), se pur contenente sostanze tossiche, nella nostra sperimentazione è stato preferito il tampone Cacodilato, più stabile nel tempo. Di seguito sono descritte le due possibili opzioni di lavoro per il tampone Cacodilato:

2a) COPRIRE il campione posto nella saliera con il tampone Cacodilato;

LASCIARE agire il tampone per 15';

ELIMINARE il tampone con una pipetta;

RIPETERE l'operazione per altre 2 volte

2b) COPRIRE il campione posto nella saliera con il tampone Cacodilato+zucchero 1,8%;

LASCIARE agire il tampone per 15';

ELIMINARE il tampone con una pipetta;

RIPETERE l'operazione per altre 2 volte

3) TRATTAMENTO CON FISSATIVO

Il trattamento con fissativo dura in tutte le procedure proposte almeno 2h. I tempi di esposizione e il quantitativo del fissativo utilizzato variano a seconda della dimensione del campione. Il procedimento viene eseguito in ambiente controllato a 4°C, in quanto la bassa temperatura favorisce la penetrazione del fissativo nel campione.

3a) COPRIRE il campione posto nella saliera con Glutaraldeide 4%;

LASCIARE agire il fissativo per 2h in frigorifero a 4°C

3b) COPRIRE il campione posto nella saliera con Karnovsky;

LASCIARE agire il fissativo per 2h in frigorifero a 4°C

3c) COPRIRE il campione posto nella saliera con Glutaraldeide 4%+zucchero 1,8%;

LASCIARE agire il fissativo per 2h in frigorifero a 4°C

4) POST-FISSAZIONE

Per lo sviluppo di questa fase si utilizza Tetrossido di Osmio al 2%. Nonostante tra i fissativi proposti (vedi Capitolo "Strumentazione e attrezzatura", Sezione "Fissativi") sia quello più tossico, il Tetrossido di Osmio ha un'ottima capacità di penetrazione nel campione. I tempi di post-fissazione variano a seconda della tecnica di preparazione scelta. Si lavora a temperatura ambiente.

4a) COPRIRE il campione posto nella saliera con Tetrossido di Osmio 2%;

LASCIARE agire il fissativo per almeno 8h (tutta la notte) a temperatura ambiente.

4b) COPRIRE il campione posto nella saliera con Tetrossido di Osmio 2%;

LASCIARE agire il fissativo per 2h a temperatura ambiente.

4c) COPRIRE il campione posto nella saliera con Tetrossido di Osmio 2%+zucchero 1,8%;

LASCIARE agire il fissativo per 2h a temperatura ambiente.

5) DISIDRATAZIONE CON ALCOOL

Tale fase utilizza l'Etanolo diluito a diverse concentrazioni: 30%, 50%, 70%, 90% e puro al 100%. Ogni passaggio va ripetuto 3 volte con tempistiche variabili da 5' a 10'.

COPRIRE il campione posto nella saliera con alcool diluito (30%, 50%, 70%, 90%);

LASCIARE agire l'alcool per 5';

ELIMINARE l'alcool con una pipetta;

RIPETERE l'operazione per altre 2 volte;

RIPETERE l'operazione per ognuna delle 4 diverse diluizioni degli alcool;

COPRIRE il campione posto nella saliera con alcool puro 100%;

LASCIARE agire l'alcool per 10';

ELIMINARE l'alcool con una pipetta;

RIPETERE l'operazione per altre 2 volte

6) LIOFILIZZAZIONE

Per completare la preparazione del campione con la Liofilizzazione, la procedura di esecuzione è la seguente:

PORRE il campione nel contenitore idoneo alla procedura di Liofilizzazione;

COPRIRE il campione con alcool Tertbutilico e porlo in freezer fino al momento della liofilizzazione;

CHIUDERE il campione;

LIOFILIZZARE il campione;

CONSERVARE il campione in frigorifero, prima dell'osservazione al microscopio elettronico a scansione SEM. Il campione va comunque metallizzato.

RISULTATI:

I risultati forniti dalla sperimentazione devono essere tenuti in stretta considerazione al fine di meglio valutare la tecnica da utilizzare:

- 1) La lettura del *Chirocephalus marchesonii* a completamento delle procedure *i)*, *ii)*, e *iii)* non ha dato risultato accettabili. L'organismo si è presentato piatto e non leggibile. Il vuoto creato dal metallizzatore ha portato al collassamento del campione;
- 2) La lettura del *Dikerogammarus villosus* a completamento della procedura *ii)*, ha mostrato un campione turgido e ben osservabile al SEM; nessun miglioramento nella lettura morfologica al SEM con le tecniche proposte al punto *i)* e *iii)*;
- 3) La lettura del *Chirocephalus marchesonii* dopo liofilizzazione e la procedura *vi)*, nonostante un iniziale turgore, non ha permesso una corretta osservazione, perché il campione dopo poco si è appiattito;
- 4) La lettura del *Chirocephalus marchesonii* dopo liofilizzazione e la procedura *v)*, ha fornito buoni risultati. Il crostaceo si è mantenuto turgido per tutto il tempo di osservazione