

SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 35

TITOLO: LABORATORIO DI IGIENE E TOSSICOLOGIA AMBIENTALE 1 – LABORATORY OF HYGENE AND ENVITOMENTAL TOXICOLOGY 1

Responsabile scientifico: Marina Isidori

Settore/i Scientifico-Disciplinari di riferimento:

MED 42

RADoR: Marina Isidori, Margherita Lavorgna, Chiara Russo

Tipologia: BIOLOGICO

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- piano rialzato, corpo A, locale 2A17.2
- dimensioni: m²
- n. 6 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

- Colture di invertebrati e alghe e test di tossicità acuta e cronica su xenobiotici in organismi della catena trofica di acqua dolce e marina (alghe, rotiferi, crostacei e ostracodi)
- Saggi di genotossicità (test Comet) in organismi acquatici esposti a xenobiotici
- Saggi di genotossicità su ceppi Escherichia coli PQ37 e Salmonella typhimurium 1535 PSK 1002
- Saggi di mutagenicità su ceppi di Salmonella typhimurium TA98 e TA100
- Saggi di attività antibatterica
- Saggi di attività antiossidante
- Lettura di piastre per saggi su colture cellulari
- Indagini microbiologiche su alimenti/acqua

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITA' SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. Colture di invertebrati e alghe e test di tossicità acuta e cronica su xenobiotici in organismi della catena trofica di acqua dolce e marina (alghe, rotiferi, crostacei e ostracodi)

Gli invertebrati sono ottenuti mediante:

- schiusa di efippi/cisti posti in cella climatica, in opportune soluzioni saline per ottenere acqua sintetica;
- allevamento partendo da una coltura di massa e allestimento di subcolture in cella climatica (Stanza climatizzata), nutrendo gli organismi con lievito, alghe, tetramin ed erba medica.

Le alghe sono ottenute da beads di alginato poste in coltura in acqua sintetica, con illuminazione da banco.

Per i test, gli xenobiotici vengono disciolti nei solventi (acqua, etanolo, metanolo, DMSO) e diluiti in soluzioni saline specifiche relative all'organismo di interesse. Gli organismi vengono esposti agli xenobiotici per 24 ore nei saggi di tossicità acuta e per tempi più lunghi nei saggi di tossicità cronica e incubati tra i 23 e i 25 °C in cella climatica (Stanza climatizzata) con e senza fotoperiodo.

Le letture sono effettuate utilizzando lettore di micropiastre, lo stereoscopio, ed il negatoscopio.

Assicurare pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento.

2. Saggi di genotossicità (test Comet) su organismi acquatici esposti a xenobiotici

Gli organismi (ottenuti come descritto nell'attività 1) vengono esposti agli xenobiotici per 24 ore, disintegrati meccanicamente con pipette e centrifugati (Sala centrifughe).

Le cellule ottenute vengono distribuite su vetrini pre-agarizzati, successivamente immersi in una soluzione di lisi cellulare (NaCl, Na₂EDTA, Tris-HCl, Triton 1% e DMSO 30%) e sottoposti a corsa elettroforetica in buffer (Na₂EDTA e NaOH). I vetrini vengono poi immersi in una soluzione di neutralizzazione (Tris-HCl), disidratati in etanolo al 70% e colorati con bromuro di etidio. Segue la visualizzazione del danno al DNA utilizzando un microscopio ottico a fluorescenza.

Assicurare pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa a flusso laminare e cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento.

3. Saggi di genotossicità su ceppi Escherichia coli PQ37 e Salmonella typhimurium 1535 PSK 1002

Aliquote cellulari batteriche conservate a -80 °C o colonie da master plate conservate in frigo vengono inoculate in specifici terreni di coltura (preparati mediante utilizzo di forno a microonde e sterilizzati in autoclave) e incubate alla temperatura di 37 °C (Camera calda). Le cellule batteriche (a densità nota) vengono esposte agli xenobiotici oggetto di studio e co-incubati o meno con la genotossina standard (4-nitrochinolina). La determinazione dell'attività del campione viene effettuata spettrofotometricamente dopo aver aggiunto un substrato cromogeno (orto-nitrofenil-β-galattoside).

Al termine della procedura i campioni vengono autoclavati e smaltiti.

Assicurare pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa a flusso laminare e cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento

4. Saggi di mutagenicità su ceppi di Salmonella typhimurium TA98 e TA100

Aliquote cellulari batteriche (ottenute come indicato nell'attività 3) vengono esposte ai campioni oggetto di studio precedentemente co-incubati o meno con i mutageni standard (4- nitrochinolina, sodio azide, 2-aminoantracene, metilcolantrene).

Si procede seminando le cellule batteriche in terreno agarizzato e incubando le piastre a 37°C (Camera calda).

La conta delle colonie viene effettuata utilizzando contacolonie (Igiene e Tossicologia ambientale 2).

Al termine della procedura le piastre vengono autoclavate e smaltite.

Assicurare pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa a flusso laminare e cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento

5. Saggi di attività antibatterica

Aliquote cellulari batteriche (ottenute come indicato nell'attività 3) sono incubate alle temperature di crescita specifiche dei microrganismi di interesse (Stanza climatizzata). Molecole, estratti naturali o materiali polimerici vengono esposti ad un numero noto cellule (determinato spettrofotometricamente). L'attività antibatterica del campione viene quantizzata mediante conta biologica vitale in terreno solido o mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro per micropiastre.

Al termine della procedura i campioni vengono autoclavati e smaltiti.

Assicurare pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa a flusso laminare e cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento

6. Saggi di attività antiossidante

Molecole o estratti naturali vengono solubilizzati in solventi idonei e diluiti. Soluzioni radicaliche di DPPH e ABTS vengono preparate utilizzando rispettivamente metanolo e acqua distillata. I campioni da esaminare vengono esposti alle soluzioni radicaliche e l'attività antiossidante è determinata utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre.

Assicurare pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa a flusso laminare e cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento

7. Lettura di piastre per saggi su colture cellulari

Le piastre (preparate nel Laboratorio Colture Cellulari) vengono lette utilizzando lettore di micropiastre. Al termine della procedura le piastre vengono smaltite in modo appropriato.

Assicurare la pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento

8. Indagini microbiologiche su alimenti/acqua

I campioni di alimenti vengono omogenizzati tramite stomacker e diluiti in soluzione fisiologica sterile. Similmente, anche i campioni di acqua da analizzare vengono o meno diluiti in soluzione fisiologica sterile.

Si procede effettuando piastramenti per inclusione mediante l'utilizzo di terreni agarizzati appropriati (preparati come riportato in attività 3) e riponendo le piastre in celle termostate (Stanza climatizzata e Camera calda)

Si procede alla conta delle colonie mediante l'utilizzo di contacolonie (Laboratorio di Igiene e Tossicologia Ambientale 2).

Assicurare la pulizia degli strumenti utilizzati e riordino banco di lavoro.

DPI: guanti e occhiali di protezione.

DPG: cappa a flusso laminare e cappa chimica.

Manutenzione ordinaria delle strumentazioni. Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al RAdoR di riferimento

LISTA DELLE ATTREZZATURE PRESENTI:

1. Autoclave
2. Bagno termostatico
3. Bilancia tecnica
4. Bilancia analitica
5. Cella elettroforetica
6. Centrifuga da banco per Eppendorf
7. Forno a microonde
8. Frigorifero
9. Incubatori n. 4
10. Microscopio ottico a fluorescenza
11. Negativoscopio
12. pH-metro
13. Piastre riscaldanti/agitanti n. 3
14. Sonicatore
15. Spettrofotometro per micropiastre
16. Stereomicroscopio
17. Stomacker

18. Termociclatore

LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE GENERALE (DPG):

1. Cappa chimica (MOMOWORK ECOAIR120 TIRAGGIO EXT)
2. Cappa microbiologica a flusso laminare (FASTER BIO48 FLUSSO VERTICALE CLASSE I)
3. Armadio per liquidi infiammabili

LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALI (DPI) AD USO PERSONALE DEGLI OPERATORI:

- Camice da laboratorio
- Occhiali di protezione
- Guanti in nitrile e in lattice
- Guanti per autoclave

Categorie ISI WEB di riferimento:

Environmental sciences, Microbiology, Public Environmental & Occupational Health, Toxicology, Food Science and Technology

Categorie ERC di riferimento:

- **PE10 Earth System Science**
 - ✓ PE10_17 Hydrology, hydrogeology, engineering and environmental geology, water and soil pollution
- **LS7 Prevention, Diagnosis and Treatment of Human Diseases**
 - ✓ LS7_9 Public health and epidemiology
 - ✓ LS7_11 Environmental health, occupational medicine
- **LS8 Environmental Biology, Ecology and Evolution**
 - ✓ LS8_12 Microbial ecology and evolution
 - ✓ LS8_14 Ecophysiology, from organisms to ecosystems
- **LS9 Biotechnology and Biosystems Engineering**
 - ✓ LS9_12 Ecotoxicology, biohazards and biosafety

[SCHEDE DI SICUREZZA](#)