

SISTEMI DI COLTURE DI PROTISTI

1- INTRODUZIONE

2- CAMPIONAMENTO

3- ISOLAMENTO

4- MANTENIMENTO IN COLLEZIONE

5- IDENTIFICAZIONE

APPENDICE 1 - MEZZI DI COLTURA

APPENDICE 2 - STERILIZZAZIONE

1 - INTRODUZIONE

Ai protisti appartengono gli eucarioti unicellulari, sia autotrofi che eterotrofi.

I protisti sono cosmopoliti ed ubiquitari

Alle forme a vita libera, si aggiungono i parassiti.

Prendendo in considerazione i protisti a vita libera si nota che le piccole dimensioni consentono loro di vivere il proprio habitat come un insieme di microhabitats, che si traduce in una coesistenza di numerose forme entro brevi spazi.

Questo aspetto è evidenziato particolarmente bene nei sedimenti marini che presentano una ricchezza di forme viventi di gran lunga superiore a quella della colonna d'acqua che li sovrasta.

Alla base di ciò c'è soprattutto la gran quantità di materiale organico che per gravità si deposita sul sedimento, costituendo un substrato idoneo per la crescita batterica.

Lo studio dei sedimenti ha avuto inizio negli anni '30 ma, almeno nella prima fase, è stata data importanza prevalentemente alle forme animali. Solo negli anni '60-'70 il sedimento si è rivelato ricco di protisti ed in particolar modo di ciliati.

Lo studio di questi ha evidenziato la presenza di molte forme, alcune delle quali maggiormente adattate a vivere negli interstizi fra i grani del sedimento (forme allungate, ciglia tigmotattiche ecc.).

Considerate le piccole dimensioni dei protisti, appare chiara l'importanza delle tecniche di microscopia, sia ottica che elettronica.

2 - CAMPIONAMENTO

SUOLO

- ☐ Si prelevano varie porzioni di terreno umido e si dispongono in piccoli contenitori.
- ☐ Si aggiunge acqua o estratto di terriccio e si mescola bene fino ad ottenere una sospensione fine.
- ☐ Si eseguono osservazioni al microscopio dopo aver trasferito quanto raccolto in capsule Petri
- ☐ Le singole cellule vengono isolate per mezzo di una micropipetta.

SEDIMENTI MARINI O D'ACQUA DOLCE

- ☐ Si esegue un carotaggio e, attraverso varie metodologie, si separano e si osservano i diversi strati del sedimento raccolto

oppure, più comunemente...

- ☐ Si opera “strisciando” un barattolo sulla superficie del sedimento cercando di raccogliere, oltre al sedimento stesso, una certa quantità di acqua.
- ☐ Il contenuto del barattolo viene suddiviso in varie aliquote, trasferito in capsule Petri ed osservato allo stereomicroscopio.
- ☐ Si procede isolando le singole cellule per mezzo di una micropipetta.

COLONNA D'ACQUA

- ☐ Si costruiscono “trappole” con 3 aperture ricoperte con rete da 200-350 μ m.
- ☐ Si fissano ad una boa o si ancorano al fondo.
- ☐ All'interno si pone un'esca, di piccole dimensioni, costituita da un substrato organico che verrà colonizzato dai batteri che, a loro volta, costituiranno la “preda” dei protisti.
- ☐ Si lascia trascorrere un certo tempo, in base alla temperatura (es. 2-3 gg a 20 °C).
- ☐ Si preleva la trappola, se ne vuota il contenuto in una capsula Petri e si esamina allo stereomicroscopio.
- ☐ Si passa poi ad isolare le singole cellule per mezzo di una micropipetta.

AL MOMENTO DEL CAMPIONAMENTO:

- Rilevare la **temperatura** del sito di campionamento
- Rilevare la **salinità** dell'acqua
- Rilevare il **pH**
- Registrare le **coordinate geografiche** o, se ciò non è possibile, annotare alcuni dati, possibilmente corredati da foto, che consentano di individuare il sito in occasione di eventuali ulteriori campionamenti

3 - ISOLAMENTO

Le cellule vengono prelevate con una micropipetta e poste in piccoli contenitori, ad es. vetrini a 3 depressioni, precedentemente lavati e sterilizzati, utilizzando un idoneo mezzo di coltura (v. avanti).

In pratica, si procede all'allestimento di una coltura preliminare finalizzata soprattutto alla STABILIZZAZIONE.

4 - MANTENIMENTO IN COLLEZIONE

PROTISTI AUTOTROFI

Pur esistendo protocolli che ne prevedono lo stoccaggio a lungo termine, l'esperienza insegna che il modo migliore per garantire la sopravvivenza nel tempo delle colture cellulari di protisti autotrofi è quello di fare ricorso a :

COLTURE MASSIVE CON TRAPIANTI PERIODICI

I PARAMETRI FONDAMENTALI dei quali bisogna tenere conto nella coltivazione dei protisti autotrofi sono: TEMPERATURA, MEZZO DI COLTURA E LUCE

TEMPERATURA

Salvo rare eccezioni, la temperatura ideale per il mantenimento a lungo termine delle colture di protisti autotrofi è di 23 °C +/- 1 °C.

Si è comunque rilevato che, mentre le temperature più alte sono poco tollerate, quelle più basse di qualche grado possono essere applicate senza che le colture subiscano conseguenze significative.

MEZZO DI COLTURA

Nell'ampia gamma dei mezzi di coltura disponibili, per i quali sono pubblicati i protocolli di preparazione, sarebbe preferibile scegliere di volta in volta quelli che meglio si adattano alla coltura in questione, facendo soprattutto riferimento alle condizioni del mezzo naturale nel quale è stato realizzato il campionamento e del quale sono stati misurati i principali parametri (v. Capitolo "Campionamento").

Per ovvi motivi di praticità, tale condizione ideale non è però realizzabile in un laboratorio, soprattutto in presenza di una collezione costituita da numerosi ceppi. Pertanto, si deve inevitabilmente ricorrere ad un numero limitato di mezzi, optando per quelli più versatili e più idonei a garantire la sopravvivenza delle colture nel tempo.

Nel gruppo di Protistologia di Pisa sono da tempo utilizzati prevalentemente due mezzi di coltura sintetici:

ACQUA DI MARE SINTETICA E.J. Allen's formula arricchita con WALNE'S FORMULA per le colture marine.

SMC MEDIUM per le colture di acqua dolce.

I protocolli di preparazione possono essere consultati in Appendice 1 "Mezzi di coltura".

LUCE

La luce solare solo apparentemente garantirebbe le migliori condizioni. In realtà la sua irradiazione potrebbe non essere continua nel tempo e soprattutto non uniforme nelle diverse parti del contenitore nel quale è conservata la coltura, cosa che oltretutto comporterebbe zone a diversa temperatura.

Pertanto in laboratorio si opta per sistemi di illuminazione artificiali, solitamente costituiti da coppie di tubi al neon in modo da avere una doppia componente : bianco freddo e rosa con ciclo notte/ giorno regolato su 12h di luce e 12 di buio

MODALITA' OPERATIVE

Prima di procedere alla descrizione delle modalità operative, è utile ricordare che per una coltura l'imposizione di un ambiente artificiale comporta le seguenti fasi:

PERIODO DI ADATTAMENTO durante il quale non si ha la crescita della coltura.

PERIODO DI ACCRESCIMENTO ESPONENZIALE con cellule in attiva divisione e conseguente aumento numerico delle stesse

FASE STAZIONARIA nella quale la divisione cellulare rallenta fino ad annullarsi a causa del consumo dei nutrienti e dell'accumulo di sostanze di rifiuto.

FASE DI DECRESCITA nella quale il numero delle cellule si riduce rapidamente con la coltura che si deteriora fino ad estinguersi.

Nella gestione delle colture massive che, come accennato precedentemente, costituiscono la forma migliore per il mantenimento in collezione dei protisti autotrofi, l'operatore, alla luce delle fasi di cui sopra, deve procedere nei trapianti periodici, eseguendo gli stessi tramite inoculi ottenuti prelevando aliquote di colture che si trovano in fase esponenziale o, al limite, all'inizio di quella stazionaria.

Tali inoculi, il cui volume può variare tra il 5% e il 10% circa di quello finale, sono solitamente realizzati in beute contenenti il mezzo di coltura sterile, che vengono chiuse ermeticamente con tappi in silicone autoclavabili nei quali sono inseriti due piccoli tubi in vetro: uno più lungo, che si estende per quasi tutta l'altezza della beuta, al quale è collegato un sistema di aerazione ed uno più corto, che non raggiunge la coltura, per la fuoriuscita dell'aria.

Il sistema di aerazione, che può essere centralizzato o costituito da un piccolo aeratore, viene collegato al tubo in vetro inserito nel tappo mediante un tubicino in silicone autoclavabile, lungo il percorso del quale sono posti due filtri da siringa di diversa porosità, in modo che l'aria proveniente dall'aeratore ne incontri prima uno da 0,8 μm e successivamente un altro da 0,2 μm , mantenendo così la coltura in perfette condizioni di sterilità.

Nel caso dei protisti autotrofi, la sterilità è infatti di fondamentale importanza per cui l'operatore nelle fasi di trapianto deve necessariamente lavorare utilizzando una cappa a flusso laminare e materiale sterile (mezzo di coltura, tappi, tubi in silicone, ecc.), avendo inoltre cura di flambare i colli delle beute, sia di quelle dalle quali l'inoculo viene prelevato sia di quelle nelle quali viene trasferito.

v. Appendice 2 "Sterilizzazione"

PROTISTI ETROTROFI

Contrariamente ai protisti autotrofi, per i quali, come si è detto, le colture massive costituiscono la migliore garanzia per la sopravvivenza nel tempo, i protisti eterotrofi vengono conservati in collezione in PICCOLE COLTURE DI MANTENIMENTO, per le quali il numero elevato di cellule costituisce un fattore favorevole ma non determinante.

I parametri fondamentali che condizionano questo tipo di colture sono:

TEMPERATURA, MEZZO DI COLTURA E DISPONIBILITÀ DI CIBO.

TEMPERATURA

Il parametro Temperatura assume, nel caso dei protisti eterotrofi, un'importanza fondamentale e, nei limiti dell'inevitabile standardizzazione associata al mantenimento delle colture in collezione, può essere diversamente modulato in funzione delle specie in oggetto e delle misurazioni eseguite al momento del campionamento.

Una volta individuata la temperatura ideale per un'attiva crescita della coltura, per il mantenimento in collezione si opta per un livello della stessa di 4-5 °C più basso. Ciò fa sì che il ritmo di divisione cellulare rallenti notevolmente e con esso l'invecchiamento della coltura.

Solitamente valori di temperatura di 23 °C +/- 1 °C sono ideali per l'attiva crescita di quasi tutte le colture originatesi dall'isolamento di cellule rinvenute in campioni raccolti in zone intertropicali che, secondo quanto indicato precedentemente, una volta stabilizzate, vengono conservate in collezione a circa 19 °C all'interno di celle termostate.

Per le colture di protisti eterotrofi campionati in zone artiche ed antartiche, ci si orienta invece su temperature intorno a 6 °C.

MEZZO DI COLTURA

Nel gruppo di Protistologia di Pisa sono da tempo utilizzati prevalentemente due mezzi di coltura sintetici:

ACQUA DI MARE SINTETICA "M.T." per le colture marine, con diversi gradi di salinità.

ACQUA MINERALE NATURALE per le colture di acqua dolce.

I protocolli di preparazione possono essere consultati in Appendice 1 "Mezzi di coltura".

DISPONIBILITÀ DI CIBO

Le colture di protisti eterotrofi hanno necessità di periodiche aggiunte di cibo, individuabile sia in protisti autotrofi, coltivati secondo quanto indicato nel paragrafo precedente, che in batteri.

Dunaliella tertiolecta e *Dunaliella salina*, per le specie marine, e *Chlorogonium* sp., per quelle di acqua dolce, sono le specie di protisti autotrofi che tradizionalmente vengono utilizzate come cibo.

Per i batteri si fa riferimento a specie a bassa classe di rischio, secondo normative in continuo aggiornamento.

MODALITA' OPERATIVE

Dal momento in cui singole cellule sono state isolate nei vetrini a tre depressioni, si eseguono piccole aggiunte di cibo molto diluito fino a raggiungere un numero di cellule sufficiente per consentirne il trasferimento in provette da batteriologia chiuse con appositi tappi in metallo, all'interno delle quali vengono conservati in collezione

Nella manipolazione delle colture di protisti eterotrofi non è necessario operare sotto cappa in condizioni di stretta sterilità, ma è comunque opportuno servirsi di terreni e vetreria sterili, in modo da evitare un'eccessiva carica batterica e soprattutto la contaminazione tra ceppi diversi.

Una volta stabilizzate in collezione, le colture saranno, come precedentemente indicato, soggette a periodici cicli di cibatura in occasione dei quali l'operatore eliminerà circa i 2/3 del volume della provetta per sostituirli con il cibo diluito nel mezzo di coltura.

Se si tratta di colture per le quali è richiesta un'attiva crescita, la cibatura verrà eseguita frequentemente, con intervalli nell'ordine di pochi giorni.

Se, al contrario, si ha a che fare con colture mantenute in collezione a temperatura più bassa, l'aggiunta di cibo avverrà con intervalli più ampi, intorno ai 20-25 giorni.

Il ritmo di divisione cellulare ed il consumo di cibo, reciprocamente correlati, presentano notevole variabilità sia tra le diverse specie che nell'ambito della stessa.

Pertanto, tale variabilità richiede un'attenta osservazione delle colture da parte dell'operatore

La valutazione del cibo consumato è particolarmente agevole nel caso che questo sia costituito da protisti autotrofi, in quanto visibili ad una superficiale osservazione allo stereomicroscopio, sia all'interno delle cellule, che assumono un colore scuro, che all'esterno delle stesse.

Risulta invece meno facile nel caso di cibatura con batteri. In questo caso si fa perciò ricorso all'osservazione delle cellule, tenendo conto che le stesse, in assenza di cibo, tendono ad assumere una forma irregolare.

5- IDENTIFICAZIONE

L'identificazione della specie ha un APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE

MORFOLOGIA

Considerate le piccole dimensioni dei protisti, la Microscopia, sia Ottica che Elettronica, è la principale via di indagine dalla quale non è possibile prescindere nello studio degli Eucarioti unicellulari. Le tecniche di microscopia ottica costituiscono l'approccio più immediato alla struttura dei protisti ed offrono chiavi interpretative che molto spesso consentono al ricercatore di fare a meno di ricorrere ad ulteriori e più complesse indagini.

MICROSCOPIA OTTICA

Osservazione “in vivo” allo stereomicroscopio

La semplice osservazione allo stereomicroscopio, pur fornendo importanti indicazioni, non sempre è in grado di evidenziare strutture, proprie della cellula, che rivestono una fondamentale importanza dell'ambito degli studi tassonomici per cui si ricorre a tecniche di microscopia a più alto ingrandimento:

Osservazione “in vivo” al microscopio a più alto ingrandimento

Se l'osservazione “in vivo” non è ancora sufficiente ad evidenziare le strutture di cui sopra si ricorre a

Procedure di colorazione scelte, di volta in volta, in base a quelli che sono gli intenti di indagine del ricercatore

Queste prevedono una prima fase di Fissazione dei preparati. La Fissazione ha lo scopo di uccidere le cellule senza che ne venga alterata la forma e consentendo ai vari reagenti, utilizzati nella successiva fase di colorazione, di legarsi agevolmente alle strutture interessate dalla colorazione stessa.

La fase della Colorazione vera e propria seguirà diversi protocolli a seconda delle strutture che si vogliono evidenziare. Per il materiale nucleare, accanto alle procedure con “Blu Unna” e “Acetorceina” quella più utilizzata è la “Colorazione di Feulgen”, mentre, per le strutture corticali, oltre alla “Impregnazione Argentica” (Metodo Chatton-Lwoff) si utilizza la “Colorazione con Protargolo”.

MICROSCOPIA ELETTRONICA

Alla Microscopia Ottica seguono spesso

Microscopia Elettronica a trasmissione, di fondamentale importanza negli studi ultra-strutturali.

Microscopia Elettronica a scansione che, oltre a fornire ulteriori dettagli sulle strutture corticali, offre un'immagine tridimensionale della cellula.

ECOLOGIA

Diversa resistenza a parametri chimico/fisici (es. temperatura, luce ecc.)

ETOLOGIA

Osservazione del movimento

CHIMICA BIOORGANICA

Studio dei “Metaboliti secondari”, altrimenti detti “Prodotti Naturali”

BIOLOGIA MOLECOLARE

APPENDICE 1 - MEZZI DI CULTURA

MEZZI DI CULTURA NATURALI: RACCOLTI DIRETTAMENTE IN NATURA

VANTAGGI: Riproducono esattamente le condizioni presenti in natura.

SVANTAGGI: sono soggetti a variazioni stagionali, possibili inquinanti ecc. e pertanto non garantiscono un'adeguata uniformità nelle procedure sperimentali.

MEZZI DI CULTURA SINTETICI: PREPARATI IN LABORATORIO SECONDO PRECISI PROTOCOLLI.

VANTAGGI:

- Non richiedono la raccolta nel sito di campionamento, operazione talvolta difficilmente realizzabile
- Costanti nel tempo.

SVANTAGGI:

- Costo elevato dei reagenti.
- Preparazione non sempre semplice.

I mezzi di coltura sintetici si dividono a loro volta in :

Sintetici indefiniti: vengono preparati in laboratorio con protocolli che danno indicazioni sulle quantità degli “ingredienti”, ma molto spesso utilizzano componenti in forma grezza di cui non è nota la composizione chimica (es. estratto di lattuga)

Sintetici definiti: si preparano seguendo rigidi protocolli che danno una precisa indicazione, sia qualitativa che quantitativa, dei reagenti chimici impiegati.

MEZZI DI CULTURA PER PROTISTI AUTOTROFI

Nel gruppo di Protistologia di Pisa sono da tempo utilizzati prevalentemente due mezzi di coltura sintetici:

- ACQUA DI MARE SINTETICA E.J. Allen's formula, arricchita con WALNE'S FORMULA per protisti autotrofi marini
- SMC MEDIUM per protisti autotrofi di acqua dolce

ACQUA DI MARE SINTETICA E.J. Allen's formula

(Protocollo semplificato rispetto all'originale)

Si sciolgono in acqua distillata o deionizzata i seguenti reagenti nelle quantità indicate:

NaCl	28,13 g / L
KCl	0,77 g / L
CaCl ₂	1,20 g / L
MgCl ₂	2,55 g / L
MgSO ₄	3,50 g / L
NaHCO ₃	0,11 g / L

Alla soluzione ottenuta si aggiungono 2 ml/L di Soluzione A e 1 ml/L di Soluzione B precedentemente preparate secondo i seguenti protocolli:

Soluzione A

Sciogliere:

20,2 g di KNO₃

in 100 ml di H₂O distillata

Conservare la Soluzione A in frigorifero.

Soluzione B

Sciogliere:

4 g di Na₂HPO₄-12 H₂O

4 g di CaCl₂-6 H₂O

2 ml di FeCl₃ liquido

2 ml di HCl

in 80 ml di H₂O distillata

Una volta aggiunte la Soluzione A e la Soluzione B, si porta ad ebollizione e si lascia raffreddare.

Si procede filtrando la soluzione con due filtri di carta piegati, sovrapposti in un imbuto in vetro, per separarla dal precipitato che si è formato con l'aggiunta della Soluzione B.

Si sterilizza in autoclave a 121 °C per 15 min. e si utilizza solo a temperatura ambiente.

È utile servirsi di una SOLUZIONE DI ARRICCHIMENTO da aggiungere solo al momento dell'inoculo come ad es.

WALNE'S FORMULA

(protocollo semplificato rispetto all'originale)

Solo al momento dell'inoculo, sotto cappa ed in condizioni di sterilità, si aggiungono 1 ml di Stock A e 0,1 ml di Stock B per L di acqua di mare da arricchire, precedentemente preparati come di seguito indicato.

Stock A

Sciogliere:

FeCl ₃ -6H ₂ O	1,30	g/L
MnCl ₂ -4H ₂ O	0,36	g/L
H ₃ BO ₃	33.60	g/L
³ EDTA (Na salt)	45,00	g/L
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	20,00	g/L
NaNO ₃	100,00	g/L
Trace metal solution	1	ml/L

in H₂O distillata

Trace metal solution:

Sciogliere:

ZnCl ₂	2,1	g
CoCl ₂ -6 H ₂ O	2,0	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ - 4H ₂ O	0,9	g
CuSO ₄ -5H ₂ O	2,0	g

in 100 ml di H₂O distillata

Acidificare la "Trace metal solution" con HCl per renderla limpida.

Sterilizzare lo Stock A mediante filtrazione con siringa (filtro da 0,2 µm)

Stock B

Sciogliere:

Vitamina B₁₂ 10 mg

Vitamina B₁ 200 mg

in 100 ml di H₂O distillata.

Sterilizzare lo Stock B mediante filtrazione con siringa (filtro da 0,2 µm).

SMC MEDIUM

Trattandosi di un terreno per protisti di acqua dolce, la concentrazione dei reagenti utilizzati è molto bassa, per cui è opportuno servirsi di “Soluzioni Madre” da preparare ed utilizzare secondo le concentrazioni e le dosi indicate.

Soluzione madre		ml di soluzione madre per L di SMC medium	Concentrazione finale nel SMBC medium
NaCl	1,5 M	1	1,5 mM
KCl	0,05 M	1	0,05 mM
MgSO ₄	0,05 M	1	0,1 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,4 M	1 *	0,4 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,05 M	1	0,05 mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,2 M	5	2 mM
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0,2 M	5	2 mM

*da aggiungere al momento dell'inoculo, previa sterilizzazione con siringa e filtro da 0,2 µm, per evitare la formazione di precipitato durante la sterilizzazione

Soluzione madre		ml di soluzione madre per l di SMC	Conc.ne finale nel terreno SMC
MnCl ₂	0,5 mM	1	0,5 µM
FeCl ₃	9,0 mM	1	9,0 µM
NH ₄ NO ₃	1,25 M	1	1,25 mM

Una volta preparata la soluzione, si filtra con un filtro di carta piegato su un imbuto, si ripartisce in beute del volume adatto e si procede alla sterilizzazione per Tindalizzazione.

MEZZI DI COLTURA PER PROTISTI ETEROTROFI

Nel gruppo di Protistologia di Pisa sono da tempo utilizzati prevalentemente due mezzi di coltura sintetici:

- ACQUA DI MARE SINTETICA “MT” per protisti eterotrofi marini
- ACQUA MINERALE NATURALE per protisti eterotrofi di acqua dolce

ACQUA DI MARE SINTETICA “M.T.”

L’acqua di mare sintetica “MT” viene preparata utilizzando prodotti commerciali costituiti da sali già miscelati, in vendita presso i rivenditori di articoli per acquari.

Si sterilizza per Tindalizzazione.

ACQUA MINERALE NATURALE

L’acqua minerale naturale, comunemente commercializzata in bottiglia, viene spesso scelta come terreno, sia per la sua ampia versatilità che per la semplicità nell’utilizzo. Può essere infatti utilizzata come tale, non richiedendo alcuna preparazione e non essendo necessario alcun trattamento di sterilizzazione.

Può essere considerata un terreno artificiale definito in quanto nelle etichette delle bottiglie sono regolarmente indicati i componenti.

Ovviamente è opportuno utilizzare sempre lo stesso prodotto.

APPENDICE 2 - STERILIZZAZIONE

Le condizioni di sterilità sono raccomandate soprattutto per i protisti autotrofi.

In ogni caso, anche quando le procedure sperimentali non richiedono condizioni di sterilità è comunque buona regola servirsi di materiale sterile al fine di ridurre, nei limiti del possibile, le variabili che intervengono nella realizzazione dell'esperimento stesso.

AGENTI CHIMICI

L'efficacia degli Agenti Chimici solitamente aumenta con la temperatura e con la concentrazione.

INORGANICI

ACIDI FORTI: assolutamente sconsigliati perché troppo lesivi.

OSSIDANTI: l'agente più comune e di più semplice utilizzo è l'Acqua ossigenata diluita.

ORGANICI

ALCOOLI: l'Alcool etilico esplica al meglio la sua azione battericida se diluito al 70%.

TENSIOATTIVI: hanno un gruppo idrofilo ed un gruppo idrofobo la cui azione combinata, in soluzione acquosa, favorisce il distacco dei residui ed il loro galleggiamento.

OSSIDO DI ETILENE: largamente impiegato a livello industriale nella sterilizzazione del materiale monouso in plastica come ad es. siringhe, capsule Petri, pipette graduate, ecc. Non viene mai utilizzato in laboratorio in quanto richiede complessi apparati ed un rigoroso controllo di qualità per verificare che non ne rimangano residui sul materiale sterilizzato.

AGENTI FISICI

Come accennato precedentemente, in Protistologia gli Agenti Fisici sono ampiamente impiegati.

La scelta si orienta su agenti diversi in funzione del materiale da sterilizzare e del grado di affidabilità richiesto dalle esigenze sperimentali.

CALORE

FIAMMA DIRETTA: si utilizza per il flambaggio di vetrerie ed anse.

Per mezzo di un Becco Bunsen, o di un analogo strumento, si fa passare la fiamma direttamente sulla superficie da sterilizzare, ad es. il collo di una provetta.

CALORE SECCO: stufa a secco: è il metodo più largamente utilizzato per la sterilizzazione della vetreria. Si esegue a 250 °C per 2 h.

Fanno eccezione tutti gli articoli in vetro graduati, come ad es, le pipette, in quanto una loro probabile deformazione ne comprometterebbe la precisione

CALORE UMIDO . le procedure di sterilizzazione basate sul calore umido, rispetto ai metodi che sfruttano il calore secco, presentano il vantaggio che i legami ad idrogeno fra un gruppo CO ed uno NH vengono distrutti più facilmente se sostituiti da legami ad idrogeno con l'acqua.

Acqua bollente: di facile impiego, dà però poche garanzie ed il suo utilizzo va inteso più come una pulizia approfondita che come una vera e propria procedura di sterilizzazione.

Vapore fluente: si fa ricorso alla “Pentola di Koch”, costituita da un contenitore cilindrico con acqua sul fondo che, una volta portata alla temperatura di ebollizione, investe di vapore il materiale da sterilizzare precedentemente posto su un piano forato sovrastante.

Generalmente si utilizza per la sterilizzazione di utensili in metallo.

Vapore sotto pressione: il processo di sterilizzazione è compiuto in Autoclave con cicli a temperatura e durata variabili (solitamente 121 °C, 15 min.).

La sterilizzazione con vapore sotto pressione sfrutta la maggiore conduttività termica del vapore rispetto all'aria e la condensazione dello stesso sui materiali ai quali cede il calore in maniera più efficiente.

È il metodo migliore per la sterilizzazione dei terreni di coltura liquidi, in quanto, grazie alla pressione elevata, consente il raggiungimento di alte temperature senza che i liquidi vadano in ebollizione.

Si utilizza anche per la vetreria graduata ed in generale di tutto il materiale che, per caratteristiche costruttive, si presta a tale procedura.

Tindalizzazione: viene preferita alla sterilizzazione in Autoclave solo per quei terreni liquidi che a temperature elevate presentano formazione di cristalli o di precipitato.

Consiste in due successivi riscaldamenti intorno ai 100 °C a distanza di 24 ore:

con il primo riscaldamento si eliminano le forme vegetative, nelle 24 ore di pausa a temperatura ambiente si ha la trasformazione di eventuali spore in forme vegetative ed infine con il secondo riscaldamento si ha la completa eliminazione delle nuove forme vegetative.

CONGELAMENTO

Cicli successivi di congelamento, da eseguire in tempi rapidi, provocano la formazione di cristalli di ghiaccio, che a loro volta provocano la distruzione delle cellule batteriche. Metodo poco utilizzato.

FILTRAZIONE

Filtri da siringa monouso sono generalmente utilizzati per la sterilizzazione di soluzioni di volume ridotto che, per loro natura chimica, non sopportano né il processo in autoclave né la Tindalizzazione.

La porosità che generalmente viene utilizzata per garantire un elevato grado di sterilità è 0,2 μm .

La soluzione da sterilizzare viene aspirata con la siringa. Si procede poi alla sostituzione dell'ago con il filtro ed il liquido viene filtrato esercitando una robusta pressione sul pistone.

RAGGI U. V.

Si ottengono con Lampade a vapori di mercurio il cui utilizzo deve essere effettuato in camere sterili. Sono poco penetranti ed agiscono sulle superfici esposte provocando danni al DNA microbico. Il loro impiego è sconsigliato perché comporta la formazione di ozono.

RADIAZIONI IONIZZANTI

I raggi γ vengono impiegati a livello industriale per la sterilizzazione del materiale monouso in plastica come alternativa all'ossido di etilene.

ULTRASUONI

Le vibrazioni meccaniche ad alta frequenza provocano la formazione di bolle all'interno del protoplasma e conseguente disorganizzazione dello stesso.

Si utilizzano "Bagnetti ad ultrasuoni", appositi strumenti nei quali i contenitori con il materiale da sterilizzare vengono immersi in acqua.