

N. RICCI (*), R. BANCHETTI (*), R. CETERA (*)

MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA DI COLTURA
PER IL CILIATO IPOTRICO *OXYTRICHA BIFARIA* STOKES (**)

Riassunto — Sono riportati i risultati di un'indagine condotta allo scopo di standardizzare le colture di laboratorio di *Oxytricha bifaria* Stokes. Rispetto alle metodiche classiche impiegate per *Paramecium*, per questo ciliato ipotrico dotato di spiccatissimo tigmotattismo, sono state apportate due fondamentali innovazioni: una riduzione relativa del cibo aggiunto quotidianamente (1+1/2 vs 1+1) ed una agitazione periodica per rotazione delle colture (circa 75 giri al minuto, per beute da un litro, contenenti 600 ml di coltura). Tali innovazioni hanno portato da 100-150 cellule per ml a 1400-1600 cellule per ml la densità cellulare ottenibile in colture di laboratorio.

Abstract *Standardization of a culturing technique for Oxytricha bifaria Stokes (Ciliata, Hypotrichida).* The results of a study planned to standardize the culturing system for *Oxytricha bifaria* Stokes are reported. For this strongly thymotactic Ciliate Hypotrich, two main improvements have been found. The reduction of the relative quantity of food which is added daily into the cultures (1+1/2 vs 1+1) and the periodical shaking of the Erlenmayer Flasks with the cultures (about 75 r.p.m., for 1 liter flasks, filled by 600 ml of fluid s.l.). By means of these two changes, standard cultures of *O. bifaria* are now as dense as 1400-1600 cells/ml, while the cell densities previously obtained ranged from 100 to 200 cells/ml.

Key words — *Oxytricha bifaria* - culturing technique.

INTRODUZIONE

Le ricerche fin qui condotte sulla biologia riproduttiva di *Oxytricha bifaria* Stokes (Ciliata, Hypotrichida), recentemente riviste organicamente da RICCI (1981), hanno dimostrato la validità di questo organismo come strumento atto ad apportare nuove co-

(*) Istituto di Zoologia ed Anatomia comparata dell'Università di Pisa.

(**) Ricerca condotta con un finanziamento del C.N.R.

gnizioni nello studio dei processi coniugativi (RICCI et al., 1975a), come in quello delle interazioni cellulari (RICCI et al., 1975b; ESPOSITO et al., 1976) e dei processi connessi all'induzione dei fenomeni meiotici (RICCI et al., 1980).

D'altra parte, l'utilità di un organismo come oggetto di indagine scientifica è strettamente dipendente dalla possibilità di ottenerne in laboratorio grosse quantità con tecniche sufficientemente semplici e standardizzate. La tecnica di coltura seguita nel nostro laboratorio di *O. bifaria* consiste nel raddoppiare il volume delle colture ogni 24 ore, mediante l'aggiunta di cibo, cioè di colture di *Enterobacter aerogenes* (HORMAECHE e EDWARDS, 1960). Questa procedura garantisce un ritmo medio di una divisione cellulare al giorno, in accordo con quanto riportato da SONNEBORN (1950) per *Paramecium* e da SIEGEL (1956) per *O. bifaria*. Si è tuttavia osservato che, in questo modo, una grossa parte del volume delle colture resta inutilizzata e che di conseguenza una grande quantità di batteri non predati dai Ciliati contribuisce a degradare rapidamente la qualità dell'ambiente. Lo spiccatissimo tigmotattismo di *O. bifaria*, che tende a distribuirsi solo sulle pareti della beuta e al livello dell'interfacie aria-liquido, è probabilmente all'origine di tale inconveniente.

Oggetto di questo studio è stato perciò la ricerca e la definizione di nuovi accorgimenti sperimentali capaci di migliorare la tecnica di coltura di *O. bifaria* in laboratorio.

MATERIALI E METODI

Per tutta questa serie di esperimenti sono state usate cellule di *O. bifaria* Stokes dei ceppi 3, 19 ed L, appartenenti a tipi coniugativi complementari. Poiché i risultati ottenuti per i tre ceppi sono stati assolutamente indistinguibili l'uno dall'altro, nel corso di questo articolo sarà sempre fatto riferimento a « cellule di *O. bifaria* » s.l., senza ulteriori distinzioni.

Le colture sono state tenute in beute da un litro, ad un ritmo luce-buio naturale. Ogni beuta era riempita con 600 ml di coltura. La temperatura costante di 22°C è stata impiegata sia per la coltura che per gli esperimenti.

Come mezzo di coltura è stato usato il brodo di lattuga, tamponato a pH 6.8 con tampone fosfato, e autoclavato, secondo le tecniche standardizzate per *Paramecium* (SONNEBORN, 1950, 1970). Tale medium era inoculato con *Enterobacter aerogenes* con l'ansa

di platino in un banco sterile a flusso laminare (Gelaire Class 100 - Gelman). A 24 ore dall'inoculo, il brodo era usato come cibo per le colture di *Oxytricha*. Una coltura-madre in crescita logaritmica è stata ripartita in tre gruppi di beute: il primo (« controllo ») è stato cibato con l'aggiunta quotidiana di un volume di cibo pari al volume della coltura stessa (« 1+1 »); al secondo (trattamento A) si è quotidianamente aggiunto un volume di cibo pari alla metà del volume della coltura (« 1+½ »), mentre al terzo (trattamento B) si è aggiunto un volume di cibo pari ad un quarto del volume della coltura (« 1+¼ »).

In una seconda serie di esperimenti (cfr. Risultati, II), beute trattate come le precedenti, sono state poste su di un agitatore a piatto rotante (Continental-Rotat 2899) per valutare l'effetto della agitazione sul numero di cellule/ml.

Il numero di cellule è stato stimato mediante due metodologie, usate in parallelo. Nel primo caso si prelevavano separatamente tre campioni di coltura di 1 ml ciascuno: mediante opportune diluizioni successive, si procedeva poi alla conta diretta delle cellule allo Stereomicroscopio Bausch & Lomb (20-60 x), per poi risalire alla densità originale. Nel secondo caso le cellule di altri tre campioni erano fissate in liquido Sanfelice e poi contate in un emocitometro (Spencer-Buffalo, U.S.A.) allo stereomicroscopio. Dal numero di cellule di ogni campione così analizzato (volume di 0,0009 cm³) si risaliva poi al numero di cellule/ml della coltura, tenendo conto della diluizione in fissativo. Poiché le differenze tra i valori di densità cellulare ottenuti con i due metodi sono state sempre inferiori al 5%, in questo lavoro sarà considerata come densità cellulare effettiva la media aritmetica dei due valori.

RISULTATI

Per ovviare ai problemi di coltura già esposti nell'introduzione, sono state condotte due serie di esperimenti, la prima tendente a ridurre il volume delle colture, la seconda volta a migliorare la distribuzione delle cellule nel volume potenzialmente disponibile.

I. *Variazioni del numero di cellule per unità di volume indotte dall'aggiunta di diverse quantità relative di cibo.*

In questa serie di esperimenti, sono state stimate le densità di cellule di tre gruppi di beute, ognuno cibato mediante l'aggiunta

di una diversa quantità di cibo: (I) i controlli (1 volume di coltura + 1 volume di cibo); (II) il trattamento A (1 volume di coltura + $\frac{1}{2}$ volume di cibo); (III) il trattamento B (1 volume di coltura + $\frac{1}{4}$ volume di cibo). I risultati della stima di densità di cellule nelle differenti colture sono riportati in fig. 1. Il fatto che, tanto

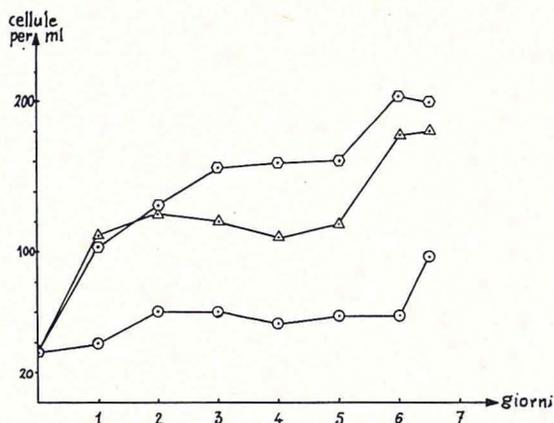


Fig. 1 - Variazioni nel tempo del numero di cellule per ml in funzione dell'aggiunta di diverse quantità di cibo a volumi costanti di coltura.

○—○: « controllo »; △—△: « trattamento A »;
 □—□: « trattamento B ».

il trattamento A che il trattamento B siano convenienti rispetto al controllo rivela che la riduzione del volume inutilizzato dalle cellule, ottenuta con la diminuzione del cibo aggiunto giornalmente, ha conseguenze positive sulla crescita cellulare. Dopo 72 ore, inoltre, il trattamento B risulta il più efficace in quanto il numero di cellule per ml (160) è quasi tre volte quello dei controlli (60), mentre la densità di cellule in A è di sole 120 cellule per ml.

II. *Variazioni del numero di cellule per unità di volume, indotte dall'agitazione rotatoria a diverse frequenze.*

In questa serie di esperimenti i tre gruppi di colture (controlli, trattamento A, trattamento B) furono sottoposte ad un'agitazione continuata o alternata per vari periodi. La distribuzione delle cellule in queste condizioni è mostrata nella parte destra di

fig. 2. La parte sinistra della fig. 2 mostra invece la distribuzione delle cellule in colture non sottoposte ad agitazione.

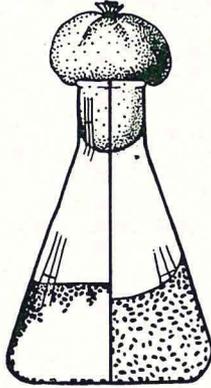


Fig. 2 - Disegno schematico di una beuta che mostra la distribuzione delle cellule in colture sottoposte ad agitazione (parte destra) e in colture non sottoposte ad agitazione (parte sinistra).

Il primo risultato chiaro fu che un'agitazione continua nuoce irreversibilmente alle cellule disturbando gravemente la crescita della coltura. Per successivi tentativi si è visto che il ritmo ottimale di agitazione è di circa 2 ore ogni 12. In queste condizioni, il numero di cellule per ml varia in funzione della frequenza di rotazione, come riportato in fig. 3, in cui i valori dei trattamenti

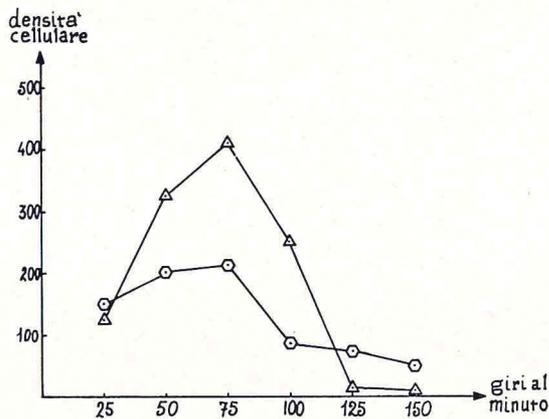


Fig. 3 - Variazioni del numero di cellule per ml in funzione dell'agitazione rotatoria a diverse frequenze. I valori sono riportati in percentuale rispetto al controllo sottoposto anch'esso ad agitazione.

△—△: « trattamento A »; ○—○: « trattamento B ».

A e B sono riportati in % rispetto al numero di cellule del controllo. I valori riportati sono stati ottenuti da beute al terzo giorno di coltura, quando cioè queste raggiungono uno stadio in cui non si ha ulteriore, sensibile aumento della densità di cellule. In queste condizioni il trattamento A è nettamente il migliore, consentendo alla coltura di raggiungere valori di densità di cellule fino al quadruplo rispetto al controllo.

Considerando che il valore assoluto del controllo, quando è agitato, si aggira sulle 400-450 cellule per ml si può concludere che il massimo di densità cellulare ottenibile si ha nelle colture a cui viene quotidianamente aggiunto metà volume di cibo e che vengono agitate due ore ogni dodici, ad una frequenza di circa 75 giri al minuto: in questo caso il numero di cellule per ml si aggira sulle 1400-1600 per ml.

DISCUSSIONE

I risultati dello studio sulle condizioni sperimentali di coltura per *O. bifaria* hanno permesso di definire il ruolo giocato dall'aggiunta differenziata di cibo alle colture e dall'agitazione, per rotazione, delle colture stesse. La densità di cellule ottenibile con la metodica tradizionale era di circa 100 cellule per ml (con punte massime di 200-300). Con i nuovi accorgimenti sperimentali tali valori si aggirano ora sulle 1400-1600 cellule per ml in colture standard. Questo sensibilissimo incremento nella resa della coltura è stato ottenuto principalmente riducendo la massa inutilizzata dei batteri: questi, con i metaboliti liberati nel mezzo di coltura, rapidamente provocavano una degradazione dell'ambiente sia per la progressiva neutralizzazione del sistema tampone (valori di pH ben più bassi del 6,8 previsto dal protocollo), sia per la rapida eliminazione di quasi tutto l'ossigeno disponibile. D'altra parte che l'ossigeno, al di là dell'evidenza intuitiva, sia un parametro di essenziale importanza per la biologia dei ciliati ipotrichi è stato sperimentalmente dimostrato (LUPORINI e TETI, 1979).

Anche l'effetto dell'agitazione contribuisce al miglioramento della resa delle colture in termini di cellule per ml sia perché redistribuisce i protozoi nell'intero volume disponibile (e porta così ad uno sfruttamento migliore del cibo), sia perché porta periodi-

camente alla superficie tutta quanta la coltura (e riossigena così il mezzo ambiente).

E' interessante notare che l'effetto positivo dell'agitazione sul numero di cellule per ml, tra i 25 e i 75 giri per minuto, viene progressivamente controbilanciato e infine cancellato, tra i 75 e i 125 giri per minuto, dal danno che le sollecitazioni meccaniche del mezzo di coltura provocano alle cellule (fig. 3). Mentre fino a circa 75 giri al minuto infatti il moto del fluido con le cellule è laminare o molto prossimo alla laminarità, oltre tale valore compare la turbolenza che aumenta poi rapidamente fino a danneggiare seriamente le colture. Non è facile definire come e a quale livello la turbolenza espliciti il suo effetto dannoso. Se non si può trascurare l'effetto meccanico dei moti turbolenti sulle cellule, non va d'altra parte neppure dimenticato che una troppo violenta agitazione può ostacolare il ciclo cellulare per lo meno in due modi: (a) rendendo più difficoltoso il processo della raccolta del cibo a seguito dell'interferenza dei moti turbolenti derivati dall'agitazione con le correnti d'acqua mosse dagli organuli ciliari verso il citostoma; (b) ledendo le cellule durante la delicata fase della divisione cellulare stessa.

BIBLIOGRAFIA

- ESPOSITO F., RICCI N., NOBILI R. (1976) - Mating-type-specific soluble factors (gamones) in cell interaction of conjugation in the ciliate *Oxytricha bifaria*. *J. Exp. Zool.*, **197**, 275-282.
- HORMAECHE E., EDWARDS P. R. (1960) - A proposed genus *Enterobacter*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.*, **10** (2), 71-74.
- LUPORINI P., TETI C. M. (1979) - Oxygen concentration of the cultural fluid and variations in the mating reactivity of the marine ciliate *Euplotes crassus*. *Experientia*, **35**, 50-51.
- RICCI N. (1981) - Preconjugant cell interactions in *Oxytricha bifaria* (Ciliata, Hypotrichida): a two-step recognition process leading to cell fusion and the induction of meiosis. *Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes*. O'Day D.H. & Horgen P.A. ed.
- RICCI N., BANCHETTI R., NOBILI R., ESPOSITO F. (1975a) - Conjugation in *Oxytricha* sp. (Hypotrichida, Ciliata). I. Morphocytological Aspects. *Acta Protozoologica*, **13** (29), 335-342.
- RICCI N., ESPOSITO F., NOBILI R. (1975b) - Conjugation in *Oxytricha bifaria*: cell interaction. *J. Exp. Zool.*, **192**, 343-348.
- RICCI N., CETERA R., BANCHETTI R. (1980) - Cell to cell contacts mediating mating-type

- dependent recognition(s) during the preconjugal cell interactions of *Oxytricha bifaria* (Ciliata, Hypotrichida). *J. Exp. Zool.*, **211**, 171-183.
- SIEGEL R. W. (1956) - Mating types in *Oxytricha* and the significance of mating type systems in ciliates. *Biol. Bull.*, **110**, 352-357.
- SONNEBORN T. M. (1950) - Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. Exp. Zool.*, **113**, 87-147.
- SONNEBORN T. M. (1970) - Methods in *Paramecium* research. *Methods in Cell Physiology*, **4**, 241-339, Acad. Press Inc., New York.

(ms. pres. il 22 settembre 1980; ult. bozze il 10 dicembre 1980)