

80. Brenno BABUDIERI. — Note di tecnica per la microscopia elettronica: II. Fissazione di preparati.

Riassunto. — L'A. tratta dell'influenza che i vari mezzi di fissazione hanno sulla morfologia dei germi osservati al microscopio elettronico; espone i risultati ottenuti dall'uso di vari fissatori, e richiama l'attenzione sugli errori che possono essere determinati dal loro uso indiscriminato. Consiglia come fissatore d'elezione l'acido osmico.

Résumé. — L'A. traite de l'influence que les divers moyens de fixation exercent sur la morphologie des germes observés sous le microscope électronique; il expose les résultats obtenus par l'emploi de divers fixateurs et attire l'attention sur les erreurs qui peuvent être déterminées lorsqu'on les emploie sans discernement. Il conseille comme fixateur d'election l'acide osmique.

Summary. — The A. speaks of the influence of the various fixing means on the morphology of bacteria observed with the electron microscope; he sets forth the results obtained by the use of some fixing substances and draws attention to the errors that can result from their indiscriminate use. He recommends the use of osmic acid as the best fixing means for electron microscopy.

Zusammenfassung. — Der Verfasser bespricht den Einfluss der verschiedenen Fixiermittel auf die Morphologie der Keime, welche am Elektronenmikroskop untersucht werden; Der V. führt die Ergebnisse bei Anwendung verschiedener Fixierungsmittel an, und macht auf die Fehler aufmerksam, die durch unzweckmässigen Gebrauch der Fixierungsmittel hervorgerufen werden können. Er schlägt Osmionsäure als bevorzugtes Fixierungsmittel vor.

Nelle ricerche eseguite con il microscopio elettronico viene spesso trascurato un fattore di primissima importanza: quello della fissazione degli oggetti da osservare. Ciò dipende dall'abito mentale che la microbiologia inevitabilmente determina nei suoi cultori. I microrganismi hanno dimensioni così ridotte che, salvo eccezioni, nel loro studio al

microscopio ottico ci si arresta al loro grossolano aspetto generale, senza indagare eventuali fini differenziazioni morfologiche. Per arrivare a questo scopo non sono necessarie fissazioni speciali, è sufficiente una fissazione qualsiasi, quale quella col calore o con l'alcool assoluto.

Ma in microscopia elettronica questo non basta più. Qui l'ingrandimento è tale da mettere in rilievo tutta la delicata struttura della cellula batterica e da dare aspetti che ricordano quelli dell'osservazione istologica. Di conseguenza nella microscopia elettronica dobbiamo abbandonare la primitiva tecnica microbiologica e impiegare quella ben più precisa e delicata, dell'istologia.

Non è certamente necessario ricordare qui l'importanza che la fissazione ha nella tecnica istologica, e come i diversi mezzi di fissazione determinino nella cellula aspetti alle volte notevolmente diversi, e spesso per nulla corrispondenti a quella che è la reale struttura della cellula vivente. Ma se nel campo della microscopia ottica noi possiamo molto spesso controllare la realtà di un dato aspetto morfologico della cellula fissata e colorata con l'osservazione della cellula vivente, sia essa non colorata, che trattata con coloranti sopravitali, ciò non è possibile nella microscopia elettronica, dove per ragioni tecniche il preparato viene osservato non vivente ed essiccato. E' questa una ragione di più per usare nella fissazione dei germi destinati all'osservazione quei mezzi che la lunga esperienza istologica ci ha indicati come quelli che meno alterano la struttura della cellula vivente.

Purtroppo questa necessità è stata spesso ignorata dagli studiosi, e vediamo così spesso, specie in America, fotografie di germi non fissati, o di altri fissati indifferentemente con formalina o con altri mezzi più o meno inadatti.

Convinto della necessità di mettere a punto tutta una nuova tecnica per questo nuovo strumento di ricerca, ho voluto indagare l'importanza che i vari mezzi di fissazione hanno sull'aspetto dell'immagine elettronica. A questo scopo ho preso per base quel fissatore che per generale consenso altera meno di tutti gli altri la struttura della cellula vivente: l'acido osmico, e l'ho messo a raffronto con gli altri più comuni fissatori che si usano in istologia.

Indubbiamente le immagini più perfette e maggiormente aderenti alla realtà (come è stato possibile controllare con l'osservazione di alcuni

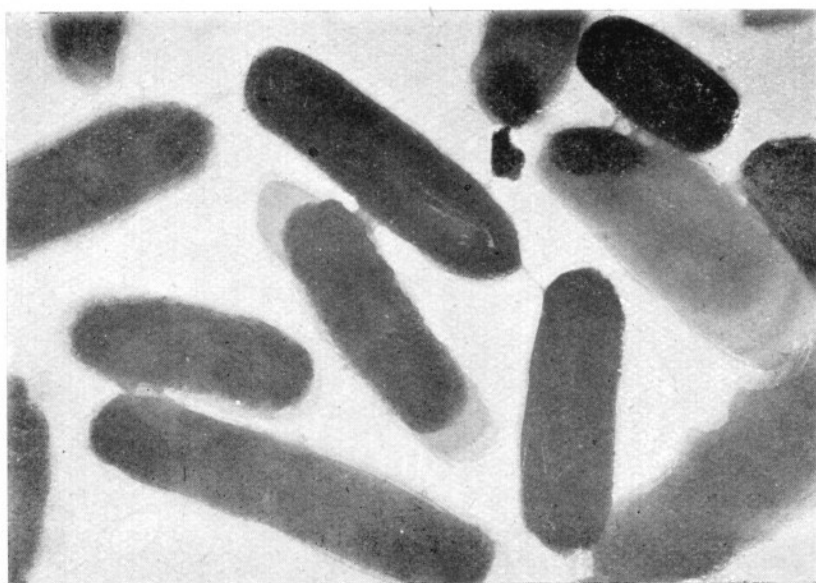


FIG. 1. - B. coli, fissazione con acido osmico.

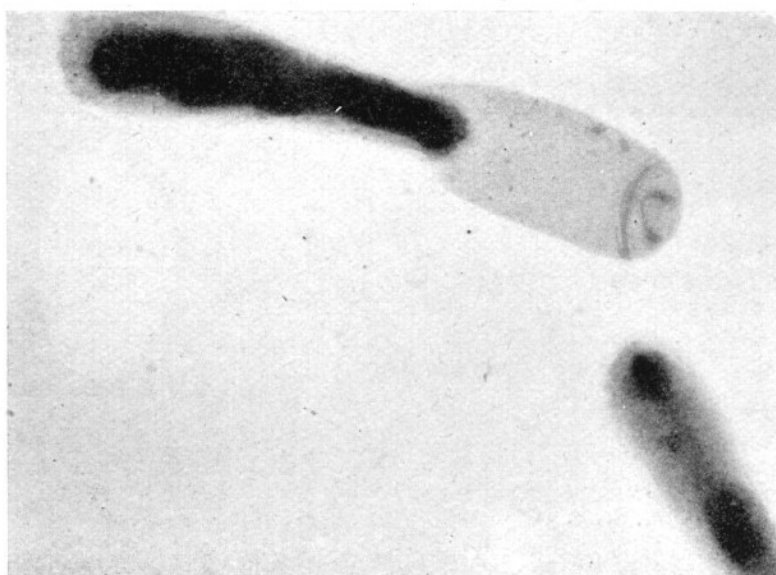


FIG. 2. - B. coli, non fissato.

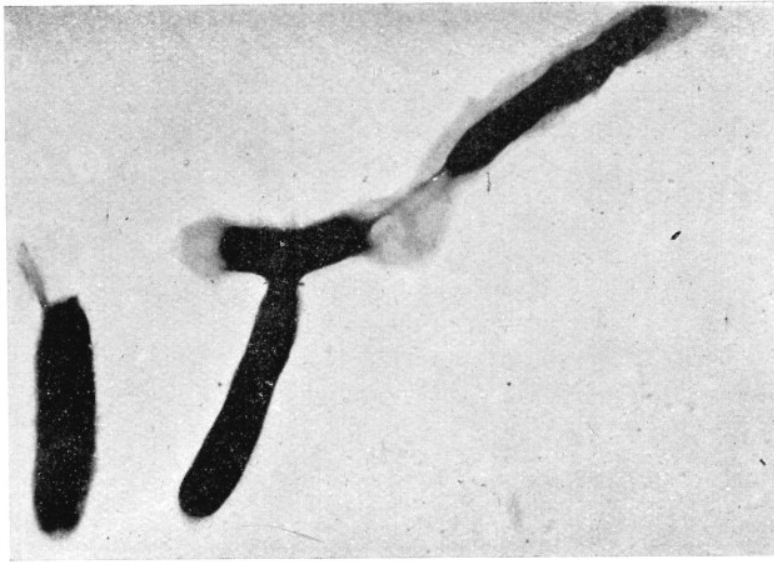


FIG. 3. - B. coli, fissazione con formalina.

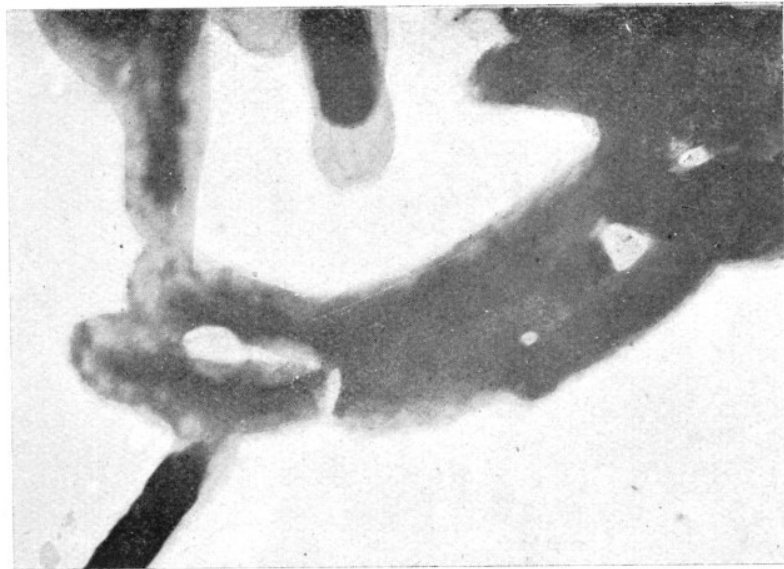


FIG. 4. - B. coli, fissazione con alcool etilico.

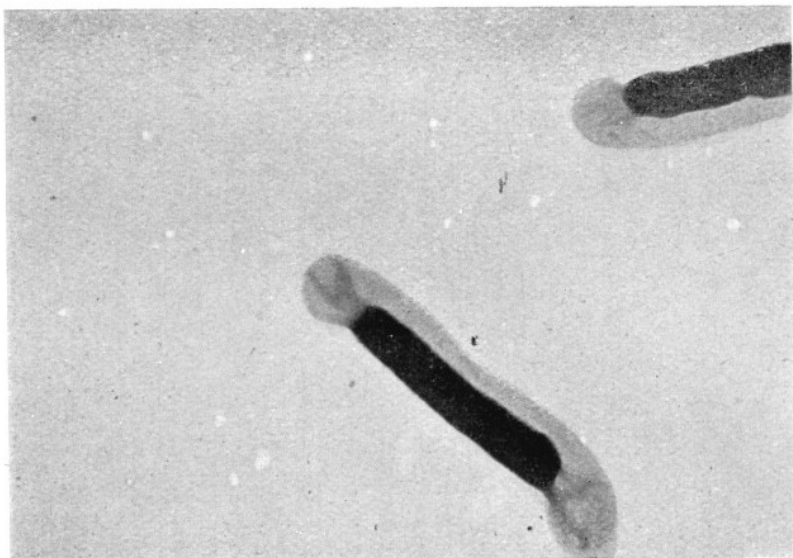


FIG. 5. - *B. coli*, fissazione con liquido di Zenker.

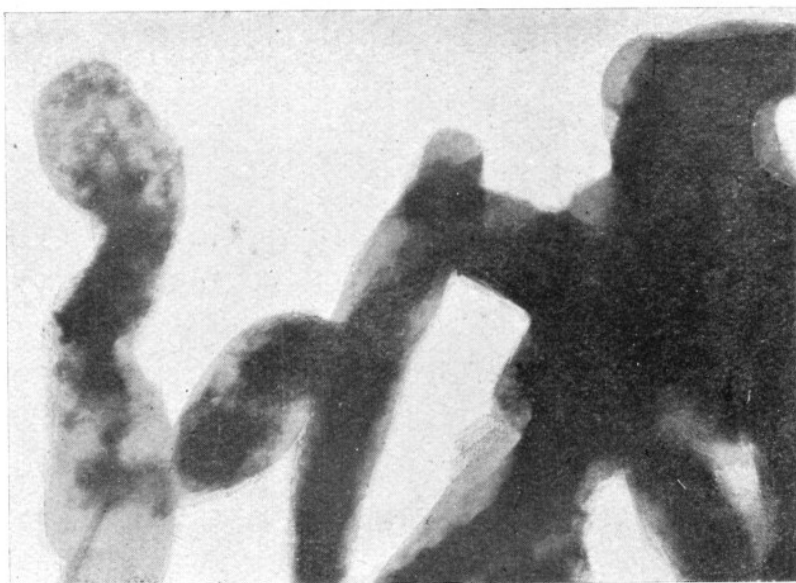


FIG. 6. - *B. coli*, fissazione con liquido di Bouin.

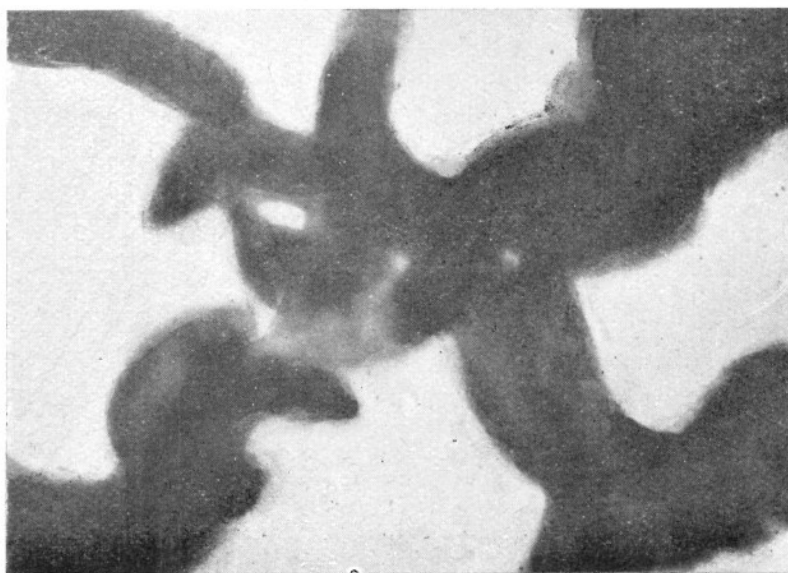


FIG. 7. - Spirillo dell'acqua, fissazione con acido osmico.



FIG. 8. - Spirillo dell'acqua, fissazione con formalina.

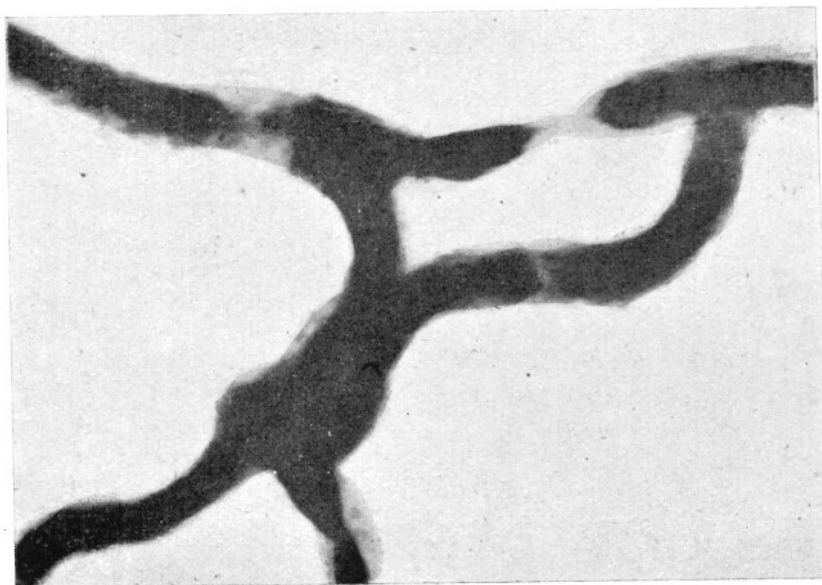


FIG. 9. - Spirillo dell'acqua, fissazione
con alcool etilico.

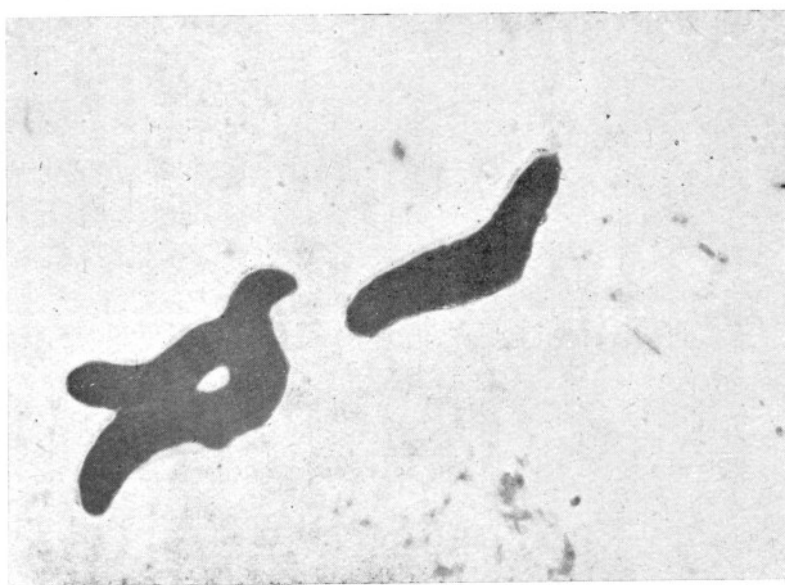


FIG. 10. - Spirillo dell'acqua, fissazione
con liquido di Zenker.

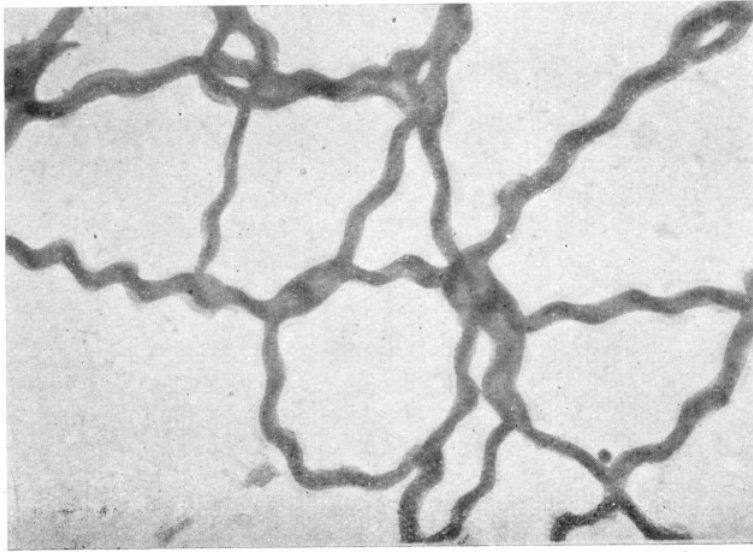


FIG. 11. - *Leptospira ictero-haemorrhagiae*,
fissazione con acido osmico.

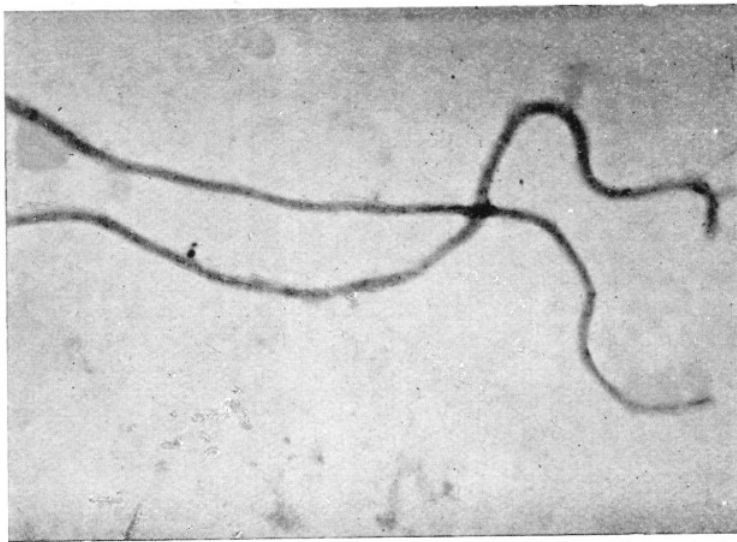


FIG. 12. - *Leptospira aciculicola*, non fissata.



FIG. 13. - *Leptospira acquiricola*,
fissazione con tormalina.

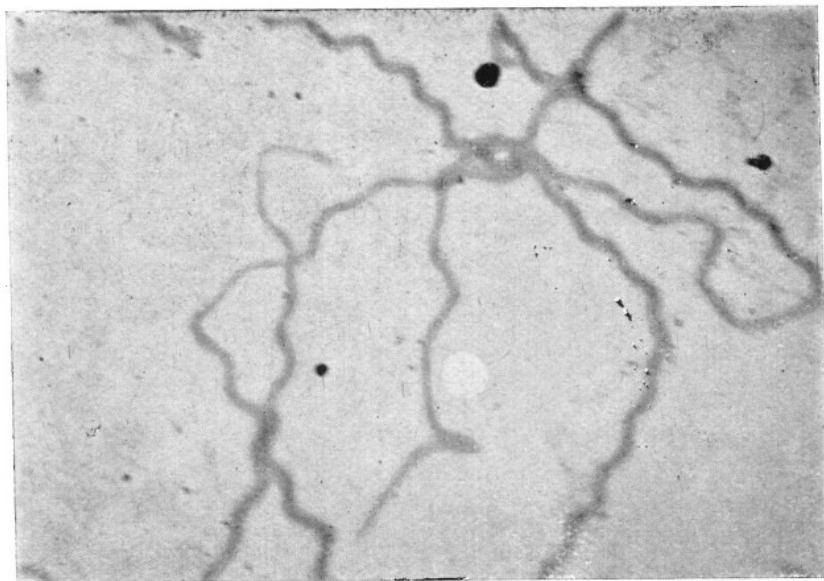


FIG. 14. - *Leptospira ictero-haemorrhagiae*,
fissazione con alcool etilico.

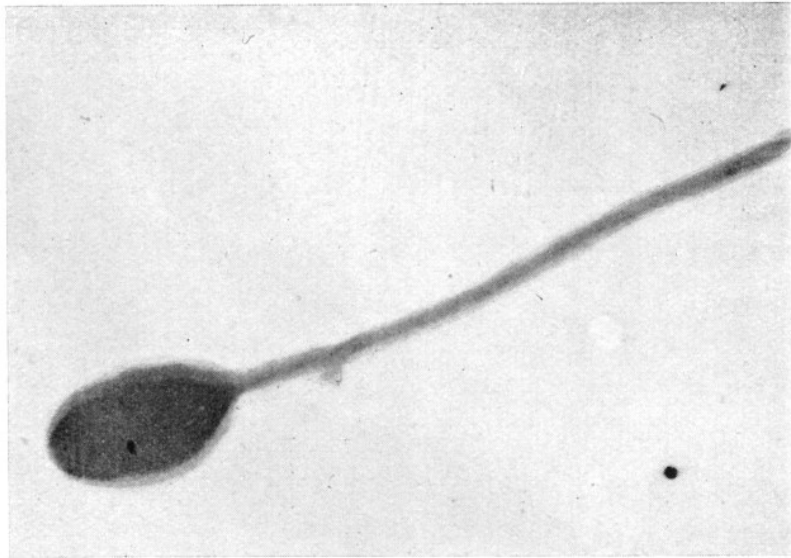


FIG. 15. - Micete (?), fissazione con acido osmico.

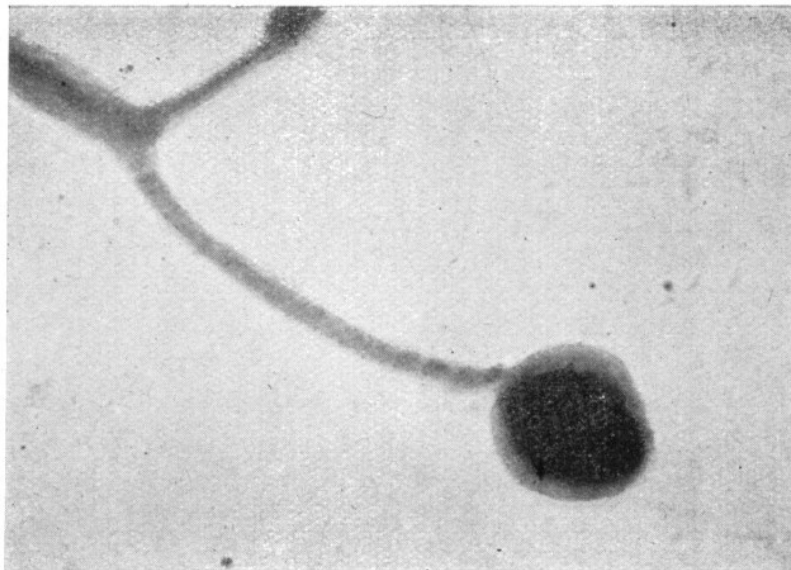


FIG. 16. 1 Micete (?), non fissato.

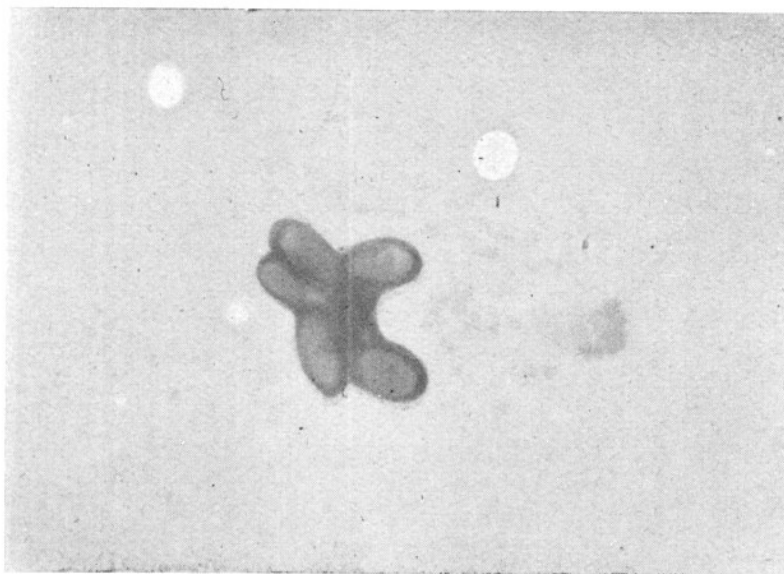


FIG. 17. - *Rickettsia burneti*, fissazione
con acido osmico.

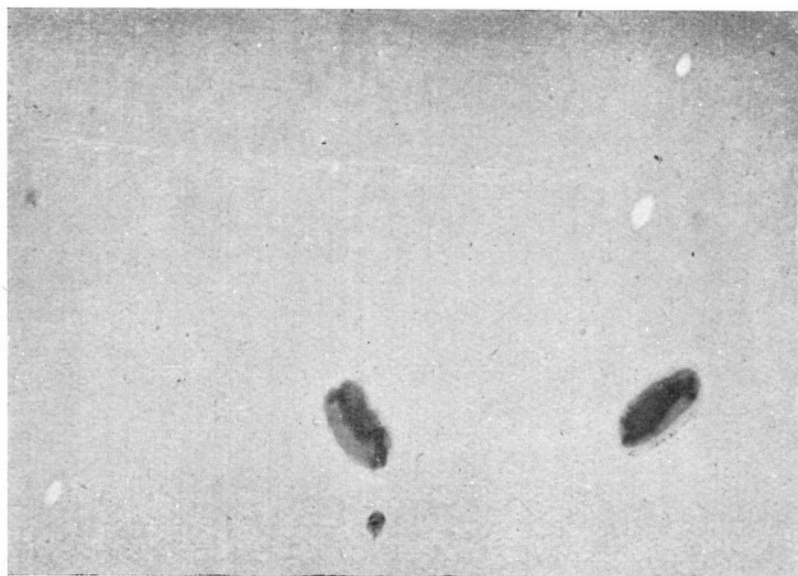


FIG. 18. - *Rickettsia burneti*, fissazione
con formalina.

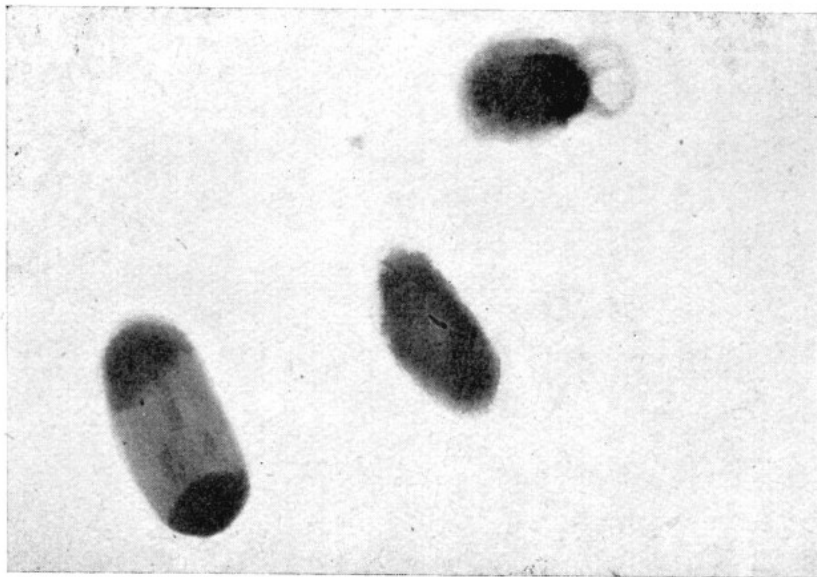


FIG. 19. - B. coli sottoposto ad idratazione per un'ora, poi fissato con acido osmico.



FIG. 20. - B. coli sottoposto ad idratazione, non fissato.

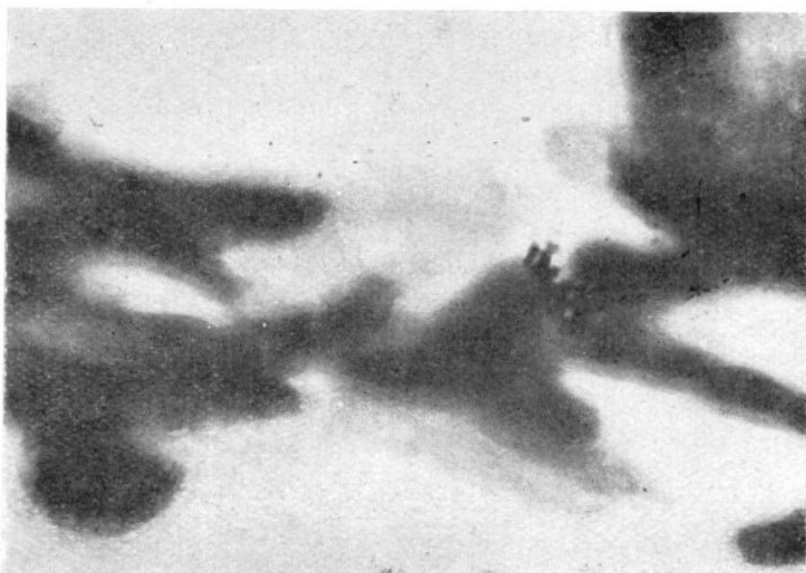


FIG. 21. - Spirillo dell'acqua sottoposto ad idratazione per alcuni giorni, non fissato.



FIG. 22 - Spirillo dell'acqua sottoposto ad idratazione per alcuni giorni, non fissato.

microrganismi di maggiori dimensioni, osservati allo stato vivente) sono quelle date dai preparati fissati con questo mezzo. Alcune particolarità di struttura, molto delicate, ma molto importanti, quali ad esempio la membrana delle leptospire e la raggera di alcuni germi, non si possono vedere impiegando altri fissatori.

Ciò risulta molto evidente dalle figure che corredano il presente lavoro.

I germi non fissati, ma semplicemente lavati in acqua distillata, presentano aspetti molto più grossolani: essi vanno generalmente incontro a fenomeni di idrolisi, ingrossano; in essi il protoplasma si stacca alle volte dalla membrana, tende a diafanizzarsi e a perdere la nitidezza dei suoi confini.

Nelle spirochete le spire si allentano, alle volte scompaiono. Se la permanenza nell'acqua, invece di durare qualche minuto si prolunga per ore o per giorni, come alle volte accade quando le sospensioni batteriche non possono essere immediatamente osservate, allora le alterazioni si fanno notevolmente più profonde e il germe appare spesso del tutto degenerato.

Un vantaggio si ottiene però dall'osservazione di preparati non fissati: l'idrolisi del protoplasma, con la sua conseguente diafanizzazione mette meglio in evidenza la presenza nel suo interno di eventuali granuli o di zone più opache che nel germe fissato con acido osmico, per la sua maggiore opacità, non sono visibili o lo sono soltanto con grande difficoltà.

Nei germi fissati con formalina il protoplasma appare per lo più coartato e notevolmente opaco: la membrana è spesso alterata, la struttura interna è poco o nulla visibile. Spesso i limiti protoplasmatici sono poco netti e come sfumati. In alcune Rickettsie la formalina provoca un caratteristico raggrinzimento.

Come si vede dalle fotografie i germi così fissati appaiono notevolmente danneggiati. A ciò si deve aggiungere che se l'azione della formalina si prolunga, alcuni germi vanno incontro a fenomeni litici che determinano alterazioni ancora maggiori. Per queste ragioni sono da considerarsi con molte riserve i risultati ottenuti dai non pochi studiosi che in ricerche di microscopia elettronica hanno usato come mezzo di fissazione esclusivamente il formolo.

L'alcool assoluto altera pure notevolmente i germi, raggrinzandoli e modificando l'opacità e i limiti del protoplasma. Per lo più i germi appaiono piuttosto diafani; qualcuno è invece interamente opaco, con membrana ampiamente staccata dal protoplasma.

Un mezzo di fissazione largamente usato in istologia è il liquido di Zenker (bicloruro di mercurio g 5; bicromato di potassio g 2,5; solfato di sodio g 1; acqua distillata cm³ 100; acido acetico da aggiungere al momento dell'uso cm³ 5).

Esso si presta invece male per la microscopia elettronica. I germi così fissati appaiono interamente opachi e alterati nella loro forma. Nei bacilli è molto caratteristico il distacco del protoplasma dalla maggior parte della membrana e il suo addensamento su di un lato di questa. Inoltre nei preparati fissati con Zenker si formano spesso precipitati che è molto difficile allontanare.

Anche il liquido di Bouin (soluzione acquosa satura di acido picrico: 30 vol.; formolo al 40%: 10 vol.; acido acetico glaciale: 2 vol.) trova larga applicazione in istologia. Questo fissatore altera l'aspetto generale dei germi un pò meno di quelli precedenti; il germe non appare gran che coartato, nè molto modificato nella sua opacità. Il protoplasma ha però spesso un aspetto sfrangiato e margini irregolari; si può arrivare ad una completa plasmolisi. La membrana è per lo più ben visibile, ma non nettamente differenziata dal protoplasma.

I pochi esempi qui riportati sono sufficienti a documentare quanto il mezzo di fissazione influisca sulla morfologia dei germi e come si debba procedere con cautela nel riferire strutture osservate in elementi fissati a formazioni realmente esistenti nei germi viventi.

Il mezzo di fissazione influenza la morfologia del germe attraverso ad un complesso di meccanismi. Può disidratarlo (alcool) e determinare di conseguenza il raggrinzamento del protoplasma, può agire sul delicato equilibrio dei colloidali componenti il protoplasma batterico, determinando in esso flocculazioni, addensamenti o rarefazioni, può infine asportare dal protoplasma alcuni dei suoi componenti solubili nel mezzo di fissazione (alcool, etere, ecc.). Son tutte evenienze queste che in particolari casi potrà essere opportuno determinare volontariamente, per studiare alcune particolarità o alcuni componenti dei germi, ma che bisogna sapere

esattamente valutare ed interpretare, per evitare d'incorrere in errori alle volte grossolani.

Il fissatore d'elezione resta pur sempre l'acido osmico e sarebbe opportuno che tutti coloro che si occupano di microscopia elettronica lo usassero, eventualmente accompagnandolo con altri fissatori.

In genere converrà fissare i germi immediatamente con i vapori o con qualche goccia di soluzione al 2%, prima di sottoporli al lavaggio. In particolari casi, potrà essere opportuno trattare per qualche tempo i germi con acqua distillata, prima della fissazione, e ciò per indurre in essi una limitata plasmolisi e far così meglio risaltare nel protoplasma la presenza di eventuali granuli.

I germi fissati con acido osmico e successivamente sospesi in acqua distillata, si conservano integri nella loro morfologia per molti giorni, e quindi la loro osservazione può venire senza danno differita.

In questi casi consiglierai però di aggiungere una minima quantità di formalina (1°/∞) e ciò per impedire che nella sospensione si sviluppi un qualche germe banale che possa poi falsare l'osservazione ultramicroscopica.

L'osservazione al microscopio elettronico è stata eseguita al Laboratorio di fisica dell'Istituto, con l'ausilio del dott. Carlo Castagnoli, a cui vanno i miei ringraziamenti.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.
24 luglio 1948.