SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 50

TITOLO: STRUTTURA E DIVERSITÀ GENETICA DELLA MICROFLORA EDAFICA- STRUCTURE AND GENETIC DIVERSITY OF EDAPHIC MICROFLORA

Responsabile: FLORA ANGELA RUTIGLIANO

Settore/i Scientifico-Disciplinari di riferimento:

BIO/07

RADoR: FLORA ANGELA RUTIGLIANO; SIMONA CASTALDI

Tipologia: CHIMICO

Gruppi afferenti: Ecologia e Biodiversità degli Ecosistemi Terrestri (ECOBET)- ECOLOGY AND BIODIVERSITY OF TERRESTRIAL ECOSYSTEMS

LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE

- Localizzazione: 1° piano, CORPO A (Locale 3A13.12)
- dimensioni*: (*Il locale e le dimensioni saranno inseriti dalla Commissione)
- n. 3 postazioni di lavoro

ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO

- Valutazione della diversità genetica delle comunità batterica e fungina di suolo ed altre matrici ambientali.
- Determinazione del micelio fungino mediante microscopia ottica
- Preparazione dei campioni per la valutazione dell'attività fungina mediante spettrofotometria
- Respirazione potenziale mediante metodo titrimetrico

RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DELLE ATTIVITA' SVOLTE E DELLE MODALITÀ OPERATIVE

1. **Valutazione della diversità genetica delle comunità batterica e fungina di suolo ed altre matrici ambientali**

Indossare i DPI (guanti di protezione, camice da laboratorio, mascherina FPP2). La procedura prevede l'estrazione del DNA da campioni di suolo mediante l'utilizzo di uno specifico kit di estrazione (FastDNA™ SPIN Kit for Soil): i campioni vengono inseriti in provette da 2,0 mL contenenti Lysing Matrix E, una miscela di particelle di ceramica e di silice, e vengono omogeneizzati mediante lo strumento FastPrep in presenza di tampone MT e tampone fosfato di sodio. Dopo la lisi cellulare, i campioni vengono centrifugati per separare il pellet (costituito da terreno e detriti cellulari) e la matrice di liquida contenete il DNA. Il DNA estratto viene purificato dal surnatante con la procedura Binding Matrix utilizzando provette munite di filtri. Aliquote di campioni di DNA estratto vengono preparate con un'apposita miscela di reazione per PCR e inserite nel termociclatore allo scopo di amplificare il gene target considerato. Successivamente la qualità e la quantità dell'amplificazione viene verificata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio, utilizzando un sistema di corsa elettroforetica orizzontale. Una aliquota dei campioni amplificati viene, poi, sottoposta alla corsa elettroforetica (DGGE) su gel di acrilamide contenente un gradiente di agenti denaturanti (urea e formammide). Terminata la corsa, il gel viene incubato con il Sybr Green e successivamente trasferito per l'acquisizione mediante Typhoon scanner e la successiva elaborazione dei dati. Il gel e tutte le soluzioni di scarto, dopo la DGGE, vengono depositate nelle apposite taniche e negli appositi contenitori sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio per poi essere successivamente trasferiti all'interno

del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RADoR.

PRIMA DELL'UTILIZZO DELLA STRUMENTAZIONE (DCODE, Sistema elettroforetico orizzontale, Termociclatore, centrifughe e FastPrep)

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore.
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio).
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria nel locale.

DURANTE L'UTILIZZO

- Verificare il corretto avvio delle analisi.
- Non intervenire di propria iniziativa sui componenti della strumentazione e non manomettere parti della strumentazione.
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RADoR).

DOPO L'UTILIZZO

- Spegnere la strumentazione, procedere a pulizia superfici interne e a riordino banco di lavoro.

2. Determinazione del micelio fungino mediante microscopia ottica e preparazione dei campioni per la valutazione dell'attività fungina

Indossare i DPI (guanti di protezione, mascherina FPP2, camice da laboratorio). Per la determinazione del micelio fungino, il campione viene pesato in apposite vaschette e trasferito in un mixer dove viene omogenizzato a velocità constante con 100 ml di acqua distillata e successivamente trasferito in contenitori di plastica da 100 ml. Un'aliquota di soluzione (1 ml) viene filtrata sottovuoto su un apposito apparato filtrante su cui è stato posto precedentemente un filtro di nitrato di cellulosa. Al termine della filtrazione, il filtro viene posto all'interno di un vaschetta contenete il colorante (blu di anilina) e poi successivamente viene posto su un vetrino porta-oggetto, coperto con un vetrino copri oggetto e osservato al microscopio ottico ad un ingrandimento 400X. Al termine dell'osservazione i vetrini vengono depositati negli appositi contenitori degli scarti sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio e poi trasferiti all'interno del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RADoR.

PRIMA DELL'UTILIZZO DELLA STRUMENTAZIONE (Mixer, sistema filtrante, microscopio ottico)

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore.
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, camice da laboratorio).
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria nel locale.

DURANTE L'UTILIZZO

- Verificare il corretto avvio delle analisi.

- Non intervenire di propria iniziativa sui componenti della strumentazione e non manomettere parti della strumentazione.
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RADoR).

DOPO L'UTILIZZO

- Spegnere la strumentazione, procedere a pulizia superfici interne e a riordino banco di lavoro.

3. Preparazione dei campioni per la valutazione dell'attività fungina mediante spettrofotometria

Lavorare sotto cappa e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio guanti, mascherina FPP2).

Aliquote di suolo fresco (5 g) vengono miscelati con soluzione di acetato di sodio triidrato (4 ml; 0,1 M; pH 5,5) e una soluzione di p-nitrophenil-N-acetyl-β-D-glucosamminide (1 ml; 10 mM). La miscela viene incubata per un'ora al buio a 37 °C, e al termine dell'incubazione vengono aggiunti in successione una soluzione di idrossido di sodio (4 ml; NaOH 0,5 M) e una soluzione di cloruro di calcio (1 ml; CaCl2 0,5 M). I campioni vengono agitati, centrifugati, filtrati (usando filtri Whatman n °2). Aliquote di campioni vengono trasferite, sotto cappa chimica, in cuvette per la lettura spettrofotometrica. Le soluzioni di scarto di questa preparazione vengono depositate nelle apposite taniche sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio e poi trasferiti all'interno del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RADoR.

4. Respirazione potenziale mediante metodo titrimetrico

Lavorare sotto cappa e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio guanti, mascherina FPP2).

Aliquote di di suolo fresco (5 g) vengono pesate in un contenitore di vetro posto sul fondo di un recipiente a chiusura ermetica; successivamente sul fondo del contenitore viene aggiunta una soluzione di idrossido di sodio (10 mL; NaOH 0,1 M) ed un barattolo contente acqua. Tutti i contenitori vengono chiusi ermeticamente e lasciati in incubazione a temperatura e umidità controllata per un intervallo di tempo variabile tra i 12 e i 15 giorni, ripetendo la misura a diversi tempi di incubazione (es. 1, 4, 7 e 12 giorni). In ciascun intervallo, dopo aver rimosso il contenitore contenente il suolo, l'eccesso di NaOH viene titolato con una soluzione di acido cloridrico (HCl 0,1 N), previa aggiunta di di cloruro di bario (2 ml; BaCl2 0,75 N), fino al viraggio dell'indicatore (fenoftleina) dal colore rosa a bianco neutro.

Le soluzioni di scarto, dopo l'analisi spettrofotometrica, vengono depositate nelle apposite taniche sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio e poi trasferiti all'interno del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RADoR.

LISTA DELLE ATTREZZATURE PRESENTI: (ELENCARE LE ATTREZZATURE PRESENTI NEL LABORATORIO RIPORTANDO IL NUMERO SE DIVERSO DA UNO)

1. Omogenizzatore Fast Prep
2. DCode Universal Mutation Detection System (BIORAD)
3. Linea di strumenti per corsa elettroforetica orizzontale
4. Centrifuga
5. Microscopio ottico
6. Stufa

7. Sistemi filtranti la determinazione della biomassa fungina del suolo Frigorifero
8. Termociclatore
9. Bilancia
10. Omogenizzatore
11. Piastra riscaldante con agitatore magnetico
12. Agitatore magnetico

LISTA DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE GENERALE (DPG):

1. Cappa chimica

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

- Occhiali di protezione
- Guanti in nitrile e in lattice (varie misure)
- Mascherine FPP2

Categorie ISI WEB di riferimento (https://www.distabif.unicampania.it/dipartimento/strutture-del-dipartimento/laboratori):
Ecology, Environmental Sciences, Plant Science, Soil Science

Categorie ERC di riferimento

- ✓ PE10_4 Terrestrial ecology, land cover change
- ✓ PE10_9 Biogeochemistry, biogeochemical cycles, environmental chemistry
- ✓ PE10_17 Hydrology, water and soil pollution
- ✓ LS8_2 Biodiversity
- ✓ LS8_5 Biological aspects of Environmental change, including climate change.
- ✓ LS8-12 Microbial ecology and evolution
- ✓ LS9_8 Applied sciences, plant breading, agroecology and soil biology