



ESERCITAZIONE

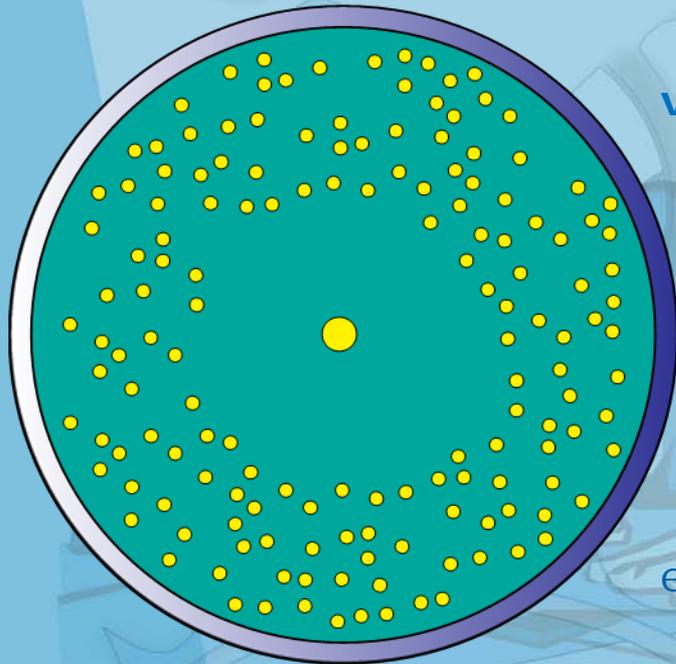
Test di tossicità e di mutagenicità

(Test di Ames adattato ai laboratori scolastici)

scopo: determinare se una sostanza è
tossica

mutagena

modello sperimentale: microrganismi coltivati su piastra



vantaggi

bassi costi

rapidità di esecuzione del test

facilità di manipolazione

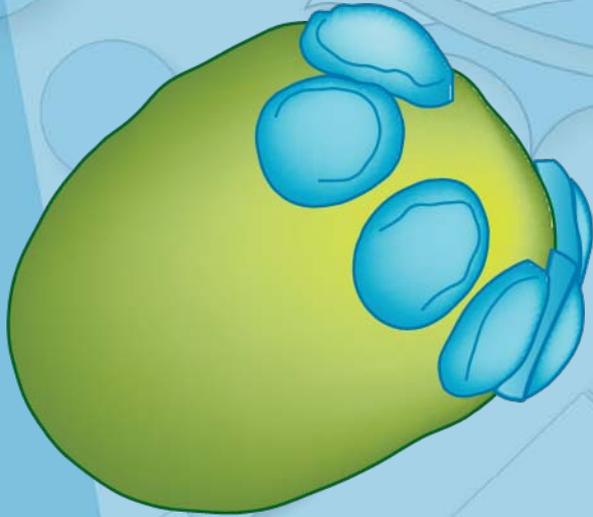
osservazione diretta degli effetti
della sostanza saggiata

effetti osservati:

comparsa di colonie

pluralità di fenotipi

Saccharomyces cerevisiae (lievito di birra)



- microrganismo **eucariote**: utilizzabile come modello con riferimento alle cellule degli organismi superiori
- economico e semplice da coltivare
- facilmente reperibile (supermercato)

LIMITI dell'utilizzo del lievito

- parete cellulare estremamente resistente, meno facilmente permeabile rispetto, ad esempio, alle cellule umane
- meccanismi specifici di riparazione del DNA diversi da quelli delle cellule umane
- assenza di molte vie metaboliche responsabili nei mammiferi della conversione di sostanze in agenti tossici o mutageni per l'organismo

Il nostro test. Saggio dell'effetto della formaldeide Su *Saccharomyces cerevisiae*

materiali:

acqua distillata sterile

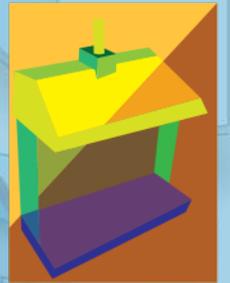
alcol etilico

beuta sterile (o un bicchiere precedentemente pulito con alcol)

cappa biologica: se non disponibile lavorare vicino a una fiamma

pipette o siringa graduata; dischetti di carta assorbente (diametro 0,5cm circa); panetto di "lievito fresco per pizza, pane, dolci" (*Saccharomyces cerevisiae*); pinzette

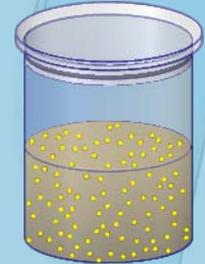
piastre di Petri contenenti circa 20 ml ciascuna di terreno di coltura per lievito (estratto di lievito 10g/l, glucosio 10g/l, agar 15g/l); 2 provette da 10 ml contenenti 5 ml di terreno indicatore (glucosio 20g/l, agar 15g/l e tri-feniltetrazolio 1,5 g/l); sostanza da saggiare; spatola per piastramenti o cotton fioc



Protocollo

*Ripristino del metabolismo normale (respirazione e fermentazione)
nelle cellule di lievito*

1) sciogliere una porzione di lievito (dimensioni di un pisello)
in mezzo bicchiere d'acqua



2) seminare una goccia della sospensione
su una piastra di coltura con un cotton fioc



3) incubare la piastra a 30 °C per 24h o a temperatura ambiente per 48h
In questo modo le cellule riattivano il normale metabolismo e si sviluppano in colonie

Semina delle cellule

1) immergere il tampone di un cotton fioc in una delle sospensioni diluite

2) passare il cotton fioc più volte sulla piastra con movimenti a zig zag

(utilizzare la diluizione che consente di inoculare qualche centinaio di cellule sulla piastra)



3) aggiungere la sostanza da saggiare depositando, con pinzette, al centro
della piastra un dischetto di carta assorbente imbevuto di formaldeide

4) seminare anche una piastra di controllo (senza aggiunta di dischetto con formaldeide)

5) incubare 24h a 30 °C o 48h a temperatura ambiente

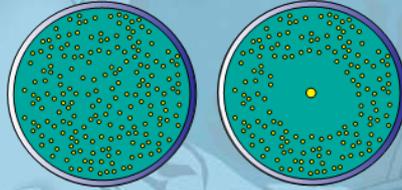


Osservazione e discussione dei risultati (I)

Confronto della disposizione delle colonie sulle due piastre:

piastra di controllo: distribuzione abbastanza omogenea su tutta la superficie

piastra con al centro il dischetto imbevuto di formaldeide: è presente un gradiente di concentrazione della sostanza dal centro ai bordi e le cellule si riproducono formando colonie solamente a partire da una certa distanza dal dischetto, laddove la concentrazione della formaldeide è sufficientemente bassa, tale da non risultare tossica.



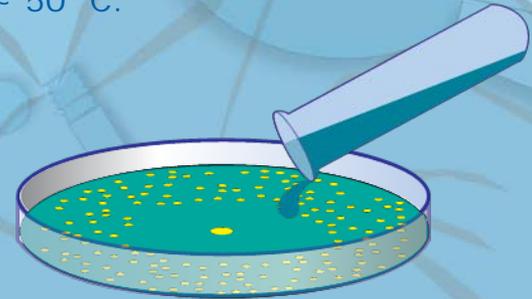
Saggio di mutagenicità: sono prese in considerazione mutazioni che comportano la perdita della capacità di respirare, che dipende dalla presenza dei mitocondri e dalla inalterata funzionalità dei genomi mitocondriale e nucleare.

Preparazione del terreno indicatore:

aggiungere, in 2 provette da 10 ml, 5 ml di terreno indicatore (glucosio 20g/l, agar 15g/l e tri-feniltetrazolio 1,5 g/l), portarlo a fusione, lasciare raffreddare a ~ 50 °C.

Procedura per la rilevazione della capacità respiratorie:

- stratificare il terreno sulle due piastre,
- attendere fino a solidificazione del *top agar*
- incubare le piastre per 40' a 30 °C (o 60' a temperatura ambiente).



Osservazione e discussione dei risultati (II)

Sulla piastra di controllo colonie sono rosse. Può essere presente qualche colonia bianca in relazione all'emergenza di mutazioni spontanee. Sulla piastra contenente la formaldeide il numero di colonie bianche è superiore rispetto al controllo in conseguenza dell'induzione di mutazioni. La frequenza di colonie mutate è correlata con la potenza mutagenica; la distanza delle colonie mutate dal centro è correlata con la concentrazione alla quale si esplica l'azione mutagenica.

Se la sostanza saggiata non ha effetti mutagenici, le colonie assumono in presenza di trifeniltetrazolio una colorazione rossa: le cellule respirano oltre a fermentare (potenziale ossidoriduttivo alto).

Le cellule non si colorano quando hanno un metabolismo esclusivamente fermentativo (il potenziale è più basso).

L'indicatore trifeniltetrazolio contenuto nel terreno assume colorazioni diverse a seconda del potenziale ossidoriduttivo.

DISCUSSIONE

La sostanza è tossica?

La sostanza sembra avere effetti mutageni?

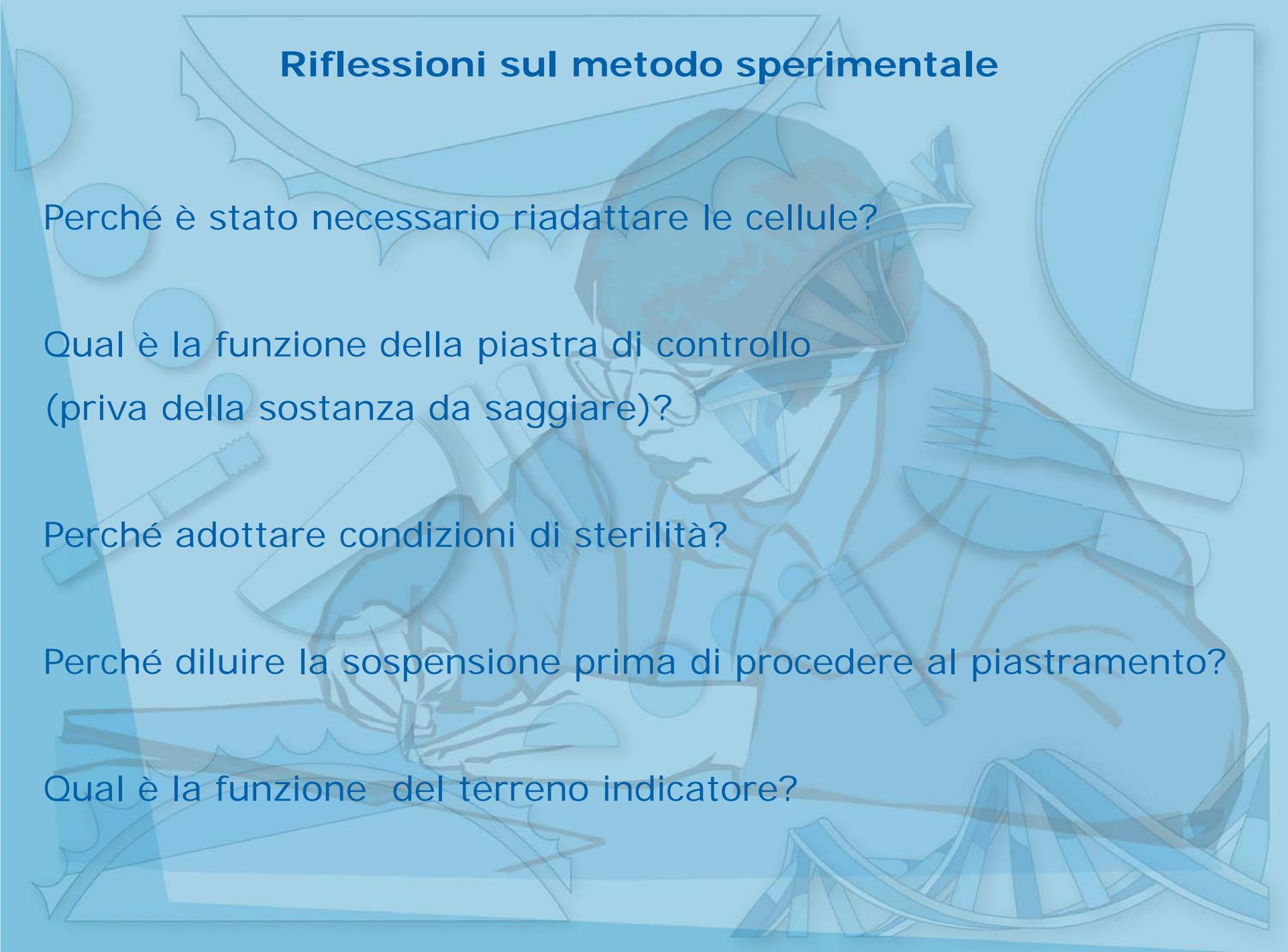
SI

formulare ipotesi per spiegare
l'assenza di mutanti

NO

confrontare frequenza di
mutazione con piastra di controllo

Riflessioni sul metodo sperimentale



Perché è stato necessario riadattare le cellule?

Qual è la funzione della piastra di controllo (priva della sostanza da saggiare)?

Perché adottare condizioni di sterilità?

Perché diluire la sospensione prima di procedere al piastramento?

Qual è la funzione del terreno indicatore?

Saccaromyces cerevisiae

metabolismo anaerobio (fermentativo)

assenza di ossigeno
ridotta produzione di cellule
produzione di alcol

metabolismo aerobio (respirazione)

presenza di ossigeno
substrato di zucchero
produzione di anidride carbonica