



Ministero
della Salute



Istituto Superiore
per la Prevenzione
e la Sicurezza del
Lavoro

Organismi geneticamente modificati: rischi connessi al rilascio nell'ambiente e all'esposizione professionale nei laboratori di ricerca

a cura di
Biancamaria Pietrangeli

**PROGRAMMA DI RICERCA FINALIZZATA
DEL MINISTERO DELLA SALUTE**

***ORGANISMI GENETICAMENTE
MODIFICATI: RISCHI CONNESSI AL
RILASCIO NELL'AMBIENTE E
ALL'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE NEI
LABORATORI DI RICERCA***

*A cura di:
Biancamaria PIETRANGELI*

***PROGRAMMA DI RICERCA FINALIZZATA
DEL MINISTERO DELLA SALUTE***

INDICE

Presentazione del Progetto “Organismi Geneticamente Modificati: Rischi connessi al rilascio nell’ambiente e all’esposizione professionale nei laboratori di ricerca”.

B. Pietrangeli pp. 1-6

Monitoraggio degli effetti di mais transgenico sulla biomassa microbica del terreno.

A. Benedetti, M. Marchionni, S. Mocali, A. Dentice A. pp. 7-26

Utilizzazione di funghi micorrizzici in un sistema modello per la valutazione dell’impatto di piante geneticamente modificate.

M.Giovannetti, C. Sbrana, A.Turrini, B. Pietrangeli, M.P. Nuti pp. 27-35

Effetti della coltivazione di piante transgeniche sulla microflora eubatterica del suolo valutati con metodi molecolari.

M.Castaldini, A.Fagiani, D. Lami, S. Landi, F. Santomassimo, N. Miclaus pp. 36-49

Valutazione della sopravvivenza e del trasferimento genico di microrganismi geneticamente modificati utilizzabili in processi di bioremediation.

E. Zennaro, C. Civolani, L.Leoni, C. Calisti, M. Ruzzi pp. 50-61

Sviluppo e validazione di modelli biologici multivalenti per la valutazione del rischio associato al potenziale patogeno di batteri di interesse biotecnologico.

P. Visca, C. Ambrosi, L. Leoni, L. Putignani, P. Ascenzi pp. 62-72

Biosicurezza degli impianti biotecnologici: verifica delle misure di contenimento dei microrganismi geneticamente modificati.

G. Gramiccioli, S. Mirri, C. Pascucci, B. Camerini, G. Corrente, E. Nucera, D. Amaddeo, I. Ciabatti, R. Lorenzetti, M. Zini, B. Pietrangeli pp. 73-83

Definizione di un sistema per la raccolta e l’elaborazione dei dati nei laboratori di ricerca biotecnologica nel campo biomedico e Elaborazione di un sistema formativo/informativo per la gestione del rischio nei laboratori di ricerca biotecnologia, biomedica ed agroalimentare.

P.Bet, D. Sossai pp. 84-90

Raccolta, elaborazione e diffusione dei dati sulle procedure di sicurezza adottate dai laboratori di ricerca nel campo delle biotecnologie vegetali.

M. Miele pp. 91-95

Messa a punto e validazione di metodiche per il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a microrganismi geneticamente modificati.

P. Tomao, S. Di Renzi, N. Vonesch, S. Signorini pp. 96-101

Presentazione del Progetto

“ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI: RISCHI CONNESSI AL RILASCIO NELL’AMBIENTE E ALL’ESPOSIZIONE PROFESSIONALE NEI LABORATORI DI RICERCA”.

Programma di Ricerca finalizzata Ministero della salute

Responsabile scientifico: Biancamaria Pietrangeli

*Dipartimento Insedimenti Produttivi ed Interazione con l’Ambiente (DIPIA).
Istituto Superiore Prevenzione e Sicurezza sul Lavoro. Via Urbana 167, 00184 Roma*

Il progetto finanziato dal Ministero della salute nell’ambito del Programma di Ricerca Finalizzata 1999 e cofinanziato dall’ISPESL è stato articolato in due linee progettuali distinte: la prima aveva l’obiettivo di approfondire le conoscenze su alcuni aspetti di rischio specifici connessi con la coltivazione di piante transgeniche (impatto sul suolo) attraverso lo studio del biochimismo del suolo e del sistema microbico ad esso correlato.

La seconda linea progettuale è stata finalizzata alla definizione di una procedura operativa di analisi e gestione del rischio relativo alla manipolazione in ambiente confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM).

Il Progetto ha visto coinvolte 11 Unità operative che di seguito vengono riportate.

UNITA’ OPERATIVE IMPEGNATE NEL PROGETTO

UO	Attività	Responsabile scientifico	Istituto
1	Monitoraggio degli effetti di PGM sui microrganismi simbiotici radicali	Prof. M.P. Nuti	Università degli Studi di Pisa. Dip. Chimica e biotecnologie agrarie
2	Effetti della coltivazione di PGM sulla microflora eubatterica del suolo valutati con metodi molecolari	Dott. N. Miclaus	Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo (Firenze)
3	Individuazione di parametri biochimici del suolo quali indicatori di impatto della coltivazione di PGM	Dott.ssa A. Benedetti	Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante (Roma)
4	Studio del trasferimento genico in microrganismi geneticamente modificati	Prof.ssa E. Zennaro	III Università di Roma. Dip.di Biologia
5	Biosicurezza degli impianti biotecnologici: tecniche per la verifica delle misure di contenimento	Dott.ssa B. Pietrangeli	ISPESL- Insed.Prod. e Interazione Ambiente

6	Definizione delle procedure di gestione del rischio connesso all'esposizione occupazionale a MOGM	Dott. S. Signorini	ISPESL-Dip.Medicina del Lavoro
7	Messa a punto e validazione di metodiche per il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a MOGM	Dott.ssa P. Tomao	ISPESL-Dip.Medicina del Lavoro
8	Definizione di un sistema per la raccolta e l'elaborazione dei dati nei laboratori di ricerca biotecnologia	Dott.ssa P. Bet	Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
9	Elaborazione sistema formativo/informativo per la gestione del rischio nei laboratori di ricerca biotecnologia	Dott. D. Sossai	Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
10	Raccolta, elaborazione e diffusione dei dati sulle procedure di sicurezza adottate dai laboratori di ricerca biotecnologia	Dott.ssa M. Miele	Università degli Studi di Genova – CIBMP
11	Sviluppo di modelli biologici per la valutazione del potenziale patogeno di batteri di interesse biotecnologico	Prof. P. Visca	IRCCS Lazzaro Spallanzani

La prima linea progettuale è stata proposta anche grazie all'esperienza maturata nell'ambito dell'attività che il Dipartimento Insediamenti Produttivi ed Interazione con l'Ambiente (DIPIA) svolge dal 1995 per la Commissione Interministeriale di Valutazione per le Biotecnologie.

Il DLgs.92/93, recepimento della Direttiva 90/220/CEE, in materia di rilascio deliberato nell'ambiente di Organismi Geneticamente Modificati (OGM), pur richiedendo al responsabile del rilascio una valutazione delle influenze e dei rischi che l'OGM presenta per l'uomo e per l'ambiente in relazione agli usi previsti, non indicava le modalità di verifica di tali influenze.

La valutazione del rischio ambientale veniva fornita o in parte B della Direttiva, ossia nell'ambito di rilasci per scopi di ricerca, o in parte C, ai fini della commercializzazione dell'OGM.

Nel caso di rilasci di piante geneticamente modificate (PGM) per scopi di ricerca, la Direttiva imponeva al notificante di ridurre al minimo gli eventuali impatti sull'ambiente prevedendo una serie di misure di controllo per evitare eventuali fenomeni di inquinamento derivante da trasferimenti di materiale genetico dalle PGM, prevedendo quindi, distanze da altre colture sessualmente compatibili, piante trappola per il confinamento del polline, emasculazione della PGM, reti contro animali ecc. Inoltre, a fini di ricerca, i tempi di permanenza in campo risultavano tali da non permettere studi significativi di impatto ambientale.

La sperimentazione per scopi di ricerca è infatti finalizzata a valutare il comportamento in campo della PGM, il conferimento delle caratteristiche desiderate, le rese agronomiche, la stabilità del gene inserito, la trasmissione del carattere alle generazioni successive ecc., considerando che non necessariamente la pianta sarà destinata alla commercializzazione.

Nel caso di rilasci in parte C della Direttiva, ossia ai fini della commercializzazione dell'OGM, le informazioni riportate dal notificante risultavano indubbiamente più numerose, ma per lo più venivano desunte da esperimenti di rilasci condotti in altri paesi, mentre è riconosciuta la necessità di disporre di dati scientifici sito-specifici, che considerino la specificità degli agroecosistemi all'interno dei quali avviene il rilascio.

L'assenza di una precisa comprensione riguardo agli effetti ambientali di questa prima generazione di colture geneticamente modificate ha determinato in Europa il blocco delle autorizzazioni alla coltivazione di PGM a partire dalla seconda metà del 1998 e la maggior parte degli Stati membri hanno rivendicato la necessità di un'attenta valutazione dell'impatto degli OGM sull'ambiente, sulla salute pubblica e sulle economie di scala dei singoli stati membri.

Tale presa di posizione a livello europeo ha messo in evidenza la necessità di acquisire nuove conoscenze di carattere scientifico, ma definendo obiettivi e criteri comuni per la valutazioni di tali rischi per permettere la totale armonizzazione tra gli stati membri nella fase di immissione sul mercato dei prodotti OGM. In tale direzione è andata la normativa comunitaria 2001/18/CE (recepita a livello nazionale dal DLgs.224/2003) che aggiorna e modifica la Direttiva 90/220/CEE in materia di rilascio deliberato nell'ambiente di OGM e che ha definito obiettivi, principi e metodologia per procedere alla valutazione del rischio ambientale connesso al rilascio nell'ambiente di OGM.

Durante la moratoria si sarebbero dovuti avviare studi tecnico-scientifici, ma anche, forse soprattutto, tecnico-economici finalizzati alla valutazione delle conseguenze ambientali e agronomiche a medio e lungo termine che la coltivazione di colture GM potrebbe comportare negli agro-ecosistemi nazionali. Sarebbe stato necessario pianificare sperimentazioni di dimensioni significative, protratte per un periodo di tempo sufficiente ad individuare eventuali effetti sugli ecosistemi verso i quali si ipotizza l'impatto, impostate in funzione degli obiettivi da raggiungere. Studi di valutazione del rischio anche ben eseguiti, ma non ben progettati, rischiano di aggiungere poco a quello che si conosce già: la conclusione che PGM che portano geni di resistenza a erbicidi non sono più invasive delle loro controparti non modificate, in assenza di pressione selettiva da parte dell'erbicida nell'ambiente testato, significa arrivare a risultati prevedibili, anche se ottenuti con metodologie scientificamente solide e ben eseguite.

Dal 1999, pur mantenendo la moratoria molti stati membri (Regno Unito, Francia, Spagna, Danimarca, Germania), hanno pianificato sperimentazioni in pieno campo con lo scopo di studiare le modalità di gestione del rischio rappresentato dal flusso genico tra colture GM e colture sessualmente compatibili, di valutare gli effetti della coltivazione di colture GM sull'abbondanza e

la diversità della vita selvatica, di pianificare le condizioni di coltivazione che permettano la coesistenza tra colture GM e loro controparti convenzionali.

Il Progetto ISPEL è stato il primo a livello nazionale sul tema “biosicurezza” che si proponeva di individuare indicatori che fossero in grado di valutare cambiamenti nella composizione e/o nell’attività della biomassa microbica del suolo.

La sperimentazione si sarebbe dovuta effettuare in pieno campo, ma la necessaria autorizzazione da parte del Ministero delle Politiche agricole e forestali a seminare sementi transgeniche, pur se già autorizzate alla commercializzazione in sede comunitaria, non è stata ottenuta.

La sperimentazione è stata così portata avanti in laboratorio e in serra su sementi di mais transgeniche con l’obiettivo di mettere a punto differenti metodi per studiare composizione e attività della biomassa microbica, in modo tale che eventuali effetti rilevati con un metodo potessero essere confermati da altri metodi.

Il protocollo sperimentale ha previsto:

- la messa a punto di metodi molecolari per studiare la diversità microbica del suolo, sia dal punto di vista filogenetico che funzionale, tramite amplificazione del DNA e dell’RNA totale e successiva analisi DGGE per valutare la ricchezza delle specie presenti e la distribuzione delle singole specie;
- l’individuazione di parametri biochimici, quali la produzione di CO₂ della biomassa microbica, il quoziente metabolico, il quoziente di mineralizzazione che permettono di evidenziare modifiche nell’attività microbica e quindi eventuali alterazioni nel turnover dei nutrienti del suolo;
- la determinazione dell’attività microbica totale del suolo, mediante il dosaggio delle attività enzimatiche che permettono di studiare i processi mediati dai microrganismi del suolo con metodi semplici e poco costosi ;
- il monitoraggio degli effetti su popolazioni di microrganismi del terreno fondamentali per la fertilità biologica dei suoli, quali i funghi micorrizici arbuscolari, che costituiscono il sistema radicale assorbente del 90% delle piante e che svolgono un importante ruolo nel funzionamento e nella biodiversità dell’ecosistema terrestre.

Nell’ambito del progetto è stato messo a punto un sistema modello per lo studio di tali interazioni che permette di monitorare l’analisi sequenziale dello sviluppo dell’infezione fungina radicale e della crescita del micelio.

La individuazione di parametri del suolo da monitorare negli studi di impatto risulta di estrema utilità per effettuare la valutazione del rischio ambientale prevista dalla nuova Direttiva in tema di

rilascio deliberato nell'ambiente di OGM, la 2001/18/CE, il cui obiettivo deve essere, caso per caso, quello di individuare e valutare gli effetti potenzialmente negativi dell'OGM, sia diretti che indiretti, immediati o differiti sull'ambiente, effettuata al fine di determinare se è necessario procedere ad una gestione del rischio.

Tra i potenziali effetti negativi (Allegato II della Direttiva 2001/18/CE) sono compresi quelli di tipo biogeochimico, in particolare sui cicli del carbonio e dell'azoto, derivanti da modificazioni nella decomposizione di materia organica nel suolo.

La valutazione del rischio ambientale delle colture GM deve quindi necessariamente prevedere studi sugli eventuali impatti sulle comunità microbiche del suolo utilizzando differenti indicatori che in modo diverso contribuiscono a rappresentare il sistema suolo nel suo complesso, perché cambiamenti nella composizione e nell'attività della biomassa microbica possono determinare a lungo termine alterazioni della fertilità e quindi della produttività del suolo.

Nell'ambito del progetto sono stati inoltre approfonditi i meccanismi alla base del trasferimento orizzontale di geni ed in particolare se e come il trasferimento genico tra microrganismi sia influenzato dalla presenza di sostanze inquinanti.

Lo scopo principale di questi esperimenti è stato quello di comprendere la dinamica del fenomeno in ambienti naturali sottoposti a stress abiotici. Queste informazioni risultano molto utili per stabilire modalità di intervento che, a seconda delle esigenze, permettano di stimolare (per esempio durante la bonifica biologica "*in situ*"), modulare o reprimere il trasferimento di geni negli ambienti naturali.

La seconda linea di ricerca del progetto aveva l'obiettivo di definire una procedura operativa di analisi e gestione del rischio relativo alla manipolazione in ambiente confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM).

Per verificare il grado di applicabilità della normativa in vigore (DLgs. 626/94 e DLgs.206/2001) e per individuare i fabbisogni formativi in tema di sicurezza sono stati elaborati questionari distribuiti a Istituti scientifici e Università campione sul territorio nazionale per ottenere informazioni sugli agenti biologici e sui MOGM maggiormente utilizzati, sulle procedure seguite per effettuare la valutazione del rischio, sulla gestione delle attrezzature, sulle procedure adottate in caso di incidenti, sulla formazione e informazione dei lavoratori, sui dispositivi di protezione individuali utilizzati ecc.

Dalla raccolta delle informazioni mediante i questionari (circa un centinaio) è stato così possibile individuare il fabbisogno informativo/formativo che ha portato alla realizzazione di un videocorso

su CD-rom della durata complessiva di 8 ore che garantisce al singolo operatore la possibilità di accedere ad un percorso formativo modulare facendo test intermedi di verifica dell'apprendimento. E' stata inoltre predisposta una newsletter telematica finalizzata alla divulgazione delle informazioni sui diversi elementi da considerare quando si effettua una valutazione del rischio, sulle diverse procedure disponibili per la presentazione delle notifiche, sulle normative nazionali ed europee che regolamentano l'utilizzo di MOGM.

Sono state identificate diverse metodiche di monitoraggio biologico dei lavoratori al fine di evidenziare indicatori biologici di esposizione ai MOGM e sono state sperimentalmente testate le tecniche per l'analisi del DNA plasmidico nelle feci e nelle cellule della mucosa boccale e gengivale degli esposti. E' stato così possibile evidenziare alcune criticità connesse con tale monitoraggio relativamente alla raccolta dei campioni che non è sempre possibile da eseguire secondo criteri standardizzati, alla compliance da parte di coloro che si devono sottoporre ai test di monitoraggio, alla riproducibilità delle procedure ecc.)

E' stato inoltre messo a punto un protocollo di monitoraggio ambientale come strumento di verifica delle misure di contenimento adottate durante le lavorazioni con MOGM tramite l'individuazione di tecniche specifiche atte ad evidenziare la presenza dei microrganismi ingegnerizzati nell'ambiente di lavoro e in quello esterno all'impianto. Tale monitoraggio, che è tanto più importante quanto più pericolosi sono i microrganismi che si manipolano, può essere considerato un metodo di autocontrollo da eseguire per localizzare nel flusso del ciclo lavorativo o produttivo i punti o le fasi in cui può determinarsi, anche solo a seguito di eventi eccezionali, l'esposizione ad un possibile pericolo.

Inoltre, al fine di poter correttamente valutare il rischio associato al potenziale patogeno di batteri di interesse biotecnologico, considerato l'elevato potenziale applicativo di batteri del genere *Pseudomonas*, dotati di estrema versatilità metabolica e fisiologica, sono state messe a punto analisi comparative e funzionali per differenziare le diverse specie di *Pseudomonas*.

MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI DI MAIS TRANSGENICO SULLA BIOMASSA MICROBICA DEL TERRENO

Benedetti A., Marchionni M., Mocali S., Dentice A.

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, Via della Navicella, 2-4 00184 Roma

Introduzione

Il suolo viene considerato il “nodo” di tutti gli equilibri ambientali ed il “fulcro” delle produzioni agrarie, è pertanto ovvio l’interesse verso gli strumenti diagnostici per la sua conoscenza e salvaguardia.

La qualità di un sistema ambientale come il suolo può essere determinata mediante l’uso di differenti indicatori che in modo diverso contribuiscono a rappresentare il sistema stesso. Non esiste naturalmente un parametro che, analizzato, renda conto da solo dello stato del sistema. A seconda della situazione si dovrebbe poter disporre di un set di parametri appropriati e affidabili da utilizzare come indicatori dei cambiamenti della qualità del suolo.

Se la definizione della qualità del suolo è un argomento ancora dibattuto in ambito scientifico, l’individuazione di indicatori in grado di monitorare il potenziale impatto delle coltivazioni transgeniche sul suolo è una sfida tuttora aperta per chi studia il ‘sistema suolo’.

Il problema dell’individuazione è particolarmente complicato per gli indicatori di impatto di PSGM, essendo possibili anche alterazioni della biodiversità genetica e funzionale della comunità biotica del suolo con conseguenze difficilmente prevedibili.

La scienza del suolo si trova a dover rispondere ad una lunga serie di interrogativi, pur disponendo ancora di un insufficiente quantitativo di dati relativamente alla valutazione dell’impatto di PSGM sul suolo. A tali interrogativi si può rispondere solo passando attraverso una mirata ricerca scientifica, che non deve prescindere dal prendere in considerazione “caso per caso” l’evento di trasformazione, l’ambiente al quale la coltura è destinata, il tempo per il quale la pianta o i suoi residui possono esercitare effetti sul suolo o l’area interessata dalla coltura transgenica.

Inoltre, non si può giungere a conclusioni definitive da studi in laboratorio o in microcosmo, prescindendo dalle sperimentazioni in pieno campo.

Perché i metodi di analisi che si hanno a disposizione siano utilizzabili nello studio del potenziale impatto di PSGM, essi devono essere in grado di rilevare anche alterazioni della biodiversità genetica e funzionale della comunità microbica del suolo o la presenza nel suolo di materiale genetico derivante da PSGM con capacità trasformante verso le popolazioni microbiche naturali.

È chiaro che questo tipo di studi richiede principalmente di risolvere questioni metodologiche a livello di protocollo, considerando la complessità del problema e quindi le differenti competenze da coinvolgere e coordinare.

Effettivamente le PGM possono agire sugli organismi del suolo a vari livelli che spaziano dal trasferimento genico orizzontale, alle alterazioni delle comunità di decompositori, fino agli effetti delle sostanze biologicamente attive sulle popolazioni non-bersaglio.

Conseguentemente, gli effetti osservabili vanno dal cambiamento della composizione della comunità microbica del suolo all'alterazione dei processi ecosistemici chiave.

Appare chiaro che un cambiamento nella composizione o nell'attività della biomassa microbica del terreno possa determinare, sia a breve sia a lungo termine, alterazioni più o meno evidenti della fertilità e quindi della produttività del terreno stesso.

Prima dell'emanazione della Direttiva 2001/18/CE nei protocolli sperimentali non era previsto alcun controllo sul suolo. Tale direttiva aggiorna la precedente 220/90 e successive modifiche, che stabiliva le misure volte a proteggere la salute umana e l'ambiente nei confronti della coltivazione in pieno campo di piante geneticamente modificate a scopo di ricerca e sviluppo, regolando l'immissione sul mercato dei prodotti da essi derivati.

La Dir. 2001/18 per la prima volta inserisce tra le diverse misure di controllo il suolo. Anche se tali controlli si limitano all'effetto sul riciclaggio del carbonio e dell'azoto, costituiscono un progresso normativo d'estrema importanza perché il suolo, tra i diversi comparti ambientali, è tra i più difficili da disinquinare.

Scopo del lavoro

In questo contesto, la presente ricerca mira all'individuazione di indicatori utili alla valutazione della pressione di colture geneticamente modificate sull'attività microbica del suolo, quindi di parametri biochimici da utilizzare come indicatori di potenziali cambiamenti della qualità del suolo, al fine di disporre di strumenti metodologici anche per l'applicazione delle normative vigenti sull'emissione deliberata nell'ambiente di piante GM.

Questa ricerca risulta complementare alle ricerche svolte parallelamente dalle altre unità di ricerca impegnate nel progetto, in particolare l'Istituto Sperimentale per la Difesa del Suolo di Firenze (Responsabile Dott. N. Miclaus) e l'Università degli Studi di Pisa, Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie (Responsabile Prof. M. P. Nuti), per lo studio degli effetti della coltivazione di piante transgeniche rispettivamente sulla microflora eubatterica del suolo, valutati con metodi molecolari, e sui microrganismi in simbiosi micorrizica.

Indicatori di qualità del suolo

La qualità ambientale di un'area o di un territorio può essere stimata e rappresentata con l'uso di opportuni indicatori ambientali. Questi possono essere definiti come strumenti in grado di rappresentare, con differenti livelli di approssimazione, particolari condizioni (eventi, processi, stati complessivi di qualità o criticità) dell'ambiente.

Un buon indicatore deve avere alcune caratteristiche riassumibili in: rappresentatività, accessibilità, affidabilità, operatività. Di regola la qualità di un dato sistema ambientale non può essere riassunta attraverso un unico parametro indicatore. Questa infatti deve combinare spesso informazioni relative a più indicatori che talvolta hanno scale di misura diverse e una diversa importanza ai fini delle valutazioni.

Differenti indicatori possono contribuire con importanza relativa diversa alla definizione di un unico obiettivo di qualità; occorre in questo caso ponderare in modo opportuno l'importanza dei singoli indicatori.

Dalla letteratura è possibile dedurre alcune caratteristiche qualificanti un indicatore, come ad esempio quelle proposte dall'OCSE (OCSE, 1999).

Rilevanza politica e utilità per gli utenti:

Fornire un quadro rappresentativo delle condizioni ambientali, delle pressioni o delle reazioni della società al cambiamento dello stato dell'ambiente;

Essere semplici, facili da interpretare ed in grado di mostrare i trend temporali;

Essere reattivi ai cambiamenti ambientali ed alle attività umane collegate;

Fornire una base per raffronti internazionali;

Avere valenza nazionale o essere applicabili a tematiche regionali di rilevanza nazionale;

Avere un valore soglia o di riferimento, in modo che gli utenti possano valutare il significato dei valori dell'indicatore.

Validità analitica:

Essere teoricamente ben fondato in termini tecnici e scientifici;

Essere basato su standard internazionali ed avere un consenso internazionale in termini di validità;

Prestarsi ad essere collegato a modelli economici, a stime di previsione e a sistemi informativi.

Misurabilità:

Essere facilmente disponibile o reso disponibile ad un rapporto costo/beneficio ragionevole;

Essere adeguatamente documentato e di qualità accertata;

Deve esserne possibile l'aggiornamento ad intervalli regolari secondo procedure ben definite.

Più schematicamente, dunque, un indicatore dovrebbe essere rappresentativo, accessibile ed applicabile.

Rappresentatività: l'indicatore deve essere chiaramente correlabile con un certo fenomeno o una certa caratteristica che si vuole rilevare o controllare; deve essere altamente correlabile con l'effetto suddetto, con una minima dispersione statistica; deve essere difficilmente occultabile da fattori di contorno; deve avere una validità sufficientemente generalizzabile a molte situazioni analoghe, anche se non identiche.

Accessibilità: deve essere facilmente misurabile e possibilmente monitorabile automaticamente; deve essere campionabile facilmente; deve avere una soglia di rilevabilità analitica accessibile con tecniche standard.

Affidabilità: deve avere valori minimi di errori sistematici.

Operatività: deve essere direttamente e facilmente utilizzabile per quantificare azioni di intervento, costi e benefici.

In definitiva secondo l'OCSE la definizione di un indicatore è un concetto molto ampio.

Gli indicatori sono descrivibili in vario modo come: parametri, variabili, misure, elaborazioni statistiche, parametri stimati valori, strumenti di misura, frazioni indici, parti di informazioni, modelli empirici, segnali.

Fertilità biologica

Il terreno si può considerare un sistema polifasico, idealmente composto per una metà dalla fase solida e per l'altra metà dalle fasi liquida e gassosa, principalmente costituito da materiale inorganico e per una piccola percentuale da sostanza organica (3-4%). La parte vivente della sostanza organica comprende batteri, funghi, alghe, attinomiceti, protozoi, vermi e artropodi.

In mancanza della frazione organica il terreno rappresenterebbe semplicemente un inerte supporto meccanico, invece esso entra in relazione con le piante a cui fa da supporto, formando un ecosistema suolo-vegetale.

In particolare, per quanto attiene al terreno agrario si deve precisare che, oltre alla funzione di sostenere e nutrire le piante, deve renderne possibile la loro coltivazione con un utile economico. La fertilità viene infatti definita come la capacità del terreno di rendere produttive le colture. Si parla normalmente di fertilità chimica (somma degli elementi nutritivi in forma assimilabile a disposizione delle colture), di fertilità fisica (struttura, tessitura del terreno etc.) e di fertilità biologica.

Il concetto di fertilità biologica è andato affermandosi solo in questi ultimi venti anni e con esso si vuole caratterizzare l'espressione del metabolismo e del turnover microbico.

Ecologia microbica

La funzione dei microrganismi del suolo è di molteplice natura: si esplica sia nei processi pedogenetici che nella nutrizione delle piante. I microrganismi intervengono infatti nella mineralizzazione della sostanza organica, nella formazione dell'humus e agiscono inoltre sulla mobilizzazione degli elementi minerali. Particolarmente importante a questo riguardo è la solubilizzazione del fosforo ad opera della CO₂ di provenienza microbica; infatti è stato notato che esiste un parallelismo tra CO₂ svolta e fosforo disponibile. Oltre a ciò occorre ricordare i rapporti che i microrganismi instaurano con le piante nella rizosfera nonché nella simbiosi micorrizica.

I microrganismi svolgono dunque un ruolo di fondamentale importanza per la fertilità dei terreni.

Nell'ambito della microbiologia pedologica, la classificazione più importante è quella per "gruppi fisiologici" proposta per primo da Winogradsky.

I gruppi fisiologici vanno intesi come l'insieme di individui sistematicamente diversi, ma in grado di svolgere nel terreno la medesima funzione. Così si parla per esempio di azotofissatori, amilolitici, pectinolitici, solfoossidanti e solforiduttori, focalizzando l'interesse sul processo biochimico più che sulle singole specie.

E' ancora di Winogradsky la suddivisione dei microrganismi in autoctoni e zimogeni, i primi con una attività scarsamente influenzata dalle variazioni ambientali, i secondi particolarmente sensibili alla presenza di determinati materiali organici ed inorganici.

I microrganismi possono inoltre essere classificati in base alle fonti nutrizionali da essi utilizzati, si distinguono cioè gli eterotrofi, che costituiscono la stragrande maggioranza, dagli autotrofi. Questi ultimi che rappresentano una minima parte vengono distinti in chemioautotrofi, se utilizzano sostanze minerali (batteri nitrificanti) e fotolitotrofi se utilizzano la luce (batteri anaerobi fotosintetici rossi e verdi).

La speciazione della carica microbica dei diversi terreni è comunque influenzata da fattori ambientali, nonché dalle caratteristiche fisico-chimiche del terreno stesso e dal suo grado di fertilità. Si è visto, inoltre che la carica microbica diminuisce con la profondità del terreno, soprattutto per il decremento del contenuto di sostanza organica. Esperienze di laboratorio hanno infatti confermato che l'apporto di sostanza organica al terreno provoca un incremento della popolazione microbica.

La capacità delle specie microbiche nell'utilizzare differenti sostanze nutritive condiziona la distribuzione nell'ambito dei terreni. La distribuzione dei microrganismi dipende ancora dalla presenza di specie tra loro competitive e per alcune di esse dalla capacità di sopravvivenza mediante sporificazione ed inoltre dalla presenza di organi di locomozione.

Descrizione dei parametri biochimici utilizzati nel presente studio

Misure respirometriche

La respirazione del suolo è uno dei parametri più consolidati e tuttora frequentemente utilizzati per quantificare le attività microbiche nei suoli. Il metodo è basato sul fatto che le cellule metabolicamente attive richiedono un apporto costante di nutrienti ed energia che, per la microflora eterotrofa, deriva dalla trasformazione della sostanza organica. Le reazioni che richiedono energia nelle cellule sono reazioni redox basate sul trasferimento di elettroni da un donatore ad un accettore. Nella respirazione, ovvero l'ossidazione della sostanza organica ad opera di microrganismi aerobici, l'ossigeno è l'accettore finale degli elettroni e i prodotti finali del processo sono acqua e anidride carbonica. Le attività metaboliche possono essere dunque quantificate misurando la produzione di CO₂ (o il consumo di O₂).

La respirazione è un processo universale e come tale non solo ristretto ai microrganismi ma viene effettuata anche da altri organismi che vivono nel terreno e dipende dallo stato fisiologico delle cellule ed è influenzato da diversi fattori, quali lo stato fisiologico dei microrganismi, il pH, l'umidità del suolo, la temperatura, la disponibilità di nutrienti, la struttura del suolo e da tutti quei fattori che promuovono o deprimono le attività metaboliche.

Il tasso di respirazione basale è una misura della respirazione microbica essenziale ed è comunemente considerata come decomposizione complessiva della sostanza organica (Anderson, 1982). La respirazione basale viene misurata senza l'aggiunta di alcun substrato al suolo. Il tasso di respirazione è dato dalla quantità totale di CO₂ prodotta in un tempo t e dipende dai fattori che controllano l'attività microbica: temperatura, apporto di acqua, apporto di nutrienti e aerazione insieme alla disponibilità di materiali e substrati. Dalla misura del tasso di respirazione è possibile costruire le curve di respirazione, basate sia su dati cumulativi che giornalieri, che sono relative alla decomposizione della sostanza organica del suolo.

La respirazione può essere determinata sia come evoluzione di CO₂ che come consumo di O₂. La prima è la strategia più comunemente utilizzata, probabilmente a causa sia della numerosa strumentazione disponibile per la stima in continuo della CO₂, sia per la sua relativa facilità di utilizzo. Tuttavia ci sono delle limitazioni: in suoli contenenti carbonati, ad esempio, il rilascio di CO₂ abiotica può dare risultati erranei e perciò in certe condizioni il consumo di O₂ viene preferito (Anderson, 1982).

Dosaggio della biomassa microbica

Generalmente gli ecosistemi traggono l'energia necessaria al loro funzionamento dal processo fotosintetico. Nel suolo esistono pochi organismi fotosintetici funzionali, pertanto la fonte di energia per lo svolgimento delle attività metaboliche è rappresentata dalla sostanza organica. Con la

mineralizzazione della sostanza organica i nutrienti inorganici (come ad esempio i nitrati, i fosfati e i solfati) sono rilasciati e possono essere riutilizzati di nuovo. Pertanto nel suolo si assiste ad un flusso di materia ed energia del quale i maggiori artefici sono i microrganismi.

La funzionalità del suolo dipende quindi dal turnover della sostanza organica, controllato, come si è detto, dalla biomassa microbica. Fattori sfavorevoli al metabolismo dei microrganismi del suolo o variazioni della qualità o quantità della sostanza organica possono dunque alterare l'equilibrio del sistema suolo-pianta, nel breve e nel lungo periodo.

La biomassa è l'intera popolazione microbica del suolo trattata come un'unica entità (Powelson, 1994). Uno dei metodi più utilizzati per la determinazione della biomassa microbica del suolo è il metodo FE (metodo della fumigazione-estrazione, Vance et al., 1987). La fumigazione con cloroformio prevista dal metodo provoca la lisi cellulare ed il rilascio del citoplasma che è successivamente estratto per la determinazione del carbonio microbico.

Quoziente metabolico per la CO₂

Il parametro ecofisiologico dell'attività specifica (quoziente metabolico, qCO_2) fu proposto da Anderson e Domsch (1985) come un adattamento alla microbiologia del suolo della teoria dello sviluppo degli ecosistemi (Odum, 1969).

La combinazione delle misure della biomassa microbica e della respirazione della biomassa stessa dà l'attività specifica, ovvero l'attività per unità di biomassa microbica.

Un basso quoziente indica un'utilizzazione economica di energia da parte dei microrganismi del suolo. Gli stress ambientali spingono i microrganismi a convogliare più energia nel proprio mantenimento piuttosto che nella crescita, tanto che una quantità maggiore di C assimilato dalla biomassa viene respirato come CO₂ e si rileva una ridotta efficienza di conversione del C in nuovo C della biomassa microbica del suolo.

In effetti si tratta di un indicatore di stato del sistema, sensibile al variare delle condizioni e potenzialmente adatto ad individuare alterazioni nel ciclo del carbonio.

Il quoziente metabolico è un valido indicatore dello stress del sistema suolo; pur tuttavia un disturbo che riduca lo stress, ad esempio, da carenze nutrizionali può determinare l'aumento dell'efficienza microbica e la conseguente diminuzione del quoziente. In accordo con Wardle e Ghani (1995) tale indice risulta molto utile quale bioindicatore di condizioni ambientali avverse per la microflora del suolo, ascrivibili indifferentemente a stress o disturbo.

Problemi con gli indicatori microbiologici

Appropriati metodi biologici del suolo combinati con proprietà fisico-chimiche potrebbero servire come indicatori dei cambiamenti della qualità del suolo. Tuttavia, Kennedy e Papendiek (1995) evidenziarono che sebbene gli strumenti per caratterizzare il suolo siano numerosi, mancano le strategie per integrare questi strumenti per determinare la qualità del suolo e che si deve ancora individuare un dato indicatore per una data situazione. Questo problema dell'identificazione è probabilmente pronunciato in modo particolare per gli indicatori microbiologici ed è uno dei motivi principali per cui i test microbiologici non sono inclusi nelle analisi routinarie del suolo.

I valori "ideali" per una buona qualità del suolo non sono noti e l'ideale varia talvolta tra differenti tipologie di suolo. Sparling (1997) manifestò l'idea che si doveva essere più specifici su quali trend dovesse avere un indicatore microbiologico. Considerando che un diverso uso del suolo influenza gli indicatori, quanto tali indicatori possono cambiare senza provocare allarme? Per rispondere a questo tipo di interrogativi si rendono necessarie ulteriori esperienze su come gli indicatori reagiscono in differenti situazioni.

Per la determinazione di qualsiasi valore attuale è necessario l'utilizzo di metodi standardizzati. E' importante che si consideri la standardizzazione di ogni aspetto del metodo, dal campionamento, attraverso lo stoccaggio ed il pre-trattamento dei campioni fino al procedimento analitico, all'interpretazione e alla presentazione dei risultati. A causa della natura molto dinamica dei microrganismi, si deve porre particolare attenzione agli indicatori microbiologici durante lo stoccaggio ed il pre-trattamento dei campioni. Sebbene siano stati pubblicati diversi manuali metodologici, i metodi utilizzati negli studi scientifici sono quasi sempre modificati in qualche modo, e in un numero sorprendentemente alto di studi i campionamenti e i pre-trattamenti vengono descritti solo in modo molto approssimato.

Le interpretazioni degli indicatori sulle funzioni del suolo possono presentare contraddizioni: mentre un agricoltore approva una elevata mineralizzazione dell'N per supportare una elevata produttività, l'ambiente può essere a rischio di contaminazione di nutrienti per dilavamento. Tali contraddizioni non sono, tuttavia, specifiche per attributi biologici. Un esempio analogo potrebbe essere uno strato di argilla dura che può inibire la crescita delle radici e di conseguenza la produzione, o può anche prevenire il dilavamento dei nutrienti (Doran e Parkin, 1994).

Un'altra ragione per le difficoltà di interpretazione è il caso di ampie fluttuazioni nel tempo dell'attività microbica del campo. L'utilizzo di metodi di laboratorio standardizzati permetterà di ovviare a questo problema. Standardizzando il tempo di campionamento in periodi influenzati il meno possibile dalle pratiche agricole, la riproducibilità dovrebbe incrementare.

Materiali e metodi

I campioni di suolo sono stati seccati all'aria e setacciati a 2 millimetri.

La stima della respirazione del suolo, che consente di quantificare l'attività microbica, è stata eseguita secondo il metodo descritto da Isermeyer (1952) il cui principio si basa sulla misura dell'anidride carbonica che si libera durante l'incubazione del suolo in un sistema chiuso.

Il carbonio della biomassa microbica (C_{micr}) è stato determinato seguendo il metodo della fumigazione-estrazione (Vance et al., 1987).

Il quoziente metabolico esprime la respirazione specifica della biomassa ed è dato dal rapporto tra la respirazione basale ($\text{CO}_2\text{-C h}^{-1}$) e la biomassa microbica (Anderson & Domsch, 1990).

La tecnica "BIOLOG" permette di studiare le comunità microbiche sulla base della loro "impronta metabolica" (CLPP - Community level physiological profiles) accoppiando l'uso dei substrati da parte dei microrganismi alla presenza di un indicatore redox colorimetrico. Il sistema è basato su piastre Ecoplates™; il valore medio di colorazione dei pozzetti (ACWD - Average Colour Well Density) è l'approccio analitico utilizzato per quantificare la diversità funzionale delle comunità microbiche.

Risultati e discussione

Effetti di mais transgenico sulla biomassa microbica del terreno

La respirazione del terreno non differenzia le diverse tesi, avendo il medesimo andamento in tutti i campioni (Fig. 1), anche confrontando i valori di CO_2 cumulativi (Fig. 2).

Il contenuto in carbonio microbico è lo stesso nelle diverse tesi in corrispondenza del primo campionamento (Giugno, Fig. 3a), mentre nel campionamento successivo (Luglio, Fig. 3b) se ne rileva una maggiore presenza in Bt 11 (17%) ed in Bt 176 (21%) rispetto al Wild type. Quest'ultimo, rispetto al campionamento precedente, da qualche segno di sofferenza: il carbonio microbico diminuisce del 12%, mentre nelle due linee transgeniche rimane pressoché invariato.

Nei campioni di Giugno si rileva che la respirazione specifica della biomassa microbica (quoziente metabolico, Fig. 4a) è appena più bassa nelle linee transgeniche rispetto al Wild type, che corrisponde a migliori condizioni ambientali per la biomassa microbica totale, quindi minor dispendio di energia e maggior capacità di convertire il C organico in nuova biomassa.

L'andamento del quoziente metabolico consente dunque di prevedere un diverso funzionamento della comunità microbica nel Bt rispetto al Wild type e mostra di essere utile nel prevederne le variazioni.

La biomassa microbica è stata inoltre determinata in campioni che sono stati tenuti in incubazione per un periodo più lungo di quello previsto dal metodo FE (10 giorni), al fine di valutarne l'andamento in condizioni che diventano via via meno ottimali soprattutto per la diminuzione del substrato. Ciò ha anche consentito di confrontare campioni di una stessa tesi trattati diversamente, dal momento che per Bt 176 manca la tesi 'testimone' essendo il Wild type in esame l'isogenico di Bt 11.

La biomassa microbica durante un'incubazione prolungata tende a diminuire e la sua composizione relativa a cambiare (in Robertson et al., 1988). Nei campioni di Giugno, il prolungamento del periodo di incubazione da 10 a circa 50 giorni ha rilevato una tendenza alla diminuzione della biomassa microbica in Wt e Bt 11 ed all'aumento invece in Bt 176 (Fig. 5a).

In quelli di Luglio, tenuti in incubazione per 90 giorni, mentre nel Wild type e, in misura maggiore, nel Bt 11, la tendenza alla diminuzione della biomassa microbica si fa più consistente, nel Bt 176 si conferma l'aumento (Fig. 5b).

Pertanto, prolungando l'incubazione per settimane, quindi provocando uno stress alle comunità microbiche del terreno, la 'resistenza' si evidenzia soltanto nella linea Bt 176.

Effetto dei residui vegetali di mais transgenico sulla biomassa microbica del terreno

Relativamente ai campioni di terreno prelevati dopo incorporazione dei residui vegetali si sono riscontrate alcune differenze tra le diverse tesi.

I valori di respirazione appaiono del tutto simili nelle diverse tesi (Fig. 6), quelli cumulativi appena inferiori nelle linee transgeniche rispetto al WT (Fig. 7).

La biomassa microbica nel Bt 11 corrisponde alla metà di quella presente nel corrispondente Wt (Fig. 8), di conseguenza il quoziente metabolico in esso è molto più elevato (Fig. 9). [Poiché per il Bt 176 non si dispone del controllo, si può fare effettivamente un confronto soltanto tra le tesi Wt e Bt 11.]

Si può ipotizzare che in Bt 11 sia disponibile meno substrato facilmente utilizzabile, derivante da una diversa composizione dei tessuti vegetali, oppure che la microflora del terreno che vive in associazione più o meno diretta con la pianta trasformata sia diversa dalla microflora associata alla pianta isogenica, e meno capace di utilizzare i residui vegetali o ancora che trovi condizioni meno favorevoli (es. effetti della tossina Bt nel terreno).

Ponendo a confronto il comportamento dei parametri biochimici del terreno a) in presenza della coltura e b) nel post-interramento dei residui vegetali, si rileva che il contenuto di biomassa microbica nel Bt rispetto alla tesi di controllo è lievemente più alto durante la coltura (Fig. 3b) mentre è molto più basso con l'interramento dei residui colturali (Fig. 8).

Il quoziente metabolico invece, come si può prevedere dall'andamento dei parametri dai quali deriva, differisce appena durante la coltura (Fig. 4a) e diventa molto più elevato in Bt 11 rispetto a Wt a seguito dell'interramento (Fig. 9).

Presumibilmente, gli essudati radicali della pianta transgenica favoriscono la biomassa microbica anche se selezionano una particolare microflora. Per i residui vegetali, quelli derivanti dalla pianta transgenica evidentemente forniscono meno nutrienti ai microrganismi del terreno o perché sono più recalcitranti alla decomposizione o perché la microflora possiede minori capacità degradative.

In effetti, la comparazione delle comunità microbiche in presenza della coltura in base ai consumi di diverse fonti di carbonio (mediante Biolog) ha rilevato una ridotta efficienza metabolica in Bt 11 rispetto a Wt (Fig. 10), che confermerebbe l'ipotesi della produzione di differenti essudati radicali da parte della pianta transgenica in grado di esercitare una pressione selettiva sulla flora microbica.

Conclusioni

L'uso degli indicatori biochimici ha permesso di evidenziare un differente funzionamento delle comunità microbiche del terreno nelle diverse tesi, sia che si riferiscano alla totalità dei microrganismi presenti nel terreno, come la biomassa microbica ed il quoziente metabolico, sia che riguardino i microrganismi coltivabili come la CLPP.

Non è tuttavia possibile estrapolare i risultati ottenuti dall'esperimento in vaso per predire il potenziale impatto della coltivazione di mais Bt sulla microflora del terreno: è ovvia la necessità di svolgere prove in campo. È inoltre necessario eseguire prove su larga scala, dovendo effettuare la valutazione del potenziale impatto caso per caso, anche nel rispetto dei "Principi per la valutazione del rischio ambientale", D.lgs. 224.

Inoltre, i parametri biochimici utilizzati in questa ricerca sono potenziali indicatori delle modificazioni dinamiche nell'attività microbica del terreno che si potrebbero verificare a lungo termine, riflettendosi sui flussi di energia e di nutrienti, e sulla fertilità del terreno stesso.

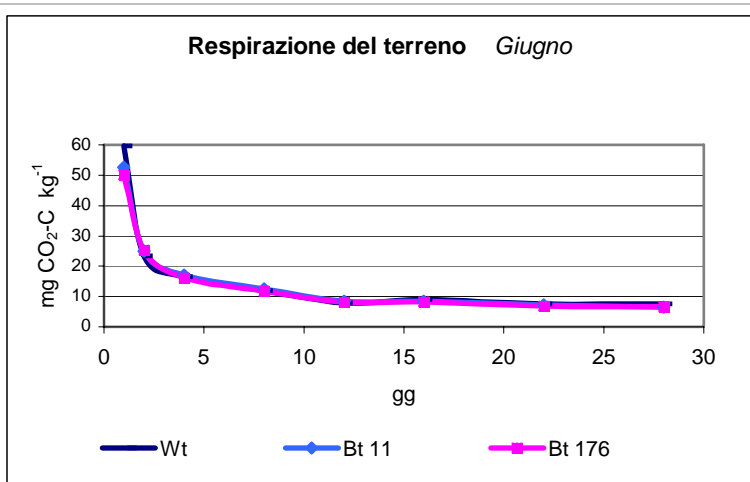


Fig. 1a

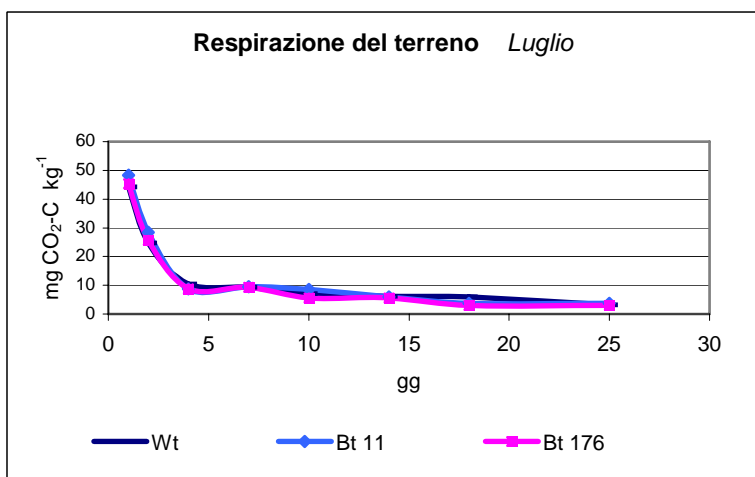


Fig. 1b

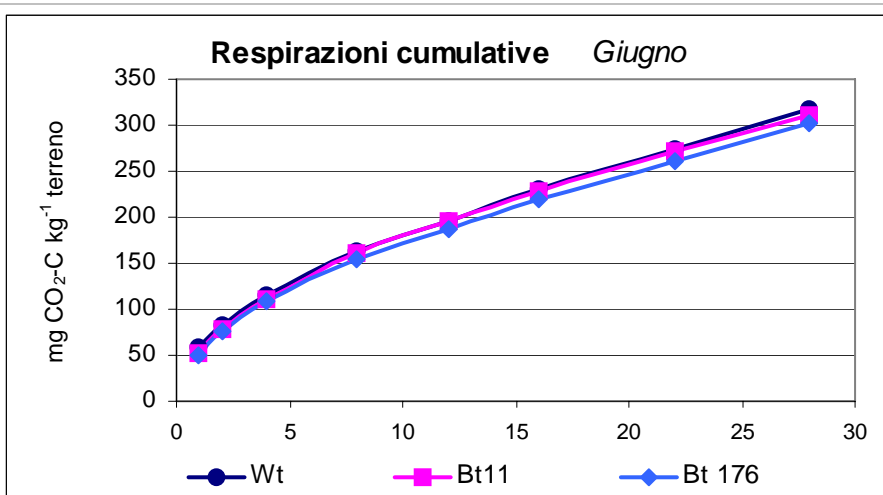


Fig. 2a

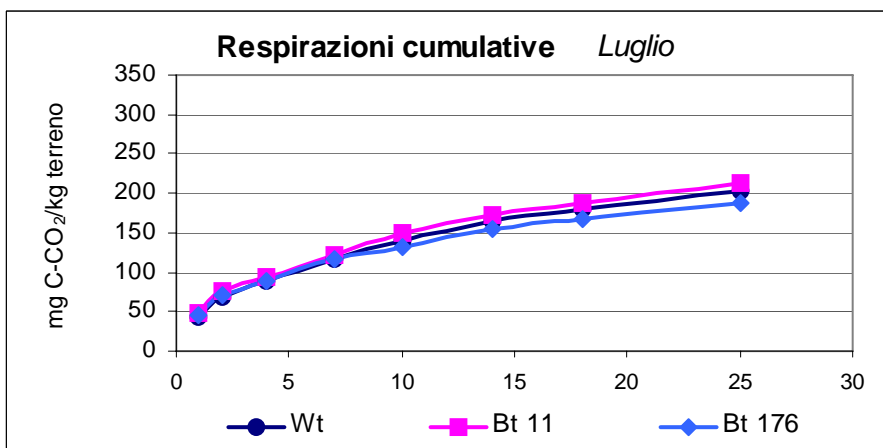


Fig. 2b

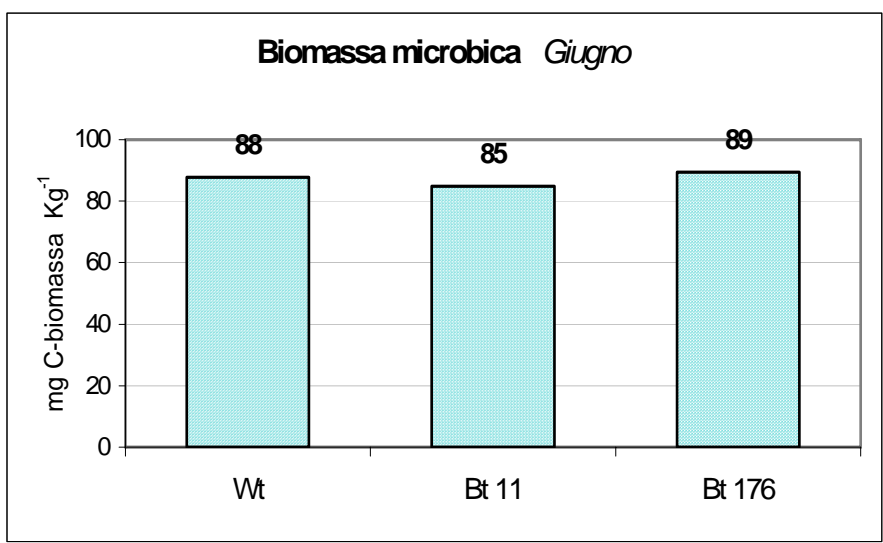


Fig. 3a

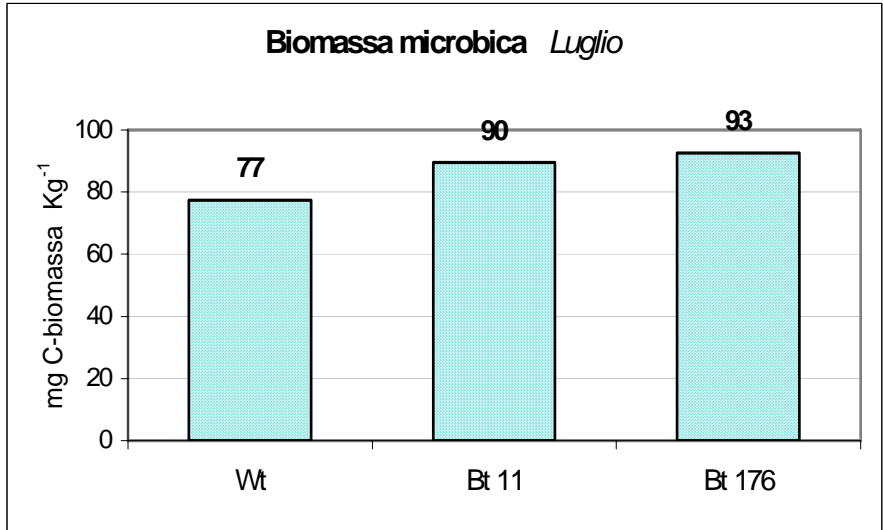


Fig. 3b

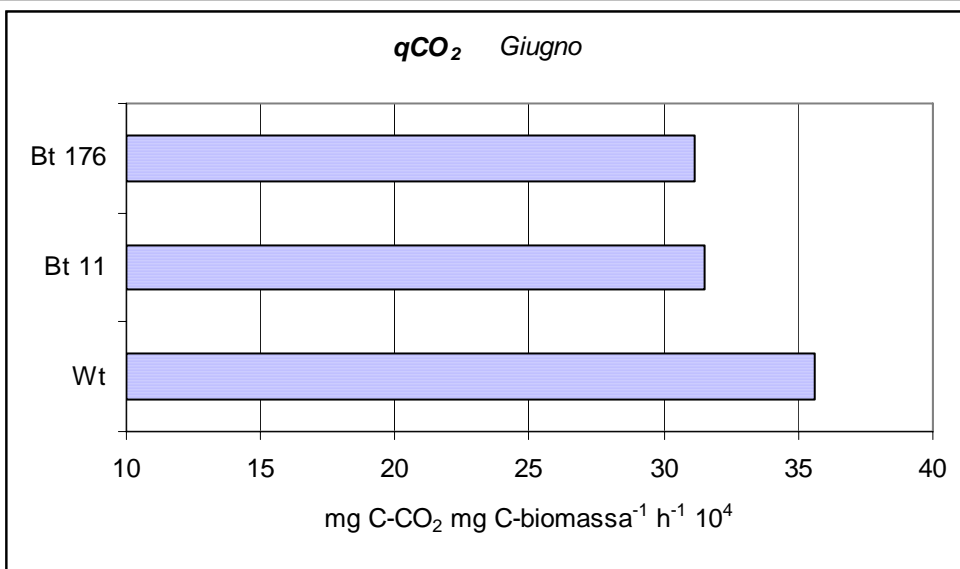


Fig. 4a

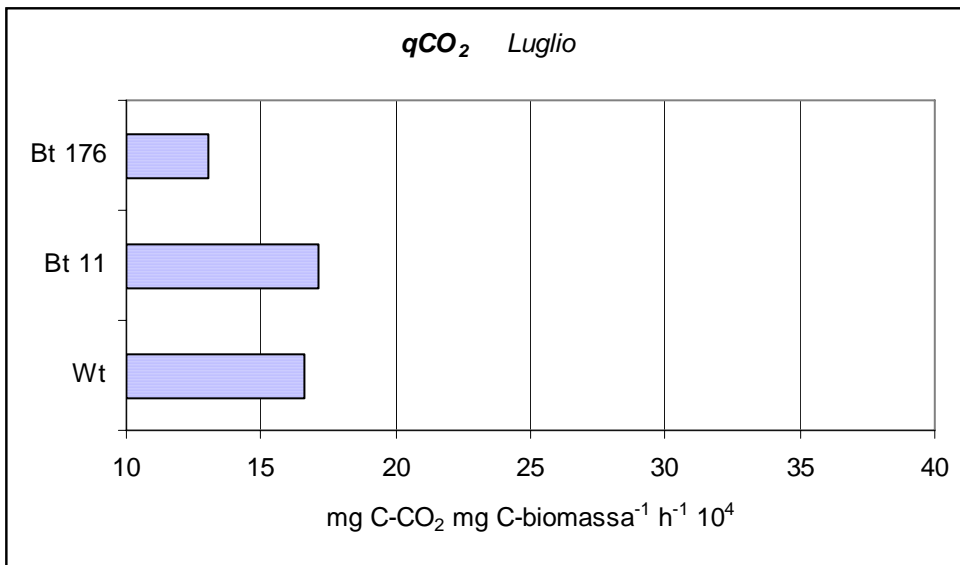


Fig. 4b

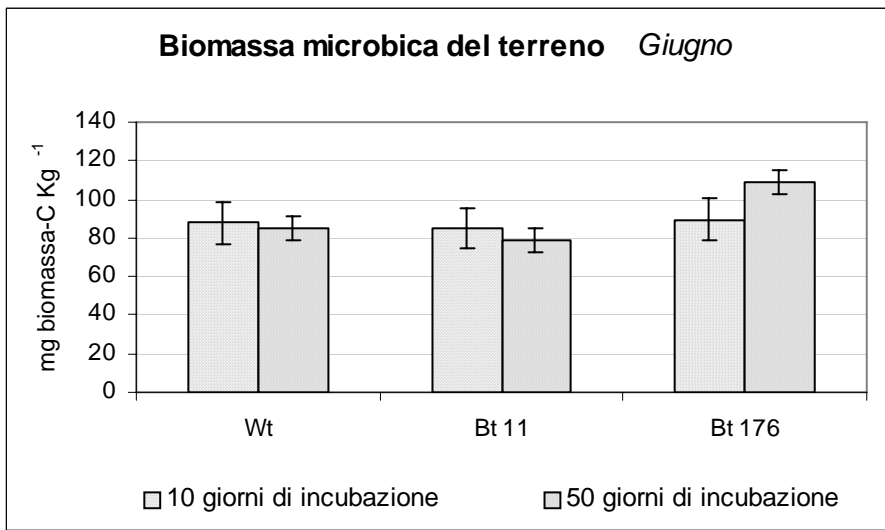


Fig. 5a

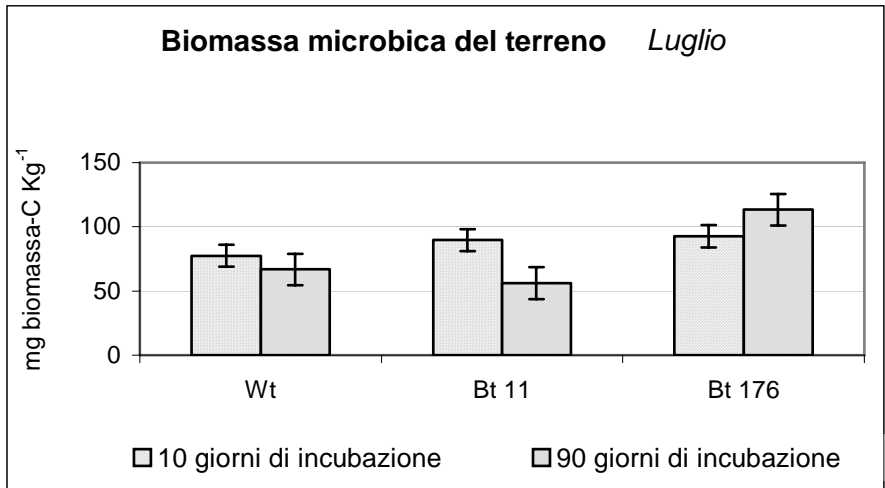


Fig. 5b

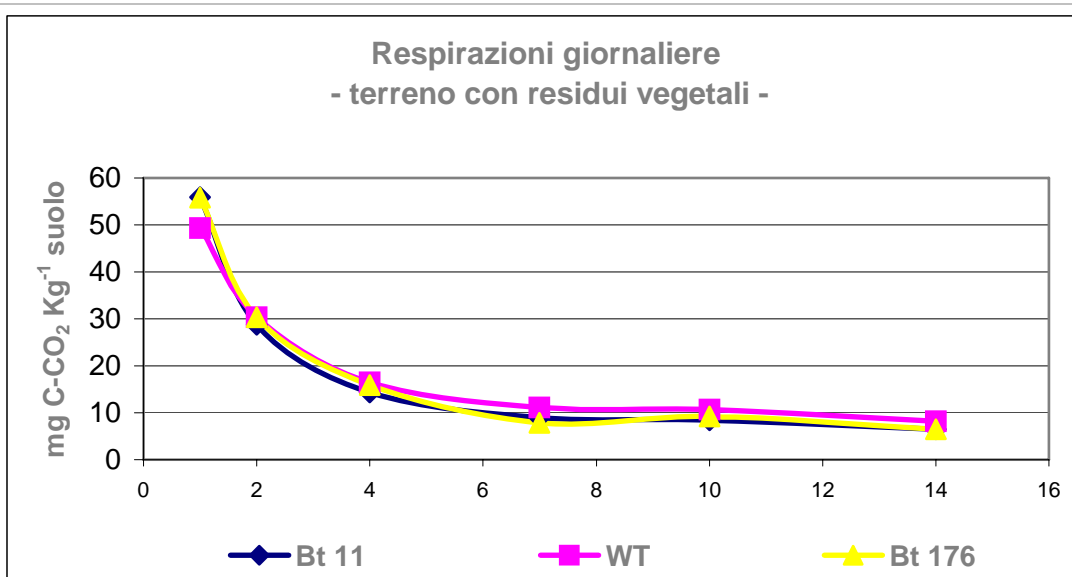


Fig. 6

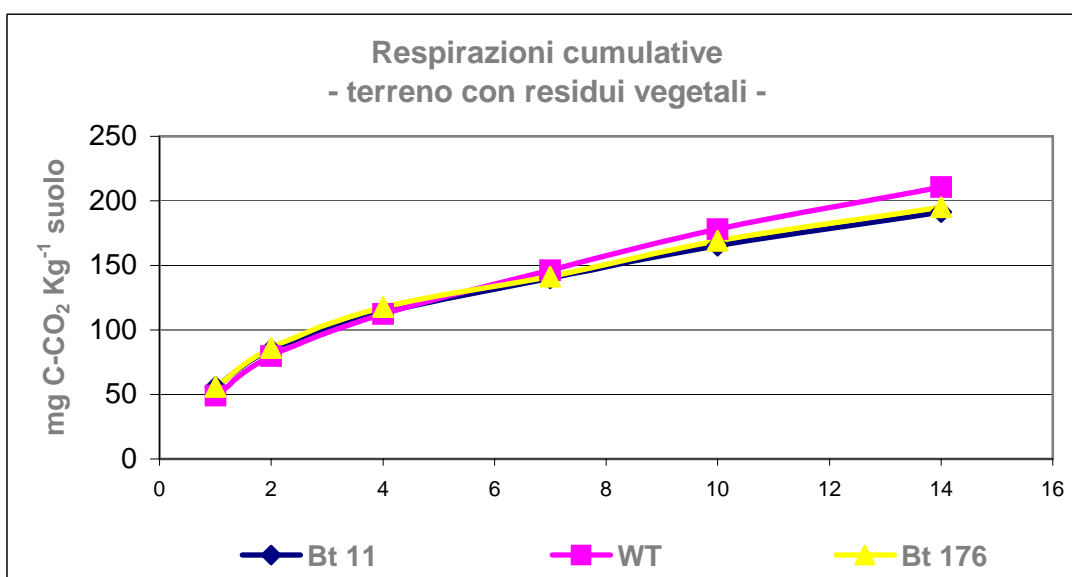


Fig. 7

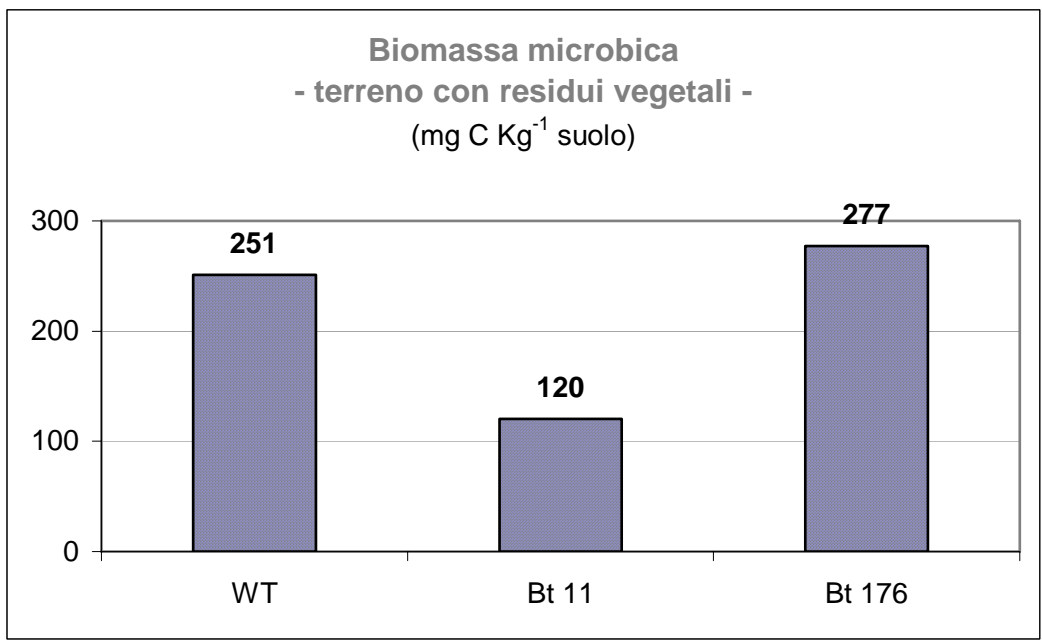


Fig. 8

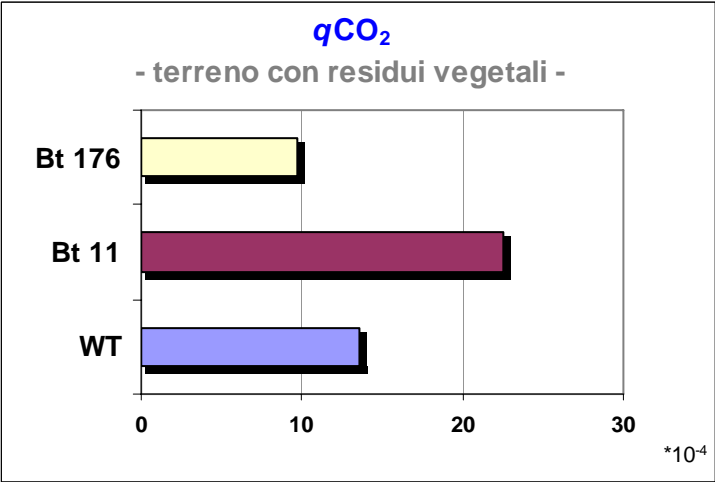


Fig. 9

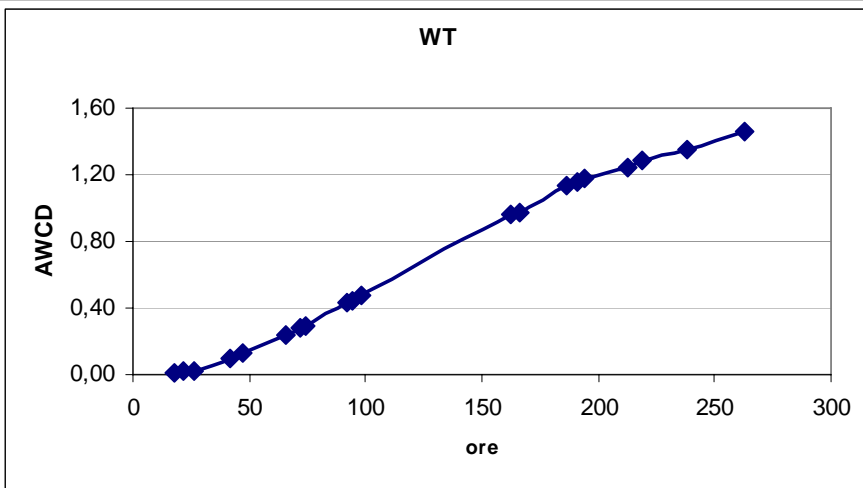


Fig. 10a

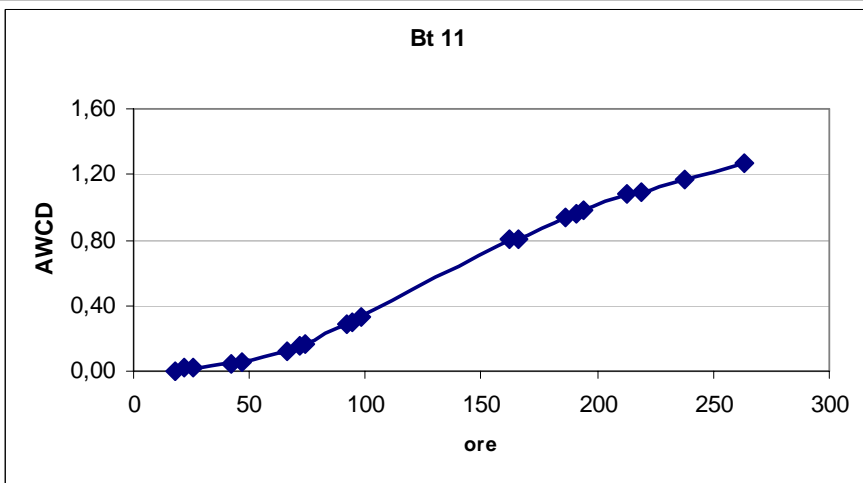


Fig. 10b

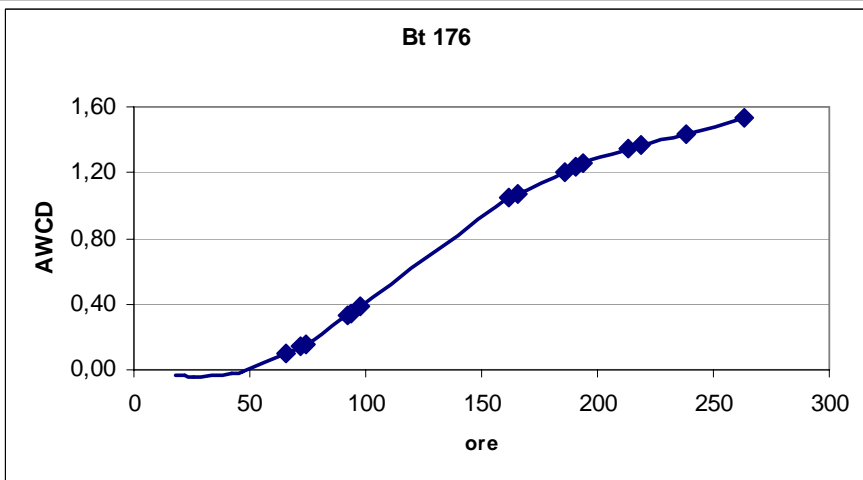


Fig. 10c

Bibliografia

- Anderson J.P.E. (1982). Soil respiration. In : Page, A.L. (ed.) methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Vol. 9, 2nd edn. ASA-SSSA. Madison, WI, pp. 831-871.
- Anderson T.H., Domsh K.H. (1985). Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. *Biol. Fertil. Soil* 1. 81-89.
- Doran J.W., Parkin T.B. (1994). Defining and assessing soil quality. In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F. & Stewart B.A. (eds) *Defining soil quality for a Sustainable Environment*, 35. American society of agronomy special publication, Madison, WI, pp. 3-21.
- Kennedy A.C., Papendick R.I. (1995). Microbial characteristics of soil quality. *J. Soil Water Conserv.* 50, 243-248.
- Odum E.P. (1969). The strategy of ecosystem development. *Science* 164, 262-270.
- Powlson D.S. (1994). The soil microbial biomass: Before, beyond and back. In: Ritz K., Dighton J. & Giller K.E. (eds.) *Beyond the biomass*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 3-20.
- Sparling G.P. (1997). Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. In: Pankhurst C.E., Doube B.M. & Gupta, V.V.S.R. (eds.) *Biological indicators of soil Health*. CAB International, Wallingford, pp. 97-119.
- Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.
- Wardle D.A. and Ghani A. (1995) A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.* 27, N.12, 1601-1610.

UTILIZZAZIONE DI FUNGHI MICORRIZICI IN UN SISTEMA MODELLO PER LA VALUTAZIONE DELL'IMPATTO AMBIENTALE DI PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE.

Giovanetti M.¹, Sbrana C.², Turrini A.¹, Pietrangeli B.³, Nuti M.P.¹

¹*Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie, Università di Pisa, Via del Borghetto 80*

²*Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR*

³*Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro, Via Urbana 167, 00184, Roma.*

Introduzione

L'uso in agricoltura di piante geneticamente modificate implica la necessità di disporre di dati riguardanti il loro impatto sulle popolazioni di microorganismi nel terreno, fondamentali per la fertilità dei suoli e la nutrizione delle piante. Un importante gruppo di microorganismi-chiave è rappresentato dai funghi micorrizici arbuscolari (MA), che stabiliscono simbiosi mutualistiche con la maggior parte delle piante terrestri (Smith and Read, 1997). I funghi MA sono sensibili alle variazioni dei sistemi colturali ed alle applicazioni di fertilizzanti e pesticidi, rappresentando così i principali microorganismi non-target da monitorare negli studi di impatto ambientale di organismi geneticamente modificati (GM) da introdurre in agricoltura (Giovanetti and Avio, 2002).

Le piante geneticamente modificate per la produzione di tossine antifungine o insetticide potrebbero significativamente influenzare la formazione della simbiosi micorrizica, e di conseguenza interferire sulla capacità del micelio extraradicale di funzionare da rete di trasferimento dei nutrienti dal terreno alle piante agrarie e sulla quantità di propaguli micorrizici rilasciati nel terreno.

Geni che controllano la sintesi di defensine, proteine dotate di attività antifungina, provenienti dalle specie *Dahlia merkii* Lehm., *Raphanus sativus* L., *Mirabilis jalapa* L., *Amaranthus caudatus* L., sono stati introdotti in piante agrarie ed ornamentali per renderle capaci di produrre costitutivamente le relative defensine ed acquisire resistenza nei confronti di funghi fitopatogeni (De Bolle *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2000). Le defensine sono piccoli peptidi, ricchi in cisteina e caratterizzati da una complessa struttura tridimensionale e da Mw di circa 5000 Da (Broekaert *et al.*, 1995). Questi peptidi di difesa sono stati isolati per la prima volta da semi di grano e di orzo (Mendez *et al.*, 1990) e successivamente da semi e tessuti vegetativi di differenti dicotiledoni e monocotiledoni (Terras *et al.*, 1992; 1993, Moreno *et al.*, 1994, Osborn *et al.*, 1995, Gao *et al.*, 2000). L'azione delle defensine nei confronti di funghi patogeni si esplica causando o una sovrapproduzione di ramificazioni delle ife (defensine di tipo morfogenico) o una riduzione della crescita delle estremità ifali (defensine di tipo

non morfogenico). Dati recenti indicano che le defensine interagiscono con differenti classi di lipidi di membrana: è stato ad esempio dimostrato che Dm-AMP1 interagisce con gli sfingolipidi mannosilati, presenti sul lato esterno della membrana (Thevissen *et al.*, 2000, Thevissen *et al.*, 2003a), mentre la defensina Rs-AFP2 interagisce con i glucosilceramidi (Thevissen *et al.*, 2003b).

Le defensine sono solitamente sintetizzate nei semi durante le ultime fasi della maturazione e sembrano esercitare una funzione di protezione della plantula. Sono espresse anche nei tessuti vegetativi, in questo caso la loro sintesi viene stimolata dall'attacco del patogeno.

Le defensine di origine vegetale potrebbero dunque essere usate per aumentare la resistenza delle piante nei confronti di funghi patogeni ed è stato infatti dimostrato che piante transgeniche che esprimono costitutivamente queste proteine sono in grado di aumentare la loro resistenza alle malattie fungine (De Bolle *et al.*, 1996).

Piante di mais e cotone denominate *Bt*, sono state ottenute per trasformazione genetica mediante l'introduzione nel loro genoma dei geni che controllano la sintesi delle proteine Cry (crystal protein) derivate da *Bacillus thuringensis*, tossiche nei confronti delle larve di lepidotteri.

L'incorporazione nelle piante del gene Cry potrebbe eliminare molti problemi associati con l'uso di pesticidi chimici, visto che le tossine sono prodotte costitutivamente nelle piante transgeniche. Comunque, è stato osservato che la tossina si accumula nel terreno legandosi alle argille ed agli acidi umici, che la rendono meno suscettibile alla degradazione microbica, ed è capace di mantenere la sua attività larvicida sino al 234° giorno, il tempo massimo di rilevamento sperimentale. E' stato inoltre osservato che le piante di mais *Bt* (NK4640*Bt*) rilasciano la tossina negli essudati radicali e che l'attività larvicida degli essudati è mantenuta per almeno 25 giorni (Saxena e Stozky, 1999; 2000).

Sia le tossine *Bt*, sia le defensine, se rilasciate negli essudati radicali, possono quindi accumularsi nel suolo a concentrazioni elevate, con il rischio di essere dannose nei confronti anche di organismi non target.

Scopo del lavoro

La presente ricerca si è proposta di analizzare il possibile rilascio della defensina Dm-AMP1 negli essudati radicali delle piante di melanzana e i possibili effetti provocati da mais *Bt* e melanzana trasformata per l'espressione di Dm-AMP1 sulle varie fasi di sviluppo ed infezione del fungo micorrizico arbuscolare *Glomus mosseae*: a) crescita pre-simbiontica, b) riconoscimento dell'ospite, c) formazione delle strutture infettive, d) colonizzazione radicale.

Materiale vegetale

Nel mais Bt 176 (NK4640Bt) la tossina di *B. thuringensis* espressa è la CryIAb, sotto il controllo del promotore della fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPC). La proteina Bt (CryIAb) si esprime nei tessuti verdi della pianta, nel polline e nelle cariossidi.

Nel mais Bt 11 (NK4640Bt) la tossina espressa è la CryIAb, sotto il controllo del promotore CaMV35S. La pianta esprime la tossina CryIAb in tutti i tessuti.

Piante di melanzana trasformata con il gene Dm-AMP1 sono risultate capaci di esprimere costitutivamente le defensine isolate da *Dahlia merkii*. Queste piante sono state caratterizzate molecolarmente ed è stato osservato che la proteina antifungina è espressa ad elevati livelli in tutti i tessuti e che si localizza preferenzialmente nelle pareti cellulari delle foglie e delle radici (Turrini *et al.*, 2004).

Rilascio della proteina Dm-AMP1 negli essudati radicali delle linee di melanzana trasformate

Per analizzare il rilascio della proteina Dm-AMP1 negli essudati delle piante di melanzana trasformate è stato approntato un sistema sperimentale basato su colture idroponiche.

Piante di melanzana trasformate con Dm-AMP1 e piante di melanzana controllo sono state poste in beute sterili da 100 ml, contenenti 30 ml di mezzo basale MS/2, privo di zucchero, e palline di vetro sterili per sostenere la pianta. Il mezzo di coltura è stato ossigenato in modo sterile, per tutta la durata dell'esperimento (Fig. 1). Campioni di liquido (10 ml) prelevati al 14° giorno dall'inizio dell'esperimento sono stati dializzati, liofilizzati, risospesi in 40 µl di acqua sterile.

Per verificare se Dm-AMP1 fosse rilasciata dalle radici delle piante di melanzana trasformate, gli essudati radicali sono stati analizzati mediante western-blot, utilizzando un anticorpo policlonale anti-Dm-AMP1. Una banda corrispondente alla proteina Dm-AMP1 era presente negli essudati di tutti i cloni trasformati (Fig. 2), mentre era sempre assente negli essudati rilasciati dalle radici delle piante controllo non trasformate.

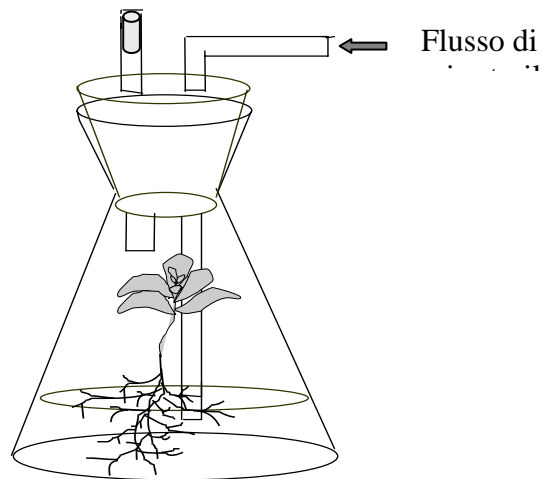


Fig. 1. Sistema di coltura idroponica per l'analisi degli essudati radicali.

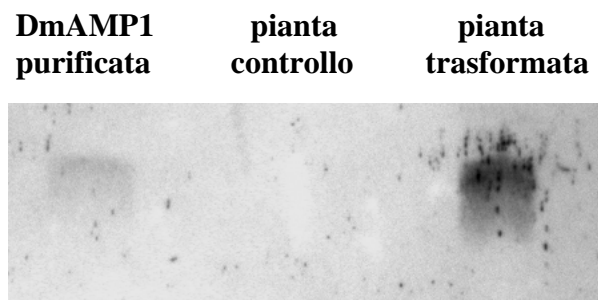


Fig. 2. Western blot degli essudati radicali di piante di melanzana trasformate con il gene Dm-AMP1 e di controlli non trasformati, comparati con la proteina Dm-AMP1 purificata.

Modello sperimentale per la valutazione di impatto su funghi micorrizici.

Per analizzare l'impatto delle piante transgeniche sui funghi non-target è stato messo a punto un modello sperimentale, che si basa sul "sistema sandwich" utilizzato per studiare i primi stadi del ciclo vitale dei funghi micorrizici arbuscolari (Giovannetti *et al.*, 1993; Turrini *et al.*, 2004). Gli esperimenti sono stati condotti sul fungo micorrizico arbuscolare *Glomus mosseae* (IMA1) proveniente da colture conservate presso il Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie dell'Università di Pisa. Gli sporocarpi sono stati isolati dal terreno della "pot culture" (coltura in vaso del fungo micorrizico con una pianta ospite) mediante sospensione in acqua, decantazione e successiva filtrazione attraverso un set di setacci con luce compresa tra 100 e 500 μm . Due membrane di esteri di cellulosa (Millipore), ciascuna contenente 10 sporocarpi, sono state sovrapposte. Gli sporocarpi, coperti con una membrana vuota e poi con ghiaia, sono stati incubati a 25°C al buio. Dopo 10 giorni le membrane sono state rimosse dalla ghiaia, aperte e controllate per la germinazione degli sporocarpi. Il sistema radicale delle piante è stato inserito tra le due membrane interne in contatto con gli sporocarpi germinati, e la seconda membrana, contenente altri 10 sporocarpi germinati è stata lasciata intatta in modo da completare il doppio sandwich (Fig. 3). In questo modo, gli sporocarpi germinati cresciuti sulla membrana esterna erano esposti agli essudati radicali, mentre quelli in contatto con le radici potevano differenziare le strutture infettive (gli appressori) e stabilire la simbiosi micorrizica. Il sistema così approntato è stato posto in un vaso con ghiaia di quarzo sterile e mantenuto in condizioni controllate (18-24°C, 16-8 h di fotoperiodo, 60% di umidità). Un mese dopo l'inoculo le piante sono state rimosse dal vaso, le membrane sono state aperte e quelle esterne, contenenti il solo micelio presimbiontico, sono state colorate con una soluzione di Trypan blue (0,05% in acido lattico) per analizzare la crescita ifale e la differenziazione. Le radici invece sono state chiarificate con KOH al 10% a 95°C per 10 min., lavate in acqua e incubate in HCl al 2% per 5 min a temperatura ambiente e poi colorate con Trypan blue a 95°C per 5 min. La misura della lunghezza di radice infetta è stata ottenuta mediante l'uso del metodo "grid line intersect" (Giovannetti e Mosse, 1980). Le radici sono state poi montate su vetrini portaoggetti e osservate al microscopio ottico per analizzare la colonizzazione radicale.

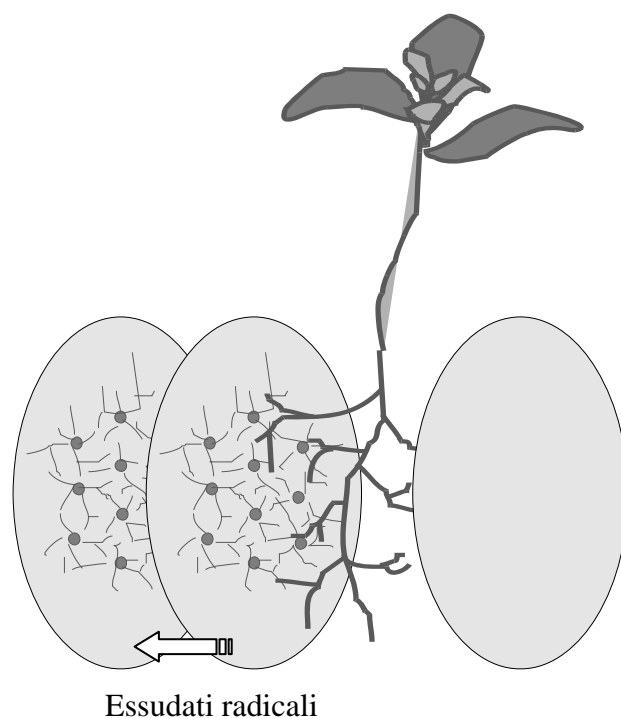


Fig. 3. Sistema sperimentale per la valutazione dell'impatto di piante geneticamente modificate sui funghi micorrizici arbuscolari.

Impatto di melanzana Dm-AMP1 su *Glomus mosseae*

Allo scopo di verificare se la proteina Dm-AMP1 avesse qualche effetto su il fungo micorrizico arbuscolare *G. mosseae* sono stati analizzati due stadi del suo ciclo vitale, cioè a) lo stadio in cui avvengono gli eventi che portano al riconoscimento tra il fungo e la pianta ospite e b) lo stadio in cui il fungo entra in simbiosi con la pianta ospite. La crescita asimbiotica non mostrava differenze significative in presenza di essudati rilasciati dalle piante trasformate o da quelle di controllo, variando tra 908.6 e 1419.2 mm. L'aumento della ramificazione delle ife di *G. mosseae* e le risposte di riconoscimento del fungo, elicitato dalla presenza dei segnali derivati dalla pianta ospite, non mostravano segni di cambiamento in presenza di essudati contenenti defensine. Infatti, le radici sia delle piante controllo, sia di quelle trasformate, cresciute al di sotto delle membrane, elicitarono la morfogenesi differenziale del micelio di *G. mosseae*, con una percentuale di sporocarpi che mostravano differenziazione variabile tra il 67% e il 100%. Questo dimostrava che la proteina

antifungina Dm-AMP1 rilasciata negli essudati radicali non interferiva con il sistema di riconoscimento tra pianta ospite e fungo simbiote.

Lo stabilirsi della simbiosi micorrizica nelle piante trasformate non differiva dai controlli. Infatti, né la percentuale di lunghezza radicale colonizzata dal fungo, che variava tra il 30 e il 60% nelle diverse piante e linee, né il numero di unità di infezione micorrizica (6,4 – 7,4 per cm di radice micorrizata) mostrava differenze statisticamente significative. Le strutture caratteristiche delle micorrize arbuscolari e cioè gli appressori, gli arbuscoli e le vescicole venivano ritrovate negli apparati radicali sia delle piante trasformate, sia delle piante controllo. Le piante trasformate inoculate con *G. mosseae* mostravano una crescita maggiore rispetto alle piante non inoculate, dando conferma dell'efficienza della simbiosi micorrizica.

Impatto di mais Bt 11 e 176 su *Glomus mosseae*

La lunghezza del micelio originato da spore germinate in presenza delle radici di mais Bt 176 differiva significativamente da quella osservata in presenza di mais wild type (wt), riducendosi del 28%, mentre non vi erano differenze significative tra Bt 11 e wt. La morfogenesi differenziale delle ife fungine veniva elicitata allo stesso livello dalle radici delle tre linee di mais Bt 176, Bt 11 e wt. L'analisi quantitativa delle strutture infettive (formazione di appressori e di punti di infezione), ha mostrato un numero significativamente più alto di appressori che non davano luogo ad infezione nelle radici di mais Bt176 (36% del totale di strutture infettive) rispetto al controllo (11%) e al mais Bt11 (9%). L'analisi microscopica delle radici mostrava la presenza, in Bt 176, di tentativi di colonizzazione abortivi, caratterizzati da retrazione del citoplasma e formazione di setti nelle ife di penetrazione che si sviluppano dagli appressori.

Conclusioni

I risultati ottenuti suggeriscono che i funghi micorrizici arbuscolari possono rappresentare dei validi indicatori ai fini della valutazione di impatto ambientale delle piante geneticamente modificate. Infatti questi organismi mostrano risposte diversificate in presenza di piante geneticamente modificate che esprimono transgeni di diversa provenienza e con diverse funzioni. Nel caso delle piante di melanzana trasformate con la proteina antimicrobica Dm-AMP1, rilasciata negli essudati radicali, il fungo micorrizico *Glomus mosseae* non era influenzato in alcuna fase del suo ciclo vitale, a differenza di quanto osservato per il mais Bt 176, in cui era parzialmente inibita la formazione della simbiosi micorrizica.

Bibliografia

- Broekaert W, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defence system. *Plant Physiology* **108**: 1353-1358.
- De Bolle MFC, Osborn RW, Goderi IJ, Noe L, Acland D, Hart CA, Torrekens S, Van Leuven F, Broekaert W. 1996. Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* **31**: 993-1008.
- Gao AG, Haikimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J, Rommens, CMT. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* **18**: 1307-1310.
- Giovannetti M, Avio L., "Biotechnology of Arbuscular Mycorrhizas" 2002. In Applied Mycology and Biotechnology, Vol. 2 Agriculture and Food Production, Khachatourians G. G. & Arora D. K. (Eds), 275-310.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489-500.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi, C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist* **125**: 587-594.
- Mendez E, Moreno A, Collila F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, De Haro C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hortothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry* **194**: 533-539.
- Moreno M, Segura A, García-Olmedo F. 1994. Pseudothionin, a potato peptide active against potato pathogens. *European Journal of Biochemistry* **223**: 135-139.
- Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, Attenborough S, Rees S, Broekaert WF 1995. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters* **368**: 257-262.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. London, UK: Academic Press.
- Terras FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. 1992. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 15301-15309.

- Terras FRG, Torrekens S, Van Leuven F, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. 1993. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters* **316**: 233-240.
- Thevissen K, Cammue BP, Lemaire K, Winderickx J, Dickson RC, Lester RL, Ferket KK, Van Even F, Parret AH, Broekaert WF. 2000. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**: 9531-9536.
- Thevissen K, Francois IEJA, Takemoto JY, Ferket KKA, Meert EMK, Cammue BPA. 2003a. DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **226**: 169-173.
- Thevissen K, Warnecke DC, Francois IEJA, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zahringer U, Thomma BPHJ, Ferket KKA, Cammue BPA. 2004. Defensins from insect and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 3900-3905.
- Turrini, A., C. Sbrana, L. Pitto, M. Ruffini Castiglione, L. Giorgetti, R. Briganti, T. Bracci, M. Evangelista, M. P. Nuti and M. Giovannetti 2004. The Antifungal Dm-AMP1 Protein from *Dahlia merckii* Lehm. Expressed in *Solanum melongena* L. is Released in Toot Exudates and differentially Affects Pathogenic Fungi and Mycorrhizal Symbiosis. *New Phytologist* **163**: 393-403.
- Turrini, A., C. Sbrana, M. P. Nuti, B. Pietrangeli and M. Giovannetti 2004. Development of a Model System to Assess the Impact of Genetically Modified Corn and Aubergine Plants on Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant and Soil* **266**: 69-75.

EFFETTI DELLA COLTIVAZIONE DI PIANTE TRANSGENICHE SULLA MICROFLORA EUBATTERICA DEL SUOLO VALUTATI CON METODI MOLECOLARI

Castaldini M., Fagiani A., Lami D., Landi S., Santomassimo F., Miclaus N.

Ente CRA - Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo - P.zza M. D'Azeglio 30, 50121- Firenze

Introduzione

La comunità microbica del suolo è uno tra i più complessi, importanti e differenti insiemi di organismi della biosfera. La diversità dei microrganismi è critica per il mantenimento delle buone condizioni del suolo, e gli stress ambientali possono alterare la popolazione microbica e pertanto mettere in pericolo l'ecosistema suolo, come è stato messo in evidenza, tra gli altri, da studi sugli effetti prodotti da pesticidi ed erbicidi che provocano una diminuzione della biodiversità microbica. Fra i microrganismi del suolo i batteri rappresentano il gruppo numericamente più rilevante e sicuramente il più importante in termini di attività metabolica in quanto sono essenziali per la mobilizzazione delle sostanze minerali, la mineralizzazione della sostanza organica, la immobilizzazione dei nutrienti, la rimozione delle sostanze tossiche e la partecipazione ai principali cicli biogeochimici, sia in condizioni di aerobiosi che di anaerobiosi. Essi sono inoltre particolarmente soggetti al cosiddetto "effetto rizosfera", per cui in quelle aree interessate dalle strutture radicali delle piante, le secrezioni da esse prodotte inducono modificazioni a carico della diversità batterica, determinandone nuovi equilibri. L'introduzione di piante geneticamente modificate, attraverso il rilascio in maniera costitutiva di essudati con caratteristiche diverse e attraverso il trasferimento orizzontale dei geni inseriti, può determinare una marcata modificazione della microflora rizosferica in primo luogo e, più in generale dell'intero ecosistema suolo, che non è il risultato di una coevoluzione naturale pianta - microrganismi nel suolo. A tutt'oggi, ad esempio, scarse sono le indicazioni provenienti da studi effettuati in pieno campo e in ambiente confinato relative agli effetti collaterali delle tossine contenute negli essudati radicali di Mais Bt sulla comunità batterica tellurica, che potrebbero essere innescati in aggiunta alla possibile selezione di altri insetti resistenti con eventuali ripercussioni dirette e indirette sugli organismi di altri livelli trofici. Pertanto per una valutazione appropriata delle interazioni suolo - pianta geneticamente modificata - microrganismi non si può prescindere da una piena conoscenza della risposta della comunità microbica all'introduzione di piante OGM.

Le tecniche di biologia molecolare apportano un contributo determinante nello studio della diversità microbica del suolo, in quanto consentono di monitorare la presenza di quei microrganismi non coltivabili che rappresentano la maggior parte della flora batterica del suolo

Si ritiene che nel suolo la percentuale dei batteri coltivabili sia compresa tra l'1 e il 10%, di conseguenza, ogni approccio che eviti la coltivazione dei microrganismi di una popolazione batterica al fine di determinare la loro identità e diversità contiene la potenzialità per divenire uno strumento efficace per la ricerca nel campo dell'ecologia microbica.

Il punto di partenza è rappresentato dall'estrazione degli acidi nucleici, DNA e RNA utilizzati per descrivere le comunità passando da una descrizione generale (gruppi e sottogruppi) a livelli di più fine risoluzione come descrizione di una singola specie ed attività (rRNA, mRNA). La scarsa presenza delle sequenze geniche di interesse, è stato superato con la tecnica dell'amplificazione a catena della polimerasi (PCR), che consente indagini di ecologia molecolare ed in particolare di caratterizzare il valore della diversità microbica dato l'enorme ruolo ed impatto che la microflora svolge a livello della intera biosfera. Gli amplificati vengono poi discriminati in base alla loro sequenza secondo una analisi sempre più stringente. Esempi progressivi di tali analisi sono:

1. l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) che discrimina in base alla dimensione dei frammenti ottenuti digerendo il DNA amplificato con enzimi di restrizione che riconoscono una particolare sequenza target fatta di 4 paia di basi;
2. il DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), che discrimina in base al modo con cui sono disposti tutti i nucleotidi all'interno di ogni amplificato,
3. il clonaggio e sequenziamento di segmenti del DNA ribosomale o di geni funzionali specifici.

L'analisi ARDRA e DGGE forniscono profili elettroforetici rappresentativi della struttura della comunità microbica; il sequenziamento permette di attribuire l'appartenenza di un ceppo ad una determinata specie microbica.

In particolare, a partire dalla seconda metà del decennio scorso si è venuta affermando la tecnica DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis nella quale frammenti di DNA con la stessa lunghezza ma con una differente sequenza possono essere separati in un gel di poliacrilamide ad alta capacità risolutiva.

La separazione avviene sfruttando la capacità di un gel di poliacrilamide contenente un gradiente lineare di agenti denaturanti il DNA di rallentare la mobilità di molecole di DNA parzialmente denaturate. Gli agenti denaturanti possono essere di tipo chimico (Urea 7M e 40% di formamide) o di tipo fisico (temperatura). Oggetto di questo tipo di analisi può essere pertanto il DNA a doppia elica estratto direttamente o il cDNA proveniente da retrotrascrizione dell'RNA messaggero o ribosomale mediante RT-PCR.

Rispetto alle altre tecniche molecolari basate sul fingerprinting degli acidi nucleici, la tecnica DGGE offre il vantaggio di fornire una analisi qualitativa (richness) e semiquantitativa (evenness)

della comunità microbica in relazione ai possibili fattori di modificazione della stessa in maniera più rapida e puntuale

In pratica durante la corsa elettroforetica del DNA su gel le diverse molecole si separano, arrestando la loro corsa, non appena raggiungono le condizioni di gradiente tali da consentire il passaggio da molecole a doppia elica a molecole parzialmente a singola elica, in quanto queste condizioni sono idealmente diverse da molecola a molecola in relazione alla loro specifica sequenza.

Il bersaglio molecolare più utilizzato è il 16S rDNA che rappresenta per tutti gli organismi viventi un orologio molecolare dell'evoluzione delle singole specie, essendo formato da zone altamente conservate e zone ipervariabili capaci di accumulare un numero di mutazioni sufficienti ad indicare le relazioni filogenetiche tra i singoli individui. Le zone conservate vengono utilizzate per progettare primer per l'amplificazione a diverso grado di specificità, mentre le regioni ipervariabili consentono la separazione delle diverse molecole in base alla loro sequenza.

I pattern ottenuti forniscono una impronta molecolare della struttura della comunità microbica, in cui ciascuna banda rappresenta una singola specie o un gruppo di batteri con sequenze del 16S rDNA con simile sequenza. Ciascuna banda può essere escissa dal gel e usata per generare cloni che possono essere sequenziati per identificarne la specie batterica predominante. Al di là delle limitazioni intrinseche nella metodica di amplificazione del DNA, la capacità di ottenere una fotografia puntuale della struttura della comunità rizosferica coltivabile e non a diversi livelli della radice contiene grandi potenzialità per gli studi ecologici della rizosfera. Alla descrizione della specie presenti nella comunità batterica del suolo si è affiancata di recente l'analisi della funzionalità di dette specie, sempre utilizzando le metodiche sopra menzionate rivolte allo studio del rRNA retrotrascritto: la comparazione dei profili DGGE di DNA e RNA consentono di mettere in evidenza quali siano le specie batteriche presenti rispetto a quelle funzionalmente attive. Infine, l'utilizzo di primer specifici per geni funzionali, che codificano per una ben precisa funzione fisiologica e che rivestono un riconosciuto valore filogenetico, almeno all'interno di un definito gruppo di batteri, consente di studiare determinate comunità batteriche sia dal punto di vista tassonomico che funzionale. Le metodiche precedentemente indicate possono rivelarsi utili anche per la descrizione delle particolari associazioni tra batteri e micorrize che avviene nella così definibile micorrizosfera, un settore di ricerca ancora tutto da esplorare.

Finalità

La sperimentazione effettuata ha avuto la finalità di:

- Valutare gli effetti della coltivazione di piante di frumento geneticamente modificate resistenti all'erbicida glufosinato, e del possibile effetto sinergico di entrambi sulla comunità batterica del suolo, utilizzando tecniche di biologia molecolare. Lo studio è stato incentrato sulla microflora eubatterica della rizosfera e del 'bulk soil' di piante di frumento isogenico e di piante di frumento geneticamente modificato inserendo il gene *bar* codificante per la resistenza all'erbicida glufosinato ammonio (BASTA) che inibisce la glutamino sintetasi.

- Analizzare la composizione e la funzionalità della comunità batterica del suolo di piante di Mais Bt 11 e 176 (*Zea mais*) modificato geneticamente per la resistenza all'insetto piralide (*Ostrinia nubilalis*) mediante inserimento del gene *CryIA(b)* di *Bacillus thuringensis* e tolleranza al glufosinato mediante il gene *pat* di *Streptomyces hygroscopicus* e *bar* di *Streptomyces viridochromogenes* rispettivamente. Inoltre Mais Wt (*Zea mais* NK4046) isogenico come controllo.

Materiali e metodi

Campionamento

I campioni sono stati prelevati da parcelle coltivate con piante di frumento (cv. 67 R, *Triticum durum* cv. Ofanto) geneticamente modificate inserendo il gene *bar* di *Streptomyces hygroscopicus* codificante per la resistenza all'erbicida fosfinotricina (BASTA) che inibisce la glutamino sintetasi (2R, 7R, 10R, 11R, 12R) e con piante isogeniche di *Triticum durum* (cv. 40 S) sensibili all'erbicida (5S, 8S, 9S, 20S). Il costrutto della PGM è stato realizzato c/o la S.O.P. dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura di Foggia.

La zona circostante alle parcelle di grano è stata coltivata con colza, e tra la colza e la recinzione è stata lasciata un'area di terreno non coltivato, che è stato usato come controllo trattato con il BASTA (C+B) e non (C).

La microflora eubatterica è stata studiata sia a livello della rizosfera che di "bulk soil", in differenti stadi vegetativi della pianta:

- alla levata delle piante;
- sei giorni dopo il trattamento con BASTA delle parcelle di grano resistente (R), di una parcella di grano sensibile (8S), e dei controlli (C) e (C+B);
- 50 giorni dopo il trattamento con BASTA;
- circa 150 giorni dopo il trattamento con BASTA e a circa 60 giorni dall'interramento dei residui.

I campioni di "bulk soil" sono stati ricavati mediante leggero scuotimento del pane di terra sollevato con le radici, mentre i campioni per la rizosfera sono stati ottenuti dalle radici stesse e dalla terra ad esse adesa.

Campionamento nelle parcelle coltivate con il mais

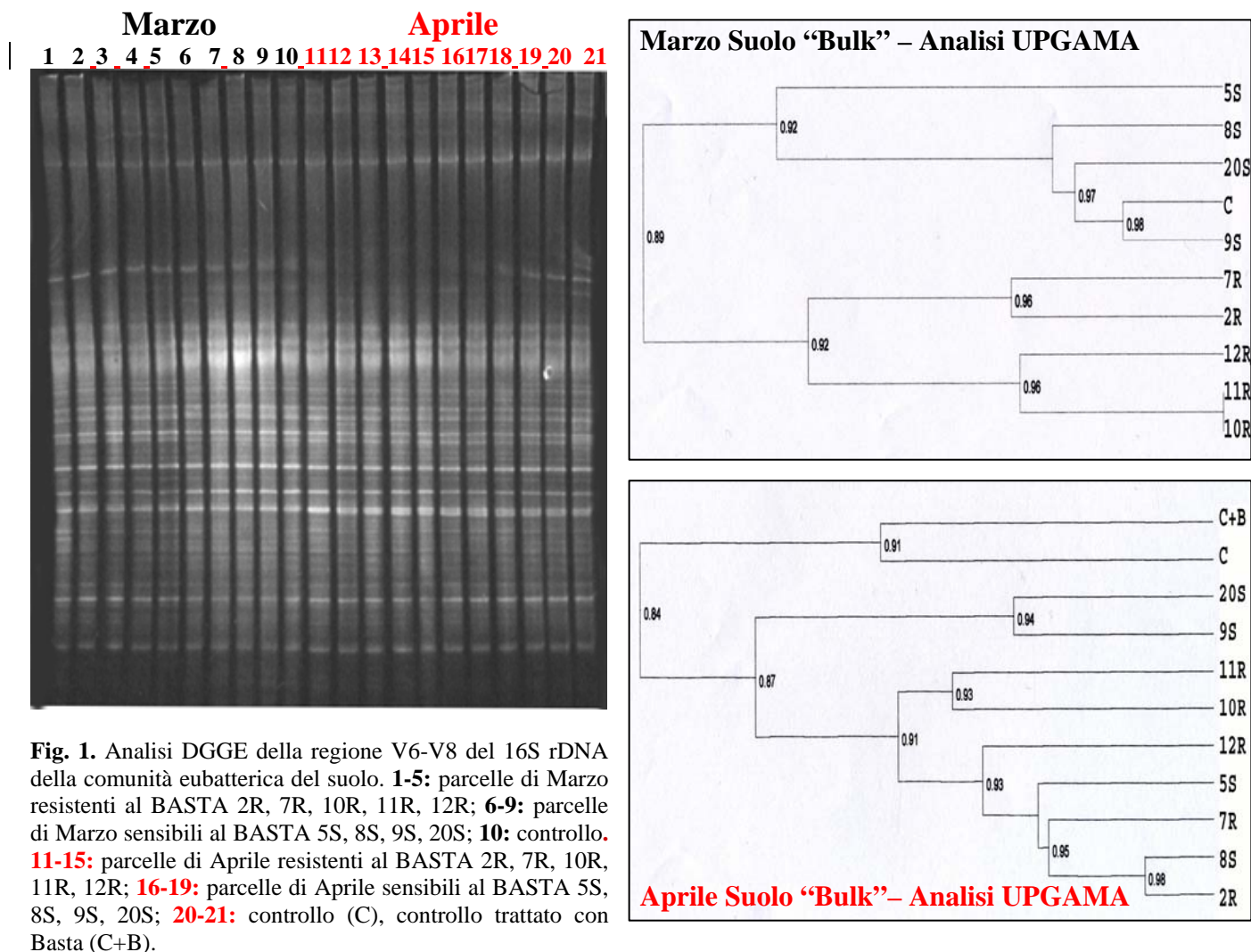
Campioni di suolo sono stati prelevati da tre ripetizioni di piante di Mais isogeniche Wt (*Z. mais* NK4046) e transgeniche Bt 11 e Bt 176 cresciute in vaso in ambiente confinato. I prelievi sono stati effettuati al momento dell'interramento delle piante, dopo tre mesi di coltura e a distanza di 2 e 4 mesi. I campioni sono stati vagliati a 2 mm e mantenuti a -20° C fino al momento dell'estrazione degli acidi nucleici.

Estrazione degli acidi nucleici - L'estrazione del DNA batterico totale, sia dal suolo rizosferico che dal "bulk soil", è stata effettuata con il FAST DNA *Spin Kit for Soil* (Bio 101); l'RNA è stato estratto secondo Griffith et al., 2000 (3). Il DNA dei batteri coltivabili è stato estratto con il metodo di Ausbel et al., 1987 (1) dal pellet dei ceppi raccolti dalle diluizioni 10^{-3} e 10^{-5} .

Analisi DGGE e UPGAMA – Lo studio della popolazione batterica totale del suolo è stato condotto tramite amplificazione del DNA e RNA totale con primers per il 16S rDNA (regione V6-V8)(2), e successiva analisi DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). I patterns DGGE sono stati esaminati valutando la posizione delle bande nel gel, il numero delle bande presenti (ricchezza delle specie presenti) e la loro intensità (distribuzione relativa delle singole specie). Per l'analisi statistica è stato utilizzato il Dice Coefficient ed elaborando i dati ottenuti in clusters UPGAMA (Unweighted Pair Grouping Mathematical Averages) tramite il Diversity Database Software (BIORAD).

Isolamento batteri coltivabili e Analisi ARDRA. A partire dai campioni di suolo rizosferico appartenente alle coltivazioni di grano, la microflora batterica eterotrofa aerobia è stata isolata su mezzo di coltura massimo (TSA 0.1) contenente $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ di *cycloheximide* a 28° C., mediante la tecnica delle diluizioni successive, in triplo. Dalle diluizioni 10^{-3} e 10^{-5} , dopo 72 ore di incubazione, sono state isolate 30 colonie; le rimanenti colonie sono state riunite per valutare la composizione delle comunità batteriche. L'analisi ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) dei ceppi coltivabili è stata eseguita tramite amplificazione del DNA con primers P₀-P₆ (4) e digestione dell'amplificato con gli enzimi *AluI* e *MspI*. L'esame dei profili ARDRA ha permesso di identificare le unità tassonomiche operative (OTU) (5) e quindi la loro frequenza nelle tesi di terreno considerate.

Risultati e discussione relative al *Triticum* GM



Dalla comparazione dei profili elettroforetici del DGGE della comunità batterica del suolo nel mese di Marzo, prima del trattamento (Fig. 1), le comunità delle parcelle coltivate con cv. sensibili al BASTA mostrano un maggiore grado di similitudine con la parcella di Controllo rispetto alle tesi con cv. resistenti all'erbicida; il dendrogramma del mese di Aprile evidenzia una maggiore disomogeneità tra le varie parcelle. In particolare va notato il distacco della Comunità presente sulla parcella 8S (trattata con BASTA) dalle altre cv. sensibili e lo scarso effetto sulla tesi C della somministrazione dell'erbicida dato che C si raggruppa ancora con C+B. E' evidente, invece, un effetto sulla comunità della pianta sensibile in seguito alla somministrazione del BASTA (parcella 8S).

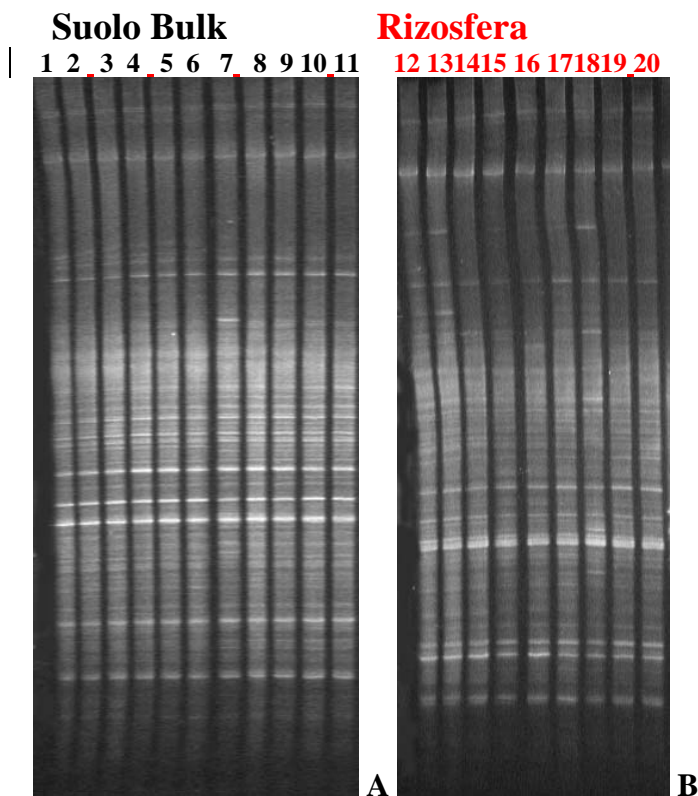
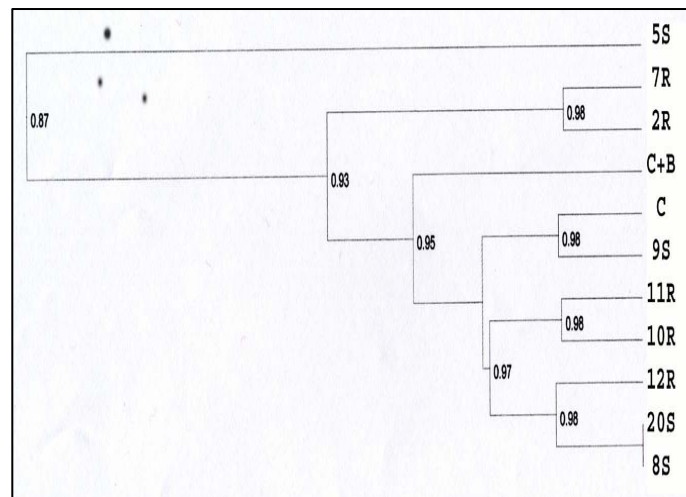
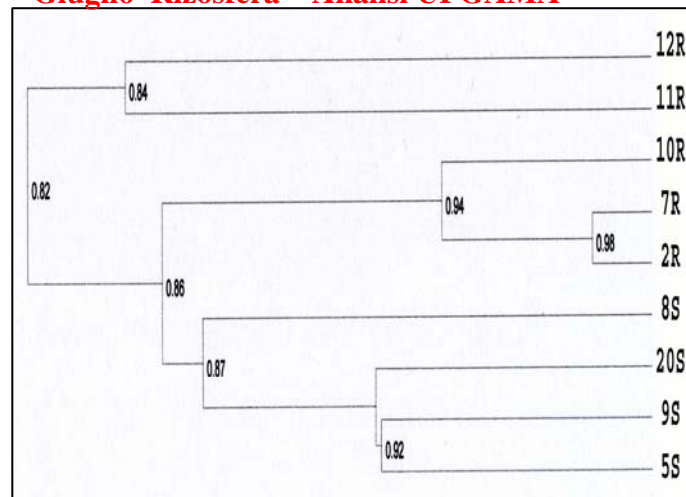


Fig. 3A. 1-5: parcelle di bulk soil resistenti al BASTA 2R, 7R, 10R, 11R, 12R; 6-9: parcelle di bulk soil sensibili al BASTA 5S, 8S, 9S, 20S. 10-11: controllo (C), controllo trattato con Basta (C+B). **Fig. 3B.** Analisi DGGE della regione V6-V8 del 16S rDNA della comunità eubatterica della rizosfera. 12-16: parcelle di rizosfera resistenti al BASTA 2R, 7R, 10R, 11R, 12R; 17-20: parcelle di rizosfera sensibili al BASTA 5S, 8S, 9S, 20S.

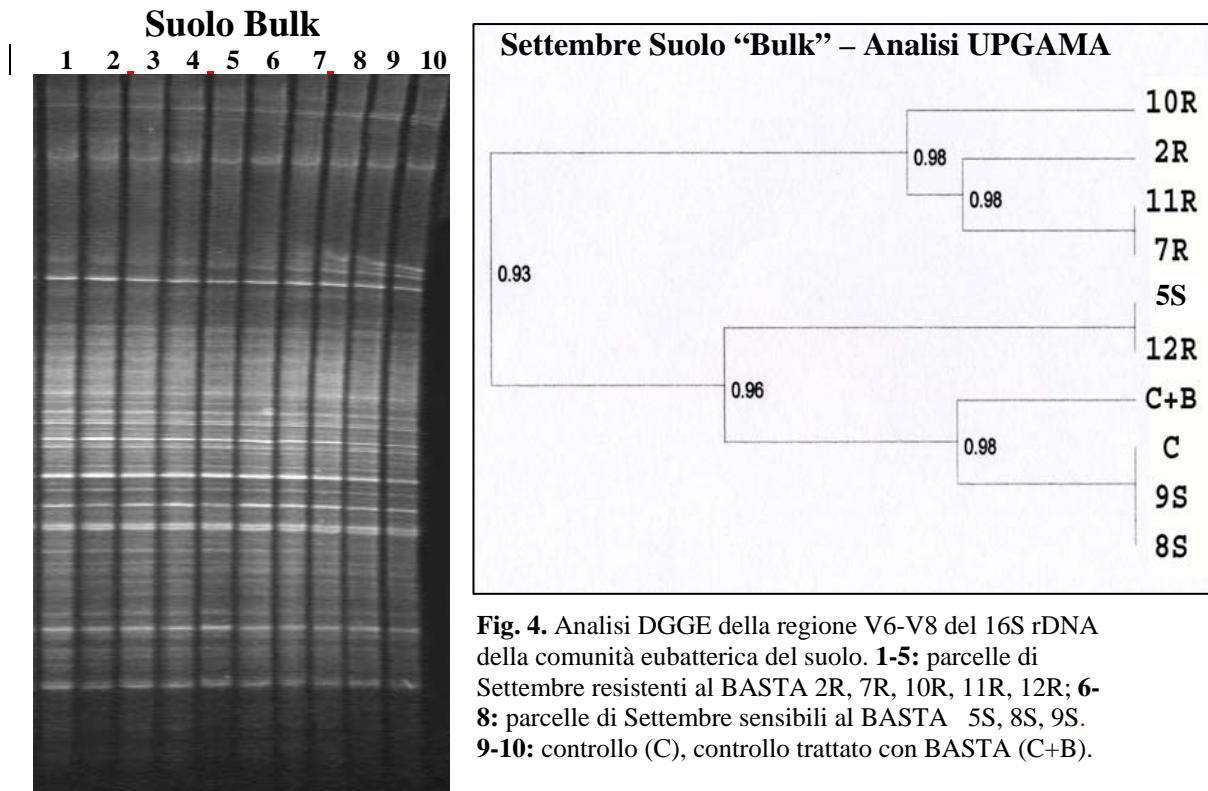


Giugno Suolo "Bulk" – Analisi UPGAMA

Giugno Rizosfera – Analisi UPGAMA



L'analisi DGGE del 16S rDNA eubatterico delle tesi di Bulk Soil del mese di Settembre (150 giorni dopo il trattamento) (Fig. 4), mostra che le parcelle sensibili (9S e 8S) presentano pattern elettroforetici identici al controllo (C), mentre le comunità resistenti al BASTA hanno un grado di similarità minore con il controllo, ma comunque estremamente elevato. Con la sola eccezione della comunità sulla parcella 12R, è possibile il raggruppamento delle parcelle tra le comunità sviluppatesi sulle cv. sensibili e quelle sulle cv. resistenti; l'elevata similarità indica uno scarso effetto dei residui interrati.



I batteri coltivabili della rizosfera, per le diluizioni analizzate (10^{-3} , 10^{-5}), mostrano con l'analisi DGGE due composizioni distinte (Fig.5).

Questa separazione tra i due gruppi risulta anche dall'analisi ARDRA (Tab.1), con le limitazioni dell'esiguità delle colonie considerate, che ha prodotto delle unità tassonomiche operative (OTU) in cui le tesi resistenti hanno una minore diversità di specie presenti rispetto alle sensibili. Infatti il numero di specie isolate, prelevate casualmente dalle piastre, indica 4 specie su 28 CFU (Colony-forming units) per le parcelle RT, 5 specie su 27 CFU per la parcella 12R, 12 specie su 25 CFU per 8S (trattata) e 11 specie su 25 CFU per le sensibili S non trattate.

1 2 3 4 5 6 7 8

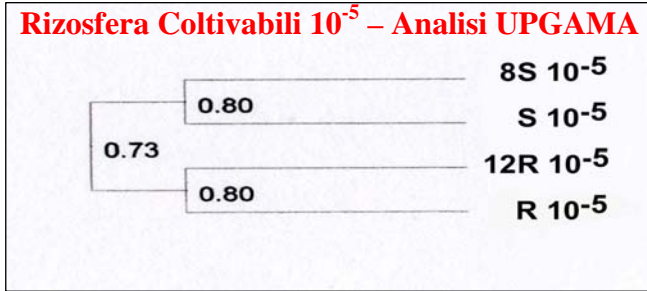
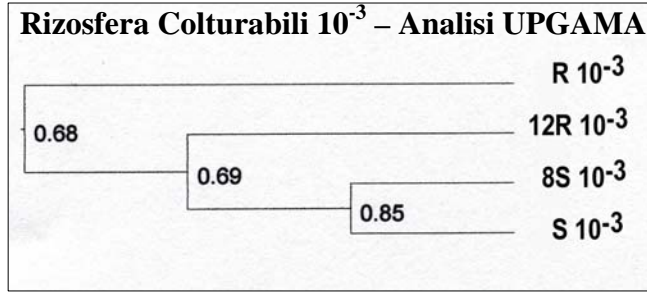
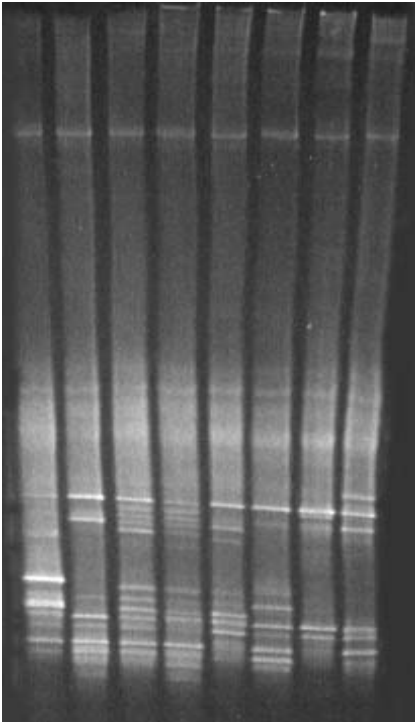


Fig. 5. Analisi DGGE della regione V6-V8 del 16S rDNA della comunità eubatterica eterotrofa aerobia coltivabile isolata a partire dal suolo rizosferico di Aprile. **1-4:** batteri coltivabili (dil. 10^{-3}) RT, 12R, S, 8S; **5-8:** batteri coltivabili (dil. 10^{-5}) RT, 12R, S, 8S.

TESI	GRUPPI																							Tot
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
RT	2	1	15	10																				28
12RT			14	10	1	1	1																	27
8ST			3	8	2			1	9	1	1	1	2	1	3	1								25
S	1		9	6				2									1	1	1	1	1	2	4	29
Tot	3	1	41	34	3	1	1	3	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	2	4	109

Tab. 1 Numero di Unità Tassonomiche Operative (OTU) identificate attraverso l'analisi ARDRA.

- RT** Piante resistenti trattate con Basta
- 12RT** Piante resistenti trattate con Basta da 2 anni i cui stocchi sono stati interrati ogni anno
- 8ST** Piante sensibili trattate con Basta da 2 anni i cui stocchi sono stati interrati ogni anno
- S** Piante sensibili non trattate con Basta

Conclusioni relative al *Triticum* GM

Le analisi DGGE della diversità della microflora eubatterica totale determinata alla levata del grano (Marzo) mostrano due distinti raggruppamenti delle Comunità presenti in funzione della coltivazione di PGM e di piante isogeniche sia a livello del suolo che della rizosfera. Inoltre è rilevante il fatto che la considerata componente biotica del Controllo si unisca con quelle isogeniche sensibili alla fosfinotricina.

Il fatto che dopo il trattamento con l'erbicida (Aprile) non sussista una così chiara distinzione tra le Comunità eubatteriche presenti nelle diverse tesi porta a considerare che l'erbicida a livello della rizosfera non produce effetti sulla ricchezza e composizione delle comunità batteriche, come risulta

dalla sostanziale equivalenza nel numero delle bande visibili nel profilo DGGE e della loro posizione (Fig. 2).

Considerando la frazione rizosferica della comunità eterotrofa aerobia coltivabile, l'analisi DGGE effettuata dopo 6 giorni dal trattamento con Basta segnala una visibile distinzione tra quelle presenti rispettivamente sulle cultivar sensibili e resistenti, per entrambe le diluizioni esaminate, che indicano una scarsa influenza dell'erbicida su questa componente della microflora.

L'esame delle unità tassonomiche operative (O.T.U.) risultanti dall'analisi ARDRA della frazione batterica coltivabile mostra non solo diversità tra parcelle delle due cultivar, ma anche una spiccata riduzione di diversità nell'ambito della rizosfera delle PGM imputabile probabilmente solo agli essudati e non al trattamento con il BASTA in quanto anche la parcella con cultivar sensibile (8S) trattata mantiene un alto grado di diversità di specie presenti.

I risultati dopo 50 giorni dal trattamento (Giugno) mostrano nuovamente una netta distinzione tra le comunità eubatteriche presenti sulla rizosfera delle due cultivar, mentre non è possibile trovare raggruppamenti omogenei per la componente suolo. Questo sta probabilmente ad indicare che nel suolo il ripristino delle condizioni precedenti procede più lentamente rispetto alla rizosfera dove maggiore è l'influenza delle rizodeposizioni e della maggiore attività metabolica.

Infine, circa 90 giorni dopo il raccolto e l'interramento dei residui vegetali (Settembre) di nuovo anche per il suolo si registrano cluster distinti per le rispettive Comunità sviluppatesi sulle parcelle con cultivar resistenti e sensibili all'erbicida ad eccezione della parcella 12R, ma comunque dato l'elevato grado di similarità tra i vari pattern elettroforetici (da 0.93 a 0.98) si assiste ad un ripristino delle condizioni di omogeneità tra le Comunità eubatteriche presenti nelle diverse tesi..

In conclusione la microflora della rizosfera sembra risentire in maniera minore dell'effetto dello spargimento del BASTA, ripristinando più rapidamente la distinzione iniziale tra microflora a contatto con piante resistenti e sensibili rispetto alla microflora dei rispettivi bulk soil.

Risultati e discussione relative al Mais GM

I dati ottenuti dall'analisi DGGE (Fig. 6) e dall'analisi statistica (Fig. 7), riguardano sia la comunità batterica presente (rDNA) che quella funzionalmente attiva (rRNA), che si mostrano molto diverse tra loro nelle diverse epoche di campionamento.

Luglio 03 Settembre 03 Novembre 03
 Test Wt Bt 11 Bt 176 Wt Bt 11 Bt 176 Wt Bt 11 Bt 176
DRD RD RD RD RD RD RD RD RD RD RD

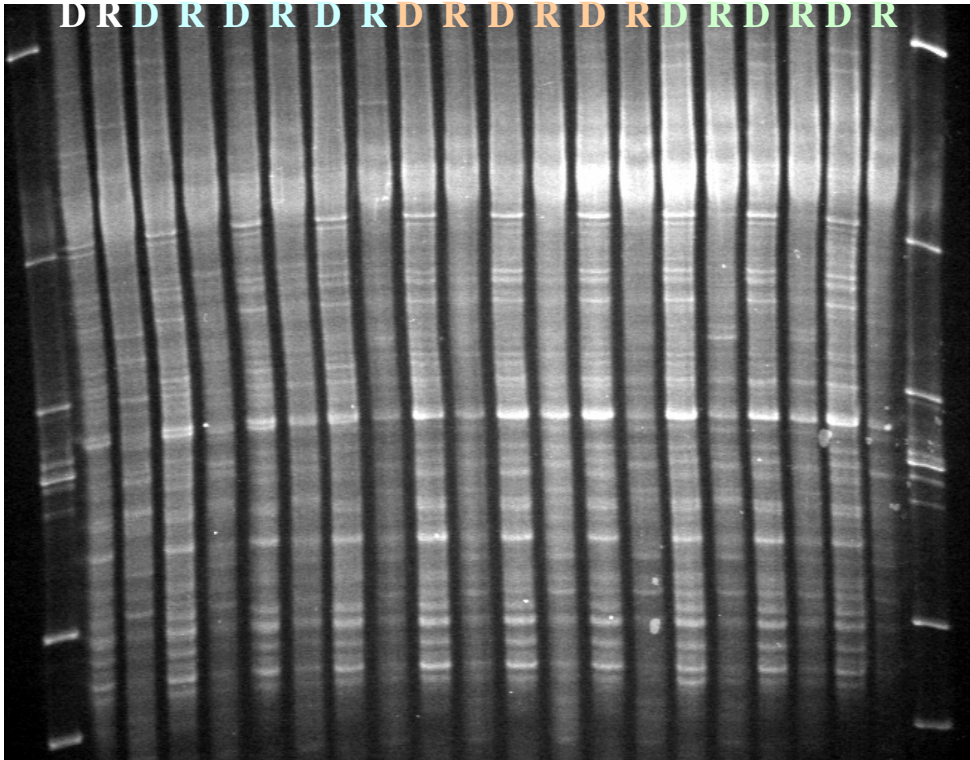
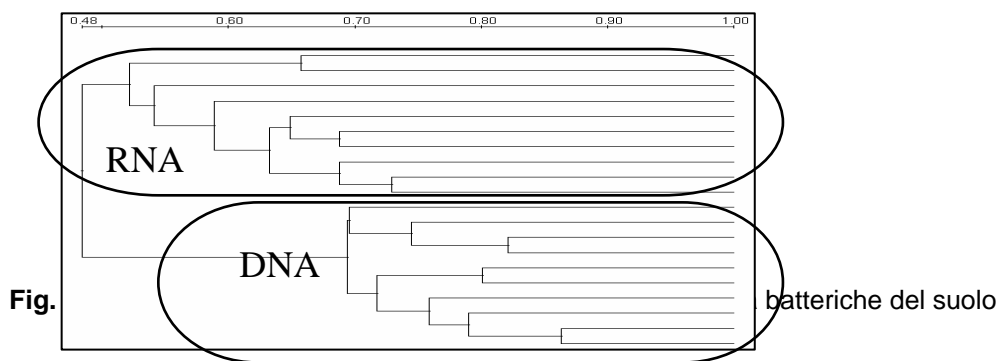
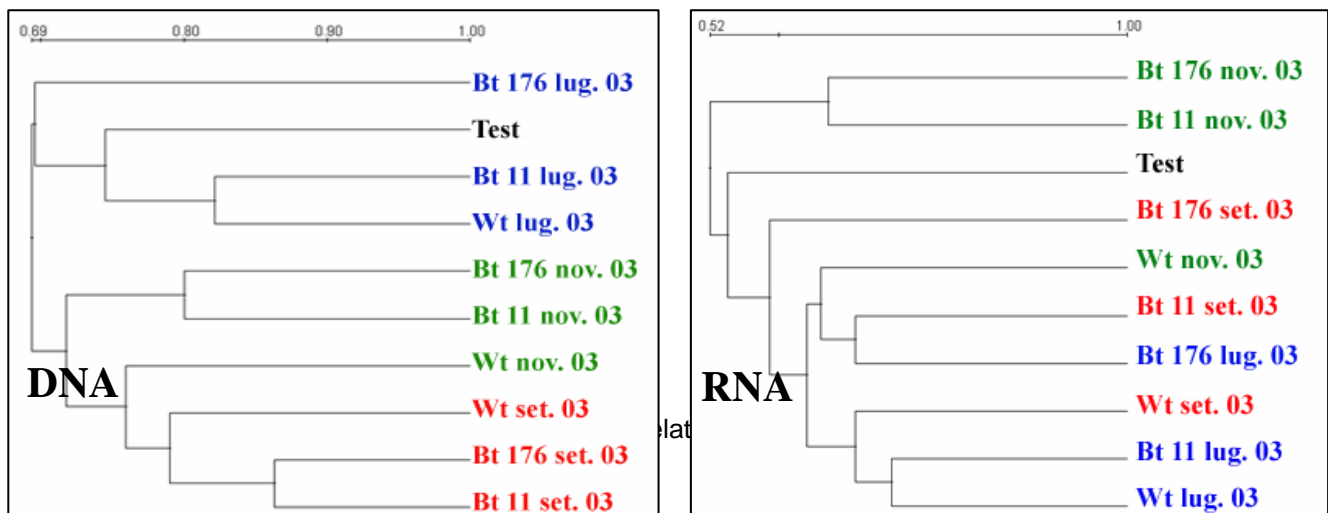


Fig. 6. DGGE pattern di rDNA (D) e rRNA (R) relativi alle comunità batteriche del suolo



L'analisi statistica dei pattern elettroforetici del DGGE, relativo al rDNA (specie presenti) mostra una diversa similitudine tra il Wt e le due PGM in relazione alla presenza della pianta in stadio vegetativo o come residuo interrato: le comunità batteriche relative al Wild type si mostrano più simili a quelle di Bt 11 solo in presenza della pianta, mentre le comunità delle due PGM diventano più simili in presenza dei residui interrati (Fig. 8). Risulta evidente anche un effetto della stagionalità, di entità comparabile con quello indotto dalle diverse cultivar.



La comunità batterica funzionalmente attiva (rRNA) invece mostra una maggiore diversità tra le tre specie due mesi dopo l'interramento, per poi assumere, dopo 4 mesi, un andamento analogo a quello del rDNA (Fig. 8). Tuttavia il grado di similitudine tra le comunità delle tre cultivar diminuisce da luglio a novembre, indicando un effetto più marcato della presenza dei residui colturali.

In conclusione le comunità eubatteriche presenti nella rizosfera delle piante geneticamente modificate oggetto della sperimentazione, non mostrano una riduzione della diversità rispetto alle coltivazioni tradizionali, ma piuttosto un cambiamento nella composizione e nelle specie attive presenti.

Per conoscere se questi cambiamenti nella comunità batterica del suolo ne consentano lo svolgimento della stessa funzione sarebbe necessario definire la modalità e la misura dell'attività funzionale derivante dall'introduzione delle rizodeposizioni e dei residui delle piante transgeniche nell'agro-ecosistema. In effetti poco si conosce sulle relazioni tra diversità delle specie, diversità funzionale e composizione funzionale in relazione allo svolgimento ed intensità dei fondamentali processi ecologici, quale la resilienza del suolo nei confronti di stress e disturbi naturali ed antropici.

Bibliografia

1. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., 1987. "Preparation of genomic DNA from bacteria." In Current Protocols in Molecular Biology, cap.2.4; Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

2. Felske A., Wolterink A., Van Lis L., Akkermans A.D.L., 1998. *Appl. Env. Microb.* 64: 871-879.
3. Griffiths R.I., Whitelley A.S., O'Donnell A.G., Bailey M.J., 2000. *Appl. Env. Microb.* 66: 5488-5491
4. Lane D.J., 1991. "16S/23S rRNA sequencing." pp. 115-175 In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chicester, UK.
5. Moyer C.I., Dobbs F. C., Karl D.M., 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:871-879.

VALUTAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA E DEL TRASFERIMENTO GENICO DI MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI UTILIZZABILI IN PROCESSI DI BIOREMEDIATION.

Zennaro E.¹, Civolani C.¹, Leoni L.¹, Calisti C.¹, Ruzzi M.²

¹ Università degli Studi di Roma3, Dipartimento di Biologia

² Università "La Tuscia", Viterbo

Introduzione

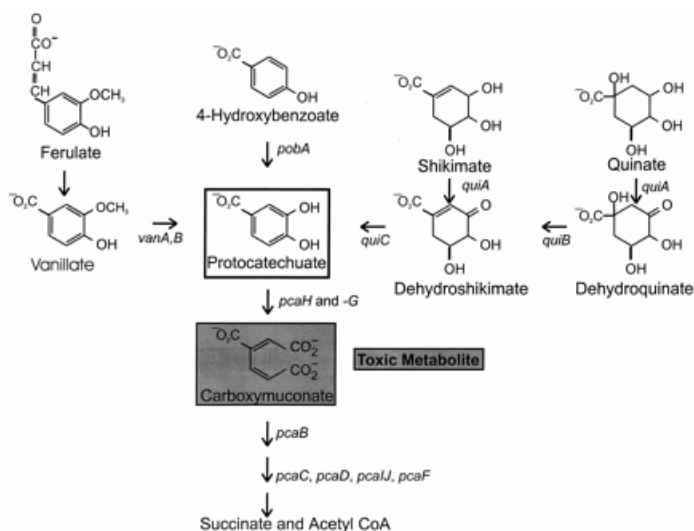
Il trasferimento orizzontale di geni è un meccanismo genetico attraverso il quale i microrganismi possono acquisire nuove capacità metaboliche. Esso può rappresentare un meccanismo importante per l'adattamento batterico alle variazioni ambientali, contribuisce a determinare la diffusione di caratteri di resistenza (per esempio agli antibiotici), ed è un potenziale fattore di rischio associato al rilascio di microrganismi geneticamente modificati (*mogm*).

Questo processo può avvenire spontaneamente in natura in seguito ad eventi di coniugazione plasmidica, trasposizione coniugativa, trasduzione fagica e trasformazione, sia tra membri appartenenti alla stessa specie che tra membri di specie differenti. L'efficienza e la frequenza del fenomeno dipendono da vari fattori, quali le caratteristiche del ceppo e dell'elemento che viene trasferito, lo stato fisiologico delle cellule e vari parametri ambientali (temperatura, pH, cationi, ossigeno disciolto, disponibilità di nutrienti). In particolare, in questa ricerca abbiamo studiato se e come il trasferimento genico tra microrganismi sia influenzato dalla presenza di sostanze inquinanti. Lo scopo principale di questi esperimenti è quello di comprendere la dinamica del fenomeno in ambienti naturali che sono stati sottoposti a stress abiotici. Queste informazioni potranno essere molto utili per stabilire modalità di intervento che, a seconda delle esigenze, permettano di stimolare (per esempio durante la bonifica biologica "*in situ*"), modulare o reprimere il trasferimento di geni negli ambienti naturali.

Il sistema sperimentale che abbiamo utilizzato consiste nell'uso di un ceppo microbico ampiamente caratterizzato: ADP1 di *Acinetobacter calcoaceticus* (Kok et al 1999), che è un ceppo naturalmente competente e trasformabile con alte efficienze, particolarmente idoneo per studi di trasferimento genico *in vitro* ed in microcosmo. Infatti utilizzando un microrganismo naturalmente trasformabile è possibile valutare il trasferimento e il mantenimento di elementi genetici che si replicano in modo autonomo nella cellula ospite o di elementi genetici che, per essere mantenuti nella cellula ospite devono essere integrati nel cromosoma batterico. Inoltre questo ceppo cresce su acido ferulico, un

composto aromatico derivato dalla degradazione della lignina, che è tossico ad alte concentrazioni (Fig.1).

Fig. 1. Via degradativa dell'acido ferulico in *Acinetobacter* ADP1. L'acido ferulico viene degradato attraverso la formazione di acido vanillico che a sua volta è convertito, come altri composti fenolici e non, in protocatecuato (box aperto). La degradazione del protocatecuato può avvenire attraverso la formazione di carbossimuconato (box pieno), il cui accumulo, come indicato in figura, è tossico per la cellula.



Trasferimento di plasmidi in grado di replicarsi in *Acinetobacter* ADP1200

Nella prima fase della ricerca sono state condotte principalmente prove di trasferimento genetico *in vitro*, con le quali si è voluto saggiare la capacità del ceppo ADP1 di ricevere e mantenere plasmidi con differenti origini di replicazione. Esperimenti analoghi non sono stati precedentemente riportati in letteratura e quindi possono fornire informazioni utili nella valutazione dei rischi associati al rilascio di *mogm*. Con le stesse prove è stato anche misurato l'effetto sulla frequenza di trasferimento del marcatore fenotipico utilizzato per la selezione dei trasformanti.

Sono stati utilizzati 7 vettori ad ampio spettro d'ospite, aventi un'origine di replicazione del tipo RK2, INCQ o INCP, e tre diversi marcatori di resistenza: kanamicina, tetraciclina e cloramfenicolo. Le prove di trasformazione sono state condotte mettendo ADP1 direttamente in contatto con un lisato cellulare del donatore, ottenuto mediante trattamento termico per 15' a 80°C (Nielsen et al. 2000).

Sono stati ottenuti trasformanti con tutti i plasmidi, indipendentemente dal gruppo di incompatibilità di appartenenza. Le differenze più marcate nelle frequenze di trasformazione sono riconducibili al marcatore con il quale è stata effettuata la selezione dei trasformanti. In particolare, i risultati migliori sono stati ottenuti selezionando per la resistenza al cloramfenicolo (Cm^R):

efficienze almeno 10 volte più elevate. Nella Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti con diversi plasmidi che possiedono il marcatore Cm^R. Nella prova sono stati considerati plasmidi appartenenti allo stesso gruppo di incompatibilità, ma di taglia diversa (pFF1 e pR9TT) e plasmidi di taglia molecolare simile, ma appartenenti a gruppo di incompatibilità differente (pR9TT e pMP190). I risultati, riportati in Tabella 1, mostrano che la trasformazione di ADP1200 è influenzata in modo sensibile dal tipo di origine di replicazione e dalla taglia molecolare dei plasmidi considerati.

Tabella 1. – Trasformazione di *A. calcoaceticus* ADP1 con plasmidi appartenenti ai gruppi di incompatibilità RK2 e IncQ.

Plasmide	Gruppo di incompatibilità	Taglia molecolare (Kb)	*N° di Trasformanti Cm ^R
pFF1	RK2	5,9	45
pR9TT	RK2	9	2
pMP190	INCQ	9	100

• *Il numero di trasformanti indica le CFU (Unità Formanti Colonia) ottenute con un lisato di 10⁶ cellule di donatore. Le prove sono state condotte con 10⁹ cellule di ADP1.*

Le frequenze di trasformazione *in vitro* di ADP1 con plasmidi ad ampio spettro d'ospite non sono particolarmente elevate (tra 10⁻⁴ e 10⁻⁶ eventi per cellula di donatore), ma confermano l'utilità del ceppo di *A. calcoaceticus* per monitorare in modo sensibile gli eventi di trasferimento genetico.

Trasformazione per ricombinazione omologa con frammenti di DNA veicolati da plasmidi che non si replicano nel ceppo ricevente

Allo scopo di valutare il trasferimento intra- ed interspecie di frammenti di DNA liberati nel suolo da microrganismi geneticamente modificati (*mogm*) a seguito di lisi batterica, è stata eseguita una serie di prove preliminari *in vitro* utilizzando *Acinetobacter* sp. ADP1, come ceppo ricevente, ed il gene *aphA3* (che conferisce resistenza alla kanamicina) come marcatore dell'avvenuto trasferimento.

Per la trasformazione sono stati utilizzati frammenti di DNA cromosomale di *Acinetobacter* corrispondenti agli operoni *lipBA* (che codifica per la lipasi) e *vanAB* (che codifica per la vanillato-*o*-demetilasi, vedi Fig. 1), nei quali è stata inserita una cassetta genica che conferisce resistenza alla kanamicina (Km^R). La determinazione della frequenza di trasferimento genico orizzontale è stata effettuata sulla base dell'acquisizione, mediata da ricombinazione omologa, della kanamicina-resistenza da parte del ceppo ADP1. Utilizzando i due operoni *lipBA* e *vanAB*, era possibile valutare se l'integrazione del DNA trasformante in regioni diverse del cromosoma avesse un effetto sull'efficienza di trasformazione

La capacità di *Acinetobacter* di catturare ed integrare DNA nel proprio cromosoma mediante ricombinazione omologa è stata valutata utilizzando:

- *DNA libero*: plasmidi che non si replicano in *Acinetobacter* contenenti le cassette geniche *lipBA::Km^R* [pZR80] e *vanAB::Km^R* [pGEM-*vanAB::Km^R*].
- *lisato cellulare* di *mogm* che contengono una delle suddette cassette geniche (*E. coli* DH5 α /pZR80 e DH5 α /pGEM-*vanAB::Km^R*, *Pseudomonas fluorescens* BF13/pRZ80p).

Ricombinazione nel locus *lipBA*

Prove di trasferimento genico condotte con il sistema reporter *lipBA::Km^R* presente nel plasmide pZR80 (Fig 2; Kok et al., 1999) hanno permesso di dimostrare che cellule naturalmente competenti di *Acinetobacter* possono essere trasformate efficientemente *in vitro* utilizzando sia DNA plasmidico purificato (Tabella 2) che lisato cellulare di *mogm* kanamicina-resistenti DH5 α /pZR80 (Tabella 3) e BF13/pZR80p (dati non mostrati). Le prove condotte con DNA libero hanno inoltre evidenziato, in accordo con quanto osservato da altri autori, che lo stato fisiologico della coltura di *Acinetobacter* ha un'influenza significativa sull'efficienza di trasformazione. L'utilizzo di una coltura in fase di attivo accrescimento esponenziale ($OD_{600}=0.6$, corrispondente a 1.2×10^8 CFU /ml) permette di ottenere un numero di trasformanti circa 5 volte più elevato (Tabella 3). Queste osservazioni hanno permesso di ottimizzare il protocollo per l'analisi del trasferimento genico orizzontale *in vitro* e, successivamente, in microcosmo migliorando in modo significativo la sensibilità del saggio stesso.

Fig. 2. Mappa del plasmide pZR80 contenente la cassetta genica *lipBA::Km^R*

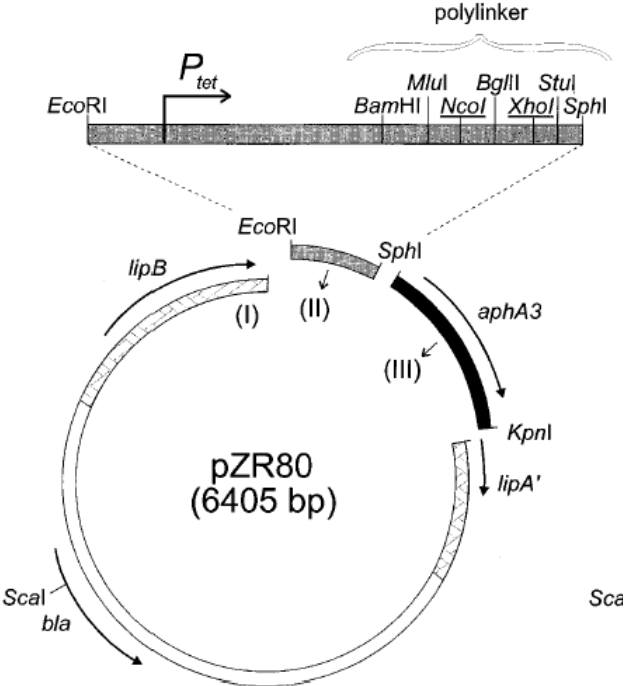


Tabella 2. Trasformazione di *Acinetobacter* con DNA del plasmide pZR80

OD della coltura <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	N° di cellule/ml (CFU/ml)	N° di Trasformanti (CFU)	Frequenza di trasformazione	Efficienza di trasformazione (CFU x µg di DNA)
0.4	6×10^7	224	3.7×10^{-6}	2.6×10^3
0.6	1.2×10^8	1050	8.7×10^{-6}	1.2×10^4

Le prove di trasformazione sono state condotte con 85 ng di DNA plasmidico (pZR80). Le cellule, 1 ml di coltura all'OD indicata in tabella, sono state poste a contatto del DNA per 90' a 37°C, raccolte per centrifugazione ed i trasformanti sono stati selezionati su terreno agarizzato LB contenente kanamicina (30 µg/ml).

La frequenza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti ed il N° di cellule utilizzate per la trasformazione.

L'efficienza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti e la quantità di DNA utilizzato.

Le prove condotte *in vitro* con lisati cellulari hanno evidenziato che la presenza di *debris* cellulari non compromette l'evento di trasferimento genico orizzontale e non influenza l'efficienza di trasformazione (Tabella 3).

Tabella 3. Trasformazione di *Acinetobacter* con il lisato ottenuto da cellule di *E. coli* modificate geneticamente (DH5α/pZR80)

Lisato cellulare (ml)	N° di cellule lisate	N° trasformanti ADP1 Km ^R (CFU)	Frequenza di trasformazione	Efficienza di trasformazione x ml di lisato
0.05	9.5×10^7	105	8.7×10^{-7}	2.1×10^3
0.1	1.9×10^8	220	1.8×10^{-6}	2.2×10^3
0.3	5.7×10^8	867	7.2×10^{-6}	2.89×10^3

- Il lisato cellulare è stato preparato mediante trattamento termico ad 80°C per 15' a partire da una sospensione microbica con titolo cellulare di 1.7×10^8 CFU/ml. Le prove sono state condotte aggiungendo volumi variabili di lisato ad 1 ml di una coltura di *Acinetobacter* in fase esponenziale di accrescimento (OD=0.6; 1.2×10^8 CFU/ml). Le cellule sono state poste a contatto del lisato cellulare per 90' a 37°C, raccolte per centrifugazione ed i trasformanti sono stati selezionati su terreno agarizzato LB contenente kanamicina (30 µg/ml). L'inattivazione del *mogm* a seguito di lisi termica è stata verificata in base all'incapacità del lisato di generare colonie su terreno nutritizio.

La frequenza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti ed il N° di cellule di *Acinetobacter* utilizzate per la trasformazione.

L'efficienza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti e la quantità di lisato utilizzato.

Ricombinazione nel locus *vanAB*

Prove sperimentali analoghe sono state eseguite utilizzando una seconda cassetta genica, *vanAB::Km*, sviluppata appositamente per questo progetto (Fig.3 e Fig.4).

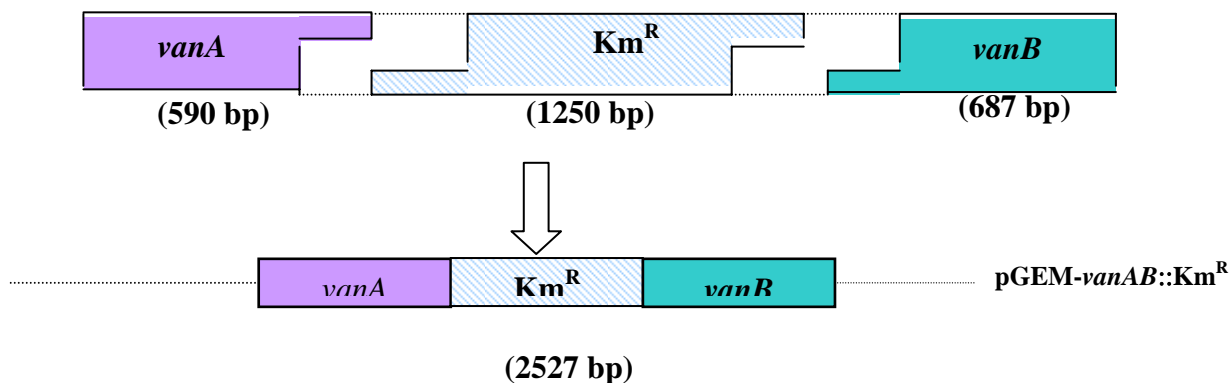


Fig. 3. Costruzione della cassetta genica *vanAB::Km^R*. Due frammenti di DNA corrispondenti ai geni *vanA* e *vanB* sono stati amplificati mediante PCR a partire dal DNA cromosomale di *Acinetobacter* sp. ADP1, utilizzando coppie di primers opportunamente ingegnerizzate al fine di inserire un sito di giunzione riconosciuto dall'enzima di restrizione *Bam*HI. Nel suddetto sito è stato inserito un frammento di DNA di 1250 bp che contiene il gene per la resistenza alla kanamicina (*Km^R*).

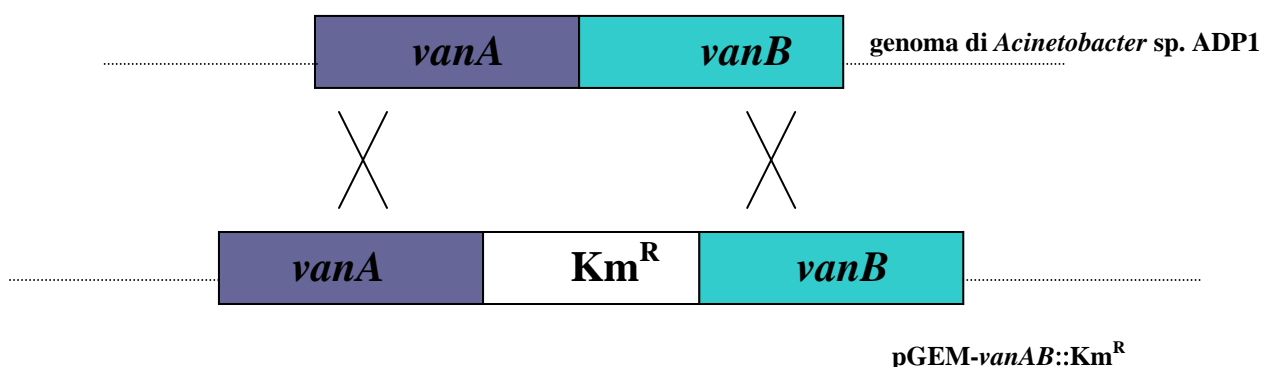


Fig. 4. Meccanismo di ricombinazione omologa per l'ottenimento di trasformanti *Km^R* di *Acinetobacter* mediante la cassetta genica *vanAB::Km^R*

Le prove sono state condotte con il plasmide ricombinante *pGEM-vanAB::Km^R* purificato e, in parallelo, con il lisato cellulare del ceppo *E. coli* DH5 α /*pGEM-vanAB::Km^R*, ed avevano lo scopo di verificare se, utilizzando un altro *locus* come bersaglio della ricombinazione omologa, vi fosse un effetto sulla frequenza di trasferimento genico orizzontale.

I risultati riportati in Tabella 4 mostrano un'efficienza di trasformazione sensibilmente inferiore a quella determinata con la cassetta *lipBA::Km^R* nelle medesime condizioni sperimentali, indicando che il locus d'integrazione del DNA trasformante influisce sulla efficienza di trasformazione.

Tabella 4. Trasformazione di *Acinetobacter* con DNA* del plasmide pGEM-vanAB::Km^R

N° di cellule <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (CFU)	N° di trasformanti (CFU)	Frequenza di trasformazione	Efficienza di trasformazione (CFU x µg di DNA)
1,2x10 ⁸	8	0,66x10 ⁻⁷	29

*Le prove di trasformazione sono state condotte con 275 ng di DNA plasmidico

La frequenza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti ed il N° di cellule di ADP1

L'efficienza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti e la quantità di DNA utilizzato.

L'integrazione sito-specifica del gene per la kanamicina-resistenza nel locus vanAB di *Acinetobacter* è stata confermata tramite reazione di PCR su DNA genomico e, fenotipicamente, per l'incapacità del ceppo ricombinante di utilizzare l'acido ferulico come fonte di carbonio.

Utilizzando uno dei mutanti ferulico-meno di *Acinetobacter*, nei quali l'operone vanAB era stato interrotto dal gene Km^R, sono state condotte prove di trasferimento genico utilizzando una copia selvatica dell'operone che codifica per la vanillato-*o*-demetilasi (Tabella 5). Gli eventi di ricombinazione omologa sul locus vanAB sono stati selezionati sulla base del recupero da parte dei trasformanti della capacità di utilizzare l'acido ferulico come fonte di carbonio.

Tabella 5. Trasformazione di *Acinetobacter* sp. ADP1(vanAB::Km^R) con la cassetta genica vanAB

N° di cellule <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1 (CFU)	N° di trasformanti	Frequenza di trasformazione	Efficienza di trasformazione x µg di DNA
1.2x10 ⁸	3	2.5x10 ⁻⁸	27

- Le prove di trasformazione sono state condotte con 109 ng di DNA plasmidico (pGEM-vanAB) come descritto in Tabella 1. La selezione dei trasformanti è stata effettuata su piastre di terreno salino M9 con acido ferulico come fonte di carbonio.

La frequenza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti ed il N° di cellule utilizzate per la trasformazione.

L'efficienza di trasformazione è data dal rapporto tra il N° di trasformanti e la quantità di DNA utilizzato.

I dati mostrati nelle Tabella 4 e 5 indicano che le efficienze di trasferimento delle cassette vanAB::Km^R e vanAB sono comparabili e le modalità di selezione dei trasformanti non hanno effetto significativo sulla determinazione delle efficienze di trasferimento, rilevate su terreno LB + kanamicina per i trasformanti ottenuti con la cassetta vanAB::Km^R e su terreno salino M9, contenente acido ferulico come fonte di carbonio, per quella vanAB.

I dati mostrati nelle Tabelle 2 e 4 indicano, invece, che la frequenza di trasferimento genico è influenzata in modo significativo dal locus utilizzato per la ricombinazione omologa. Sulla base dei risultati ottenuti le successive prove in microcosmo sono state effettuate utilizzando la cassetta genica che permetteva di rilevare in modo più efficiente (~400 volte) i fenomeni di trasferimento orizzontale: lipBA::Km^R.

Prove in microcosmo

In un ultima serie di prove è stata valutata la capacità di *Acinetobacter* sp. ADP1 di acquisire, mediante ricombinazione omologa, DNA rilasciato in microcosmo da *mgm*. Le prove sono state condotte utilizzando cellule di *E. coli* DH5 α /pZR80, come donatore della cassetta genica *lipBA::Km^R*, e microcosmi composti da suolo sterile, il quale, in base a quanto riportato in letteratura (Nielsen et al. 2000), permette di determinare in modo più semplice le frequenze di trasferimento orizzontale ed i fattori che influenzano questo fenomeno. In particolare è stato analizzato l'effetto della presenza di composti aromatici tossici, quali l'acido ferulico, sulla trasformazione naturale di cellule di *Acinetobacter*. I microcosmi sono stati allestiti (in triplicato) in tubi di polipropilene da 50 ml (tubi Falcon tipo 5998), contenenti 5 gr di terreno boschivo sottoposto a trattamento di sterilizzazione. Al suolo sono stati aggiunti 0.5 ml di una coltura *overnight* di *E. coli* DH5 α /pZR80 (2×10^9 CFU/ml) e 0.5 ml di una coltura di *Acinetobacter* in fase esponenziale di crescita ($OD_{600}=0.6$, 1.2×10^8 CFU/ml). I microcosmi di suolo sono stati messi ad incubare per 24 h a 20°C prima di effettuare le aggiunte (0.2 ml/g di suolo) di acido ferulico (2% v/v), glucosio (2% v/v) ed acqua, come controllo. Dopo un periodo di incubazione di 1, 6 e 10 giorni, le cellule sono state recuperate dal suolo mediante una soluzione (10 ml) di sodiopirofosfato (0.1%) e, a partire da diluizioni seriali della sospensione così ottenuta, sono state allestite le prove di conta su piastra. Per la determinazione delle CFU, aliquote delle diluizioni seriali sono state piastrate su terreno LB (per la determinazione della popolazione microbica totale: *E. coli* + *Acinetobacter*), su terreno salino (M9) contenente una fonte di carbonio (acido ferulico, 0.1% v/v) utilizzata solo da *Acinetobacter* (per la determinazione della popolazione di ADP1) e su terreno salino addizionato con kanamicina (per la selezione dei trasformanti ADP1 Km^R). Le piastre sono state messe ad incubare a 30°C per 3 giorni prima di procedere alla conta delle colonie.

I risultati mostrati in Figura 5 indicano (pannello inferiore) che fenomeni di trasferimento genico orizzontale si osservano in tutte e tre le condizioni esaminate (insorgenza di kanamicina-resistenti nella popolazione di *Acinetobacter* sp. ADP1). In presenza di acido ferulico, un composto aromatico che in basse concentrazioni può essere utilizzato come fonte di carbonio da *Acinetobacter* ed in alte concentrazioni è tossico sia per *E. coli* che per *Acinetobacter*, si osserva, a 10 giorni, un'aumento della frequenza di trasformazione (data dal rapporto tra il N° di trasformanti Km^R ed il N° di CFU di *Acinetobacter*) di circa 100 volte, rispetto alle altre due condizioni. Un altro effetto significativo che si osserva in presenza di acido ferulico è un incremento nel tempo della frequenza di trasformazione: da 9×10^{-5} , dopo 24 h dall'aggiunta del composto aromatico (giorno 1), ad 1.7×10^{-3} , al sesto giorno, e 2.7×10^{-3} , al decimo giorno. In assenza di aggiunte, la frequenza di trasformazione, al giorno 1, è comparabile con quella determinata in presenza di acido

ferulico e poi tende a scendere fino a 2×10^{-5} (giorno 10). Un andamento analogo si osserva in presenza di glucosio, dove la frequenza di trasformazione è compresa tra 4.2×10^{-5} (al primo giorno dopo l'aggiunta) e 2.7×10^{-5} (al decimo giorno). L'aumento nella frequenza di trasformazione nei microcosmi emendati con acido ferulico non può essere spiegato come un aumento specifico della popolazione di *Acinetobacter* (Figura 5, pannello centrale). E' possibile ipotizzare che la tossicità dell'acido ferulico possa portare ad un aumento della lisi delle cellule ricombinanti di *E. coli*, con un conseguente aumento del rilascio di DNA plasmidico. In questo modo verrebbe ad aumentare la quantità di DNA biodisponibile per le cellule di *Acinetobacter*, il che, come è stato osservato nelle prove preliminari condotte *in vitro* con quantità crescenti di lisato cellulare (Tabella 2), porterebbe ad un incremento della frequenza di trasferimento. Non può essere escluso, però, che anche *Acinetobacter* possa risentire della tossicità dell'acido ferulico e, in risposta a questo stimolo, possa acquisire uno stato di maggiore competenza alla trasformazione. Sebbene non siano stati ancora chiariti i meccanismi molecolari che determinano l'aumento della frequenza di trasformazione di *Acinetobacter* in presenza di acido ferulico, i risultati ottenuti in questa ricerca indicano che il rilascio di composti tossici nell'ambiente, oltre ad avere effetti negativi sulla biodiversità, può stimolare in modo significativo l'insorgenza di fenomeni di trasferimento orizzontale.

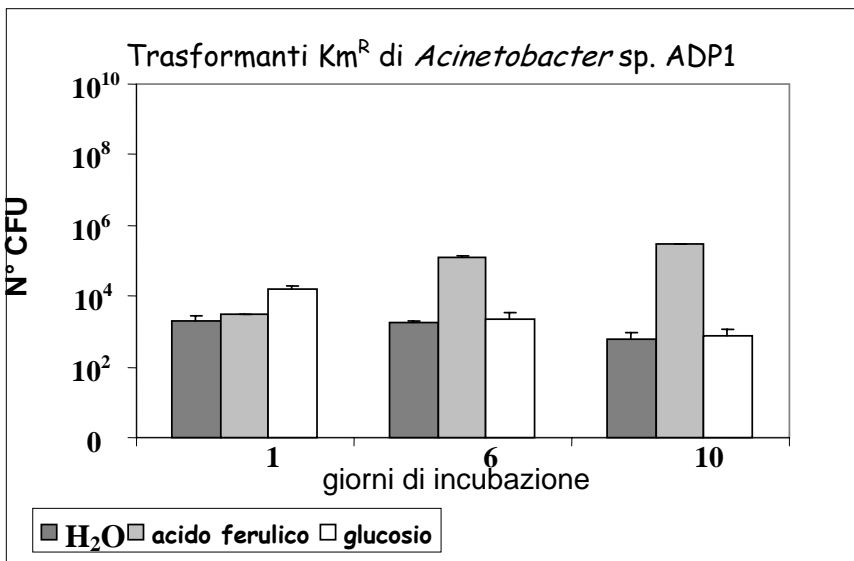
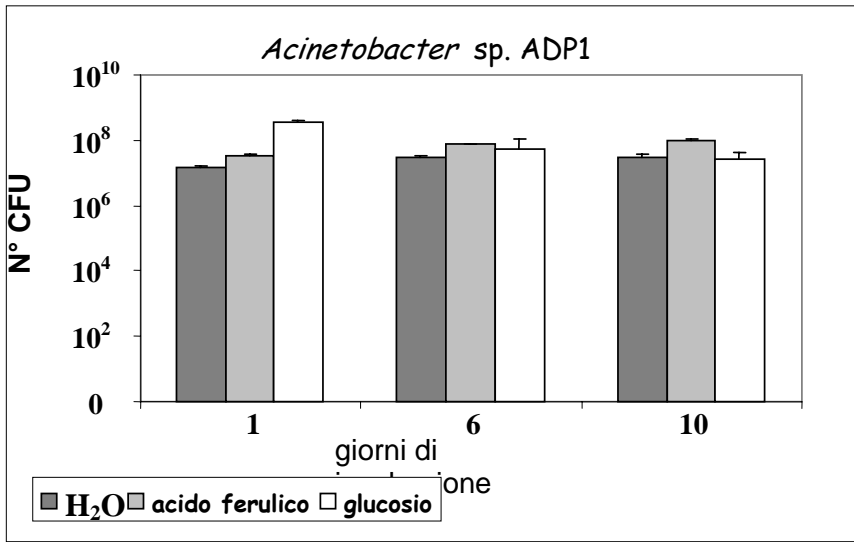
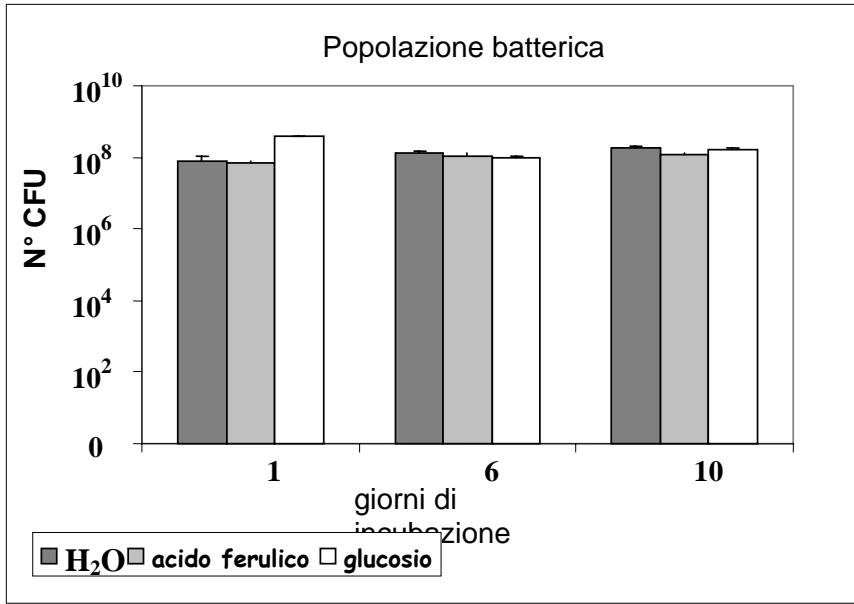


Fig. 5. Trasformazione naturale di *Acinetobacter* in microcosmo contaminato da *mogm* (*E. coli* DH5 α /pZR80). I dettagli dell'esperimento sono descritti nel testo. Ogni prova sperimentale è stata eseguita in triplicato.

Abbiamo dimostrato che, in presenza di composti aromatici quali l'acido ferulico, l'acquisizione di un gene che conferisce resistenza ad antibiotici può avvenire tramite ricombinazione omologa con una frequenza cento volte più elevata, il che può aumentare in modo considerevole la diffusione di questi geni tra microrganismi del suolo e da questi a patogeni umani.

Il sistema di analisi in microcosmo che è stato messo a punto in questo lavoro può essere un utile strumento per valutare in modo rapido la capacità di composti tossici di stimolare il trasferimento genetico orizzontale in ambienti naturali.

Bibliografia

- Kok, R.G., D.M. Young, and L.N. Ornston. 1999. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1675-1750.
- Nielsen, K.M., K. Smalla, and J.D. Van Elsas. 2000. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 206-212.

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI MODELLI BIOLOGICI MULTIVALENTI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO AL POTENZIALE PATOGENO DI BATTERI DI INTERESSE BIOTECNOLOGICO

Visca P.^{1,2}, Ambrosi C.¹, Leoni L.¹, Putignani L.², Ascenzi P.^{1,2}

¹Dip. di Biologia, Università di Roma Tre, Roma

² Istituto Nazionale di Malattie Infettive IRCCS “L. Spallanzani”, Roma

Introduzione

I batteri del genere *Pseudomonas* sono microrganismi Gram-negativi ubiquitari (Palleroni, 1994), in grado di colonizzare disparate nicchie ecologiche grazie alla loro ampia versatilità metabolica e fisiologica. Alcune specie di *Pseudomonas* fluorescenti, quali *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*, sono naturali residenti della rizosfera (ovvero quella regione di terreno che circonda e che include la radice della pianta) e sono in grado di promuoverne la crescita. Grazie a tale attività fitostimolante, queste specie di *Pseudomonas* sono note come *plant growth-promoting* (PGP) *rhizobacteria*. Molteplici ricerche hanno evidenziato l'elevato potenziale applicativo di tali *Pseudomonas* nel biocontrollo delle patologie infettive di numerose piante di interesse agronomico (Haas e Keel, 2003; Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Thomashow, 1996; O'Sullivan e O'Gara, 1992). I PGP *Pseudomonas* esplicano il loro effetto fitostimolante principalmente mediante l'inibizione della crescita dei microrganismi fitopatogeni che occupano la stessa nicchia ecologica (fitoprotezione). Tale fenomeno è basato sulla capacità da parte dei PGP *Pseudomonas* di produrre e rilasciare nella rizosfera fattori preposti all'acquisizione di sostanze nutritive essenziali per la proliferazione cellulare. Tra i fattori con ruolo fitoprotettivo accertato vi sono i siderofori (Sharma e Johri, 2003; Boruah e Kumar, 2002; O'Sullivan e O'Gara, 1992), denominati pioverdine o pseudobactine, prodotti e rilasciati nella rizosfera in risposta alla bassa concentrazione di ferro assimilabile. Le pioverdine prodotte dagli *Pseudomonas* fluorescenti appartengono al gruppo di siderofori idrossi-chinolinici, la cui struttura presenta un cromoforo fluorescente legato all'estremità N-terminale di un peptide contenente uno o due residui di L-N⁵-idrossi-ornitina (L-N⁵-OH-Orn) che partecipano con il cromoforo alla coordinazione del Fe(III) (Budzikiewicz, 2001). Nelle diverse pioverdine, il cromoforo è conservato, mentre il peptide ha composizione e lunghezza variabili che riflettono differenze specie-specifiche nella capacità di acquisizione del ferri-sideroforo. Tali molecole di basso peso molecolare, chelando il Fe(III) ad alta affinità, ne assicurano l'acquisizione all'interno della cellula produttrice. Di conseguenza, nella rizosfera si genera una condizione di estrema carenza di ferro libero che reprime la moltiplicazione di quei microrganismi fitopatogeni

che occupano la stessa nicchia ecologica (Sharma e Johri, 2003; Boruah e Kumar, 2002; O'Sullivan e O'Gara, 1992). L'utilizzo di *P. putida* e *P. fluorescens* in agricoltura rappresenterebbe una valida alternativa all'uso di pesticidi e fertilizzanti chimici. Tuttavia, si rendono necessarie analisi comparative e funzionali per differenziare i PGP *Pseudomonas* dalle specie di *Pseudomonas* patogene, come il patogeno opportunisto *Pseudomonas aeruginosa*. In tale batterio, la carenza di ferro, rappresenta lo stimolo che induce la produzione di svariati fattori di virulenza, tra cui la pioverdina.

Il nostro gruppo di ricerca è da anni impegnato nello studio dei meccanismi di acquisizione del ferro in *P. aeruginosa*. Precedenti studi avevano portato all'identificazione del gene *pvdA*, codificante l'enzima L-Orn- N^5 -ossigenasi responsabile dell'idrossilazione della L-Orn in *P. aeruginosa* PAO1 (Visca *et al.*, 1994). Studi sulla regolazione trascrizionale dei geni biosintetici della pioverdina_{PAO1} (*pvd*) hanno dimostrato che in *P. aeruginosa* PAO1 il repressore Fur (*ferric uptake regulator*) regola l'espressione del gene *pvdA* in modo indiretto mediante il controllo trascrizionale del gene *pvdS*, codificante un fattore sigma alternativo appartenente alla famiglia degli ECF (*extra cytoplasmic function*). La proteina PvdS, riconoscendo la sequenza consensus definita *iron starvation box* (ISB), conferisce alla RNA polimerasi *core* (RNAPc) la capacità di riconoscere e legare in modo specifico i promotori dei geni *pvd* (Visca *et al.*, 1994; Leoni *et al.*, 1996).

Caratterizzazione, in *Pseudomonas putida/fluorescens* B10, dell'omologo funzionale del gene *pvdA* di *P. aeruginosa* PAO1

In un precedente lavoro avevamo dimostrato, mediante analisi Southern, che il gene codificante l'enzima L-Orn- N^5 -ossigenasi è conservato in diverse specie di *Pseudomonas* fluorescenti (Visca *et al.*, 1994). Utilizzando una libreria genomica di *P. putida/fluorescens* B10 abbiamo identificato una regione genomica di B10 in grado di ripristinare nel mutante *pvdA* pioverdina-difettivo di *P. aeruginosa* PAO1 la sintesi di pioverdina_{PAO1}. Subclonaggi successivi ci hanno permesso di identificare il gene *psbA*, (*pseudobactin gene A*), codificante l'enzima L-Orn- N^5 -ossigenasi in *P. putida/fluorescens* B10. Membri di questa classe di monoossigenasi ad attività ω -aminoacido idrossilasica, esclusivi del metabolismo microbico dei siderofori, sono presenti, con diversi gradi di omologia, in diverse specie microbiche sia patogene che ambientali, come *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Shigella flexneri*, *Bordetella bronchiseptica*, *Ustilago maydis*, *Sinorhizobium meliloti*. Un allineamento multiplo di queste proteine. ha evidenziato la presenza di domini strutturali e funzionali comuni, in particolare tre regioni altamente conservate: le prime due si trovano rispettivamente in prossimità dell'*N*-terminale e della regione centrale e sono omologhe alle

consensus proposte per il legame con il FAD ed il NADP. La terza regione conservata si trova nella regione C-terminale e corrisponde al motivo L/FATGY che costituisce il core di una regione consensus più ampia caratterizzata dal motivo [D(X)₃FATGY(X)₄P]. Anche se a questo motivo non è stata ancora associata una funzione in modo conclusivo, si ritiene che sia coinvolto nel legame al substrato.

Le pioverdine prodotte dagli *Pseudomonas* fluorescenti possiedono attività di antibiosi *in vitro* nei confronti di rizobatteri fitopatogeni

Per valutare il ruolo della pioverdina_{B10} nell'inibizione della crescita di rizobatteri fitopatogeni, abbiamo generato un mutante *psbA* sito-specifico di *P. putida/fluorescens* B10, pioverdina_{B10}-difettivo. Analisi fenotipiche e biochimiche hanno rivelato che tale mutante di *P. putida/fluorescens* B10 è un mutante sideroforo-nullo poiché non produce siderofori secondari di tipo salicilico. Questo risultato è di particolare rilevanza in quanto avvalorava l'assunto secondo il quale le pioverdine rappresentano la strategia di elezione per l'acquisizione del ferro negli *Pseudomonas* ambientali, al contrario di quanto avviene in specie patogene come *P. aeruginosa* PAO1 che a questo scopo producono cospicue quantità di salicilato e/o piochelina (Meyer, 1992; Maurhofer *et al.*, 1998). Il mutante *psbA* di *P. putida/fluorescens* B10 era il candidato di elezione per studiare l'antibiosi mediata dai siderofori *in vitro*. Pertanto, abbiamo confrontato l'attività batteriostatica dei ceppi selvaggi di *P. putida/fluorescens* B10 e *P. aeruginosa* PAO1 con quella dei rispettivi mutanti pioverdina-difettivi (Visca *et al.*, 1994) in un saggio di antibiosi nei confronti del batterio fitopatogeno *E. carotovora* subsp. *carotovora in vitro*. Entrambi i mutanti erano incapaci di esercitare alcuna attività inibitoria nei confronti di *E. carotovora*, indipendentemente dalla concentrazione di ferro nel mezzo colturale, contrariamente ai ceppi parentali che possedevano un'attività antibatterica ferro-regolata. Inoltre, abbiamo dimostrato che la maggiore inibizione determinata da *P. aeruginosa* PAO1 rispetto a quella determinata da *P. putida/fluorescens* B10 è dovuta alla superiore quantità di pioverdina_{PAO1} che *P. aeruginosa* PAO1 produce e rilascia nel mezzo colturale (Figura 1).

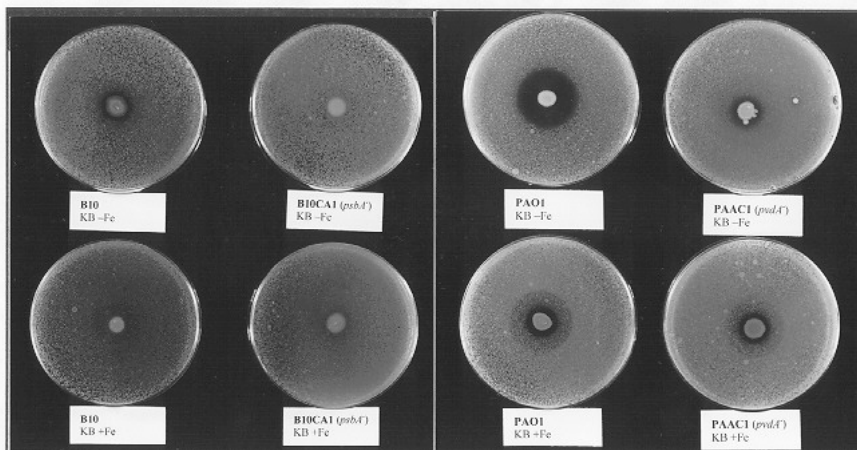


Fig. 1. Saggio di antibiosi *in vitro*. Sospensioni di 10 μ l di *Pseudomonas* coltivati in KB ($\cong 10^6$ CFU) sono stati depositati al centro di piastre di KB con o senza l'aggiunta di FeCl_3 100 μ M. Le piastre sono state incubate a 28°C per 24 ore prima di essere spruzzate con una sospensione colturale di *E. carotovora* ($\cong 10^6$ CFU). Le piastre sono state ulteriormente incubate a 28°C per 24 ore. Le zone di inibizione della crescita di *E. carotovora* è visibile come un alone che circonda l'inoculo centrale di *Pseudomonas*. I ceppi ed il terreno utilizzati sono indicati sotto ciascuna piastra. KB -Fe, terreno KB; KB + Fe, terreno KB addizionato con 100 μ M FeCl_3 .

Caratterizzazione, in *Pseudomonas putida/fluorescens* B10, dell'omologo funzionale del gene *pvdS* di *P. aeruginosa* e studio della regolazione trascrizionale ferro-dipendente di *psbA*

Al fine di indagare le differenze a livello di regolazione trascrizionale dei geni biosintetici della pioverdina in specie di *Pseudomonas* patogene ed ambientali, abbiamo condotto studi sulla regolazione del gene *psbA*. Esperimenti di ibridazione Northern e Western hanno dimostrato che tale gene viene trascritto e tradotto solo in condizioni colturali di carenza di ferro. Il confronto tra le sequenze promotore di *psbA* (*PpsbA*) di *P. putida/fluorescens* B10 e *pvdA* (*PpvdA*) di *P. aeruginosa* PAO1 ha evidenziato una omologia del 68% (Leoni *et al.*, 1996) (Figura 2 A).

Entrambe le regioni non contengono sequenze canoniche riconosciute da ⁷⁰ né di legame per Fur (Figura 2 A), mentre sono presenti la ISB, caratteristica dei promotori dei geni PvdS-dipendenti di *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2002), e la sequenza TCCTA, presente nelle corrispondenti regioni dei promotori dei geni *algD* e *algT* di *P. aeruginosa* (Schurr *et al.*, 1995). L'analisi dei siti di inizio della trascrizione di *psbA*, mediante *primer extension*, ha permesso di identificare 4 diversi siti d'inizio della trascrizione (rispettivamente a 90, 88, 49 e 44 bp a monte dell'ATG di *psbA*) (Figura 2 A e B). Inoltre, i trascritti T2 e T4 di *psbA* corrispondono ai trascritti T1 e T2 di *pvdA*, rispettivamente. E' interessante notare che mentre il trascritto più abbondante di *psbA* era il T4,

nelle stesse condizioni sperimentali, il trascritto più rappresentato di *pvdA* era il T1 (Leoni *et al.*, 1996).

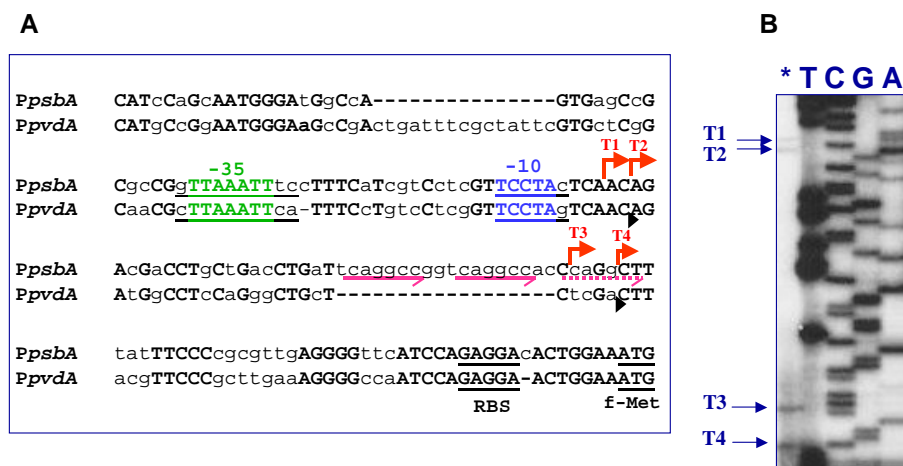


Fig. 2. Analisi strutturale del promotore del gene *psbA*. (A) Allineamento della regione di 158 nt a monte del codone di inizio (ATG) del gene *psbA* di *Pseudomonas* B10 con il promotore del gene *pvdA* di *P. aeruginosa*. I nucleotidi identici sono riportati in lettere maiuscole ed in grassetto. Le frecce indicano i siti di inizio della trascrizione minori (T1 e T2) e maggiori (T3 e T4) di *psbA* e la loro direzione. I motivi ISB e TCCTA conservati in entrambe le sequenze contenuti nelle regioni -35 e -10, rispettivamente, sono sottolineati. I putativi siti di legame del ribosoma (RBS) ed i codoni di inizio della trascrizione (f-Met) di entrambi i geni sono indicati con una linea tratteggiata. La posizione delle sequenze ripetute dirette conservate è indicata da due emifrecce sotto la sequenza, mentre la terza sequenza ripetuta diretta parzialmente conservata è indicata da una emifreccia tratteggiata sotto la sequenza. I triangoli pieni sotto la sequenza di *pvdA* indicano i siti di inizio della trascrizione T1 e T2 di tale gene. (B) Localizzazione dei siti di inizio della trascrizione di *psbA*. L'asterisco indica l'analisi di *primer extension* dell'RNA messaggero di *psbA*, ottenuti utilizzando l'oligonucleotide PE*psbARV*. Le corsie T, C, G ed A rappresentano i marcatori di sequenza di pCAΔSh con lo stesso oligonucleotide. Tali reazioni di sequenza sono state fatte correre in parallelo con i prodotti della *primer extension* per determinare esattamente le estremità al 5' del trascritto. Le frecce poste sulla sinistra della figura indicano i siti di inizio della trascrizione T1, T2, T3 e T4 di *psbA*.

L'allineamento dei due promotori ha permesso di evidenziare la presenza di una delezione di 14 nt e di una inserzione di 18 nt posizionate a -49 e -137 a monte dell'ATG di *psbA*, rispettivamente (Figura 2 A). A causa di tale inserzione in *PpsbA*, il sito T4 si trova ad una maggiore distanza dall'ISB rispetto al T2 di *pvdA* (Figura 2 A). Inoltre, l'inserzione contiene due ripetizioni dirette (TCAGGCCggTCAGGCC) seguite da una ripetizione diretta parzialmente conservata (cCAGGct). L'insieme delle caratteristiche strutturali identificate in *PpsbA* suggeriva che un fattore sigma, omologo a *pvdS* di *P. aeruginosa*, potesse essere coinvolto nella regolazione del gene *psbA*. Pertanto, abbiamo valutato l'attività di *PpsbA* in un mutante nel locus *pvdS* di *P. aeruginosa* e nell'ospite eterologo *Escherichia coli*, utilizzando la fusione trascrizionale *PpsbA::lacZ*. I risultati hanno dimostrato che l'attività di *PpsbA* era strettamente dipendente dalla presenza del gene *pvdS* di *P. aeruginosa* (cromosomico od *in trans*). Quindi, esperimenti di complementazione ci hanno permesso di identificare il gene omologo a *pvdS*, denominato *psbS* in *P. putida/fluorescens* B10. La

sequenza aminoacidica di PsbS mostra estesa similitudine con i fattori sigma alternativi della famiglia degli ECF appartenenti al sottogruppo degli *iron starvation sigma factors*. A questo sottogruppo di ECF appartengono fattori sigma accomunati da importanti caratteristiche: i) una struttura minimalista tipica dei sigma alternativi appartenenti alla famiglia degli ECF; ii) una espressione finemente regolata a livello trascrizionale dal repressore Fur; iii) il coinvolgimento nella regolazione di geni e/o operoni necessari per l'acquisizione del ferro. Infatti, l'analisi della regione di DNA a monte di *psbS* ha evidenziato la presenza dei tipici motivi di legame per il repressore Fur (Fur-box). L'appartenenza di PsbS alla sottoclasse degli *iron starvation sigma factors* è stata anche confermata mediante un'analisi filogenetica. Esperimenti di transattivazione in *E. coli* ad in *P. aeruginosa* PAO1 hanno dimostrato che PsbS è necessario per l'espressione di *psbA* in *P. putida/fluorescens* B10 e che è funzionalmente interscambiabile con il gene *pvdS* di *P. aeruginosa*. Inoltre, esperimenti FURTA (FUR titration assay) condotti sui promotori dei geni *psbA* e *psbS* hanno dimostrato che il repressore Fur è in grado di legare il promotore del gene *psbS* ma non *PpsbA in vivo*. Questi risultati spiegano l'assenza di Fur-box su *PpsbA* e dimostrano che, come in altre specie di *Pseudomonas* fluorescenti, la regolazione ferro-dipendente dei geni biosintetici della pioverdina_{B10} in *P. putida/fluorescens* B10 avviene con un meccanismo a cascata. In presenza di alte concentrazioni di ferro, Fur si lega sul promotore del gene *psbS*, inibendone la trascrizione. Quando la concentrazione intracellulare di ferro è bassa, la repressione operata da Fur viene meno e il fattore sigma PsbS viene espresso ed è in grado di attivare l'espressione del gene *psbA*.

Regolazione differenziale pioverdina-dipendente dei promotori *psbA* e *pvdA* in *Pseudomonas* patogeni ed apatogeni

Allo scopo di indagare se tali promotori rispondessero a stimoli ambientali aggiuntivi rispetto alla carenza di ferro, è stata confrontata l'attività di tali promotori in *P. putida/fluorescens* B10, in *P. aeruginosa* e nei rispettivi mutanti L-Orn N⁵-ossigenasi-difettivi. È stato osservato che l'espressione ferro-dipendente di *psbA* e di *pvdA* è quantitativamente comparabile in *P. aeruginosa* e nel mutante pioverdina_{PAO1}-difettivo. Invece, in *P. putida/fluorescens* B10 l'attività del promotore eterologo *PpvdA* era marcatamente ridotta rispetto a quella di *PpsbA*, mentre entrambe le fusioni sono silenti nel mutante pioverdina_{B10}-difettivo di *P. putida/fluorescens* B10. In tale mutante, l'attività di entrambi i promotori poteva essere ripristinata con l'aggiunta nel mezzo di coltura di pioverdina_{B10}. Tali risultati chiaramente dimostrano che entrambi i promotori sono soggetti ad induzione da sideroforo in *P. putida/fluorescens* B10, fenomeno non osservabile in *P. aeruginosa* PAO1, neanche nei mutanti di *P. aeruginosa* PAO1 bloccati in fasi successive della biosintesi della pioverdina_{PAO1} (Visca *et al.*, 1992 (Figura 3)).

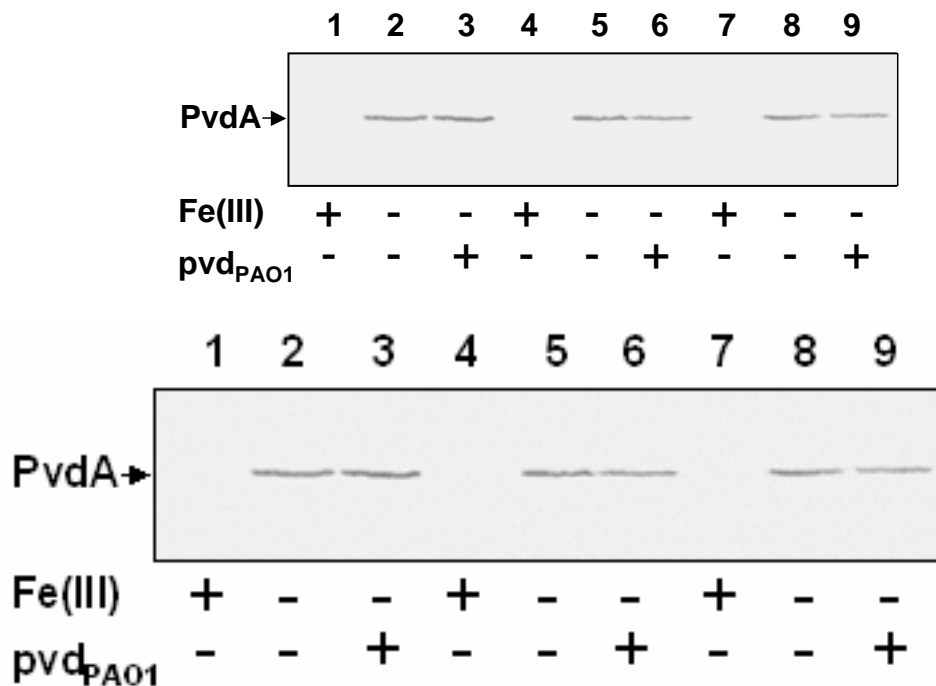


Fig. 3. Analisi in Western blot dell'espressione ferro-regolata di PvdA nel ceppo selvaggio *P. aeruginosa* e nei mutanti PALS125 e PALS106. La proteina PvdA di 50 kDa è stata evidenziata in estratti cellulari di *Pseudomonas* in fase esponenziale ($A_{600} \cong 0.5$) coltivate in terreno KB addizionato con 100 μM FeCl_3 [Fe(III)] o con 50 μM di pioverdina_{PAO1} (pvd_{PAO1}), come indicato al di sotto della figura, utilizzando un anticorpo sierico policlonale anti-PvdA. Corsie 1, 2 e 3, *P. aeruginosa* PAO1 (ceppo selvaggio); corsie 4, 5 e 6, PALS106 (pvdC1); corsie 7, 8 e 9, PALS125 (pvdC3). La posizione di PvdA è indicata a sinistra.

L'induzione da sideroforo di *PpsbA* non è mediata da una sovraregolazione di *psbS*, dal momento che tale gene è espresso a livelli confrontabili sia nel ceppo selvaggio che nel mutante di *P. putida/fluorescens* B10. I differenti motivi strutturali osservati confrontando *PpvdA* e *PpsbA* (ovvero, la presenza di tre sequenze ripetute dirette TCAGGCC) sembrano non essere coinvolti nell'autoinduzione da sideroforo, dal momento che entrambi rispondono positivamente alla pioverdina_{B10} nel sistema di *P. putida/fluorescens* B10. Pertanto, i geni *psbA* e *pvdA* presentano una simile regolazione ferro-dipendente, ma il profilo di regolazione trascrizionale dei due sistemi è solo parzialmente sovrapponibile, dal momento che il gene *pvdA* non risponde all'autoinduzione da sideroforo in *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 4).

Il fenomeno di induzione dell'espressione di *psbA* mediato dalla pioverdina_{B10} è il primo esempio di autoinduzione da sideroforo omologo. Infatti, l'autoinduzione da sideroforo è stata dimostrata nel sistema *pupIR-pupB* di *P. putida* WCS358. Infatti, in *P. putida* WCS358 il recettore PupB, codificato dal gene *pupB*, è deputato al trasporto specifico delle pioverdine eterologhe BN7 e BN8 (Koster *et al.*, 1994; Venturi *et al.*, 1995b). La trascrizione di *pupB* dipende dalla carenza di ferro e dalla presenza di ferripioverdine_{BN7/BN8}. Per l'espressione ferro-dipendente di *pupB* sono necessari i

regolatori PupI e PupR. PupR è una proteina transmembrana che attiva l'espressione di *pupB* mediante l'attivazione dell'ECF PupI in presenza di ferrioverdine_{BN7/BN8}, mentre ne inibisce l'attività in assenza dei siderofori induttori (Koster *et al.*, 1994). Ancora non è stato possibile chiarire se un simile meccanismo di regolazione in grado di modulare l'attività di PvdS a seconda dello stato di legame del recettore con la ferrioverdina_{B10} sia presente anche in *P. putida/fluorescens* B10. Una tale sistema di regolazione assicurerebbe l'espressione di *psbA* soltanto in quelle condizioni ambientali nelle quali la pioverdina_{B10} mostra una massima efficienza nell'acquisire il ferro.

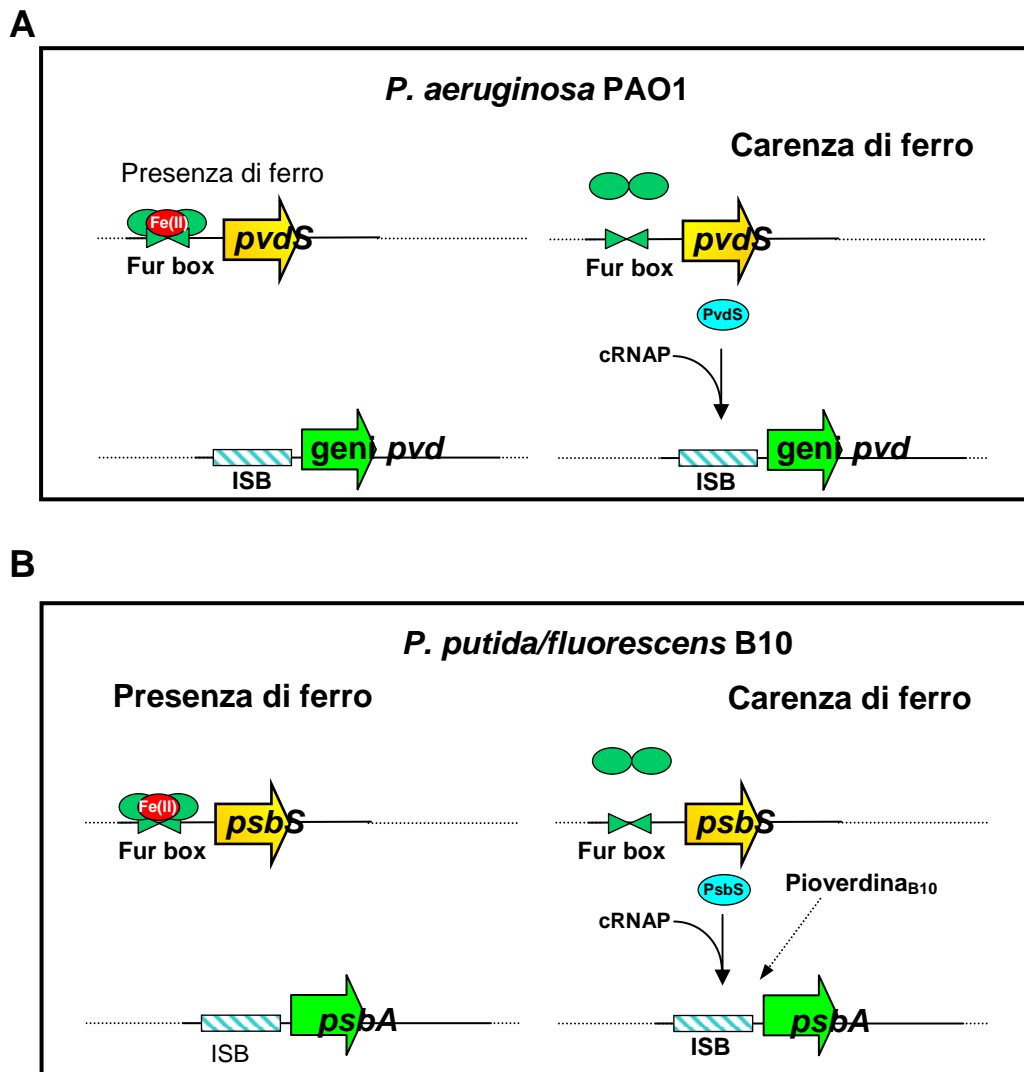


Fig. 4. Modelli proposti della regolazione dei geni della pioverdina in *P. aeruginosa* PAO1 ed in *P. putida/fluorescens* B10. (A) In *P. aeruginosa* PAO1, la presenza di ferro inibisce la trascrizione del gene *pvdS* mediante il legame del complesso dimerico Fur-Fe(II) sulle Fur-box presenti sul promotore di tale gene. In assenza di ferro, la repressione operata da Fur viene meno ed il gene *pvdS*

è trascritto. Il prodotto di tale gene è un sigma alternativo ECF che, riconoscendo l'*iron starvation box* (ISB) presente sui promotori dei geni della pioverdina (*pvd*), conferisce specificità al *core* della RNA polimerasi (RNAP) affinché tali geni vengano trascritti. (B) In *P. putida/fluorescens* B10, l'espressione del gene *psbA* è controllata in modo simile dal sigma alternativo ECF P_{sbS}, Fur-regolato. Un ulteriore livello regolativo è conferito dalla pioverdina_{B10} esogena che esercita una regolazione positiva sull'espressione del gene biosintetico della pioverdina_{B10} *psbA*

Bibliografia

- Ambrosi C., Leoni L., Putignani L., Orsi N., Visca P. (2000). Pseudobactin biogenesis in the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* strain B10: identification and functional analysis of the L-ornithine *N*⁵-oxygenase (*psbA*) gene. *J. Bacteriol.* **182**: 6233-6238.
- Ambrosi, C., Leoni L., Visca, P. (2002). Different responses of pyoverdine genes to autoinduction in *Pseudomonas aeruginosa* and the group *Pseudomonas fluorescens-Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4122-4126.
- Bloemberg, G.V., B.J. Lugtenberg, 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**:343-350.
- Boruah, H.P., Kumar, B.S. 2002. Plant disease suppression and growth promotion by a fluorescent *Pseudomonas* strain. *Folia Microbiol (Praha)*.**47**:137-143.
- Budzikiewicz, H., 2001. Siderophores of the human pathogenic fluorescent pseudomonads. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**:1-6.
- Haas, D., Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117-153.
- Koster, M., van Klompenburg, W. Bitter, W. Leong, J. Weisbeek P. 1994. Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. *EMBO J.* **13**:2805-2813.
- Leoni, L., Ciervo, A. Orsi, N. Visca, P. 1996. Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J. Bacteriol.* **178**:2299-2313.
- Leoni L., Visca P. (1999). Iron-regulated gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **3**:493-513 (Review).
- Leoni L., Orsi N., de Lorenzo V., Visca P. (2000). Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **182**:1481-1491.

- Leoni, L., Ambrosi C., Petrucca A., Visca, P. (2002). Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promoting *Pseudomonas* B10. FEMS Microbiol. Lett. **208**:219-225.
- Maurhofer, M., Reimann, C. Schmidli-Sacherer, P. Heeb, S. Haas, D. Défago G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathology **88**:678-684.
- Meyer, J.M. 1992. Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. J. Gen. Microbiol. **138**:951-958.
- Ochsner, U.A., Wilderman, P.J. Vasil, A.I. Vasil M.L. 2002. GeneChip(R) expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. Mol. Microbiol. **45**:1277-1287.
- O'Sullivan, D.J., F. O'Gara, 1992. Traits of fluorescens *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rev. **56**: 662-676.
- Palleroni, N.J., 1994. Pseudomonaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Eds. Jholt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T.
- Putignani, L., Ambrosi C., Ascenzi P., Visca P. 2004. Expression of L-ornithine N(delta)-oxygenase (PvdA) in fluorescent *Pseudomonas* species: an immunochemical and in silico study. Biochem. Biophys. Res. Commun. **313**:245-257.
- Schurr, M.J., Yu, H. Martinez-Salazar, M. Hibler, N.S. Deretic V. 1995. Biochemical characterization and posttranslational modification of AlgU, a regulator of stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Bioph. Res. Comm. **216**: 874-880.
- Sharma, A., Johri, B.N. 2003. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). Microbiol. Res.**158**:77-81.
- Thomashow LS. 1996. Biological control of plant root pathogens. Curr. Opin. Biotechnol. **7**:343-347.
- Venturi, V., Weisbeek, P. Koster, M. 1995. Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. Mol. Microbiol. **17**:603-610.
- Visca, P., Ciervo A., Orsi, N. 1994. Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-Ornithine N⁵-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **176**:1128-1140.

- Visca, P., Serino, L. Orsi, N. 1992. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants blocked in the synthesis of pyoverdine. J. Bacteriol. **174**:5727-5731.
- Visca, P., Leoni L., Wilson M.J., Lamont I.L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. Mol. Microbiol. **45**:1177-1190 (Review).

BIOSICUREZZA DEGLI IMPIANTI BIOTECNOLOGICI: VERIFICA DELLE MISURE DI CONTENIMENTO DEI MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI.

Gramiccioli G.¹, Mirri S.¹, Pascucci C.¹, Camerini B.¹, Corrente G.¹, Nucera E.¹, Amaddeo D.², Ciabatti I.², Lorenzetti R.², Zini M.², Pietrangeli B.³

¹Direzione Ricerca e Sviluppo, Sigma Tau, Pomezia.

²Dip. di Virologia e Biotecnologie, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana, Roma.

³Dip. Insediamenti Produttivi ed Interazioni con l'Ambiente. Istituto Superiore Prevenzione e Sicurezza sul Lavoro, Roma.

Introduzione

La valutazione dei rischi connessi con la manipolazione di microrganismi geneticamente modificati (MOGM), sia per il lavoratore che per l'ambiente, deve considerare una serie di elementi (art.5 all.III del DLgs.206/2001) tra cui le caratteristiche di pericolosità del microrganismo ricevente, del microrganismo donatore, del MOGM derivante, del vettore utilizzato e dell'inserito. Da tale valutazione derivano le misure di contenimento che garantiscono la protezione della salute dei lavoratori e dell'ambiente esterno.

In un processo biotecnologico il contenimento è perseguito attraverso l'applicazione di misure di sicurezza biologiche, tecniche e gestionali. Le prime riguardano la scelta del microrganismo e tendono a limitarne la sopravvivenza nell'ambiente (uso di mutanti auxotrofici, di plasmidi con capacità di trasferimento ridotte, ecc.). Le misure tecniche si riferiscono alla corretta progettazione della struttura (laboratorio, impianto di produzione) e sono relative alla costruzione degli stessi, alle attrezzature e al processo di lavorazione e/o di produzione). Le misure gestionali consistono in regole pratiche da seguire per la manipolazione in sicurezza dei microrganismi e sono definite dalle cosiddette GLP (Good Laboratory Practices) per i laboratori di ricerca e dalle GILSP (Good Industrial Large Scale Practices) per la produzione su larga scala .

Il D.Lgs. 206/2001 prevede tra le informazioni da fornire all'Autorità competente (Ministero della salute) nella notifica di impiego di MOGM di classe 3 e 4 (art.10), le procedure e i piani per la verifica dell'efficacia delle misure di contenimento. Tali verifiche sono infatti tanto più importanti quanto più pericolosi sono i microrganismi che si manipolano. Ma indagini sistematiche effettuate nell'ambiente di lavoro permettono di monitorare il corretto svolgimento del lavoro e a rilevare immediatamente l'esistenza di condizioni operative cui può conseguire una potenziale esposizione, ovvero il verificarsi di dispersioni di microrganismi.

Il monitoraggio ambientale assume rilevanza più che nella stima della esposizione ad agenti biologici (per i quali non esistono limiti di esposizione con funzione di valori soglia), come sistema di verifica della efficacia delle misure di contenimento dei MOGM. In tale contesto l'approccio preventivo deve essere tale da ridurre al più basso livello possibile la contaminazione ambientale e l'entità dell'esposizione individuale.

La ricerca dei possibili rilasci di MOGM viene talvolta effettuata dagli organismi preposti al controllo durante le visite ispettive ed è rivolta alla verifica della dispersione ambientale dei MOGM di lavorazione negli ambienti di lavoro attraverso il prelievo di campioni dalle superfici dei laboratori, spogliatoi, bagni, ecc. Il controllo è effettuato su specifici terreni selettivi di crescita e l'identificazione avviene utilizzando normalmente l'antibiotico resistenza o il marker genetico introdotto in fase di modificazione.

Il rilascio di MOGM dall'ambiente confinato del laboratorio e/o dell'impianto biotecnologico può teoricamente avvenire in diversi modi: acque di scarico, rifiuti solidi contaminati, aria (attraverso il ricambio, filtri di apparecchi di condizionamento), persone (tramite indumenti contaminati), incidenti di diversa natura (in fase di stoccaggio, trasporto campioni, manipolazione). Attualmente in letteratura non sono riportati eventi o casi di dispersioni accidentali di MOGM nell'ambiente.

In questo lavoro è stato effettuato un monitoraggio ambientale finalizzato alla ricerca di MOGM nelle aree di lavoro per verificare l'efficacia delle misure di contenimento e delle procedure di disinfezione previste nel caso di sversamenti accidentali durante le lavorazioni.

La sperimentazione è stata eseguita nei laboratori di ricerca biotecnologica della SIGMA TAU di Pomezia ed in quelli del Dipartimento di Virologia e Biotecnologie dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZPS) di Lazio e Toscana, entrambi autorizzati alle operazioni con MOGM ai sensi del D.Lgs 206/2001.

Il protocollo sperimentale ha previsto:

- la valutazione della contaminazione microbica ambientale attraverso il campionamento e l'analisi dell'aria e delle superfici di lavoro, durante le routinarie attività di laboratorio e durante specifiche operazioni;
- la valutazione della validità delle procedure di disinfezione adottate al termine dell'attività lavorativa e/o nel caso di incidente comportante uno sversamento di materiale contaminato;
- l'isolamento e la identificazione di un ceppo geneticamente modificato a seguito di rilascio accidentale del MOGM nelle acque di scarico del laboratorio.

I MOGM utilizzati sono stati diversi ceppi di *Escherichia coli* (XL-1 Blue; XL-1 Blue K^R; BL21 Gold (DE3) pLysS e TOP10) e di *Saccharomyces cerevisiae* (EKY3)

TECNICHE DI MONITORAGGIO NELL'AMBIENTE DI LAVORO

Prove sperimentali eseguite nei laboratori della SIGMA-TAU hanno permesso di mettere a punto una serie di metodiche di monitoraggio ambientale con riferimento a *E.coli* e *S. cerevisiae*.

Prove di crescita su diversi terreni di coltura

Per tre ceppi di *E.coli* geneticamente modificati (XL-1 Blue; XL-1 Blue K^R; BL21 Gold (DE3) pLysS ed il ceppo non MOGM di *E. coli* 92 F è stata eseguita inizialmente una valutazione delle caratteristiche di crescita a 37° e a 44° C su alcuni terreni selettivi e/o differenziali o contenenti inattivanti dell'attività disinfettante: Mc Conckey agar 3, Violet red bile, Rapid'E. coli, Tryptone soy agar (TSA), TSA + inattivanti, TBX, Endo.

I dati, riportati in Tabella 1, suggeriscono che i terreni utilizzati, ad eccezione del Mc Conckey agar 3 e del Violet red bile, sono risultati validi per la crescita e la selettività dei ceppi di *E. coli* testati.

I terreni Rapid'E. coli e TBX risultano essere i più adeguati.

Tabella 1

TERRENI	BL 21 Gold		XL 1 Blue		XL1 Blue K ^R		92 F	
	37°	44°	37°	44°	37°	44°	37°	44°
Mc Conckey 3	+/- ?	Nd	+/-	nd	+/-	nd	+	nd
Violet red bile	+/- ?	Nd	+/- ?	nd	+/- ?	nd	+	nd
Rapid' E. coli	Nd	+	+	+	nd	+	+	+
TSA	+	Nd	+	nd	+	nd	Nd	nd
TSA+inattivanti	+	Nd	+	nd	+	nd	Nd	nd
TBX	+	+	+	+	+	+	Nd	nd
Endo	+	Nd	+	nd	+	nd	Nd	nd

Legenda: 0: nessuna crescita; +/-: crescita non ottimale e/o non conforme;+: crescita ottimale e conforme; +/- ?: crescita ma solo alcuni criteri distintivi soddisfatti; nd: non determinato.

Determinazione della velocità di azione disinfettante con criterio quantitativo secondo norme CEN

Il test è stato eseguito secondo la norma europea sui disinfettanti prEN 1276..

I risultati ottenuti espressi in UFC (Tabella 2) mostrano che il disinfettante a base ammonica quaternaria Benzoxonio Cl⁻ allo 0,1 % esercita sui tre ceppi di *E. coli* testati una rapida e radicale

azione disinfettante, poiché nelle piastre contenenti le membrane trattate con il disinfettante non si è sviluppata alcuna colonia batterica, mentre nelle piastre di controllo è stato osservato un numero di colonie > di 300 UFC.

Tabella 2

CEPPI MOGM			
	1 min.	5 min.	15 min.
BL 21 Gold (DE3)p Lys S	0	0	0
Controllo	> 300	> 300	> 300
XL 1 Blue	0	0	0
Controllo	> 300	> 300	> 300
XL 1 Blue K ^R	0	0	0
Controllo	> 300	> 300	> 300

Determinazione della carica batterica su superficie solida

L'esperimento è stato realizzato con il dispositivo Rodac Weight (RW) costituito da un supporto metallico al quale, nella parte superiore è fissato un timer, ed in quella inferiore sono assicurate delle piastrine Petri (24 cm²) contenenti i terreni di coltura. Il dispositivo RW è stato posto in 3 punti equidistanti tra loro e dalle pareti di ciascun locale monitorato. In ogni punto le piastre sono state poste a contatto con il pavimento per 10 secondi e quindi incubate in termostato a 37° C (TSA) e 44° C (Rapid'E. coli) per 48-72 ore.

I risultati ottenuti espressi in UFC (Tabella 3) mostrano che in tutti i locali monitorati non è stata osservata presenza di ceppi di *E. coli*.

Tabella 3

Locali	Rapid'E. coli			TSA			TSA+inattivanti		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
136/L ^a	0	0	0	28	15	8	12	21	34
138/L ^a	0	0	0	2	0	11	Nc	33	21
148/L ^a	0	0	0	12	18	18	16	21	11
152/L ^a	0	0	0	16	22	nc	56	32	22
153/L ^a	0	0	0	26	33	14	11	9	11
155/L ^a	0	0	0	0	0	nc	32	10	33
164/L ^a	0	0	0	1	58	0	12	5	2
242/L ^a	0	0	0	nc	Nc	nc	53	18	50
257/L ^a	0	0	0	nc	1	nc	32	16	14
163/L ^b	0	0	0	5	64	53	37	40	20
169/L ^b	0	0	0	6	Nc	nc	24	77	nc
121/L ^c	0	0	0	nc	50	28	27	23	8
158/L ^d	0	0	0	nc	nc	33	Nc	nc	45

Legenda : **1**: punto di rilevamento 1; **2**: punto di rilevamento 2; **3**: punto di rilevamento 3
L^a: laboratori MOGM; L^b: laboratori non MOGM con uso di batteri; L^c: laboratori MOGM senza uso di batteri; L^d: stanze di servizio; nc: non contabile (> 300).

Rilevamento aereo dinamico

Il test consiste nell'aspirare volumi noti di aria su terreni selettivi per verificare la presenza di ceppi di *E. coli*. È stato utilizzato il dispositivo Surface Air Sistem (SAS) in grado di aspirare 100 litri di aria/minuto. L'aria aspirata è stata poi convogliata sulle piastre Petri contenenti i terreni di coltura Rapid'E. coli 2 (selettivo e differenziale per *E. coli*) e TSA (per valutare la carica microbica totale).

Dopo 10 minuti di aspirazione le piastre sono state incubate in termostato a 37° C (TSA) e 44° C (Rapid'E. coli) per 48-72 ore.

I risultati ottenuti espressi in UFC/m³ (Tabella 4) mostrano che in tutti gli ambienti monitorati non è stata rilevato alcun ceppo di *E. coli*.

Tabella 4

Locali	Rapid'E.coli	TSA
136/L ^a	0	18
138/L ^a	0	25
148/L ^a	0	28
152/L ^a	0	10
153/L ^a	0	15
155/L ^a	0	44 (*)
164/L ^a	0	25
242/L ^a	0	10
257/L ^a	0	18
163/L ^b	0	65
169/L ^b	0	63
121/L ^c	0	25
158/L ^d	0	218

Legenda. L^a: laboratori MOGM; L^b: laboratori non MOGM con uso di batteri; L^c: laboratori MOGM senza uso di batteri; L^d: stanze di servizio; (*) : presenza di alcune colonie fungine.

Rilevamento della carica microbica in un esperimento di simulazione di incidente

Nella prova di simulazione di incidente (spargimento di batteri in ambiente confinato) sono state adottate modalità analoghe a quelle che devono essere osservate in una situazione reale.

Nell'esperimento, effettuato con il ceppo di *E. coli* (92F) non modificato geneticamente, da una brodocoltura in TSB in fase esponenziale (18-24 h) sono stati preparati 100 ml di sospensione batterica contenente 10⁸ cellule/ml . La sospensione è stata quindi versata in piastre quadrate in vetro-alluminio per simulare uno spargimento accidentale. Sono state effettuate quindi le operazioni di asciugatura e disinfezione con base ammoniacale quaternaria Benzoxonio Cl⁻ allo 0,1 %.

Le superfici così decontaminate sono state quindi campionate con il metodo delle piastre a contatto, mentre l'aria circostante è stata monitorata con il sistema dinamico Surface Air System e con metodo statico.

Sono stati effettuati in sequenza 3 rilevamenti: nel primo, subito dopo lo sversamento, è stata valutata la carica batterica aerea totale e specifica con metodo dinamico SAS sui terreni TSA e Rapid'E. coli 2.

Nel secondo rilevamento, eseguito subito dopo asciugatura con carta della superficie contaminata, sono state valutate la carica batterica totale, quella specifica per *E.coli* (sistema dinamico SAS) e di superficie (sistema RW) sui terreni TSA e Rapid'E. coli 2 . Nel terzo

rilevamento, effettuato dopo 1 minuto di disinfezione, sono state valutate la carica batterica totale e specifica aerea con metodo statico e dinamico (SAS) sui terreni TSA e Rapid'E. coli 2 e quella di superficie (sistema RW) sui terreni TSA, Rapid'E. coli 2 e TSA+ inattivanti dell'azione disinfettante.

I risultati ottenuti (Tabella 5) mostrano che in nessun caso è stata rilevata la presenza nell'aria del ceppo di *E. coli*, indicando che la dispersione del batterio in aria dopo incidente avviene solo in particolari condizioni e che la disinfezione con base ammoniacale quaternaria Benzoxonio Cl⁻ allo 0,1 % è sempre rapida e completa.

Tabella 5. Test con *E. coli* 92 F.

Operazioni/sequenze temporali	Rilevamento aereo statico			Rilevamento aereo dinamico			Rilevamento superficie		
	TSA	TSAin	Rapid' E.coli	TSA	TSAin	Rapid' E.coli	TSA	TSAin	Rapid' E.coli
Subito dopo incidente	nd	nd	nd	12	nd	0	Nd	nd	nd
Dopo asciugatura	nd	nd	nd	12	nd	0	Nd	nd	nc
Dopo disinfezione	20	nd	0	14	nd	0	0	0	0

nc: non contabile (> 300)

nd: non determinato

E' stata inoltre monitorata l'eventuale produzione di bioaerosol durante alcune operazioni eseguite di routine nei laboratori: il travaso di brodocolture e la sonicazione di pellet microbici. Sono stati utilizzati il ceppo di *Escherichia coli* XL1 blue ed il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* EKY3.

Travaso di brodocolture

L'operazione prevede il trasferimento di brodocolture da beute da un litro in altre beute o in provettoni da centrifuga da 50 ml. Sono stati eseguiti 2 tipi di controllo: aereo, per mezzo di un dispositivo SAS e delle superfici di lavoro mediante il dispositivo Rodac.

Il controllo è stato eseguito ponendo a contatto con il bancone nove piastrelle disposte su tre file da tre nello spazio sottostante che separava i due recipienti ove era stato operato il passaggio delle brodocolture. Sono state utilizzati i terreni Rapid E.coli 2 per il ceppo di *E. coli* e Sabouraud agar supplementato con Penicillina G (50 mcg/ml) e Streptomycin (100 mcg/ml) per *S. cerevisiae*. Le piastre sono state incubate rispettivamente a 44°C e a 35°C per 72 ore.

Sonicazione di pellet microbici

L'operazione avviene per mezzo di un sonicatore racchiuso in un box per la protezione dell'operatore. Il materiale microbico viene sonicato in tubi dove viene introdotto il puntale del sonicatore. Viene quindi applicata alla sospensione batterica una serie di impulsi ((3-10sec/200-300W).

Il controllo aereo è stato eseguito un controllo con l'apparecchio SAS al momento dell'apertura del box di protezione. E' stato inoltre effettuato un ulteriore controllo aereo statico sulla superficie di sostegno immediatamente intorno al campione e sul piano del box di protezione. E' stata evidenziata una contaminazione di lieve entità (n.2 colonie di *E. coli* e n.1 colonia di *S. cerevisiae*) rilevata durante il travaso di brodocolture.

Isolamento e identificazione di un ceppo geneticamente modificato a seguito di rilascio accidentale del MOGM nelle acque di scarico del laboratorio.

La sperimentazione è stata eseguita presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Roma.

Il MOGM utilizzato è *E. coli* (TOP10) trasformato con un plasmide (pMTR1) contenente un inserto (ORF *gag*) codificante per la proteina capsidica p26 del virus dell'Anemia Infettiva Equina. Il MOGM risultante viene utilizzato per la produzione di proteine ricombinanti per l'impiego come antigeni in test sierologici per la diagnosi dell'Anemia Infettiva equina. Il MOGM, a differenza del ceppo selvatico, è resistente all'antibiotico ampicillina.

La simulazione di un rilascio accidentale di MOGM nelle acque di scarico del laboratorio ha considerato la possibilità che 10 litri di brodocoltura contenente MOGM, in tarda fase esponenziale di crescita (10^9 batteri/ml), confluissero nelle acque reflue dell'impianto di depurazione (contenente circa 10.000 litri di liquami).

Per tale simulazione un volume di 190 ml di refluo è stato addizionato a 1,9 ml di brodocoltura di MOGM contenente circa 10^8 cellule/ml. Dal campione di refluo sperimentalmente contaminato, e mantenuto a T ambiente in agitazione, sono stati effettuati prelievi (10 ml) a tempi successivi (subito dopo l'inoculo, a 4, 8 e 20 ore) che sono stati piastrati in tre repliche su terreno ID (terreno cromogeno selettivo per la rivelazione e la conta di *E.coli* betaD-glucuronidasi positivi e di altri coliformi), in presenza o meno di antibiotico (100 ug/ml di ampicillina) e incubati a 37°C per circa 20 ore.

Si è proceduto quindi alla conta delle colonie batteriche cresciute su piastra ed alla verifica della loro identità mediante ibridazione su colonia effettuata con una sonda specifica per il plasmide ricombinante pMTR1, impiegando un kit commerciale (Roche) basato sull'impiego di sonde marcate con digossigenina. In particolare la sonda utilizzata è stata ottenuta mediante amplificazione enzimatica (PCR) del gene *gag* .

Come controllo negativo sono stati impiegati 10 ml di refluo, prelevati immediatamente prima della contaminazione; per il controllo positivo è stata allestita una coltura di TOP10(pMTR1) in LB liquido, mantenendo il volume e la diluizione impiegati per la contaminazione sperimentale.

Sia il controllo negativo che i quattro prelievi eseguiti dal controllo positivo sono stati trattati come già descritto per i prelievi ottenuti dalla coltura contaminata sperimentalmente.

Il numero di colonie di TOP10(pMTR1) è riportato in Tabella 6.

Tabella 6

Tempi di prelievo (ore)	N° di colonie (UFC) su piastra senza antibiotico (diluizione 10^{-4})	N° di colonie (UFC) su piastra con antibiotico (diluizione 10^{-4})
0	266	430
4	78	124
8	0	29
20	0	4

Nel controllo negativo non si sono osservate colonie di TOP10 (pMTR1), mentre per il controllo positivo il numero di colonie è riportato in Tabella 7.

Tabella 7

Tempi di prelievo (ore)	N° di colonie (UFC) su piastra senza antibiotico (diluizione 10^{-6})	N° di colonie (UFC) su piastra con antibiotico (diluizione 10^{-6})
0	3	2
4	248	212
8	285	236
20	200	166

Dall'analisi dei risultati riportati in Tabella 6 si rileva la progressiva riduzione nel tempo del numero di colonie di MOGM, a fronte, invece, dell'atteso incremento del numero di colonie di MOGM in assenza di competizione da parte dei microrganismi presenti nel refluo (Tabella 7).

La presenza dell'antibiotico non ha comportato una riduzione nel numero di colonie di *E. coli* e ciò risulta verosimilmente attribuibile alla resistenza all'antibiotico ampicillina largamente diffusa tra questo gruppo di microrganismi nell'ambiente naturale.

Discussione

In questo lavoro sono riportate metodiche di monitoraggio ambientale di MOGM negli ambienti di lavoro e nelle acque reflue del laboratorio. Tale monitoraggio può essere considerato un metodo di autocontrollo per localizzare nel flusso del ciclo lavorativo i punti o le operazioni in cui può determinarsi, anche solo a seguito di eventi eccezionali, l'esposizione a possibili pericoli. Indagini di monitoraggio effettuate sistematicamente permettono di valutare l'effettiva frequenza con cui

si può verificare una contaminazione ambientale. Una volta definite le misure di contenimento, di severità proporzionata alla pericolosità dei microrganismi trattati ed al rischio di contaminazione presente, il monitoraggio costituisce il sistema di verifica dell'efficacia di tali misure e può essere quindi eseguito periodicamente.

Nelle pratiche di monitoraggio, la valutazione del grado di contaminazione microbiologica delle superfici trova indicazione per verificare l'efficacia dei sistemi di decontaminazione in uso e/o accertare l'assenza di dispersioni di microrganismi al di fuori delle aree di contenimento previste.

La ricerca di possibili rilasci di MOGM può essere inoltre effettuata dagli organismi preposti al controllo durante le visite ispettive agli impianti biotecnologici con la finalità di verificare la dispersione dei MOGM nell'ambiente di lavoro (spogliatoi, bagni, ecc.) e in quello esterno circostante l'impianto (su campioni di terreno, sulle acque reflue, ecc.). Il controllo del rilascio del MOGM nell'ambiente esterno risulta importante per le eventuali interazioni che il MOGM potrebbe avere con la struttura e la funzione degli ecosistemi e/o per l'eventuale diffusione di tratti genetici che potrebbero risultare nocivi all'uomo, agli animali e alle piante.

Bibliografia

- DLgs 12 aprile 2001, n.206. Attuazione della direttiva 98/81/CE che modifica la direttiva 90/219/CE, concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati. Gazzetta Ufficiale n.126 del 1 giugno 2001. Suppl. ordinario G.U. Serie generale n.126 del 1 giugno 2001.
- DLgs. 19 settembre 1994, n.626. Attuazione delle direttive 89/391/CEE, 89/654/CEE, 89/655/CEE, 89/656/CEE, 90/269/CEE, 90/270/CEE, 90/394/CEE e 90/679/CEE riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro. G.U. n.265 del 12 novembre 1994.
- Coordinamento tecnico per la prevenzione degli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano (1996). Linee guida per l'applicazione del DLgs 626/94.
- Atti del Convegno "Organismi geneticamente modificati: rischi connessi al rilascio nell'ambiente e all'esposizione professionale nei laboratori di ricerca". Genova 26 marzo 2004.
- Anonymous (1996). Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - test method and requirement. European Committee for Standardisation *prEN 1276*, CEN/TC 216 N 109.

- W.H.O (1995). Manuale di biosicurezza in laboratorio (II edizione). Annali dell'Istituto Superiore di sanità. Vol. 31.
- Assobiotec (2000). Norme tecniche in biotecnologia: vol.I – Processi su larga scala e di produzione.
- Vogel G., Kaderli M., Zajac P., Dumermuth E., Vogeli U. (2000). Monitoring vaccinia virus contamination in laboratories. In Biological Hazards Management: Fact and Fiction. Fourth Scientific Meeting and Annual Conference of European Biosafety Association. Amsterdam 20-21 November 2000
- Pettauer D., Kappeli O., Van den Eede G. (1998). Safety analysis of contained low-hazard biotechnology applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:649-654.
- Crook B., Cottam A.N. (1996). The current status of monitoring for process microorganisms in biotechnology: results of an industry questionnaire. *Ann. Occup. Hyg.* 40(2):223-232.
- Damiani G.(1999). Effetti e controlli ambientali. Atti del Seminario “Le biotecnologie”. pp.69-77.
- European Federation of Biotechnology (2000). Safe biotechnology 10: DNA content of biotechnological process waste. *Trends in Biotechnology* 18:141-146.
- Hamilton-Miller JM (2004). Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23(3):209-12.

DEFINIZIONE DI UN SISTEMA PER LA RACCOLTA E L'ELABORAZIONE DEI DATI NEI LABORATORI DI RICERCA BIOTECNOLOGICA NEL CAMPO BIOMEDICO.

ELABORAZIONE DI UN SISTEMA FORMATIVO/INFORMATIVO PER LA GESTIONE DEL RISCHIO NEI LABORATORI DI RICERCA BIOTECNOLOGIA, BIOMEDICA ED AGROALIMENTARE.

Bet P., Sossai D.

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

L'Unità n. 8, nell'ambito del progetto "Organismi geneticamente modificati: rischi connessi al rilascio nell'ambiente e all'esposizione professionale nei laboratori di ricerca", ha predisposto un sistema basato sulla distribuzione di questionari ai ricercatori che utilizzano microrganismi geneticamente modificati (MOGM) prendendo in esame alcuni Istituti Scientifici e Università campione sul territorio nazionale. I questionari sono uno strumento utile per il personale che opera quotidianamente nei laboratori di ricerca biomedica esposto, anche inconsapevolmente, al rischio di contrarre infezioni che possono essere anche molto gravi in seguito al contatto con microrganismi patogeni.

Prima di elaborare i questionari sono stati contattati i responsabili dei laboratori che utilizzano MOGM dell'Istituto Nazionale Ricerca sul Cancro di Genova (responsabile del progetto per l'Unità 8), dell'Istituto Gaslini di Genova, dell'Università di Genova, dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, dell'Università di Milano e dell'Istituto Oncologico di Padova, per illustrare il progetto di ricerca che, per essere realizzato in modo ottimale ha richiesto un fattivo contributo da parte di un numero considerevole di ricercatori che svolgono attività nel settore biomedico. Sono stati, inoltre, organizzati diversi incontri di lavoro con i responsabili delle altre Unità partecipanti al progetto, in particolare l'Unità n. 9, 11 e 6 durante i quali si è ampiamente discusso sui contenuti dei questionari in modo che potessero fornire le informazioni necessarie anche al fine di elaborare un efficace sistema formativo sulla base delle reali esigenze dei ricercatori.

I questionari, elaborati in formato elettronico, hanno fornito informazioni sugli agenti biologici e sui MOGM utilizzati, sulla valutazione del rischio, sullo spazio adibito a laboratorio, sulla gestione dell'attrezzatura adibita all'uso dei microrganismi geneticamente modificati, sul trasporto di materiale biologico, sullo smaltimento dei rifiuti, sulle procedure in caso di incidenti, sui dispositivi di protezione individuale e collettiva, sull'informazione e formazione ricevuta dai ricercatori, nonché sulla sorveglianza sanitaria. Si è cercato di porre i quesiti in modo molto completo e

dettagliato affinché i ricercatori e i responsabili dei laboratori incontrassero meno difficoltà possibili nella compilazione dei questionari.

Dopo l'elaborazione dei questionari sono stati effettuati incontri con il personale che utilizza MOGM nel corso dei quali sono stati presentati e distribuiti i questionari sia ai responsabili che ai ricercatori.

Con i responsabili dei laboratori e con alcuni ricercatori dell'Istituto Oncologico di Padova, presso cui non è stato possibile organizzare incontri, sono stati effettuati numerosi colloqui telefonici, durante i quali sono state presentate le principali motivazioni che hanno portato all'elaborazione del progetto e quindi dei questionari.

Dopo la distribuzione del materiale elaborato, i referenti di ciascun Istituto sono stati contattati in modo costante, sia per fornire eventuali spiegazioni sulle domande contenute nei questionari, sia per sollecitare la compilazione degli stessi da parte dei ricercatori interessati, alcuni dei quali hanno avuto difficoltà a fornire le informazioni richieste in quanto non erano a conoscenza della normativa e delle procedure relative all'utilizzo di MOGM.

Inoltre, nonostante i questionari fossero anonimi e si sia più volte precisato che i dati forniti dai ricercatori venissero utilizzati nel rispetto della privacy sia per le informazioni relative ai singoli ricercatori che per quelli relativi ai laboratori partecipanti al progetto, un ricercatore si è rifiutato di compilare e di far compilare al proprio personale i questionari in quanto non ha ritenuto che le procedure utilizzate fossero sufficienti a garantire l'anonimato dei ricercatori.

A parte l'eccezione riportata precedentemente i ricercatori contattati hanno collaborato attivamente alla realizzazione del progetto facendo pervenire i questionari sia per via elettronica che per posta.

In totale sono stati raccolti circa 100 questionari compilati dai responsabili dei laboratori e dai ricercatori che lavorano in modo costante con MOGM.

Da un'attenta analisi dei dati forniti dai ricercatori che operano nei laboratori biotecnologici sono emersi alcuni elementi interessanti che si riportano di seguito.

Gli operatori lavorano prevalentemente con agenti biologici di gruppo 1, tra questi il più utilizzato è *E.coli*, e svolgono operazioni che richiedono un livello di contenimento di classe 1. Inoltre le attività di manipolazione con gli MOGM che svolgono giornalmente hanno una durata media di 2-3 ore.

Tutti i laboratori coinvolti possiedono un proprio documento di valutazione del rischio e presentano le notifiche per l'impiego di agenti biologici e ai MOGM agli Enti territoriali di competenza, ma non sempre i ricercatori sono a conoscenza di queste informazioni.

Il Responsabile del Servizio di Prevenzione e Protezione è generalmente presente a livello di Istituto/Ente, anche se non è sempre noto ai ricercatori il suo compito ed il suo ruolo; inoltre, non tutti i laboratori sono provvisti di un responsabile per la sicurezza biologica.

Tutti i laboratori biomedici all'ingresso delle zone di lavoro sono muniti di appositi segnali di rischio biologico.

In tutti i laboratori è presente un elenco di materiale potenzialmente pericoloso inerente le sostanze chimiche, radioattive, gli agenti biologici e i MOGM; gli appositi segnali di rischio biologico vengono generalmente utilizzati per segnalare gli spazi dedicati all'uso di agenti biologici e MOGM dove è sempre presente un lavandino. Tali spazi non vengono utilizzati per consumo di cibo e bevande.

E' da rilevare, inoltre, che esistono procedure inerenti la pulizia del banco da lavoro, delle mani nonché tutte le procedure di gestione delle attrezzature che si utilizzano in laboratorio ed altresì quelle di trasporto del materiale biologico e di smaltimento dei rifiuti biologici pericolosi, ma non sono quasi mai scritte.

I rifiuti biologici pericolosi nei laboratori dove vengono manipolati microorganismi geneticamente modificati sono sempre smaltiti in modo corretto.

Tutti gli operatori di questo settore conoscono le procedure da attuare in caso di incidente ma pochissimi laboratori sono dotati di kit di decontaminazione.

I dispositivi di protezione individuale sono utilizzati da tutti gli operatori in particolare i guanti, i camici (meno frequentemente quelli monouso), mentre gli occhiali con protezione laterale non sono usati in alcun laboratorio.

I dispositivi di protezione collettiva come le cappe vengono utilizzate da tutti i lavoratori in laboratorio e sono esclusivamente cappe a flusso laminare verticale, mentre le centrifughe presenti nei laboratori sono dotate quasi tutte di coperchio antiaerosol.

Tutti gli operatori si ritengono informati sui rischi degli agenti biologici e MOGM, tuttavia richiedono un aggiornamento periodico su tale argomento anche attraverso la produzione di manuali di sicurezza biologica con precise procedure da seguire in caso di manipolazione di agenti biologici. Infine, un altro elemento importante emerso dall'analisi dei questionari distribuiti ai lavoratori dei laboratori di ricerca, è il fatto che in alcuni laboratori la sorveglianza sanitaria riguarda solo il personale di ruolo, trascurando i lavoratori a tempo determinato.

L'analisi dei questionari è stata effettuata in stretta collaborazione con l'Unità n. 11 (che ha svolto un lavoro analogo al nostro Istituto rivolto però a ricercatori che utilizzano MOGM nell'ambito delle biotecnologie vegetali) e con l'Unità n. 9 (il cui compito è stato quello di definire un modello informativo-formativo per i ricercatori che lavorano con MOGM) con le quali è stato elaborato un

documento di valutazione del rischio. Tale documento contiene informazioni sulle procedure da tener presente per l'analisi del rischio correlato agli effetti potenzialmente nocivi per ciascuna attività con MOGM; in queste analisi si deve tener conto degli eventuali effetti dannosi associati sia al microorganismo utilizzato che alle procedure seguite durante la sua manipolazione.

E' stata altresì realizzata una newsletter per poter divulgare a tutti gli operatori del settore dettagliate informazioni e aggiornamenti riguardanti le normative nazionali in materia di sicurezza oltre a link a siti utili. Questa newsletter è stata creata in formato elettronico proprio per poter essere inviata agli utenti attraverso la posta elettronica e per poter poi essere pubblicata sul sito web dell'Istituto.

E' in corso di attivazione un forum di discussione che ha l'intenzione di far partecipare le persone interessate a problemi specifici attraverso una mail. Questa discussione sarà moderata dal responsabile dell'U.O. n.8 e, se del caso, verranno fatte apposite richieste agli esperti coinvolti nel progetto, compreso i funzionari del Ministero della Salute.

L'unità n. 9 aveva come obiettivo quello di proporre uno strumento di formazione sui sistemi di sicurezza rivolto a operatori esposti al rischio biologico da microrganismi geneticamente modificati partecipare con le altre Unità Operative a elaborare procedure operative di gestione del rischio, definire moduli informativi e formativi sulla sicurezza e sulla buona prassi di laboratorio.

L'importanza di costruire un prodotto informativo e formativo per il personale derivava dalle valutazioni fatte dall'Ente proponente la ricerca, Istituto Superiore per la Prevenzione e la Protezione sulla Sicurezza del Lavoro, sul fatto che nel nostro Paese e anche a livello internazionale non siano conosciuti prodotti che affrontano in modo completo le problematiche, anche di carattere normativo, legate alla sicurezza da agenti biologici geneticamente modificati per il personale sia dei laboratori che dedicati all'assistenza e alla cura dei pazienti sottoposti a terapie con mogm.

Verificata l'assenza di prodotti simili sul mercato sia nazionale che internazionale si è iniziata una attività di ricerca sulle produzioni delle agenzie Europee e Americane di biosicurezza. Si è prestata particolare attenzione ai lavori di A.B.S.A. (American Biosafety Association) e E.B.S.A. (European Biosafety Association) in queste due associazioni scientifiche sono raccolte le esperienze maggiormente significative prodotte in Europa, Nord America ma anche le esperienze delle ex Repubbliche sovietiche quali la Russia, il Kazakistan, che aderiscono all'ABSA e del Giappone che aderisce all'EBSA. Altri contributi importanti sono stati raccolti dai contatti stabiliti con il Center Disease Control di Atlanta e il Centro Milrieux di Lione entrambi centri di riferimento per patologie ad alta complessità di origine microbiologica.

Altro aspetto preso in considerazione nella fase di progettazione era produrre uno strumento che potesse circolare sia all'interno di reti aziendali (intranet) che aperto all'universo del web viaggiando, se del caso, anche in internet. E' evidente che la scelta finale di impiego del prodotto è legata alla Direzione del Progetto ovvero all'ISPESL e ai finanziamenti futuri che potranno permettere una elaborazione maggiormente sofisticata.

I livelli di riferimento sono comunque prodotti "friendly" capaci di informare anche, in forma ludica, senza mai perdere gli aspetti scientifici.

Si è costruito un percorso sulle modalità formative che l'esperienza nazionale e internazionale hanno saputo produrre negli ultimi anni; cercando di garantire un supporto didattico differenziato che, seppure in assenza di tutor, garantisca al singolo ricercatore la possibilità di accedere ad un percorso formativo modulare per quanto concerne la preparazione delle diapositive ed informativo con l'elaborazione video su CD-rom.

Le indicazioni nella costruzione del prodotto sono state prese dalle esperienze di e-learning sviluppate dallo IOR (Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna) e dalla Direzione Sanitaria di FIAT Auto che nel tempo hanno sviluppato interessanti percorsi di formazione su diverse tipologie di rischio e in particolare le misure di prevenzione incendi presso lo IOR e l'impiego dei Video terminali presso FIAT Auto (software già usato dalle Aziende sanitarie dell'Area genovese).

Sono state prodotte oltre 160 diapositive che conducono il personale in formazione in un percorso fornendo, dopo una parte introduttiva di carattere generale, i primi elementi di base sulla biosicurezza nei laboratori, gli aspetti normativi, i sistemi di protezione individuale e collettiva; per semplicità viene riportato un indice dei principali argomenti trattati nel modello formativo:

- le problematiche della sicurezza nel mondo del lavoro
- la sicurezza nelle strutture di ricerca e ospedaliere italiane
- il rischio biologico
- gli agenti biologici
- la normativa vigente
- i sistemi di contenimento degli agenti biologici
- i criteri di valutazione del rischio rispetto agli organismi

- le valutazioni inerenti l'ambiente sanitario e la sicurezza nella gene therapy (sicurezza per gli operatori)
- la gestione della sicurezza nei laboratori e le classi di contenimento
- i sistemi di valutazione dell'apprendimento

Il corso, che ha una durata complessiva di 8 ore, può essere svolto anche in tempi diversi dall'operatore facendo test intermedi di verifica dell'apprendimento.

Alla fine del percorso formativo in base ai risultati raggiunti verrà rilasciato dal sistema un certificato di partecipazione e la relativa valutazione.

Ciò che si è ottenuto quindi è stata l'analisi delle procedure di lavoro e i requisiti minimali di protezione degli operatori dei laboratori. È stata elaborata, insieme a tutte le unità operative del gruppo di lavoro relativo all'esposizione professionale di MOGM nei laboratori, una check list compilabile dai ricercatori, dalla quale sono stati elaborati dati al fine di definire le procedure di gestione del rischio all'interno di un laboratorio di ricerca. L'analisi di questi dati potrà consentire la verifica dello stato dell'arte relativa all'applicazione della normativa vigente e ha fornito un valido supporto per effettuare una valutazione dei rischi adeguata all'ambiente di lavoro di ricerca biotecnologia da parte dell'unità operativa n.6.

Infine si è prodotto materiale formativo per la prevenzione dei rischi derivanti dalla manipolazione di agenti biologici e/o MOGM riguardante il personale di ricerca, sotto forma di diapositive e sotto forma di un video su supporto informatico (cd rom).

Per la produzione di questo videocorso sulla sicurezza sono state effettuate riprese in diversi laboratori di Milano, Roma, Parma e Genova. Le persone intervistate hanno trattato i seguenti argomenti: Descrizione degli obiettivi del progetto, le tecnologie ricombinanti in campo biomedico e agroalimentare, il rischio associato all'uso di MOGM, la trasmissione orizzontale del DNA, il quadro normativo e la sicurezza (D.Lgs. 626/94 e 206/2001), il sistema di notifica, la valutazione del rischio, l'utilizzo di MOGM in stabulario, i sistemi di protezione individuale e collettiva.

Sono stati definiti i requisiti del percorso di formazione, e degli altri prodotti derivati dal progetto, al fine di renderli fruibili tramite web.

Bibliografia

- D.Sossai, M.Miele, P. Bet “Safety Manual for researchers in biotechnology laboratories Erga Ed.
- Campi M. G., Bet P, Ruzzon T., Doria Miglietta G., Sossai D. Guida al corretto utilizzo degli agenti biologici ed. EPC Libri (1998).
- Manuale di biosicurezza in laboratorio, II Ed., Annali dell’Istituto Superiore di Sanità. Istituto Superiore di Sanità, (1995).
- CDC - NIH BioSafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. US Department of Health and Human Services Public Helth Service 4th Edition.
- Eds.Richmond Y and McKinney R. W. (1999).
- CDC - NIH Guidelines for research on Recombinant DNA Molecules (1976).
- CDC - NIH. Primary Containment for Biohazards: Selection, installation and Use of Biological Safety Cabinets 2nd Edition. Richmond Y. and McKinney R. W. (2000).
- Freshney R.I. *Culture of animal cells*. Fanth Edition. Willey - Liss. (2000).
- *Manuale di biosicurezza in laboratorio*, II Ed., Annali dell’Istituto Superiore di Sanità. Istituto Superiore di Sanità, (1995).
- Richmond Y. Anthology of Biosafety. II. Facility Design Considerations. American Biological Safety Association, Richmond Y., PhD, Ed. (2000).
- Richmond Y. Anthology of Biosafety. I. Perspectives on Laboratory Design. American Biological Safety Association, Richmond Y., PhD, Ed. (1999).
- Rodricks J.V. Calculated risks Cambridge University Press, Cambridge (1994).

RACCOLTA, ELABORAZIONE E DIFFUSIONE DEI DATI SULLE PROCEDURE DI SICUREZZA ADOTTATE DAI LABORATORI DI RICERCA NEL CAMPO DELLE BIOTECNOLOGIE VEGETALI.

Miele M.

Università degli Studi di Genova – Centro Interuniversitario Biologia Molecolare Piante

Uno dei principali obiettivi della ricerca svolta dall'Unità operativa n. 11 è stato quello di valutare le procedure di sicurezza e le misure di protezione individuale adottate nei laboratori che utilizzano microrganismi geneticamente modificati (MOGM) per la produzione di piante transgeniche.

A tal fine, nella prima fase del progetto sono stati elaborati questionari per ottenere informazioni sugli agenti biologici e sui MOGM maggiormente utilizzati, sulla valutazione del rischio, sull'organizzazione dello spazio e sulla gestione delle attrezzature deputate all'uso dei microrganismi geneticamente modificati, sulle procedure adottate durante il trasporto di materiale biologico, sullo smaltimento dei rifiuti biologici, sulle procedure da seguire in caso di incidenti, sui dispositivi di protezione individuale e collettiva, sull'informazione e formazione ricevuta dai ricercatori sugli organismi con cui lavorano, nonché sulla sorveglianza sanitaria su di loro effettuata dalle Istituzioni presso le quali svolgono *la loro attività lavorativa*.

L'elaborazione dei questionari è stata effettuata in stretta collaborazione con l'Unità 6 l'Unità 8 e l'Unità 9 con le quali è stata realizzata un'approfondita ricerca bibliografica sulle check-list e sui manuali per la sicurezza esistenti a livello nazionale ed internazionali sul tema del rischio biologico. Dall'elaborazione del materiale raccolto e sulla base delle esigenze espresse dai referenti dei diversi Istituti coinvolti nel progetto, sono stati prodotti questionari, sottoforma di ceck-list sia per i responsabili dei laboratori che per i ricercatori. I quesiti sono stati elaborati in modo tale che le informazioni richieste potessero permettere alle Unità coinvolte di raggiungere i diversi obiettivi, tra cui:

- individuare le principali procedure adottate nei laboratori di ricerca biotecnologia;
- elaborare un esempio di documento di valutazione del rischio da mettere a disposizione dei ricercatori on-line;
- contribuire alla realizzazione di un modello formativo –informativo sulla base delle reali esigenze espresse dai ricercatori;
- individuare una procedura operativa di analisi e gestione del rischio relativo alla manipolazione degli MOGM in ambiente confinato.

Il materiale prodotto è stato distribuito ai ricercatori ed ai responsabili dei laboratori dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Sanremo, del Dipartimento di Biologia Animale e Genetica

dell'Università di Firenze dell' Università di Milano, dell'Università la Tuscia di Viterbo, dell'Università di Piacenza e della Plantechno di Cremona, tramite referenti con i quali si era precedentemente discusso sui principali obiettivi del progetto e sul modo più idoneo per proporre i quesiti ai ricercatori.

Dagli incontri periodici organizzati con i referenti degli Istituti sono state messe in evidenza le difficoltà incontrate nella compilazione dei questionari da parte dei ricercatori, difficoltà correlate in particolare alla poca conoscenza delle attuali normative legislative vigenti in materia di agenti biologici e MOGM.

E' stato quindi distribuito agli interessati il "Manuale di Sicurezza per il personale dei laboratori di ricerca biotecnologica" che si è rivelato uno strumento indispensabile per coloro che lavorano con agenti biologici e MOGM in quanto, oltre che fornire informazioni utili ai fini della compilazione dei questionari, contiene una documentazione approfondita sui possibili rischi esistenti nei laboratori di ricerca biotecnologica e, fornisce un supporto pratico per la gestione del rischio biologico con precisi riferimenti legislativi. Tale manuale è stato pubblicato dall'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST) di Genova, in collaborazione con il Consorzio Interuniversitario per la Biologia Molecolare delle Piante ed altri Istituti nazionali e stranieri che si occupano di sicurezza tra cui l'ISPESL.

La seconda parte del progetto è stata prevalentemente dedicata alla raccolta ed all'analisi dei dati contenuti nei questionari ed all'elaborazione di un documento tipo per la valutazione del rischio nei laboratori di ricerca.

I ricercatori che hanno aderito alla presente ricerca sono risultati essere numericamente inferiori a quelli che hanno collaborato alla ricerca analoga svolta nel settore biomedico; ciò non sorprende considerando che a livello nazionale, la ricerca svolta nel campo delle biotecnologie vegetali ha una diffusione più limitata rispetto a quella in ambito biomedico. C'è inoltre da considerare che alcuni responsabili dei laboratori di ricerca che svolgono attività di ricerca con piante transgeniche sono poco sensibile alle problematiche della sicurezza correlate al rischio biologico, dimostrandosi poco rispettosi anche delle normative vigenti. Alcuni di loro infatti hanno ritenuto opportuno non partecipare al progetto e di conseguenza non coinvolgere i ricercatori del proprio laboratorio con la motivazione che utilizzando organismi non pericolosi, non si è sottoposti a regole da seguire (es. notifiche, valutazione del rischio, uso di dispositivi di protezione ecc.) anche quando manipolano MOGM.

Indipendentemente dal numero di ricercatori che hanno compilato i questionari, un elemento importante *da sottolineare* è che uno dei principali obiettivi raggiunti dal presente progetto sia stato quello di sensibilizzare i ricercatori, talvolta anche by-passando i responsabili. Altresì è

fondamentale rilevare che anche quando si lavora con organismi considerati non pericolosi per l'uomo e l'ambiente per i quali non sono mai stati riportati fenomeni di intolleranza e di allergicità di qualunque sorta, bisogna adottare le massime precauzioni possibili in quanto il rischio di esposizione, pur essendo basso non può mai essere considerato nullo. Pertanto anche quando si lavora con tali organismi si deve effettuare un'accurata valutazione del rischio, attribuire alle operazioni previste un determinato livello di contenimento ed effettuare la relativa notifica al Ministero.

Generalmente per quanto riguarda la manipolazione genetica delle piante i rischi che vengono maggiormente presi in considerazione sono relativi all'ambiente ed al trasferimento orizzontale dei geni per la resistenza agli antibiotici e alla microflora del suolo. L'uso degli agrobatteri, sistema di elezione per la trasformazione genetica delle piante, non è considerato a rischio per l'operatore, in quanto è opinione diffusa che il processo che porta all'escissione prima ed all'integrazione poi del DNA plasmidico funziona solo per le cellule vegetali. Un recente lavoro ha invece riportato che l'agrobatterio, in particolari condizioni sperimentali è in grado di trasferire il proprio DNA plasmidico anche in cellule animali ed umane. Ulteriori approfondimenti sono necessari per verificare se un rischio effettivamente esiste per gli operatori che utilizzano gli agrobatteri, per cui, nel frattempo si suggerisce di utilizzare questi microrganismi in laboratori con adeguati livelli di contenimento.

Nonostante la poca disponibilità di alcuni laboratori, i responsabili ed i ricercatori che hanno aderito al progetto si sono dimostrati molto collaborativi ed hanno dato un utile contributo anche per l'elaborazione del modulo formativo sottoforma di videocorso realizzato in collaborazione con l'Istituto nazionale ricerca sul Cancro di Genova, responsabile dell'Unità 8 e 9. Inoltre, sempre in collaborazione con l'IST verrà organizzato a Febbraio 2004 un incontro che prevede il coinvolgimento di esperti nel settore della sicurezza biologica, a cui potranno partecipare i laboratori che svolgono attività di ricerca in ambito vegetale e biomedico che hanno preso parte al progetto. Tale incontro vuole essere un momento di verifica e di confronto sia per i ricercatori che hanno preso parte al progetto che di altri interessati per cercare di diffondere quanto più possibile i risultati ottenuto dal presente progetto.

Le principali considerazioni che si possono evincere dall'analisi dei questionari pervenuti (circa 50) sono riportate di seguito.

I ricercatori che operano nel campo delle biotecnologie vegetali hanno in genere difficoltà a classificare gli agenti biologici con cui lavorano, infatti i patogeni vegetali quali gli agrobatteri, non sono inclusi nella lista degli agenti biologici riportata nell'allegato III della direttiva europea 2000/54. A tal riguardo sarebbe opportuno un sollecito a livello degli organi competenti, affinché

venga elaborata una lista di agenti biologici che includa anche i patogeni vegetali. Agrobatteri a parte, gli agenti biologici prevalentemente utilizzati dai laboratori che hanno partecipato al presente progetto appartengono al gruppo 1 (*E. coli*) e le attività svolte richiedono un livello di contenimento di classe 1.

Sebbene a livello di Istituto vengano rispettate le normative vigenti in materia di microrganismi geneticamente modificati, non sempre i ricercatori ed i loro responsabili sono a conoscenza delle procedure seguite e delle eventuali notifiche di impiego e di impianto presentate agli Organi competenti.

I laboratori generalmente elaborano un documento di valutazione del rischio relativo agli agenti biologici e ai MOGM e possiedono un manuale di sicurezza, ma non tutti sono a conoscenza dei compiti e dei ruoli del Servizio di prevenzione e protezione e dei relativi responsabili.

Sono presenti in genere procedure da seguire per le attività correlate alla ricerca anche se non sono scritte, mentre le procedure da adottare in caso di incidenti sono in genere scritte; inoltre, i laboratori non sono quasi mai dotati dei kit di decontaminazione.

I Dispositivi di Protezione Individuale vengono utilizzati correttamente dagli operatori; per quanto riguarda i Dispositivi di protezione collettiva, le cappe presenti nella parte maggior parte dei laboratori di biotecnologie vegetali sono a flusso laminare orizzontale e le centrifughe sono raramente dotate di coperchio antiaerosol.

I ricercatori ritengono di ricevere adeguate informazioni sui rischi a cui possono andare incontro durante l'attività di ricerca dai responsabili del laboratorio, ma in nessun Istituto è previsto un programma di formazione con aggiornamenti periodici per coloro che manipolano MOGM.

Un altro dato interessante emerso dall'analisi dei questionari distribuiti, è che viene generalmente sottoposto a sorveglianza sanitaria solo il personale di ruolo, ma non quello con contratto a tempo determinato.

È stata inoltre predisposta una newsletter telematica finalizzata alla divulgazione di informazioni sui diversi elementi da considerare quando si effettua una valutazione del rischio, sulle diverse procedure disponibili per la presentazione di notifiche, sulle normative nazionali ed europee che regolamentano l'utilizzo di MOGM.

L'Unità 11 ha infine partecipato alla definizione di un modello formativo sulla prevenzione del rischio biologico per i ricercatori che svolgono attività nel campo delle biotecnologie. In particolare è stato preparato un opuscolo informativo contenente le seguenti informazioni:

- metodologie scientifiche utilizzate per la produzione di MOGM ed OGM con particolare riferimento alle piante transgeniche;
- possibili rischi e benefici per la salute umana derivanti dall'uso di MOGM ed OGM;

- possibili rischi/benefici per l'ambiente derivanti dall'uso di OGM;
- legislazione europea che regola l'uso di MOGM ed OGM.

MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI METODICHE PER IL MONITORAGGIO BIOLOGICO DI LAVORATORI ESPOSTI A MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI .

Tomao P., Di Renzi S., Vonesch N., Signorini S.

ISPESL – Dipartimento di Medicina del Lavoro , Centro Ricerche Monte Porzio Catone – Via F. Candida, 1 - 00040 (RM).

Introduzione

Nella definizione di "biotecnologia" sono comprese tecnologie produttive antichissime (biotecnologie tradizionali), che hanno accompagnato l'uomo fin dai tempi più remoti, dall'epoca in cui egli cominciò ad usare inconsapevolmente microrganismi per produrre cibi, bevande e farmaci. Alle tecnologie "classiche" si sono affiancate biotecnologie innovative in cui vengono utilizzate tecniche di manipolazione del materiale genetico (ingegneria genetica) con numerose applicazioni in campo scientifico e industriale.

Negli anni '60 si sapeva che nei batteri vi erano degli enzimi specificatamente preposti alla riparazione del DNA e che tali enzimi erano anche impiegati nel processo di ricombinazione genetica che consente l'inserimento di materiale genetico virale nel DNA di un batterio. Viene scoperto, infatti, il processo di riparazione per "taglio e rattoppo" di lesioni a carico del DNA da Setlow.

E' così che verso la fine degli anni '70 nasce l'ingegneria genetica, che, sfruttando la tecnica del DNA ricombinante, permette di creare nuove molecole di DNA attraverso l'unione di frammenti di acido nucleico provenienti da specie diverse. Solitamente uno dei due frammenti rappresenta il gene che interessa e l'altro un semplice vettore. Questa molecola di DNA ricombinante risultante può essere introdotta in cellule batteriche e quindi fatta riprodurre in migliaia di copie identiche (clonazione genica).

Una volta individuato il metodo per creare un DNA ricombinante, nel 1973 Cohen, Boyer, Helling e Clang costruirono in vitro un plasmide ricombinante che, reinserito nel batterio, si dimostra biologicamente funzionante sia che vengono inseriti geni della stessa specie, sia di specie diversa e superiore, come ad esempio i geni umani. Di conseguenza diventa possibile analizzare il DNA di organismi superiori.

Ha avuto grande successo la tecnica del clonaggio, messa a punto da David Hogness e dalla sua équipe, che lavorando col genoma di *Drosophila* lo frammentano e costruiscono una banca di

sequenze di DNA costituita da una popolazione batterica eterogenea, con un batterio che contiene un fago diverso, portatore di un frammento di DNA distinto.

Nel 1975 Cohen e Milstein ottengono anticorpi coltivando in provetta le cellule del sistema immunitario che li producono (linfociti) opportunamente fusi con cellule tumorali di mieloma. Si ottiene così un ibrido che produce grandi quantità di anticorpi con caratteristiche chimiche e funzionali ben definite.

Nel 1981 la Corte Suprema degli Stati Uniti decide che i microrganismi prodotti dall'ingegneria genetica possono essere brevettati.

Martin Evans e il suo gruppo stabiliscono alcune linee cellulari prelevate da embrioni di topo nei primi stadi di sviluppo che conservano la totipotenza. In questo modo è possibile produrre animali chimerici costituiti da cellule con diversi patrimoni genetici, ma di solito della stessa specie.

Negli anni '90 vengono utilizzati anticorpi monoclonali per guidare le medicine contro il cancro fino ai tessuti cancerosi.

Sempre in questo periodo abbiamo nuove varietà di piante alimentari manipolate dall'ingegneria genetica capaci di fabbricare concimi di cui hanno bisogno e di resistere alla siccità e alla malattia.

Ha poi avuto inizio il progetto Genoma con l'obiettivo di analizzare il DNA umano, strettamente avvolto nei 46 cromosomi, srotolarlo e "decodificarlo".

La tecnica del DNA ricombinante, più comunemente nota come ingegneria genetica, permette di ottenere organismi con, all'interno delle proprie cellule, frammenti di DNA estraneo.

Questa tecnica è altamente innovativa poiché supera sia le barriere tra organismi pluricellulari e microrganismi, sia le barriere tra specie diverse.

La tecnica si articola in tre fasi fondamentali. Innanzi tutto bisogna prelevare piccoli segmenti di DNA da una cellula "donatrice" e lo si può fare in due modi:

- 1) Usando una endonucleasi di restrizione che tagli un segmento di DNA della cellula donatrice in siti specifici lasciando, alcune volte, delle estremità adesive, oppure.
- 2) Usando la transcriptasi inversa capace di ottenere piccoli segmenti di DNA della cellula partendo dall'mRNA

Una volta che il segmento di DNA estraneo viene individuato verrà inserito all'interno di un vettore che lo trasporterà sin nella cellula ospite. I vettori usati sono plasmidi o batteriofagi (o fagi). Il segmento di DNA estraneo viene inserito nel vettore: con la stessa endonucleasi di restrizione, usata in precedenza per tagliare il segmento di DNA del vettore, facendo attenzione che i frammenti esportati non svolgano funzioni vitali per il vettore stesso. Successivamente, lo si sostituisce con un segmento di DNA della cellula donatrice, usando un enzima, la DNA ligasi. A questo punto il vettore che possiede un frammento di DNA estraneo viene denominato chimera. L'ultima fase della

tecnica consiste nell' inserire il vettore all' interno della cellula ospite. Ciò può avvenire per trasformazione, quando, trattandosi di un plasmide, il vettore attraversa facilmente la parete cellulare. Grazie all'applicazione di tecniche all'avanguardia, il vettore può essere inserito all'interno della cellula ospite in altri due modi: con la biolistica (biologia + balistica), una tecnica con la quale microparticelle rivestite di DNA, capaci di attraversare la membrana cellulare, vengono sparate da una sorta di fucile genico all'interno della cellula ospite; con l'elettroporazione, tecnica con la quale vengono a formarsi delle aperture sulla membrana cellulare grazie all'applicazione di un campo elettrico pulsante. Una volta aperti questi fori il vettore potrà essere inserito facilmente nel citoplasma della cellula ospite. Infine il DNA estraneo, una volta saldatosi al DNA della cellula ospite, si duplicherà con esso e potrà esprimere i propri caratteri.

Il campo medico è particolarmente interessato alle applicazioni delle biotecnologie, ne beneficiano in particolare la prevenzione, la diagnosi e la terapia. La scoperta di anticorpi monoclonali ha portato importanti innovazioni nel settore diagnostico. Grazie alla loro purezza, alla specificità e alla disponibilità illimitata hanno trovato importanti riscontri nell'oncologia, perché permettono di distinguere in modo specifico le strutture prodotte da cellule tumorali. Queste stesse proprietà consentono l'impiego di anticorpi monoclonali come vettori di farmaci anti-tumorali a scopi terapeutici. In questo modo gli immuno-farmaci giungono esclusivamente sulle cellule maligne senza portare ulteriori conseguenze sulle altre, per la loro tossicità.

Gli anticorpi monoclonali sono impiegati anche in infettivologia per il riconoscimento di agenti patogeni: ad esempio è stato possibile conoscere l'epidemiologia di alcune malattie, come l'epatite virale A e B, l'infezione causata da Herpesvirus di tipo I e da *Chlamydia* e la mononucleosi.

Un altro campo di applicazione degli anticorpi monoclonali è l'immunologia, che studia gli effetti della reazione antigene-anticorpo. E' stato possibile, studiare le varie sotto-popolazioni di linfociti, globuli bianchi presenti nel sangue che producono anticorpi, e le modalità di risposta immunitaria. In tal modo, si sono scoperte le cause di alcune patologie, di alcune malattie come le immunodeficienze, insufficienze immunitarie, acquisite o ereditarie, o le malattie autoimmuni in cui le funzioni di difesa sono rivolte verso il proprio organismo.

La costruzione di sonde genetiche, che riconoscono sequenze specifiche di acidi nucleici per la complementarità delle basi azotate, vengono costantemente impiegate sia in campo diagnostico che per l'individuazione di mutazioni genetiche anche quando non danno luogo a malattie clinicamente manifeste.

Un'applicazione, molto discussa, delle biotecnologie in campo medico è la cosiddetta terapia genica, che consiste nella sostituzione o correzione di geni difettosi tramite l'inserimento nel genoma di copie di un gene funzionalmente normale.

Attraverso la tecnica del DNA ricombinante si può intervenire anche sulle malattie che interessano le cellule ematopoietiche, che producono elementi corpuscolati del sangue, i cui progenitori si trovano nel midollo osseo.

Il rischio dovuto alla manipolazione, produzione ed utilizzo di prodotti ingegnerizzati si incentra sui meccanismi di riarrangiamento genico, non sempre conosciuti e sulla possibile diffusione ambientale. Ad esempio il crescente sviluppo di microrganismi pluriresistenti ad antibiotici apre oggi un importante problema di sanità pubblica che solo in parte potrebbe essere legato al crescente sviluppo dei chemioterapici in campo sanitario. Non bisogna infatti dimenticare che potrebbe esserci una diffusione ambientale di geni che portano resistenza ad antibiotici, utilizzati nei laboratori di ricerca come determinanti genici di selezione.

L'utilizzo in laboratori di ricerca di vettori plasmidici o di altri vettori (virali, batteriofagi, cosmidi), introdotti nelle cellule riceventi attraverso processi artificiali di trasformazione potrebbe quindi comportare un rischio per l'operatore direttamente coinvolto nel processo sperimentale. Anche se la manipolazione dei diversi vettori da parte di personale specializzato, negli impianti autorizzati, non sembra costituire al momento un rischio per la salute e per l'ambiente, sarebbe comunque auspicabile verificare un'eventuale contaminazione ai fini di un migliore contenimento dei MOGM e di una maggiore sicurezza degli impianti in cui si manipolano.

Sono state identificate diverse metodiche utilizzate per il monitoraggio dell'espressione di proteine virali, per la ricerca di virus infettivi, per l'identificazione di una risposta immunitaria contro di essi, per la presenza di acido nucleico esogeno in campioni biologici. Il nostro studio ha affrontato lo studio e la validità di alcuni di questi metodi.

Obiettivi

Lo scopo del progetto era di mettere a punto un monitoraggio biologico su popolazioni di lavoratori esposti a microrganismi geneticamente modificati (MOGM) che operino nel campo della terapia genica, mediante tecniche di biologia molecolare. Il biomonitoraggio dei lavoratori esposti potrebbe contribuire alla caratterizzazione di indicatori biologici per valutare qualitativamente una probabile esposizione professionale a MOGM, ed inoltre potrebbe mettere in evidenza eventuali rischi nella manipolazione dei MOGM con la finalità di individuare le fasi di lavoro critiche, cioè quelle con maggiore possibilità di rischio di trasmissione del microrganismo all'operatore.

Fasi della ricerca

Lo studio si proponeva la ricerca e l'identificazione di MOGM, o loro materiale genetico, in campioni umani.

A tal fine sono state analizzate due strategie sperimentali diverse per verificare l'avvenuta contaminazione dell'operatore con il MOGM utilizzato, allo scopo di definire quale campione umano poteva essere più idoneo per l'eventuale identificazione del contaminante.

Successivamente sono stati selezionati alcuni laboratori di ricerca universitari autorizzati ad utilizzare MOGM in seguito ad una corretta notifica all'Organismo preposto, con i quali si sarebbe dovuto procedere ad una campagna di screening (monitoraggio sui laboratoristi), ma la mancanza di fondi non ha permesso di effettuare tale fase .

I risultati derivanti dalle tecniche utilizzate per la ricerca di contaminazioni da MOGM sono stati analizzati ed hanno evidenziato vantaggi e svantaggi delle due procedure studiate.

Metodologia

Considerando l'impiego da parte dei ricercatori di vettori plasmidici è stata messa a punto la tecnica per l'analisi di DNA plasmidico nelle feci: una aliquota (1 g risospeso in 10 ml di soluzione salina sterile) è stata analizzata tal quale, con un'altra aliquota è stata allestita una coltura di arricchimento in terreno contenente l'antibiotico marcatore plasmidico sia per arricchire il campione che, nello stesso tempo, selezionare la popolazione genomica prescelta. Da ambedue i campioni è stato estratto il DNA batterico totale e sono state condotte tre PCR separate. La prima mediante l'utilizzo di oligonucleotidi universali per amplificare il DNA eubatterico codificante l'RNA ribosomale 16S, la seconda per selezionare il gene di resistenza del vettore, e l'ultima utilizzando primers che riconoscono il gene esogeno introdotto nel vettore. I campioni positivi alla PCR, rappresentanti l'avvenuta contaminazione, sono stati confermati mediante l'ibridazione con sonde specifiche.

Inoltre è stato preso in considerazione un altro campione biologico: il prelievo delle cellule della mucosa boccale o gengivale, in quanto la mucosa boccale e gengivale potrebbe rappresentare un utile sito indicativo ai fini dell'identificazione di una contaminazione. Il campione, prelevato mediante spazzolino e risospeso in tampone fosfato, è stato quindi sottoposto ad estrazione del DNA; successivamente il DNA è stato analizzato mediante PCR con primers specifici; i campioni positivi alla PCR, rappresentanti l'avvenuta contaminazione, sono stati confermati mediante l'ibridazione con sonde specifiche.

Risultati e discussione

Inizialmente le due metodiche descritte nei materiali e metodi sono state sperimentate su alcuni soggetti scelti nell'ambito di un gruppo di esposti a MOGM di gruppo I. Lo studio condotto ha messo in evidenza alcune criticità.

Per quanto riguarda la scelta del campione si evidenzia che la raccolta delle feci non sempre incontra accettazione da parte della popolazione da studiare. Inoltre è risultato abbastanza indaginoso effettuare un campionamento secondo criteri standardizzati, in quanto la flora microbica intestinale subisce sensibili modifiche in relazione anche al tipo di alimentazione e che tali modifiche non sempre sono facilmente identificabili. In tal senso l'utilizzo delle feci per la ricerca di acido nucleico esogeno, di determinanti di antibiotico resistenza o di vettori non sempre ha portato ad una loro corretta individuazione.

Al contrario, per quanto riguarda il prelievo delle cellule della mucosa boccale e gengivale, non solo abbiamo ottenuto una maggiore compliance da parte di chi si sottoponeva al test, ma la procedura si è rivelata di lettura immediata, maggiormente riproducibile e soprattutto non soggetta a variazioni dovute a dieta/assunzione di antibiotici a scopo terapeutico.

Bibliografia

- E.K. Weibel, B.D. Seiffert. Biosafety investigations in an r-DNA production plant. *Applied Microbiology and Biotechnology* (1993), 39: 227-234.
- R.R. Colwell. Biodiversity and release of genetically engineered organisms: a partnership of value. *Current Opinion in Biotechnology* (1994), 5: 244-246.
- R.P. Tengerdy, G. Szakàcs. Perspectives in agrobiotechnology. *Journal of Biotechnology* (1998), 66: 91-99.
- B. Crook. Review: Methods of Monitoring for Process Micro-organisms in Biotechnology. *Annual Occupational Hygiene* (1996), 40 (3): 245-260.
- Engineered Organisms in Environmental Settings. "Biotechnological and Agricultural Applications" . (1996) Edited by Morris A. Levin and Eitan Israeli.
- F. Wurm and A. Bernard. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* (1999), 10: 156-159.