



**HAL**  
open science

# Asbestos hazard in Western Alps: the use of soil fungi in bioremediation of asbestos fibres dispersed in the environment; a chemical-molecular integrated analysis.

Stefania Daghino

► **To cite this version:**

Stefania Daghino. Asbestos hazard in Western Alps: the use of soil fungi in bioremediation of asbestos fibres dispersed in the environment; a chemical-molecular integrated analysis.. Other [q-bio.OT]. Università degli studi di Torino; Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Italian. NNT: . tel-00011760

**HAL Id: tel-00011760**

**<https://theses.hal.science/tel-00011760>**

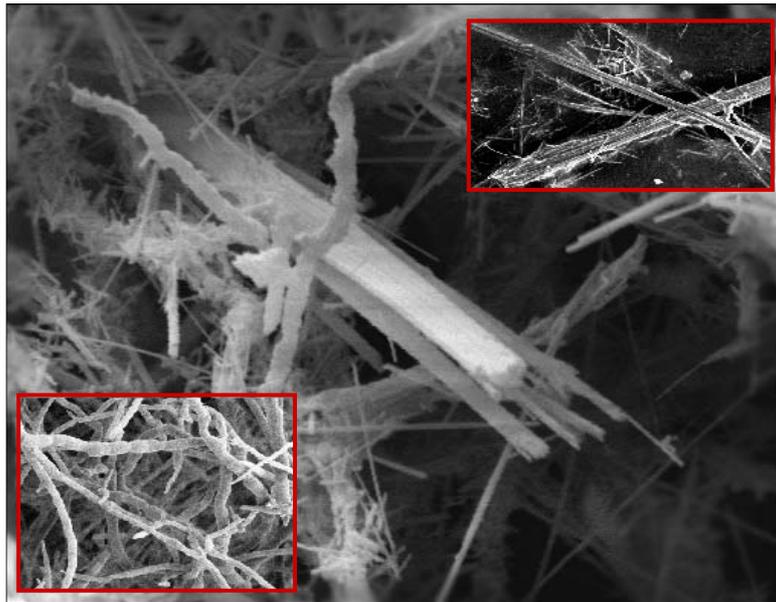
Submitted on 6 Mar 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO  
UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE

## **RISCHIO AMIANTO NELLE ALPI OCCIDENTALI**



**RISCHIO AMIANTO NELLE ALPI OCCIDENTALI:  
UTILIZZO DI FUNGHI DEL SUOLO IN PROCESSI DI  
BIORISANAMENTO DI FIBRE DI AMIANTO IN  
AMBIENTE NATURALE;  
UN' ANALISI INTEGRATA CHIMICO-MOLECOLARE**

**STEFANIA DAGHINO**





DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE DEI  
FUNGHI  
(XVIII CICLO – ANNI 2002-2005)

DOTTORATO IN CHIMICA E SCIENZE  
DELLA VITA

Tesi in cotutela

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO  
CENTRO INTERDIPARTIMENTALE "G. SCANSETTI"  
PER LO STUDIO DEGLI AMIANTI  
E DI ALTRI PARTICOLATI NOCIVI  
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA VEGETALE

UNIVERSITÀ JOSEPH FOURIER –  
GRENOBLE  
LABORATOIRE LESIONS DES ACIDES NUCLEIQUES  
CENTRE ETUDES ATOMIQUES

**RISCHIO AMIANTO NELLE ALPI OCCIDENTALI**  
UTILIZZO DI FUNGHI DEL SUOLO IN PROCESSI DI BIORISANAMENTO DI  
FIBRE DI AMIANTO IN AMBIENTE NATURALE; UN'ANALISI INTEGRATA  
CHIMICO-MOLECOLARE.

**ASBESTOS HAZARD IN WESTERN ALPS**  
USE OF SOIL FUNGI IN THE BIOREMEDIATION OF ENVIRONMENT  
DISPERSED ASBESTOS FIBRES; A CHEMICAL-MOLECULAR INTEGRATED  
ANALYSIS.

STEFANIA DAGHINO

**Commissione:**

Prof.ssa Marie-Claude Jaurand – INSERM Parigi (controrelatore)

Prof. Gian Attilio Sacchi – Università di Milano (controrelatore)

Prof.ssa Bice Fubini – Università di Torino

Prof. Norberto Roveri – Università di Bologna

Dr. Thierry Douki – Centre d'Etudes Atomiques (Grenoble)

**Tutori:**

Prof.ssa Silvia Perotto – Università di Torino

Prof. Alain Favier – Università di Grenoble

**Coordinatore del ciclo:**

Prof.ssa Paola Bonfante – Università di Torino

**Settore scientifico-disciplinare:**

BIO/01

2005



REGIONE PIEMONTE - ASSESSORATO ALL'AMBIENTE





DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE DEI  
FUNGHI  
(XVIII CICLO – ANNI 2002-2005)

DOCTORAT EN CHIMIE ET SCIENCES  
DU VIVANT

Tesi in cotutela tra/thèse en cotutelle entre

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO  
CENTRO INTERDIPARTIMENTALE "G. SCANSETTI"  
PER LO STUDIO DEGLI AMIANTI  
E DI ALTRI PARTICOLATI NOCIVI  
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA VEGETALE

UNIVERSITÀ JOSEPH FOURIER –  
GRENOBLE  
LABORATOIRE LESIONS DES ACIDES NUCLEIQUES  
CENTRE ETUDES ATOMIQUES

### **RISCHIO AMIANTO NELLE ALPI OCCIDENTALI**

UTILIZZO DI FUNGHI DEL SUOLO IN PROCESSI DI BIORISANAMENTO DI  
FIBRE DI AMIANTO IN AMBIENTE NATURALE; UN'ANALISI INTEGRATA  
CHIMICO-MOLECOLARE.

### **LES RISQUES DE L'AMIANTE DANS LES ALPES OCCIDENTALES**

UTILISATION DES CHAMPIGNONS DU SOL POUR LA BIORÉMÉDIATION DES  
FIBRES D'AMIANTE PRÉSENTES DANS L'ENVIRONNEMENT; UNE ANALYSE  
CHIMICO-MOLECULAIRE.

STEFANIA DAGHINO

#### **Commissione/Jury:**

Prof.ssa Marie-Claude Jaurand – INSERM Paris (controrelatore/rapporteur)

Prof. Gian Attilio Sacchi – Università di Milano (controrelatore/rapporteur)

Prof.ssa Bice Fubini – Università di Torino (examinateur)

Prof. Norberto Roveri – Università di Bologna (examinateur)

Dr. Thierry Douki – Centre d'Etudes Atomiques, Grenoble (examinateur)

#### **Tutori/directeurs de thèse:**

Prof.ssa Silvia Perotto – Università di Torino

Prof. Alain Favier – Université J. Fourier, Grenoble

#### **Coordinatore del ciclo/directeur de l'école doctorale:**

Prof.ssa Paola Bonfante – Università di Torino

Prof. Michel Robert-Nicoud – Université J. Fourier, Grenoble

2005



REGIONE PIEMONTE - ASSESSORATO ALL'AMBIENTE



Questa Tesi si inserisce nel quadro di un progetto di ricerca multidisciplinare dal titolo “AMIANTO E MINERALI ASBESTIFORMI NELL’ARCO ALPINO: IDENTIFICAZIONE E MAPPATURA, VALUTAZIONE DEL RISCHIO, INATTIVAZIONE E/O CONFINAMENTO”, rivolto allo studio di questi differenti aspetti dei minerali fibrosi in tre valli delle Alpi Occidentali, la Val di Susa e le Valli di Lanzo (Val di Viù e d’Ala).

Il progetto, finanziato dall’Assessorato all’Ambiente della Regione Piemonte, è stato coordinato dal Centro Interdipartimentale “G. Scansetti” per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi dell’Università di Torino.

Il progetto, svolto da cinque dottorandi di diverse discipline, che hanno lavorato congiuntamente sui differenti aspetti del rischio amianto nell’ambiente naturale, si articola nei seguenti punti principali: i) identificazione delle mineralizzazioni asbestifere nelle serpentiniti delle Valli in esame e loro caratterizzazione (Tesi di Chiara Groppo); ii) determinazione delle fibre disperse nell’ambiente per azione degli agenti atmosferici e delle fibre presenti nei polmoni umani e di animali (Tesi di Elisa Fornero, Dottorato di Ricerca in Scienze della Terra); studio comparativo della potenziale patogenicità dei vari minerali fibrosi diffusi sul territorio (sia quelli considerati amianti dalla Legge 277/91 che quelli con struttura analoga ma non regolamentati dal punto di vista legislativo) attraverso iii) lo studio chimico della reattività di superficie (Tesi di Francesco Turci, Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche); iv) test cellulari (Tesi di Elena Gazzano, Dottorato di Ricerca in Scienze Bio-chimiche); iv) studio degli effetti generati dall’alterazione e dalla crescita di funghi o licheni sulla composizione e sulla reattività delle fibre, alla luce della messa a punto di metodi di biorisanamento (Tesi di Stefania Daghino, Dottorato di Ricerca in Biologia e Biotecnologie dei Funghi).

Per tutta la sua durata, il progetto si è svolto in stretta e costruttiva collaborazione con l’Assessorato all’Ambiente e con l’ARPA Piemonte. I nostri più sentiti ringraziamenti vanno, in particolare, alla Dott.ssa Laura Bruna, al Dott. Paolo Piazzano e all’Ing. Giorgio Schellino per la fiducia ed il sostegno accordatoci, nonché per i proficui scambi di informazioni.

Si ringraziano, inoltre, la Dott.ssa Anna Maria Tasselli, l’Ing. Stefano Rigatelli e il Dott. Vincenzo Coccolo per aver incoraggiato e appoggiato il progetto nella sua fase iniziale.



*Per questa esperienza di dottorato vorrei ringraziare:*

*La prof.ssa Silvia Perotto per la sua vivacità, che ci sprona sempre ad imparare, scoprire e a migliorare*

*La prof.ssa Bice Fubini, per aver ideato il progetto in cui si inserisce questa tesi, e per aver guidato il mio lavoro*

*Il prof. Alain Favier che si è adoperato per realizzare la cotutela e per permettermi di conoscere e lavorare al LAN*

*La dott.ssa Elena Martino, per il sostegno, le disponibilità e la sensibilità, professionale e personale*

*Il dott. Thierry Douki, che mi ha accolto al LAN, e mi ha seguito con disponibilità e competenza*

*La dott.ssa Maura Tomatis per la dedizione nel coordinare il progetto*

*La dott.ssa Ivana Fenoglio per aver discusso con me la parte chimica di questo lavoro*

*e la prof.ssa Mariangela Girlanda per la parte micologica.*

*Pour cette expérience de thèse, je veux remercier :*

*Silvia Perotto, pour la vivacité, qui nous pousse à apprendre, découvrir,  
nous améliorer*

*Bice Fubini, pour avoir conçu le projet au sein duquel j'ai réalisé ma  
thèse, et pour avoir encadré mon travail,*

*M. Alain Favier, qui a soutenu mon projet de cotutelle et qui m'a offert  
l'occasion de connaître et travailler au LAN*

*Elena Martino, pour le soutien, la disponibilité et la sensibilité,  
professionnelle et personnelle*

*Thierry Douki, qui m'a accueillie au LAN, et qui a suivi le cours de mon  
travail avec disponibilité et compétence*

*Maura Tomatis pour avoir coordonné le projet avec dédication*

*Ivana Fenoglio pour l'aide pour la partie chimique  
et Mariangela Girlanda pour la partie mycologique.*



*Alle mie nonne  
A mamma, papà e Luca*



# Indice

<b>Extended abstract</b> .....	5
1.1    Introduction.....	5
1.2    Isolation and identification of fungi from serpentine soils: results and discussion.....	9
1.3    Fungi-mediated fibres modification: results and discussion.....	10
1.4    Metabolic responses of fungi to asbestos fibres: results and discussion. ....	14
1.5    Conclusions and perspectives. ....	16
<b>1    Introduzione</b> .....	17
Résumé.....	17
Abstract.....	17
1.1    Il <i>bioweathering</i> .....	20
1.2    Il ruolo dei funghi nei processi geologici .....	22
1.3    I meccanismi di interazione tra funghi e metalli. ....	28
1.4    Gli ambienti ofiolitici come area di studio delle interazioni funghi-metalli e funghi-minerali.....	29
1.5    Il problema ambientale amianto: il caso della regione Piemonte.....	30
1.6    La struttura. ....	33
1.7    L'utilizzo dell'amianto: storia, epidemiologia e legislazione. ....	34
1.8    Cause e meccanismi della tossicità degli asbesti. ....	36
1.9    Caratteristiche chimiche coinvolte nella tossicità dell'asbesto. ....	38
1.10   Il ruolo del ferro nella tossicità dell'asbesto.....	41
1.10.1   Generazione di radicali. ....	41
1.10.2   Mobilizzazione del ferro.....	43
1.11   Ossidazione di proteine, lipidi e DNA. ....	45
1.11.1   Metodologie per lo studio della genotossicità dell'asbesto.....	50
1.12   Risposte cellulari all'esposizione a fibre di asbesto.....	51
1.13   La bonifica dell'amianto.....	56
1.14   Le metodologie per il ripristino ambientale.....	56
1.14.1   Trattamenti termici.....	58
1.14.2   Trattamenti chimico-fisici.....	59
1.14.3   Trattamenti biologici.....	60
1.15   Suoli naturalmente ricchi o contaminati da asbesto: ipotesi di una strategia di biorisanamento. ....	63
1.16   Meccanismi e mediatori dell'interazione funghi/ferro nel suolo.....	64
1.16.1   Chelanti specifici del ferro: i siderofori .....	64
1.17   Premesse e obiettivi del lavoro .....	69
<b>2    Materiali e metodi</b> .....	73
2.1    Descrizione degli asbesti utilizzati.....	73
2.2    Isolati fungini.....	73
2.3    Microanalisi campioni di suolo .....	74
2.4    Terreni e sistema di coltura .....	74

2.5	Incubazione di fibre di crocidolite con deferoxamina.....	75
2.6	Saggio per evidenziare la presenza di molecole chelanti del ferro.....	75
2.6.1	Saggio di filtrati colturali fungini.....	76
2.6.2	Saggio di miceli fungini.....	76
2.7	Inclusione dei campioni per la microscopia elettronica a scansione (SEM) .....	76
2.8	Identificazione molecolare degli isolati fungini.....	77
2.8.1	Estrazione del DNA.....	77
2.8.2	Amplificazione della regione ITS del gene ribosomale.....	77
2.8.3	Sequenziamento e analisi bioinformatica delle sequenze.....	77
2.9	Isoelettrofocalizzazione preparativa.....	77
2.10	Quantificazione delle proteine con il metodo di Bradford.....	78
2.11	Preparazione dei campioni proteici dalla frazione extracellulare per SDS- PAGE.....	78
2.12	SDS-PAGE.....	79
2.13	Colorazione con nitrato d'argento delle proteine su gel di poliacrilammide .....	79
2.14	Western blot.....	80
2.15	Gel di attività enzimatica: visualizzazione dell'attività superossidodismutasi .....	80
2.16	Saggi di attività enzimatica.....	81
2.16.1	Superossido dismutasi (SOD).....	81
2.16.2	Catalasi (CAT).....	82
2.16.3	Glutazione perossidasi (GPx).....	82
2.17	Saggio per valutare la perossidazione lipidica.....	82
2.18	Determinazione spettrofotometrica del ferro nel terreno di coltura.....	83
2.19	Determinazione complessimetrica del magnesio nel terreno di coltura.....	83
2.20	Analisi delle fibre al microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM) .....	84
2.21	Spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica.....	86
2.21.1	Spin trapping: radicale ossidrilico.....	88
2.21.2	Spin trapping: radicale carbossilico.....	88
2.22	Saggio ossidazione DNA isolato.....	88
2.23	Test cellulari di genotossicità delle fibre di asbesto.....	90
2.23.1	Allestimento delle colture cellulari e incubazione con fibre di asbesto.....	90
2.23.2	Test MTT di misura della citotossicità.....	90
2.23.3	Estrazione del DNA cellulare.....	91
2.23.4	Digestione enzimatica del DNA di origine cellulare.....	91
2.24	Comet assay.....	91
2.25	Analisi statistica.....	92
3	<b>Isolamento di ceppi fungini da suoli serpentinitici</b> .....	93
	Résumé.....	93
	Abstract.....	93
3.1	Introduzione.....	94

3.2	Descrizione campioni utilizzati.....	96
3.3	Identificazione molecolare di <i>V. leptobactrum</i> e analisi filogenetica.....	102
3.4	Discussione.....	105
3.4.1	Isolamento e identificazione di specie fungine da suoli serpentinitici .....	105
3.4.2	Analisi molecolare di <i>V. leptobactrum</i> .....	106
4	<b>Modificazione di fibre di asbesto ad opera di funghi del suolo</b> .....	107
	Résumé.....	107
	Abstract.....	108
4.1	Introduzione.....	110
4.2	Estrazione di ioni ferro e magnesio da fibre di asbesto .....	110
4.2.1	Selezione dei ceppi più efficienti .....	110
4.2.2	Tre ceppi selezionati modificano le fibre di crisotilo e crocidolite.....	113
4.2.3	Estrazione di ferro da fibre di crocidolite con deferoxamina. ....	118
4.2.4	Analisi al microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM) delle fibre di crisotilo 6D dopo incubazione con <i>V. leptobactrum</i> .....	118
4.2.5	Analisi XPS e EDS di fibre di crisotilo 6D e crocidolite dopo incubazione con <i>F. oxysporum</i> e <i>V. leptobactrum</i> .....	119
4.3	Valutazione della reattività delle fibre dopo l'incubazione <i>in vitro</i> in presenza di funghi.....	121
4.4	Studio della genotossicità delle fibre.....	122
4.4.1	Ossidazione di molecole di DNA isolato.....	123
4.4.2	Ossidazione di DNA cellulare .....	127
4.5	Discussione.....	134
4.5.1	Caratterizzazione dell'interazione tra funghi e fibre di amianto. ....	134
4.5.2	Alterazione delle proprietà chimiche delle fibre di asbesto .....	138
5	<b>Interazione funghi/asbesto: aspetti del metabolismo fungino</b> .....	147
	Résumé.....	147
	Abstract.....	148
5.1	Introduzione.....	149
5.2	Saggio di attività chelante fungina. ....	150
5.2.1	Produzione di siderofori da parte di miceli isolati da suoli serpentinitici. .....	150
5.3	Saggio di perossidazione lipidica in miceli fungini.....	153
5.4	Caratterizzazione della risposta fungina allo stress ossidativo: <i>V. leptobactrum</i> .. .....	153
5.4.1	Alterazione dei profili proteici extracellulari in seguito all'incubazione di funghi del suolo con fibre di asbesto .....	153
5.4.2	<i>V. leptobactrum</i> : enzimi antiossidanti nel comparto extracellulare. .....	156
5.4.3	<i>V. leptobactrum</i> : enzimi antiossidanti nel comparto intracellulare.....	158
5.5	Caratterizzazione della risposta fungina allo stress ossidativo: <i>F. oxysporum</i> .....	159
5.6	Discussione.....	160
5.6.1	I mediatori dell'interazione tra funghi e fibre: chelanti del ferro.....	160

5.6.2	I mediatori dell'interazione tra funghi e fibre: enzimi antiossidanti. .....	161
6	<b>Conclusioni e prospettive</b> .....	167
	Résumé .....	167
7	<b>Bibliografia</b> .....	169
8	<b>Appendici al testo</b> .....	181

## Extended abstract

### 1.1 Introduction

The interactions between minerals and microorganisms may potentially affect any biological, geological and biogeochemical process occurring at or near the earth surface.

The “*weathering*” of rocks and minerals is their deterioration or erosion, mediated by several different processes, acting synergistically to determine the composition of lithosphere, biosphere, hydrosphere and atmosphere (Vaughan et al., 2002). Among these processes, there is an important biological component, due to the activities of pioneer organisms, such as lichens, but also to bacteria and fungi.

Filamentous fungi, plants and animals can enhance the disgregation of rock substrates by physical forces, such as the pressure of growing hyphae and roots or the burrowing (Burford et al., 2003). However the biochemical activities of microorganisms are likely to play a more important role in rocks weathering than their biomechanical effects (Sterflinger, 2000).

Bacteria, algae, fungi and plants contribute to chemical rocks weathering by releasing organic acids and other metabolites, as well as CO<sub>2</sub>, that leads to carbonic acid formation, thus determining the soil acidification (Sterflinger, 2000; Ehrlich, 1998; Gadd and Sayer 2000).

In the last years the *geomicrobiology*, defined as the study of the interactions between minerals and microorganisms, has largely focused on prokaryotes. The role of fungi in geological processes has been neglected, with the exception of lichens (Sterflinger, 2000; Banfield et al. 1999). In spite of this, the typical filamentous growth and the secretion of protons, organic acids and other metabolites, make fungi particularly suitable as biological weathering mediators of rocks, minerals and building materials (Gadd 1999 e 1993; Gu et al., 1998).

The geomycology has been defined by Burford et al. (2003b) as “*the impact of fungi on geological processes, including the alteration and weathering of rocks and minerals, the accumulation of metals and their role in nutrient cycling and influence on proliferation of microbial communities in mineral substrates*”.

The mechanisms of interaction of fungi with rocks and minerals are mediated either by biomechanical activities (*biogeophysical weathering*), or by biochemical activities (*biogeochemical weathering*; Hoffland et al, 2004). The biomechanical deterioration of rocks is caused by the deep penetration of fungal hyphae into cracks, fissures and cavities already formed, but also by active burrowing into the intact mineral (e.g. into the mineral cleavage planes; Kumar and Kumar, 1999; Sterflinger, 2000). However the pressure force would not be enough to allow the hyphae penetrate into the rocks, if not helped by biochemical solubilization of the substrate (Hoffland, 2004).

There are four mechanisms of metals and minerals solubilization by fungi: acidolysis and complexolysis are the most important, but also redoxolysis and mycelial metal accumulation. Low molecular weight organic acids are the most important chemical species for rocks biodeterioration (Gadd 1999, 2001a) and they have the double function to acidify the substrate, thus enhancing ions solubility, and to form complexes with solubilized ions, thus mobilizing them. Fungi are also able to synthesise and release siderophores, that can contribute to bioweathering thanks to their chelating activity (Watteau and Berthelin, 1994). Siderophores are low molecular weight molecules (500-1000 Da), with a high specificity for iron (Winkelmann, 2002). Biosynthetic pathways regulation allows the microorganism to reach high siderophores concentration close to the cell in condition of iron starvation.

The biochemical activity of fungi and other microorganisms can also affect metals speciation and mobility in the soil, modifying their biogeochemical cycles as well as the C, N, P, and S cycling. These processes are relevant for *bioweathering* (Gadd, 2004).

Soils rich in metals, naturally or because of human activity, offer environmental cases for the study of the interaction mineral/fungi or metal/fungi. Such soils are naturally found in *ophiolitic* sites, that are recognized for their scientific and ecological relevance (Brooks, 1987; Baker et al., 1992). The term *ophiolite* denotes a group of oceanic rocks, exposed on the continental crust because of the orogenic movements of earth surface, and including serpentine rocks, which can be asbestos bearing rocks. Serpentine soils have strong limitation of fertility because of their mineral composition, rich in magnesium and containing heavy metals that reach hazard levels, such as nickel and chromium. These characteristics result in a strong selection of plant species, but also of stress-tolerant microorganisms, like fungi, moss and lichens (Pierivittori and Siniscalco, 2004).

In Italy, ophiolitic areas are found in the North-Western Alps and in the Northern Apennin, and they are considered to be a source of biological variability and biodiversity (Pierivittori and Siniscalco, 2004).

Chrysotile (serpentine asbestos) and tremolite (amphibole asbestos) are often present in serpentine rocks. These two minerals raised a strong environmental and epidemiologic concern (Favero et al., 2004). Recent experiments show that the chelating activity of lichen growing in contact with serpentine rocks rich in chrysotile, modify the morphology of the mineral, that loses its crystallinity, and its chemical reactivity (Favero et al., 2005).

Few studies have focused on the interaction of fungi with serpentine rock in natural environment. Some saprotrophic strains isolated from soil can disgregate silicates mainly by oxalic acid release. For instance *Aspergillus niger* weathers olivine, serpentine, feldspar and other minerals, *Penicillium simplicissimum* disgregates basalt, *Penicillium expansum* and *Scopulariopsis brevicaulis* extract aluminium from aluminosilicates (Sterflinger, 2000).

The environmental issue represented by asbestos bearing rock exposed at the surface, led us to focus our attention on the interaction of fungi with these minerals, and on the possible minerals modification consequent to the fungal activity. These modifications could be interesting to reduce the environmental hazard caused by asbestos fibres, which are classified as class I carcinogens (IARC 1987). In fact, when airborne and inhaled, they are a hazard for health depending on their morphology and chemical composition (Fubini, 1997).

The environmental hazard of asbestos material is related not only to serpentine rocks naturally exposed and weathered, but also (and mainly) to asbestos mines and wastes, industrial sites where asbestos was processed and near areas contaminated because of the high volatility of fibres (Progetto di Massima 1993).

To find a strategy to cope with the asbestos problem is not easy, and requires the evaluation of the environmental context, the risk of exposure and the primary causes, such as factors and mechanisms of asbestos toxicity.

Asbestos is a family of crystalline silicates minerals (figures 1.5 and 1.6). The laws of industrial countries, including Italy, classify as asbestos the minerals listed in table 1.4. Starting from the 50's, the development of pulmonary diseases by asbestos workers has been correlated with their occupational history. Since then, many epidemiological studies have demonstrated that asbestos causes several lung diseases (e.g. asbestosis, pleural plaques formation, pleural mesothelioma and bronchiolar carcinoma) and other tumours (Hardy and Aust, 1995; Berry et al., 2000).

The mechanisms of asbestos toxicity are not fully established. The fate of the fibres inhaled into the lung depends mainly on their size, shape and biopersistence. In fact, the

fibrous shape and aerodynamic properties of these minerals allow them to enter into the deep lung airways and can enhance the damage to cells and tissues because they affect the natural mechanism of clearance from the lung. Asbestos minerals are very poorly soluble, thus highly biopersistent. This is a factor to take into account, since the longer the fibre resides in the tissue, the bigger is the damage (Fubini and Otero-Arean, 1999).

Another factor of asbestos toxicity seems to be the surface reactivity, because the surface of the fibres is the site of interaction with the lung fluids. The reactions occurring at this site depend only in part on the chemical composition of the mineral, because the surface is continuously modified by the medium, for instance by molecular adsorption or ions exchange (Fubini, 1997). One of the most harmful reactions occurring at the fibres surface is the free radical generation, that can lead to the oxidation of biomolecules (lipids, proteins and DNA), to alteration of intracellular signalling cascades related to cellular homeostasis, and can contribute to the oxidative stress related to the chronic inflammation, all together leading to fibrosis (Shukla et al., 2003; Mossman and Churg, 1998).

The mechanisms undergoing *Reactive Oxygen Species* (ROS) release from the fibre is not fully understood. Many studies show the central role of surface iron, catalyzing oxygen radical formation by the Haber Weiss cycle. In fact, treatments of crocidolite fibres with iron chelators able to extract ions from the fibre surface lead to the inhibition of hydroxyl radical release and in parallel to a decrease in DNA and lipid oxidation (Gold et al., 1997; Turver and Brown 1987; Gilmour, 1995; Weitzman and Weitberg, 1985). However, fibres reactivity does not only depend on the amount of iron located at the surface, but mainly on its oxidation and coordination state (Fubini and Mollo, 1995).

Even though asbestos is poorly soluble, high amounts of iron are extracted into solution by chelators *in vitro* (Lund and Aust 1990, Werner 1995). This is likely to occur also *in vivo*, where the fibre is in contact with endogenous chelators. This suggests a role of mobilized iron in damaging biomolecules, confirmed by *in vitro* assays of DNA oxidation demonstrating that the ability of fibres to damage DNA depends on iron mobility and redox cycling (Lund and Aust 1992). This suggests that fibres surface could have a role not only in direct radical generation, but also in iron release and binding (Hardy and Aust 1995, Weitzman and Graceffa 1984).

The molecular targets of oxidant species generated by asbestos are proteins, lipids and DNA. Proteins oxidation by asbestos modifies the functions of these biomolecules. The latter process can increase the extent of oxidative stress by degrading antioxidant proteins and other reducing compounds (Hardy and Aust 1995). Lipid peroxidation is a mechanism that alters the structure of cell membranes. Involvement of ROS in these reactions is demonstrated by using antioxidant molecules and iron chelators, that have an inhibitory effect (Ghio et al., 1992; Hardy and Aust, 1995). DNA oxidation can lead to bases and deoxyribose modification. The consequences of DNA exposure to ROS can be the induction of single or double strand breaks, the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8oxodGuo) and other oxidized bases, as well as abasic sites, DNA-DNA adduct and DNA-proteins cross-links. Cellular consequences of DNA damage include induction of apoptosis, necrosis or malignant transformation (Cadet, 1999; Aust and Eveleigh, 1999).

The cells feature many antioxidant defence systems. Some are low molecular weight compounds, such as vitamins C and E, that scavenge free radicals and prevent their reactions with biomolecules. Besides, there is a set of enzymes, such as superoxide dismutases (SOD), catalases (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), that act together to keep ROS concentration in the cells under control (Kinnula, 1999).

The asbestos fibres induce several metabolic responses in the cell that are not yet fully elucidated (figure 1.11). Asbestos affects cell signalling, cell cycle regulation, apoptosis and

induces many defence mechanisms. The mechanism of interaction between fibres and cells are not clear, but fibres morphology and surface reactivity seem to be very important.

Asbestos is thus harmful for health, and soils rich in potentially airborne fibrous asbestos mineral, either naturally or resulting from human activity, constitute an exposure hazard for people and animals living nearby.

The remediation of asbestos in soil can not be dealt with by using the same protocols set up for asbestos in buildings, because of the wide areas involved and the high risk of fibres dispersion. Moreover, any treatment of large soil masses should be of low impact, with little or no secondary consequences to waters, air, vegetation and animals. For instance it would not be possible to transfer the soil to an industrial plant to treat it, because of the huge volumes and especially because of the risk of fibres dispersion in air.

Remediation of contaminated sites should aim to limit the diffusion of the contamination or to really clean the site, by extracting and eliminating the pollutants (Figure 1.12). A generic remediation process can be either *in situ* or *ex situ* and carried on by physical, chemical or biological treatments. *Bioremediation* was defined by the *American Academy of Microbiology* as “*the use of living organisms to reduce or eliminate environmental hazard resulting from accumulation of toxic chemicals and other hazardous wastes*”. The contaminant removal can be mediated by microorganisms, like fungi and bacteria, by plants (*phytoremediation*) or by the isolated enzymes produced by these organisms (Adriano, 1999). Bioremediation processes of organic compounds are based on the ability of the chosen organism to use the contaminating compound, leading either to its mineralization (i.e. the conversion of organic pollutants into CO<sub>2</sub> and water) or to its transformation in a less harmful compound. The inorganic pollutants, such as heavy metals and radionuclides, cannot be degraded. The bioremediation of those compounds should thus aim to immobilize the contaminant or modify its chemical status to extract it or to make it less toxic. Microorganisms are able to use inorganic substances as final electron acceptor instead of oxygen, to adsorb them on the cell wall or to stock them into the vacuole (Gadd 1993).

The presence of fibrous asbestos minerals, mainly as a consequence of human activity (e.g. asbestos mines) represents an important environmental issue. In those cases asbestos cannot be removed, and at the moment there are no strategies of inactivation *in situ*. Any remediation method should aim to modify the characteristics of asbestos minerals that are related to its toxicity, such as fibrous shape, crystalline structure, biopersistence, iron content and surface reactivity.

Iron ions extraction could be important because of its role in catalyzing damaging reactions at the fibres/lung fluids interface. In fact, asbestos treatment with chelators *in vitro* can subtract iron ions from fibres surface and subsurface (Prandi L., 2002) and blunt the fibres surface chemical reactivity (Ghio et al., 1992). Asbestos in soil could be modified by fungal chelators, directly released by closely growing fungi. The interaction of fungi with iron in the soil is based on mechanisms of solubilization and adsorption, mediated by siderophores or by aspecific chelators like organic acids, that could be exploited to mobilize iron from asbestos minerals.

Recent research shows that several fungi are able to grow *in vitro* with asbestos fibres and to extract different amount of iron from the minerals *in vitro* (Martino et al., 2003). The amount of iron mobilized depends also on the chemical composition and on the surface characteristics of the asbestos used. *F. oxysporum*, a well known siderophore-synthesizer, is very active in iron extraction from different kinds of fibres over a prolonged period of time. Treatment of crocidolite UICC and chrysotile A, two kinds of asbestos, by this fungus leads to the blunting of their chemical reactivity (Daghino et al., 2005).

Since fungi isolated from many types of soils are able to extract iron from fibres and to modify their reactivity, we wondered whether fungi growing on serpentine soils would have a special ability to interact with fibres. Therefore, fungi were isolated from fragments of serpentine rocks collected in several sites in Western Alps. The most abundant species in these samples were morphologically identified. Among them, some strains were functionally tested and selected for their ability to extract iron and magnesium from fibres.

The modifications occurring in both partners of this interaction, i.e. the fibres and the fungi, were investigated. The fibres, collected after incubation with the fungal mycelia, were studied for their chemical composition and reactivity, both in acellular and in cellular systems, to assess the biological damage they could still induce.

Asbestos fibres can be a source of oxidative stress for fungi as they are for mammalian cells. For this reason, the metabolic response of fungi to fibres was investigated by comparing the protein profiles and some enzymatic activities expressed in the presence or in the absence of fibres.

This work is an example of *geomycological* study, in which fungal partners were isolated from field, but their interaction with the minerals was studied *in vitro*, under controlled conditions, with the aim to reveal the modification of fibres but also to better characterize the fungal metabolic response.

## 1.2 Isolation and identification of fungi from serpentine soils: results and discussion.

A possible strategy to find suitable agents for bioremediation of a contaminated site is the isolation of indigenous microorganisms from the contaminated soil itself and the *in vitro* selection of strains of interest for their degradative/detoxifying capabilities and their competitive growth. Those strains can be grown *in vitro* and then be reinoculated in the field (*bioaugmentation*) with some chemical or physical treatment to enhance their development (*biostimulation*).

Asbestos minerals are components of serpentine rocks, naturally exposed at the surface in *ophiolitic* areas. Many ophiolitic sites can be found in Western Alps (e.g. in the Ultrabasic Massif of Mt. Avic or in the Ultrabasic Massif of Lanzo) but also in other sites of Valle d'Aosta and Valle di Susa (Piervittori and Siniscalco, 2004). A peculiarity of these soils is the high heavy metal content that limits the biodiversity and promotes the development of fungal and bacterial species more resistant/tolerant to heavy metals than the species found in non-contaminated soils (Weissenhorn et al., 1993). These species are particularly interesting as agents for bioremediation of inorganics polluted sites.

For these reasons, many samples of serpentine rocks collected in the Western Alps area, but also in China, were used to characterize the associated fungal population. All the sampling sites in Piemonte are marked in figure 3.1 and listed in table 3.2.

The soil and detritus of the dismissed asbestos mine of Balangero (Torino, Italy) was sampled to isolate and identify fungal strains. The genera *Mortierella*, *Myrothecium* e *Penicillium* and the species *Verticillium leptobactrum*, *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces lilacinus* dominated in the observed population for both abundance (figure 3.3) and frequency (figure 3.4).

A more detailed study of the fungal diversity in these substrates involved the isolation and morphological identification of fungi from other samples from Valle d'Aosta (table 3.5) and China (Suoloshu mine, Rizhao County, Southern Su-Lu, Shandong; table 3.6). *Verticillium leptobactrum* was the most abundant fungus in the Valle d'Aosta samples, as already observed in the fungal population from the Balangero soil.

*V. leptobactrum* was also isolated from serpentine rocks collected in the Col de La Croix site (Massif of Mt. Avic), in Valle Chalamy (Valle d'Aosta) and in a site located in the Massif of Lanzo (Fubine). Besides, it was isolated from a non-serpentine sample (limestone rich in magnesium) from Mt. Chaberton (Valle di Susa), but not from other mineralogically different samples (listed in table 3.2).

The specie *V. leptobactrum* was previously isolated, albeit rarely, only from insects, nematodes or other fungi, and it was poorly characterized from the genetic and physiological point of view. In contrast it is very abundant in all the serpentine soils considered from Western Alps, it was not isolated from samples collected in China.

The presence of a fungal specie in a soil may be affected by many factors (e.g. nutrient and water availability, temperature, interactions with other microorganisms or plants). The isolation of *V. leptobactrum* from limestone rocks rich in magnesium, suggested a possible correlation between the development of the fungus and the chemistry of the substrate, since serpentines (e.g. chrysotile) are also rich in magnesium. The analysis of the average chemical composition of the rocks used for isolation (figure 3.7), however, did not confirm the hypothesis. The chemistry of the substrate cannot justify the dominant presence of *V. leptobactrum* in the serpentine site. Nevertheless, it is the first time that this specie is so abundantly found in different sites that share the geographic location in the Western Alps.

The striking dominancy of *V. leptobactrum* raised the interest for this fungus, not only as possible bioremediation tool to modify asbestos fibres (see next paragraph), but also for its phylogenetic characterization. The analysis of ITS ribosomal sequences was used to confirm the previous morphological identification of the specie and to investigate its taxonomic relationship with related species (Gams and Zare, 2001). The taxonomy of the section *Prostrata* of the genus *Verticillium*, that includes *V. leptobactrum*, was recently revised by Gams and colleagues (2001). They divided the section in five new genera: *Simplicillium*, *Lecanicillium*, *Pochonia*, *Haptofillium* e *Rotiferophthora*.

Figure 3.8 shows the *neighbour joining* tree including 19 “serpentine” strains, 3 outgroup strains, the deposited sequence of *V. leptobactrum* and other sequences of fungi belonging to the five genera listed above. The “serpentine” fungi form a cluster that is very close to, but distinct from, the other genera. In this group, most of the isolates' ribosomal DNA sequences cluster with the sequence deposited in gene banks for *V. leptobactrum*, thus suggesting their belonging to this specie. Three isolates form a separate group. Because of the lack of other *V. leptobactrum* sequences in data bases, we are not able to assess if there is an intraspecific variability or if the three separated strains belong to another specie.

Finally, there is no correspondence between the clusters of sequences and the sampling sites. The analysis of functional genes potentially involved in the adaptation of the fungus to the substrate, would allow to investigate if the site of sampling is affecting the intraspecific variability of *V. leptobactrum*.

### 1.3 Fungi-mediated fibres modification: results and discussion.

The different types of asbestos (table 1.4) are characterised by different amounts of iron. This characteristic contributes to determine asbestos toxicity, since iron catalyses reactions such as ROS release, damaging lipid, proteins and DNA (Fubini and Mollo, 1995). Therefore, an hypothetical bioremediation process could be based on iron depletion from the fibres, mediated by chelating molecules released by an efficiently growing fungus directly into the soil. To study the interaction between fungi and fibres, the fungi were grown in batch liquid cultures, either in the presence or in the absence of the fibres. The mineral was sometimes kept

separated from the mycelia by a dialysis membrane, that allow to collect the fibres after the incubation with the fungi and to analyse them.

The functional study of some fungi, chosen among the most abundant in the serpentine soil of Balangero (figure 3.3), was based on the evaluation of fungal growth and iron extraction activity in the presence of fibres. The fibres used in these studies were crocidolite UICC and chrysotile 6D (table 2.1), the latter one extracted from the Balangero mine, the site of origin of the fungi. As chrysotile is a magnesium silicate, the fungal ability to extract magnesium from fibres was also investigated. The most active and well growing strains (figure 4.1, 4.2, 4.3) were then used to modify fibres and carry on further analysis of fibres reactivity (radical release and DNA damage).

#### *Fungal growth and ions extraction from fibres*

The reactivity and toxicity of asbestos fibres has been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (Mossman and Churg 1998). In spite of this, fungi do not seem to suffer fibre toxicity. In fact, with the exception of *Aspergillus fumigatus* (figure 4.1), fungal growth did not decrease in the presence of asbestos fibres, and in some cases even increased. *Paecilomyces lilacinus* and *V. leptobactrum* showed the most abundant growth both in the presence and in the absence of chrysotile and crocidolite (figure 4.1). These data confirm previous studies, where different fungal strains were able to grow in the presence of crocidolite fibres, showing different effectiveness (Martino et al., 2003).

One of the factors determining asbestos toxicity is the fibrous habit (Fubini and Otero-Arean 1999). *V. leptobactrum* mycelia tightly interact with fibres, and morphology of the hyphae was consequently modified (figure 4.4). This could be the consequence of both the mechanical stress generated by the fibres, and the oxidative reactions taking place at the fungus/fibres interface (e.g. lipoperoxidation of membranes; see chap. 5). However, no negative effects on the biomass development were observed. This is maybe related to the induction of defense reactions, such as pigment release. For instance, melanins are pigments that permit the survival of fungi under several stress condition (Bell and Wheeler, 1986). Melanized cells, such as clamidospores, show higher impermeability and tolerance to heavy metals (Gadd, 1993).

Fungi are able to release organic compounds that modify metals mobility and bioavailability (Gadd and White, 1989). *F. oxysporum*, already tested in similar assays with crocidolite UICC, chrysotile A and amosite (Daghino et al., 2005), confirmed its ability to extract iron from crocidolite and chrysotile 6D, and also showed a good ability to extract magnesium. Among the fungal strains isolated from a serpentine soil, *V. leptobactrum* and *P. lilacinus* were able to extract iron from crocidolite and iron and magnesium from chrysotile 6D. The most active was *V. leptobactrum* (figures 4.6 and 4.9), that was helped by a high biomass production, that is likely to determine a high metabolites release. In fact, *P. lilacinus* seems to be more active, if the data is expressed as ratio with biomass dry weight (figure 4.7). The amount of iron and magnesium extracted from the fibres depends not only on the activity of the fungus, but also on the physico-chemical characteristics of the different fibres, namely the amount of ion in the fibres and the surface area. Therefore, it is important to normalize the data of iron extraction when comparing two different fibres. Figure 4.8 reports the results of this normalization, and shows that fungi induce deeper modification in chrysotile than in crocidolite. These data confirm previous experiments done both with fungi and with purified organic chelators *in vitro* (Daghino et al., 2005; Lund and Aust, 1990).

Iron and magnesium extraction from fibres was observed by two direct analysis of the chemical composition of the fibres (table 4.11 and figure 4.12). These data show that the effect of the fungal treatment involves mainly the fibres surface, while the bulk is only slightly modified. The decrease of iron and magnesium amount on the fibres parallels with the data of

extraction. Chrysotile modification was stronger than crocidolite's, maybe because of the different structure and surface characteristics. In fact, previous studies had shown that chrysotile is more soluble than crocidolite, thus more easily altered by chelating treatment (Fubini and Otero-Arean, 1999).

Iron and magnesium mobilization from asbestos fibres is likely to be mediated by low molecular weight chelators released into the medium by the fungus, because the extraction occurs even if fibres are separated from the mycelium by a dialysis membrane. Previous work showed that fungi able to extract iron from crocidolite could release two kind of chelators, siderophores and organic acids (Martino et al., 2004), but the exact identity of the molecules involved in these activity remains unclear as well as the molecules and the mechanisms undergoing magnesium extraction.

Crocidolite fibres already depleted of iron were treated in a solution of desferoxamine, a strong iron chelator. This experiment showed the effective decrease of iron available for chelation at the surface of fibres, but on the other hand it demonstrated that a prolonged treatment of fibres with chelators can lead to further iron depletion (figure 4.10).

#### *Fungi can modify asbestos fibres chemical reactivity.*

Reactivity and toxicity of asbestos fibres are related to the presence of iron at their surface (Weitzman, 1984). For this reason, the reactivity of fibres depleted of iron by fungi was investigated by focusing on the ability of fibre to generate free radicals, especially hydroxyl radicals and carboxyl radicals (Fubini et al., 1995a; Fenoglio et al., 2001). Free radicals generation is function of iron oxidation and coordination state (Fubini and Mollo 1995).

The results suggest that the chelating activity of fungi involves reactive sites at the fibre surface, because there is a general decrease of reactivity for both chrysotile and crocidolite (figures 4.13, 4.14 and 4.15). The only exception observed was chrysotile, incubated with *V. leptobactrum*, that exhibited enhanced reactivity. This could be caused by the strong chelating ability of the fungus that, by modifying the fibre surface, may lead to the exposure of poorly coordinated iron ions that may represent new reactive sites. A similar effect was observed after treatment of crocidolite with ascorbic acid (Martra et al., 2003). *V. leptobactrum* does not modify the reactivity of the two types of fibres in the same way, probably because of the different structure of the minerals, as crocidolite is less soluble and has a smaller surface area than chrysotile (Fubini and Otero-Arean, 1999).

Free radical release is one of the main causes of asbestos toxicity and carcinogenicity (Kamp and Weitzman, 1999; Hardy and Aust, 1995a). In particular, genotoxic effects of fibres *in vitro* are mediated by free radicals (Gilmour et al., 1995) and correlate with the induction of mesothelioma *in vivo* (Adachi et al., 1994).

The ability of fibres depleted of iron by fungi to induce an oxidative damage to naked DNA in the presence of hydrogen peroxide was investigated by measuring 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8oxodGuo) formation. Both untreated and control (i.e. fibre incubate in the fungal culture medium, without fungus) crocidolite UICC and chrysotile 6D induced DNA oxidation. Control fibre were even more active than the untreated, perhaps because of the higher amount of iron at their surface, as revealed by SEM-XPS analysis (figure 4.12), and possibly due to iron deposition from the culture medium. Fibres treated with fungi induced significantly lower amount of 8oxodGuo than control fibres (figure 4.18). The results obtained during the set up of the experimental protocol suggest that iron active in DNA damaging is mobilized from the fibres and that the oxidation occurs only in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thus, fungi decrease the amount of iron available for mobilization and active in DNA damage.

The decrease in the oxidative ability of the fibres correlates with the blunting of radicals release, with the exception of *V. leptobactrum*-treated fibres (that generates more radicals, but do

not oxidize DNA) and of control fibres (that oxidize DNA, but do not show differences in radical release if compared with untreated fibres). These differences are likely related to the presence of EDTA in the protocol for DNA oxidation, but not in the radical release assays. The two assays reveal the reactivity in a different way, the first depending on the EDTA chelating activity, the second on direct surface reactivity.

The oxidation of an isolated molecule of DNA by fibres depends on the chemical properties of the fibres surface and on the medium. The reaction occurring on the fibres, i.e. generation of radicals or iron complexation, can directly affect DNA.

The reactions occurring in a cellular context are much more complex (figure 1.11). Many studies report the induction of 8oxodGuo in several cell lines exposed to crocidolite (Takeuchi and Morimoto, 1994; Chao et al., 1996; Xu et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). The oxidation of DNA in HL60 and A549 cell lines was investigated, with the aim to reveal possible differences between fungus-treated and untreated fibres. HL60 are macrophage-like cells able to phagocyte crocidolite fibres (Takeuchi and Morimoto, 1994). A549 is a lung epithelial cell line, typical target of asbestos toxicity *in vivo* (Riganti et al., 2002).

The exposure of both cell lines to crocidolite lead to a decrease of cells viability, while chrysotile had only a weak effect on viability (figure 4.19, 4.21 and 4.24). The difference could be explained by considering the lower amount of iron in chrysotile and the important role of this ion in damaging membranes and causing cell lysis (Gazzano et al., 2005). Compared to control fibres, iron depletion from fibres by fungal activity led to a decrease in cytotoxic effects of chrysotile on HL60, but not on A549. *F. oxysporum* and *P. lilacinus*-treated crocidolite was less toxic for A549, but *F. oxysporum*-treated fibres were more toxic for HL60. Different cells responded differently to the same fibre. A possible reason is that the mechanism of interaction between cells and fibres varies from cell-line to cell-line, and consequently the molecular target of fibres-induced reactions are different. For instance, if the fibres are not phagocytosed, the first molecular target should be the membranes, while if they are phagocytosed, they will react with intracellular molecules also.

The experimental protocol was set up by using the cellular DNA oxidation in untreated fibres as a reference (figure 4.20, table 4.23 and figure 4.25).

The results obtained from HL60 cells show that there is an induction of DNA oxidation by phorbol-myristate acetate (PMA), used to induce cell differentiation (table 4.23). This effect hid the induction of DNA oxidation shortly after the beginning of exposure to crocidolite. Increase in the level of 8oxodGuo was visible only after 24 hours, probably because of the activation of repair systems that blunts the effect of PMA, but not the effect of the continuous exposure to fibres. Thus, after 24 h of incubation the level of DNA oxidation was lower than at 8 h, but there was a significant oxidative stress induction by fibres if compared with the basal level without fibres. Under these conditions, crocidolite fibres treated with *F. oxysporum* and *V. leptobactrum* were less damaging than control fibres (figure 4.22).

Chrysotile induced a high level of oxidative DNA damage in HL60 during the first 8 h of incubation, which was effectively repaired at the end of 24 h, when no differences could be seen between basal level without fibres and fibre-treated cells. Fibres modification by fungi induced a decrease of the average 8oxodGuo levels induced. This difference between control and treated fibres was not statistically significant and disappeared after 24 h (figure 4.22). Chrysotile induced a strong and rapid DNA damage that was repaired by cells, while exposure to crocidolite lead to a weaker but lasting damage. The difference in the effect of the two fibres was observed also with untreated fibres and could be related to the already discussed different surface properties. For instance, the wider specific surface of chrysotile could lead to a more extensive interaction with the membranes or to the exposure of more available reactive sites.

Besides, the two kinds of fibres could be phagocytosed in different amounts and/or at a different rate (Hesterberg et al., 1987).

Crocidolite and chrysotile induced 8oxodGuo formation in A549 cells after 24 h exposure. There were non significant differences between control and treated fibres (figure 4.26).

The *comet assay* carried on with A549 cells, showed an effect of both crocidolite and chrysotile on the level of DNA strand breaks. These preliminary results show that the Comet assay could be a method to reveal the differences in genotoxic effects of fungi-treated and untreated fibres.

Altogether the reported results demonstrate that, with one exception, iron depletion from fibres mediated by fungi leads to an inhibition of the fibres surface reactivity. In parallel, the modified fibres have a lower oxidative activity on naked DNA. However in a cellular context, the fibres modification leads to a decrease of DNA oxidation only in few cases, and it was not possible to draw a direct correlation between chemical modification of fibres and cellular effects, probably due to the high complexity of cellular organisation and responses. Also, the strong variability observed may depend on the already mentioned differences between fibre structures and on the unpredictable modification of their reactivity in the cell culture medium. Other factors determining such variability could be: the release of free radical by inflammatory-type cells like macrophages and neutrophils (Kamp and Weitzman, 1999), the regulation of iron transport and storage systems that keep under control intracellular iron concentration (Hardy and Aust, 1995) and the regulation of antioxidant defences (Riganti et al., 2002, Poser et al., 2004).

#### **1.4 Metabolic responses of fungi to asbestos fibres: results and discussion.**

The biochemical activities of soil fungi mediate their interaction with minerals. Fungi release in the extracellular matrix organic acids and siderophores, that are able to mobilize and complex ions. Siderophores are specific iron chelators and previous experiments reported a good correlation between iron extraction from crocidolite and siderophores production (Martino et al. 2003).

Fungi isolated from a serpentine soil are able to release iron-chelating molecules (figure 5.2). These species were tested for the production of iron chelators. *V. leptobactrum*, which was very active in iron and magnesium extraction from fibres, did not produce high amount of chelating molecules. Thus, its extracting ability could be justified by its high biomass development in the presence of fibres rather than the production of strong chelators. The pH of the culture medium did not change after fungal growth and compounds release. This suggests that these compounds are not organic acids, and let hypothesize a role of siderophores. In fact, the fraction of the culture medium showing a chelating activity contained molecules of 300-2000 Da, corresponding to the molecular weight reported in the literature for siderophores (figure 5.1).

Iron extraction from asbestos by fungi lead to an increased concentration of these ions in the culture medium. Fungi are thus exposed both to the stress derived directly from the fibres and to the stress caused by the mobilized, possibly redox-active iron, similarly to asbestos-exposed mammalian cells. Some of the markers of oxidative stress in mammalian cells were considered in order to understand the oxidative stress response in fungi.

Asbestos fibres can damage cell membranes by inducing an increase in lipid peroxidation (Gulumian, 1987), mediated by ROS or directly by iron (Ghio et al., 1992;, Petersen, 2005). Malondialdehyde (MDA), a product of this reaction, is highly toxic and used as a marker of oxidative stress (Del Rio et al., 2005). Mycelia incubated with crocidolite showed a higher amount of MDA than control mycelia (figure 5.3), whereas chrysotile induced MDA

formation, but not at levels significantly different from the controls. Since lipoperoxidation is initiated by iron-generated radicals, the lower amount of iron contained in chrysotile likely explains the difference from crocidolite. Since the fungal cell membranes are protected by a cell wall, lipoperoxidation occurred independently from contact between fibres and target molecules. The iron mobilized by fungal chelators is likely to catalyze radical formation close to the membranes, and to start the damaging reactions.

The incubation of mycelia with asbestos lead to a modification in the pool of extracellular proteins expressed by *V. leptobactrum* and suggest a different regulation of transcription/translation in the presence and in the absence of asbestos. The induction or inhibition of proteins could be a response to either the physical stress or to the increased concentration of iron and the consequent oxidative stress. This data confirm what was already observed in *F. oxysporum* (Martino et al., 2004, Daghino et al., 2005) and what is generally known for fungi exposed to heavy metals or oxidants-related stress (Vido et al., 2001; Godon et al., 1998).

Superoxide dismutase (SOD) enzymes play a major role in the response to oxidant stress. Their expression is induced in ericoid fungi by heavy metals (Martino et al., 2002) and in *Geomyces pannorum* var. *pannorum* by crocidolite (Martino et al., 2004). In this study, the presence of a Mn-SOD was observed in filtered culture media of *F. oxysporum* grown with crocidolite, of *V. leptobactrum* grown with chrysotile and in intracellular extracts of *V. leptobactrum* grown both with chrysotile and with crocidolite.

In parallel with these results, there was an increase of SOD enzymatic activity in extracellular media of *F. oxysporum* and *V. leptobactrum* grown in the presence of crocidolite, while chrysotile caused only a slight induction (figure 5.5). The expression and the activity data cannot be directly compared because the activity assays are not specific for Mn-SOD, but are the results of all the SOD enzymes activity (e.g. CuZnSOD, Martino et al. 2002). The higher induction of SOD activity by crocidolite than chrysotile could reflect a stronger stress, that may be consistent with the significant induction in lipid peroxidation. MnSOD is an important enzyme in the response of mammalian cells to asbestos fibre. It was found to be induced in mesothelial cells *in vitro* and *in vivo*, but not in fibroblasts (Kinnula, 1999). Some studies demonstrated that the activation of SOD enzymes without activation of other antioxidant enzymes, like catalases (CAT) and glutathione peroxidases (GPx), is not protective or even harmful. Thus the equilibrium among all these enzymatic activity seems to be more important than the activity of each enzyme (Kinnula, 1999).

CAT is activated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in filamentous fungi (Angelova et al., 2004) and by chrysotile in plants (Trivedi et al., 2004). GPx is activated in *Euphorbia esula* when exposed to abiotic stress. CAT and GPx were found to be very active in intracellular extracts of *V. leptobactrum* grown in the presence of chrysotile, while their activity was reduced by crocidolite treatment. To better understand this results it would be necessary to investigate SOD intracellular activity, that would provide the substrates of enzymatic reactions catalyzed by CAT and GPx. The high activity of the chrysotile treated mycelium could be an adaptive behaviour of the fungus, that was isolated from a chrysotile rich soil. By contrast the inhibition of CAT and GPx by crocidolite is similar to the antioxidant defences inhibition by crocidolite in A549 cells, where there is a depletion of glutathione (Riganti et al., 2002), that is the substrate of GPx. Moreover, many authors report that CuZnSOD, CAT and GPx induction is not always consistent with MnSOD induction (see Kinnula, 1999).

These data concerning the fungal metabolic response to asbestos fibres, even if not complete, suggest the involvement of the same antioxidant systems involved in the mammalian cells response.

## 1.5 Conclusions and perspectives.

One of the issues raised by the presence of asbestos in soils is the remediation of the sites involved, because the contaminant is neither degraded nor removable.

The experiments reported in this thesis show the ability of fungi to interact with asbestos fibres and to modify them after just 20 days. It would be interesting to investigate the alteration of redox and coordination states of surface iron, because they are, in addition to the amount of this ion, important factors determining iron reactivity.

As a consequence of chemical modification of the fibres, the damage caused to DNA *in vitro* was strongly reduced. This result did not find a direct correspondence with the results obtained in cell cultures. However, other experiments suggest that iron extraction from the fibres could be prolonged until no more bioavailable iron remains, thus further inactivating the fibres.

The *in vitro* modification and the *bioweathering* activity of fungi in the soils, allows some speculation on their possible effectiveness on asbestos minerals in the soil, even though no *in field* assays have been performed so far. These assays should aim to investigate the ability of fungi, already tested *in vitro*, to interact with the mineral in a non sterile system, affected by climatic factors and by the presence of other microorganisms.

The isolation and identification of the fungal population inhabiting *ophiolite* sites contribute to the characterization of these ecologically important sites, but also to the identification of metal tolerant strains, interesting for the development of bioremediation strategies.

The fungal metabolic responses to the oxidative stress generated by fibres seems to use molecular mechanisms similar to those involved in the stress response of mammalian cells. This may suggest, with the necessary distinction, a possible use of fungi as model organisms for the study and the comparison of the effect of the different fibres. For instance, as the fungi have no phagocytosis, this model system would allow to make distinctions between the mechanical stress related to fibres shape, and the chemical stress due to iron reactivity and mobilization. Moreover the fungus, for the characteristics of its genome, could be a simpler model than mammalian cells to study the genetic alteration induced by asbestos exposure.

---

# Capitolo 1

## Introduzione

### **Résumé**

Le mot “*weathering*” définit dans le vocabulaire géologique des processus de dégradation des roches qui ont un rôle dans la composition de la lithosphère, biosphère, hydrosphère et atmosphère (Vaughan et al., 2002). Si ce processus se produit à travers les organismes pionniers comme les lichens, les bactéries et les champignons, il est possible de parler de *bioweathering* (Burford et al., 2003). Ce processus était déjà connu par Sollas en 1880. L’interaction des champignons avec les minéraux est une part importante des cycles biogéologiques des éléments comme C, N, P, S et quelques ions métalliques (Gadd 1993, 1999, 2000a). L’étude de l’impact des champignons sur les processus géologiques s’appelle la “géo-mycologie” (Burford et al., 2003a). Les mécanismes d’interactions entre les champignons et les substrats minéraux peuvent être divisés en mécanismes biogéophysiques (liés à l’activité biomécanique des champignons) et biogéochimiques (liés à l’activité biochimique des champignons; Hoffland et al., 2004). Les champignons peuvent produire des composés extracellulaires qui modifient la bio-disponibilité des métaux comme les agents chélatants (acide citrique, sidérophores), des pigments (mélanine) et des acides organiques.

Les serpentinites sont des roches de la famille des ophiolites et contiennent du chrysotile (amiante serpentine) et trémolite (amiante amphiboles). En Italie, les zones ophiolites sont principalement présentes dans le nord-ouest des Alpes et le nord des Apennines.

La réactivité des fibres d’amiante est due à la composition chimique de surface et principalement à la présence d’ions métalliques qui peuvent catalyser des réactions d’oxydo-réduction (Guthrie, 1997). En particulier, les radicaux libres contribuent à la toxicité des fibres en catalysant l’oxydation de l’ADN, des lipides et des protéines (Gold et al., 1997; Turver and Brown, 1987; Gilmour, 1995; Weitzman and Whitberg, 1985). L’exposition à l’amiante induit aussi l’activation des défenses antioxydantes en activant principalement trois familles d’enzymes: supéroxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) and catalase (CAT).

L’amiante est un problème ambiantale à cause de la présence de roches contenant ce minéral mais aussi à cause des anciennes mines d’amiante, comme celle de Balangero (Piémont, Italie). La revalorisation (*remediation*) de ces sites naturellement contaminés passe par la modification de la toxicité des fibres. Considérant les propriétés des champignons ils s’agit de bons candidats pour la *bioremediation* de l’amiante.

L’objectif de cette thèse est l’isolement de souches fongiques à partir de sols serpentiniques afin de savoir quelles sont les espèces fongiques les plus abondantes dans ces sols et de sélectionner les souches les plus efficaces pour leur interaction avec les fibres d’amiantes. Les modifications des fibres et l’altération du métabolisme fongique ont été considérés. Ce travail représente un exemple d’étude de géo-mycologie.

### **Abstract**

The word “*weathering*” defines, in the geological vocabulary, a number of rock alteration processes which play a synergic role in defining lithosphere, biosphere, hydrosphere and atmosphere composition (Vaughan et al., 2002).

There is a biological component which contributes to rocks disgregation, mainly through pioneer organisms such as lichens, but also by many bacteria and fungal species. It is therefore

possible to speak of *bioweathering*, which is the disgregation of rocks that derives from the activity of living organisms (Burford et al., 2003), a process already described by Sollas in 1880.

Bacteria, algae, fungi and plants can cause chemical *weathering* through soil acidification, organic acids and metabolites secretion. Due to their extensive soil colonization and abundance, fungal interactions with minerals play an important role in the biogeochemical cycles of elements such as C, N, P, S and some metal ions (Gadd 1993, 1999, 2000a). The typical filamentous growth and the ability to produce and release organic acids, protons and other metabolites make fungi particularly important as *weathering* biological agents (Gadd 1999 and 1993; Gu et al., 1998).

*Geomycology* can be defined as the study of the impact of fungi on the geological processes (Burford et al., 2003a). Mechanisms of interaction of fungi with the mineral substrate can be divided in biogeophysical mechanisms, related to a biomechanical fungal activity and biogeochemical mechanisms, related to the biochemical fungal activities (Hoffland et al., 2004). Fungi can solubilize minerals and metal compounds essentially through the release of organic acids or chelating molecules. Fungi can interact with metal ions in different compartments (extracellular and intracellular). Moreover, fungi can release extracellular compounds which modify metal bioavailability such as chelating agents (citric acid, siderophores), pigments with chelating properties (melanins) and organic acids. Fungi can also perform chemical transformation of metal compounds (reduction, oxidation, methylation, dealkylation). When metal ions cross the fungal cell wall, metal uptake occurs through an active metabolism-dependent process (Morley et al., 1996).

Ophiolitic environments have been studied for long time because of their scientific and environmental significance (Brooks, 1987; Baker et al., 1992). Serpentinite rocks belong to the ophiolitic family and contain chrysotile (serpentine asbestos) and tremolite (amphibole asbestos), fibrous minerals which are of very high concern in environmental/epidemiological studies (Favero et al., 2003). In Italy, ophiolitic areas are represented mainly in the Northern-Western Alps and in the Northern Apennines, and they are important sites for the high biodiversity associated with them (Piervittori and Siniscalco, 2004). In Piedmont, a number of asbestos containing rocks do exist. The general term asbestos refers to a number of silicates crystalline minerals.

Recent studies have elucidated the pathogenesis mechanisms of lung diseases derived from asbestos exposure, and underlined their complexity (Kamp and Weitzman, 1999). Morphology, dimensions and persistence are the three most important factors in determining the pathological effects of any inhaled particles/fiber. More recently, major importance has been given to the chemical reactions related to particulates (Hardy and Aust, 1995; Fubini, 1997).

The reactivity of asbestos fibers is related to the surface chemical composition and mainly to the presence of metallic ions able to behave as electrons acceptor/donator and thus to catalyse oxidation/reduction reactions (Guthrie, 1997). In particular, the generation of free radicals (such as ROS) caused by asbestos fibers contributes to the pathogenesis mechanisms, by catalyzing DNA, lipids and proteins oxidation (Kamp et al., 1992; Hardy and Aust., 1995b). The long term reaction of fibers surface is mostly determined by the presence of iron ions at the surface and by its oxido-reductive activity. The crucial role of iron is also demonstrated by the fact that the treatment of fibres with a strong iron chelators like desferroxamine inhibits the release of oxydril radicals *in vitro* and the oxidative effect on DNA and lipids induced by crocidolite fibers (Gold et al., 1997; Turver and Brown, 1987; Gilmour, 1995; Weitzman and Whitberg, 1985). Asbestos exposure induces also the activation of antioxidant defences through the activation of three main enzymes families: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx).

Asbestos, however, represents an environmental problem also because of its abundance in rocky areas containing this mineral or in dismissed mines. Remediation of asbestos present in soils raises specific problems due to the wide areas interested by the contamination and to the higher dispersion of fibers. An asbestos remediation protocol should aim at modifying the features responsible of asbestos toxicity, such as the fibrous habitus, the crystalline structure and the iron content. Fungi, when considering their properties and the characteristics previously described, would represent good candidates for use in asbestos bioremediation. In fact, their hyphal growth would be an optimal pre-requisite to immobilize asbestos fibers in soils, and their ability to solubilise iron through the release of specific chelators would reduce the fibers iron content and thus the generation of free radicals.

General aim of the thesis was therefore the isolation of the fungal components from serpentinitic soils with two main objectives: (a) to identify the most abundant fungal species in the serpentinitic areas in Western Alps; (b) to select the most efficient strains for the interaction with asbestos fibers, in particular strains more efficient in iron extraction. Both fibers modifications and alteration of the fungal metabolism have been considered. This work represents an examples of a geomycological study.

Minerali e microrganismi hanno interagito sulla Terra a partire dal Precambriano (Ehrlich, 1998; Hochella, 2002) ed è riconosciuto che le forme di vita primordiali abbiano avuto un ruolo importante nella formazione di litosfera, idrosfera ed atmosfera (Bengston, 1994). Infatti, siccome le strutture cellulari sono costituite di composti del carbonio in stato parzialmente o completamente ridotto, la comparsa delle prime forme di vita unicellulare deve aver influenzato la distribuzione del carbonio sulla superficie terrestre, nonché il ciclo del carbonio quando questo è divenuto limitante. Le stesse biomolecole sono costituite anche da elementi quali N, P, S, ed è verosimile che la loro distribuzione sia stata allo stesso modo alterata dalla comparsa delle prime forme di vita (Ehrlich, 1998). Si suppone che il metabolismo negli organismi primordiali fosse anaerobico, probabilmente di tipo chemiorganotrofo o chemiolitotrofo (v. tabella 1.1). Una strategia metabolica primitiva può essere stata rappresentata dalla formazione di pirite ( $\text{Fe}_2\text{S}$ ) a partire da forme ridotte dello zolfo ( $\text{H}_2\text{S}$ ) con liberazione di energia. In seguito si ritiene si sia originata un'attività fotosintetica basata su porfirine, dapprima anossigenica, successivamente ossigenica. Organismi fotoautotrofi (cianobatteri, solfobatteri rossi e verdi) e chemiolitoautotrofi (idrogenobatteri, solfobatteri, ferrobatteri e batteri nitrificanti) svilupparono la capacità di formare carbonio organico ridotto fissando la  $\text{CO}_2$  atmosferica attraverso il ciclo di Calvin. In particolare la comparsa dei cianobatteri, i primi organismi fotosintetizzanti ossigenici, 3.5 miliardi di anni fa, portò alla progressiva conversione dell'atmosfera primordiale, ricca di gas riducenti, in un'atmosfera in cui l'ossigeno era il secondo gas più abbondante dopo l'azoto: due miliardi di anni fa l'ossigeno raggiunse la concentrazione critica dell'1% che permise la formazione dello strato di ozono e la rapida evoluzione degli organismi aerobi, con la comparsa di nuove specie procariote e poi eucariote (Brock et al., 1995). Microrganismi eucarioti e forme di vita superiore hanno quindi ulteriormente modificato la distribuzione della materia sulla superficie terrestre inserendosi nei cicli geochemici degli elementi, per esempio in quello già citato del carbonio.

Le interazioni tra microrganismi e minerali possono virtualmente influenzare ogni processo biologico, geologico e biogeochimico che avvenga alla o in prossimità della superficie terrestre. Microrganismi procarioti (batteri e archea) e eucarioti (funghi, alghe e protozoi) sono presenti in quasi tutti gli ecosistemi, colonizzando anche gli ambienti più estremi come deserti caldi e freddi (Howoritz et al., 1972, Friedman and Ocampo, 1976), suoli ipersalini (Javor,

1989), sorgenti calde e geysir (Renaut and Jones, 2000), suoli geotermici (Redman, 1999). In questi ambienti i microrganismi possono interagire con 4000 specie minerali, ognuna con un'ampia variabilità nella chimica di superficie, e possono influenzare diversi processi mineralogici (Hochella, 2002).

Gruppi		Fonte di energia	Fonte di carbonio	Esempi
<b>Fototrofi</b>				
Fotolitotrofi	Autotrofi	Luce	CO <sub>2</sub>	Alghe, cianobatteri, solfobatteri rossi e verdi
Fotoorganotrofi	Eterotrofi	Luce	Composti organici e CO <sub>2</sub>	Batteri rossi e verdi che utilizzano fonti di carbonio organico
<b>Chemiotrofi</b>				
Chemiolitotrofi	Autotrofi	Reazioni red/ox composti inorganici	CO <sub>2</sub>	Batteri nitrificanti, idrogenobatteri, solfobatteri
	Eterotrofi (mixotrofi)	Reazioni red/ox composti organici	Composti organici	<i>Beggiatoa</i>
Chemioorganotrofi	Eterotrofi	Reazioni red/ox	Composti organici	Batteri eterotrofi, funghi, protozoi

Tabella 1.1 - Le strategie nel metabolismo energetico dei microrganismi / Strategies of energetic metabolism of microorganism. (Modificata da Brock et al., 1995).

### 1.1 Il *bioweathering*

Il termine anglosassone “*weathering*” può essere tradotto come “sgretolamento, erosione, deterioramento”, e definisce in ambito geologico un insieme di processi di alterazione di rocce e minerali che giocano un ruolo sinergico nel determinare la composizione di litosfera, biosfera, idrosfera e atmosfera (Vaughan et al., 2002).

Il suolo può essere definito come uno strato che ricopre la litosfera, attraverso il quale avvengono scambi con l'atmosfera, l'idrosfera e la biosfera. I processi che portano alla sua formazione hanno origine proprio con la degradazione dei substrati rocciosi (aggregati di minerali). I meccanismi e la velocità di disgregazione di rocce e minerali dipendono da fattori estrinseci (ad esempio le condizioni ambientali) ed intrinseci (ad esempio le caratteristiche mineralogiche della roccia stessa) (Hochella, 2002). La degradazione meteorica delle rocce rappresenta il fattore principale del primo stadio di formazione di un suolo: essa raggruppa tutti i processi di degradazione chimico-fisica cui sono soggette le rocce di affioramento e che variano al variare del clima e della composizione della roccia stessa. In particolare, processi di alterazione fisica prevalgono in regioni dal clima arido, mentre quelli di alterazione chimica dominano soprattutto nelle regioni umide.

Inoltre esiste una componente biologica che contribuisce alla disgregazione della roccia, soprattutto attraverso organismi detti “pionieri”, come i licheni ma anche molte specie di batteri e funghi. In questo caso si può parlare di *bioweathering*, che viene quindi definito come lo sgretolamento, la decomposizione di rocce e minerali mediati dall'attività di organismi viventi (Burford et al., 2003), un processo già riconosciuto da Sollas nel 1880.

Microrganismi, animali e piante superiori possono decomporre aggregati di rocce attraverso attività di tipo biomeccanico o biochimico sui costituenti minerali (Goudie, 1996).

Microorganismi filamentosi, piante superiori ed animali possono favorire la disgregazione dei substrati rocciosi esercitando forze di tipo fisico (ad esempio la pressione delle radici o delle ife fungine in crescita, oppure l'escavazione di una tana) (Sterflinger, 2000). Tuttavia le attività biochimiche degli organismi viventi sembrano avere un peso maggiore nei processi di disgregazione delle rocce rispetto a quelle di tipo meccanico (Sterflinger, 2000; Etienne, 2002). Batteri, alghe, funghi e piante possono attuare meccanismi di *weathering* chimico attraverso l'acidificazione del suolo, la secrezione di acidi organici ed altri metaboliti, e di anidride carbonica, che rilasciata durante la respirazione può portare alla formazione di acido carbonico (Sterflinger, 2000; Ehrlich, 1998; Gadd and Sayer, 2000).

Spesso comunità miste di microrganismi detti litobionti colonizzano le superfici minerali formando un "*biofilm*" costituito da cellule immobilizzate all'interno di una matrice di polimeri extracellulari secreti dai microrganismi stessi (Decho, 2000; Vaughan et al., 2002). La matrice extracellulare permette l'adesione delle cellule alle superfici e agisce come un collante tra i frammenti di sedimenti attorno a cui si forma (Decho, 2000). *Biofilm* si possono trovare in ambienti acquatici, nel sottosuolo e nelle zone del suolo più vicine alla superficie e quindi a contatto con l'aria. I *biofilm* che si trovano in ambienti costantemente coperti dall'acqua contengono fino al 98% di acqua, mentre quelli che si formano in zone aerate del suolo contengono per lo più biomassa e ne permettono il mantenimento in stato metabolicamente attivo nonostante la limitata disponibilità di acqua (Gorbushina and Krumbein, 2000).

Il *weathering* di substrati rocciosi può portare alla proliferazione di comunità microbiche in ambienti sub-aerei o nel sottosuolo. Maggiore è la profondità, minore è la disponibilità di ossigeno così come minore è la biodiversità rilevata: tra i 10 e i 50 metri di profondità sono state isolate forme vitali di batteri, alghe funghi e protozoi, mentre tra i 150 e i 250 metri si ritrovano solo alcune scarse forme di vita batteriche, e nessuna eucariote (Ehrlich, 1998). Questo fatto può essere dovuto alle condizioni ambientali limitanti, come la temperatura e la scarsità di ossigeno, ma alcuni autori sottolineano anche la difficoltà di isolare con le tecniche tradizionali microrganismi che hanno tipicamente una crescita molto lenta o che non sono coltivabili *in vitro*. Al fine di identificare tali microrganismi è necessario l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare in grado di amplificare regioni del genoma utili per la loro identificazione (Reeves, 1997; Sterflinger, 2000).

La disponibilità di nutrienti negli strati più profondi del sottosuolo è probabilmente limitante anche nelle migliori circostanze. I batteri che si sviluppano in questi ambienti possono essere, a seconda del tipo di nutrienti disponibili, sia eterotrofi che chemiolitotrofi. I primi saranno predominanti in depositi di rocce sedimentarie, che presentano residui di carbonio organico metabolizzabile. I secondi saranno invece dominanti in depositi di rocce ignee, dove qualsiasi molecola organica è stata distrutta dal calore del magma da cui tali rocce si originano ma sono disponibili ioni inorganici come fonti di energia. Analogamente, a seconda della disponibilità di ossigeno, batteri proliferanti nel sottosuolo possono essere aerobi (ad esempio eterotrofi, ammonio e nitrito-ossidanti), aerobi facoltativi o anaerobi (ad esempio fermentatori, nitrato e solfato-riduttori e metanogeni) (Ehrlich, 1998).

I processi di degradazione fisica dei minerali favoriscono ed accelerano i processi di degradazione biomeccanica, chimica e biochimica e vice versa. Per esempio, la formazione di fessure e di zone sgretolate accelera i meccanismi di degradazione mediati dai microrganismi, fornendo delle nicchie di crescita che possono essere facilmente colonizzate e dando inizio a cicli di crescita-morte-degradazione-ricolonizzazione della superficie del minerale. L'abbondanza e la diversità delle comunità microbiche aumentano man mano che le rocce sono sgretolate e trasformate in suolo (Banfield et al., 1999). Inoltre, il metabolismo dei microrganismi viene influenzato dai minerali con cui essi vengono in contatto: l'acquisizione di energia e nutrienti, l'adesione cellulare e la formazione di *biofilm* ne sono esempi (Hochella,

2002). I microrganismi, intervenendo nei processi di dissoluzione o di formazione dei minerali, traggono vantaggio da queste reazioni, in quanto ne ricavano energia o la possibilità di compiere cicli di respirazione in carenza o assenza di ossigeno. Alcune specie batteriche infatti utilizzano gli ioni che compongono i minerali come accettori terminali di elettroni nella catena respiratoria, e questo risulta nella riduzione degli ioni stessi (Lovley, 2004). Per esempio il batterio denominato *Pantoea agglomerans SP1* è in grado di accoppiare l'ossidazione dell'acetato alla riduzione del Fe(III) in ambienti sedimentari (Francis et al., 2000). Inoltre i microrganismi acquisiscono elementi essenziali allo sviluppo, come C, N, P e Fe, dalla superficie dei minerali, dove tali elementi sono presenti a concentrazioni molto più alte rispetto a quelle che si trovano nell'ambiente circostante (Atlas and Bartha, 1998).

D'altro lato i microrganismi influenzano sia la dissoluzione che la formazione dei minerali, e ne modificano la chimica e la reattività di superficie (Hochella, 2002; Putnis, 2002). La dissoluzione può essere inibita da alcune attività metaboliche dei microrganismi, come la secrezione di polisaccaridi extracellulari, che possono inattivare i centri reattivi sul minerale (Welch, 1999). Al contrario i microrganismi possono aumentare la velocità di dissoluzione dei minerali modificando il pH e rilasciando molecole con proprietà chelanti come acidi organici e siderofori (Gadd, 1999; Stone, 1997). In alcuni ambienti i microrganismi promuovono la formazione dei minerali (*biomineralizzazione*) attraverso la precipitazione per ossidazione o riduzione enzimatica di ioni precedentemente solubilizzati da minerali preesistenti. Ad esempio il Mn(II) può essere ossidato a MnO<sub>2</sub> e tale processo risulta più rapido in presenza che in assenza di batteri manganese-ossidanti, grazie alla catalisi enzimatica. Nel caso di reazioni ossidative, parte dell'energia rilasciata viene utilizzata dal microrganismo. Nel caso di reazioni di riduzione microbica, la specie inorganica utilizzata serve come accettore finale di elettroni nella catena respiratoria e sostituisce parzialmente o totalmente l'ossigeno.

La formazione di minerali da parte dei microrganismi può avvenire anche per via non-enzimatica. Alcuni possono essere formati tramite acquisizione attiva o passiva di una o più specie inorganiche seguita dalla conversione in sali o ossidi utili al sostegno o alla protezione della cellula. In questi casi, il microrganismo fa da "stampo" nella definizione della struttura dell'aggregato minerale che viene a formarsi. La deposizione di minerali da parte del microrganismo può avere l'effetto di aumentarne la competitività all'interno di una comunità microbica. Ad esempio, in presenza di metalli tossici biodisponibili, i ceppi batterici in grado di adsorbire tali ioni all'involucro cellulare di peptidoglicano o di immobilizzarli come solfuri, carbonati o fosfati insolubili godranno di un vantaggio rispetto ad altri ceppi, incapaci di detossificare tali composti. Le reazioni di ossidoriduzione di specie inorganiche hanno anche l'effetto di renderle meno tossiche. Ad esempio il Cr(VI), mutageno e carcinogeno, può essere ridotto a Cr(III) la cui tossicità è ridotta grazie alla bassa solubilità e bassa biodisponibilità a pH neutro. Tale riduzione può avvenire per via enzimatica o non-enzimatica, in condizioni aerobiche o anaerobiche a seconda del ceppo batterico che la attua (Ehrlich, 1996a).

## 1.2 Il ruolo dei funghi nei processi geologici

I funghi sono organismi chemioeterotrofi, ubiquitari in ambienti terrestri, possono crescere in forma lievitoide unicellulare, in forma miceliare filamentosa o essere dimorfici (ossia alternare le due forme a seconda delle condizioni ambientali) (Deacon, 2000; Gadd, 1999 e 1993). I funghi possono espletare diverse funzioni ecologiche come decompositori della materia oppure come simbionti e patogeni di piante e animali. Essi sono infatti caratterizzati da una morfologia miceliare filamentosa che garantisce un elevato rapporto superficie/massa e li rende efficienti colonizzatori del substrato in cui crescono. Inoltre essi costituiscono la biomassa più abbondante nel suolo rispetto ad altri microrganismi. Questi due fattori,

invasività e abbondanza nei suoli, assicurano che l'interazione funghi/minerali sia parte integrante dei cicli biogeochimici di elementi quali C, N, P, S e alcuni metalli (Gadd 1993, 1999, 2000a). I funghi nel suolo possono crescere in forme autonome, come simbionti di piante, patogeni di piante o animali, lieviti unicellulari e sono coinvolti nel ciclo del carbonio e di altri elementi (Gadd and Sayer 2000). In particolare i funghi micorrizici sono uno dei gruppi di funghi del suolo più importanti dal punto di vista dell'interazione con minerali e della dissoluzione di composti contenenti metalli (Hoffland, 2002; Landeweert, 2001; Martino et al., 2003).

Negli ultimi anni la geomicrobiologia, ossia lo studio delle interazioni tra microrganismi e minerali, si è largamente focalizzata sui procarioti. Il ruolo dei funghi nei processi geologici e di *weathering* è stato sottovalutato, con l'eccezione dei licheni (Sterflinger 2000, Banfield et al. 1999, Easton 1997). Tuttavia la caratteristica crescita filamentosa e la capacità di produrre e secernere acidi organici, protoni ed altri metaboliti rendono i funghi particolarmente adatti come agenti di *weathering* biologico di rocce, minerali e materiali da costruzione (Gadd 1999 e 1993, Gu et al., 1998).

La *geomicrologia* può essere definita come lo studio dell'impatto dei funghi sui processi geologici, ovvero l'alterazione e il deterioramento di rocce e minerali, l'accumulo di metalli, il ruolo nei ciclo biogeochimici dei nutrienti e l'influenza sulla proliferazione delle comunità microbiche nei substrati minerali (Burford et al., 2003a).

Dal punto di vista funzionale, si possono distinguere cinque gruppi di funghi potenzialmente coinvolti nel *bioweathering* dei minerali.

I funghi micorrizici, ed in particolare ectomicorrizici e micorrizici ericoidi formano simbiosi con oltre l'80% delle piante terrestri (Landeweert et al., 2001). Tali funghi assorbono nutrienti e acqua dal suolo e li trasferiscono all'apparato radicale della pianta, ricevendo in cambio fotosintati. La simbiosi più diffusa tra le piante ad alto fusto e i membri dei *phyla* Basidiomicota e Ascomicota è quella di tipo ectomicorrizico (Smith and Read 1997). Questo tipo di interazione pianta-fungo è caratterizzata dalla formazione di un mantello di micelio attorno all'apice radicale, da cui si dipartono verso l'esterno le ife fungine che, grazie alla loro morfologia di crescita e le ridotte dimensioni, esplorano il suolo circostante alla ricerca di nutrienti, colonizzando anche micrositi che sarebbero altrimenti inaccessibili alle radici. L'effetto positivo dei funghi ectomicorrizici sulla nutrizione della pianta è stato tradizionalmente attribuito all'acquisizione quantitativa di nutrienti dalla componente acquosa del suolo (aumentata dall'incremento della superficie di contatto e del volume di suolo sfruttato) e al successivo trasferimento alle radici. Più recentemente sono stati rivalutati gli effetti qualitativi della simbiosi sulla nutrizione della pianta, ed in particolare la possibilità che il fungo utilizzi fonti di P e N organici nel suolo (Smith and Read 1997) e la capacità dello stesso di solubilizzare attivamente ioni dalla struttura dei minerali. Entrambi questi meccanismi costituirebbero un "scorciatoia" per la nutrizione della pianta. Nel primo caso, ioni P e N provenienti da fonti organiche, verrebbero trasferiti attraverso il micelio direttamente alla pianta, senza passare per lo stadio intermedio della mineralizzazione nel suolo. Nel secondo caso, elementi essenziali presenti nel suolo come costituenti dei minerali verrebbero trasferiti alla pianta, senza essere preventivamente solubilizzati nella componente acquosa del suolo (van Breemen et al., 2000). I funghi ectomicorrizici influenzano l'acquisizione di nutrienti da parte della pianta attraverso la produzione di enzimi e il rilascio di acidi organici. L'attività enzimatica extracellulare permette la mobilizzazione di nutrienti da fonti organiche quali aminoacidi, peptidi, proteine, amminozuccheri, chitina e acidi nucleici, con il successivo trasferimento di N e P alla pianta ospite (Chalot and Brun, 1998; Antibus et al., 1997). La secrezione di acidi organici nel mezzo media l'estrazione da matrici minerali di ioni quali P, K, Ca e Mg.

Un altro gruppo importante nel *bioweathering* è costituito dai micobionti, partner fungini delle simbiosi licheniche. I licheni, simbiosi tra un fungo e un'alga o un cianobatterio, risalgono al Devoniano inferiore (circa 400 milioni di anni fa). Sebbene evolutivamente più giovani dei funghi micorrizici, i licheni hanno avuto un ruolo importante nel deterioramento delle rocce e nella formazione del suolo (Chen et al., 2000). Siccome il micobionte, diversamente dal fotobionte, si trova a stretto contatto con il minerale, si pensa che esso sia il principale responsabile del deterioramento del substrato.

Anche i funghi saprotrofi possono interagire con i substrati minerali. Per esempio *Aspergillus niger* (utilizzato industrialmente per la produzione di acido citrico) è in grado di crescere rapidamente utilizzando fonti di carbonio relativamente semplici.

Un altro gruppo è rappresentato dai funghi saprotrofi in grado di degradare i complessi di ligninocellulosa, i quali producono abbondanti quantità di anioni organici come l'ossalato per generare perossido di idrogeno e complessi di manganese che possono ossidare i composti fenolici (Dutton and Evans 1996), e che potrebbero quindi essere potenziali agenti di *bioweathering*.

Infine i funghi "meristemati" ed altri saprotrofi stress-tolleranti sono stati spesso segnalati su substrati minerali (Sterflinger and Kumbrein, 1997). Si tratta di funghi adattati a crescere su superfici caratterizzate da elevate escursioni termiche e umidità variabile. Tali funghi possono crescere sulla superficie delle rocce (epilitici), nelle fessure (endolitici) o scavare attivamente nel substrato roccioso (criptoendolitici) (Kumar and Kumar, 1999; Sterflinger, 2000; Verrecchia, 2000). Essi formano aggregati di microcolonie demaziacee e sono caratterizzati da una parete spessa e pigmentata (Bogomolova et al., 1998).

Molti funghi sono in grado di sopravvivere e sfruttare microhabitat favorevoli sulle o all'interno delle superfici rocciose (Burford et al., 2003a) sia come simbionti (ad esempio i licheni) che in forma libera (Bogomolova et al., 1998; Sterflinger, 2000). Funghi con queste caratteristiche sono stati isolati sia da rocce ignee che sedimentarie comprese rocce silicee (silice, silicati e alluminosilicati), arenaria, granito, calcare, marmo e gesso, nonché da ambienti estremi quali deserti caldi e freddi. (Sterflinger, 2000; Ehrlich, 1998).

In molte regioni costiere e negli ambienti ipersalini lo stress osmotico dovuto all'elevata salinità inibisce ulteriormente la crescita microbica sulle superfici rocciose esposte. I substrati unicamente inorganici non favoriscono la proliferazione fungina e batterica, che è al contrario facilitata dalla presenza contemporanea di substrati inorganici ed organici sulla superficie o nelle fessure delle rocce. Inoltre materiali "di scarto" di alghe e batteri, ad esempio cellule morte, materiale vegetale in decomposizione, particolato solido, aerosol e feci di animali costituiscono fonti di nutrienti per i funghi (Sterflinger, 2000) in substrati a prevalenza minerale.

Il microambiente (ossia la presenza di superfici di materiali inorganici o organici, materiali adsorbenti ed esopolisaccaridi) influenza profondamente i processi di *weathering* mediati dai funghi (Burgstaller and Shinner, 1993). Tali processi si basano su complessi meccanismi di dissoluzione, trasporto e ricristallizzazione che avvengono all'interno della matrice extracellulare dei microrganismi che si sviluppano alla superficie del minerale (Banfield and Nealson, 1998).

I funghi intervengono nei processi di alterazione delle rocce promuovendo la diagenesi dei minerali (genericamente definita come la trasformazione di un minerale in uno differente) e la loro dissoluzione. Inoltre essi possono mediare la formazione di minerali secondari attraverso la precipitazione di ossalati, come ad esempio whewellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e weddellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), o attraverso l'adsorbimento passivo di ioni alla parete cellulare (Arnott 1995; Gadd 1993, 1999). E' stata osservata la formazione di ossalati metallici da parte di licheni,

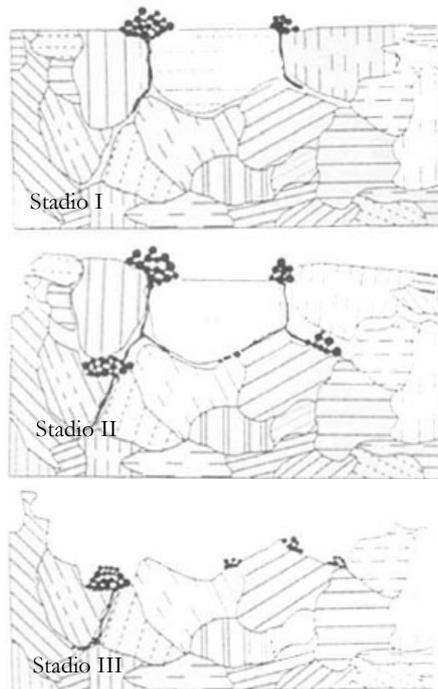
funghi ectomicorrizici ed ericoidi, di idrossidi e ossidi di ferro da parte di licheni e di carbonati da parte di funghi micorrizici e licheni (Hoffland et al., 2004).

I meccanismi di interazione dei funghi con il substrato minerale si possono suddividere in meccanismi biogeofisici, mediati da attività fungine di tipo biomeccanico, e meccanismi biogeochimici, mediati da attività di tipo biochimico (Hoffland et al., 2004).

### *Meccanismi biogeofisici*

Il deterioramento biomeccanico delle rocce avviene grazie all'estesa penetrazione delle ife fungine nel substrato litico attraverso fenditure e incrinature precedentemente formate, ma anche attraverso meccanismi di penetrazione attiva in minerali intatti (ad esempio lungo i piani cristallini di rocce calcistiche e dolomitiche come riportato da Kumar and Kumar, 1999 e Sterflinger, 2000).

Grazie alla loro caratteristica crescita miceliare, i funghi sono in grado di esplorare l'ambiente circostante per individuare e utilizzare nuove risorse nutritive. L'esplorazione del



**Figura 1.2:** modello descrittivo del meccanismo di penetrazione delle ife in un substrato minerale. / model of hyphae penetration mechanism in a mineral substrate. (Modificato da Sterflinger 2000)

substrato è facilitata da una serie di risposte sensoriali, note come “tropismo”, che determinano la direzione della crescita ifale (Jacobs et al., 2002a). Il “tigmotropismo” o “sensibilità di contatto” è una caratteristica di molti funghi che crescono sulla superficie dei minerali o all'interno di substrati solidi (Watts et al., 1998), la cui crescita è direzionata dalla presenza di solchi, scalini o bordi, ossia dalla micromorfologia del substrato. Grazie alla loro capacità di formare reticoli tridimensionali essi hanno l'effetto di legare e aggregare le particelle del materiale in cui crescono, ed in particolare i funghi del suolo ne aumentano la stabilità, favoriscono la ritenzione idrica e quindi le reazioni chimiche che favoriscono il deterioramento. Inoltre lo sgretolamento di rocce e particelle di suolo causa un aumento dell'esposizione di nuove superfici chimicamente reattive e quindi soggette a *weathering* chimico (Barker et al., 1997).

L'invasività della crescita ifale è dovuta all'elevata pressione idrostatica (o turgore) interna, che permette la penetrazione e l'acquisizione di nutrienti da molti materiali solidi (Money, 1996). Per esempio funghi patogeni delle piante sviluppano negli appressori pressioni osmotiche fino a  $10-20 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  (Howard et al.,

1991). Per analogia con i meccanismi di penetrazione delle ife dei funghi patogeni delle piante che vedono coinvolta la produzione di melanina durante la formazione delle strutture di infezione, si pensa che tale pigmento favorisca la penetrazione in substrati recalcitranti (Money and Howard, 1996). Ciò è confermato dal fatto che molti funghi osservati su substrati rocciosi sono fortemente pigmentati (Horre and de Hoog, 1999).

L'azione meccanica della crescita fungina riguarda sia materiali da costruzione come mattoni o calcestruzzo sia rocce in ambienti naturali. E' stato proposto un modello descrittivo

dell'attacco meccanico dei funghi sul marmo (figura 1.2, modificata da Sterflinger, 2000), basato sull'analisi di campioni raccolti in campo e su un esperimento condotto inoculando funghi demaziacei su campioni di marmo di Carrara. Nello stadio di prepenetrazione (I) il fungo aderisce fermamente alla superficie della roccia attraverso un appressorio. Poi una sottile ifa di penetrazione (II) si estende nella parte interna della roccia sfruttando i piani di rottura della struttura cristallina. L'ifa di penetrazione si inserisce in fenditure della roccia fino a raggiungere delle cavità interne dove si può sviluppare una nuova colonia. Questo processo causa un'alterazione nella struttura cristallina, che col tempo collassa (III) (Sterflinger, 2000).

I funghi quindi accelerano i meccanismi fisici di deterioramento delle rocce, penetrando in incrinature, spazi vuoti, piani di rottura dei minerali, incorporando frammenti di minerali nel tallo lichenico, formando minerali secondari che smembrano ulteriormente le rocce, espandendo e contraendo le ife durante cicli di inumidimento/essiccamento o congelamento/riscaldamento. Allo stesso tempo i funghi possono rallentare il deterioramento, là dove il tallo lichenico o il micelio costituiscono una copertura che riduce le fluttuazioni di temperatura e l'abrasione dovuta a vento e pioggia (Ariño et al., 1995).

### *Meccanismi biogeochimici*

L'azione biochimica dei funghi sui minerali rappresenta un meccanismo di deterioramento più efficiente rispetto all'azione meccanica. Infatti la forza di turgore non sarebbe probabilmente sufficiente a permettere la penetrazione degli apici ifali nelle rocce (Hoffland et al., 2004), se non coadiuvate dalla solubilizzazione chimica del substrato.

I funghi possono solubilizzare minerali e composti metallici attraverso quattro tipi di meccanismi: acidolisi, complessolisi, ossidoriduzione, accumulo nel micelio. I primi due meccanismi sono i più diffusi.

L'acidolisi si basa sulla capacità di molti ceppi fungini di acidificare il substrato in cui crescono attraverso l'efflusso di protoni (via ATPasi di membrana o per antiporto con nutrienti che vengono acquisiti dal substrato), la produzione di acidi organici (come acido citrico e acido ossalico) e l'accumulo di acido carbonico come risultato della produzione di anidride carbonica durante la catena respiratoria (Burgstaller and Schinner, 1993). La dissoluzione della  $\text{CO}_2$  respiratoria in acqua genera acido carbonico che causa una diminuzione del pH locale e potenzia la solubilizzazione dei minerali. Questo meccanismo interviene per esempio nella dissoluzione di carbonati (Ehrlich, 1996) e silicati (Sterflinger, 2000). Il rapporto tra la quantità di  $\text{CO}_2$  prodotta dai funghi e dai batteri in ambiente naturale non è stato mai misurato, ma si suppone che esso dipenda dal tipo di materia organica disponibile come fonte di carbonio nel suolo (Sterflinger, 2000). L'acidificazione dell'ambiente locale può essere anche dovuta all'acquisizione di  $\text{NH}_4^+$  da parte dei funghi, che risulta in un eccesso di cationi nel citoplasma, che viene controbilanciato dall'efflusso di protoni verso l'esterno. Si pensa che tale rilascio di protoni sia stata la causa della solubilizzazione di fosfati da parte di 10 ceppi ectomicorrizici cresciuti su agar *in vitro* con  $\text{NH}_4^+$  come unica fonte di azoto (Lapeyrie et al., 1991).

La complessolisi è mediata dalla secrezione di metaboliti primari e secondari con proprietà chelanti quali acidi organici, acidi lichenici, acidi polisaccaridici e siderofori.

Gli acidi organici a basso peso molecolare sono le specie chimiche più importanti per il biodeterioramento delle rocce (Gadd 1999, 2001a) e hanno la doppia funzione di acidificare il substrato favorendo la solubilizzazione di ioni e di complessare gli ioni solubilizzati, grazie alle loro proprietà chelanti. La formazione di complessi chelante-metallo dipende dalla concentrazione delle due specie in soluzione, dal pH e dalle costanti di stabilità dei vari ioni. Tali molecole vengono rilasciate nell'ambiente sotto forma di anioni, ad esempio ossalato e citrato, in quanto si tratta di acidi forti che al pH citosolico (circa 7) sono dissociati. E' stata osservata una correlazione positiva tra le concentrazioni di  $\text{H}^+$  e di ossalato nella rizosfera di

un suolo con piante micorrizate, che suggerisce che protoni e ossalati vengano rilasciati contemporaneamente dai funghi (Casarin et al., 2003). Ossalato e citrato legano di preferenza cationi di- e trivalenti come  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$ . La formazione di tali complessi comporta la diminuzione della concentrazione degli ioni in soluzione e la riduzione del livello di saturazione, promovendo quindi l'ulteriore solubilizzazione di ioni dal substrato e il deterioramento dei minerali. L'ossalato è quantitativamente l'acido organico a basso peso molecolare più importante nei licheni, mentre i funghi ectomicorrizici producono una più ampia varietà di acidi di questo tipo, compresi citrato e malato (Landeweert et al., 2001). Anche funghi micorrizici ericoidi, in particolare ceppi tolleranti ai metalli tossici, producono malato, citrato e fumarato (Martino et al., 2003a).

Un'altra categoria di composti organici coinvolti nel biodeterioramento dei minerali è quella degli acidi lichenici, che sono composti polifenolici prodotti grazie alla specifica interazione tra un micobionte il partner fungino e quello algale della simbiosi. Ogni lichene produce un'unica e specie-specifica serie di acidi lichenici, i quali, nonostante la bassa solubilità in acqua, aumentano la velocità di solubilizzazione dei minerali (Ascaso and Galvan, 1976) e da lungo tempo sono stati riconosciuti come i principali composti che mediano il biodeterioramento delle rocce indotto da licheni (Chen et al., 2000). Tuttavia, proprio a causa della loro bassa solubilità in acqua, tali composti sono probabilmente meno importanti nel *bioweathering* rispetto all'ossalato e ad altri acidi organici a basso peso molecolare. Inoltre i composti lichenici sono usualmente concentrati nel tallo superiore, all'interfaccia fungo/alga o fungo/cianobatterio, non all'interfaccia con il minerale. Complessi acido lichenico-metallo sono stati raramente osservati in campo, e ciò suggerisce che essi abbiano un ruolo secondario nel biodeterioramento dei minerali in natura (Barker and Banfield, 1996).

L'osservazione dell'interfaccia lichene-minerale in sistemi intatti ha permesso di individuare la presenza di uno strato di polimeri organici extracellulari che ricopre il minerale. Si tratta probabilmente di acidi mucopolisaccaridici, i quali potrebbero contribuire al *bioweathering* del minerale grazie alle proprietà chelanti dei sottogruppi di acido uronico e dei gruppi carbossilici che li costituiscono (Barker and Banfield, 1996).

Infine i funghi sono in grado di sintetizzare e secernere i siderofori, che possono avere un ruolo nel *bioweathering* grazie alla loro attività chelante. Per esempio il fungo *Suillus granulatus* è in grado di solubilizzare ioni ferro dalla goetite (ossoidrossido ferrico) tramite la secrezione di siderofori (Watteau and Berthelin, 1994).

I siderofori sono definiti come composti a basso peso molecolare (500-1000 Da) con un'elevatissima affinità per il ferro (Winkelmann, 2002), in particolare chelanti specifici del Fe(III) (Neilands, 1995). Sebbene il ferro sia il più abbondante metallo di transizione presente nella biosfera, esso presenta una bassa biodisponibilità per i microrganismi per i quali è un elemento essenziale. (Neilands, 1995). La principale funzione dei siderofori è quindi quella di mediare l'acquisizione di ferro da idrossidi insolubili o da superfici solide, ma anche da altre forme solubili e insolubili quali citrato ferrico, fosfato ferrico, complessi Fe-transferrina, ferritina, nonché da chelanti artificiali come EDTA (acido etilen-diammino-tetracetico) e NTA (acido nitrilotriacetico) tramite reazioni di scambio del ligando Fe(III). I siderofori hanno pertanto la doppia funzione di portare in soluzione ioni ferro da forme insolubili e di mediare lo scambio tra le forme solubili extracellulari e i trasportatori di membrana che ne permettono l'acquisizione da parte del microrganismo. L'efficienza dei siderofori è garantita essenzialmente da tre fattori: l'affinità per i ligandi, la regolazione della biosintesi e la specificità dei trasportatori. I siderofori contengono i più efficienti gruppi ferro-leganti in Natura, ossia i gruppi idrossamato, catecolato e  $\alpha$ -idrossi-carbossilato, che formano complessi esadentati con il Fe(III), occupando i sei siti di coordinazione dello ione ferrico. Inoltre, i siderofori sono caratterizzati da tre gruppi bidentati in una sola molecola, caratteristica che li favorisce rispetto

ai ligandi monodentati (come l'acqua) in quanto per coordinare lo stesso numero di ioni sarà necessaria una concentrazione molto più bassa di ligando (Renshaw et al., 2002). La regolazione delle vie di biosintesi dei siderofori consente al microrganismo di ottenere elevate concentrazioni locali di siderofori in vicinanza delle cellule e in condizioni di quantità limitanti di ferro. Parallelamente alla capacità di solubilizzare e trasportare ferro extracellulare, i siderofori presentano specificità strutturale conformazionale per i recettori e i trasportatori di membrana (Winkelmann, 2002).

Quasi tutte le specie batteriche e fungine sono in grado di produrre siderofori, salvo eccezioni come alcune specie di *Saccharomyces*, che tuttavia non possono utilizzare siderofori di origine esogena.

### 1.3 I meccanismi di interazione tra funghi e metalli.

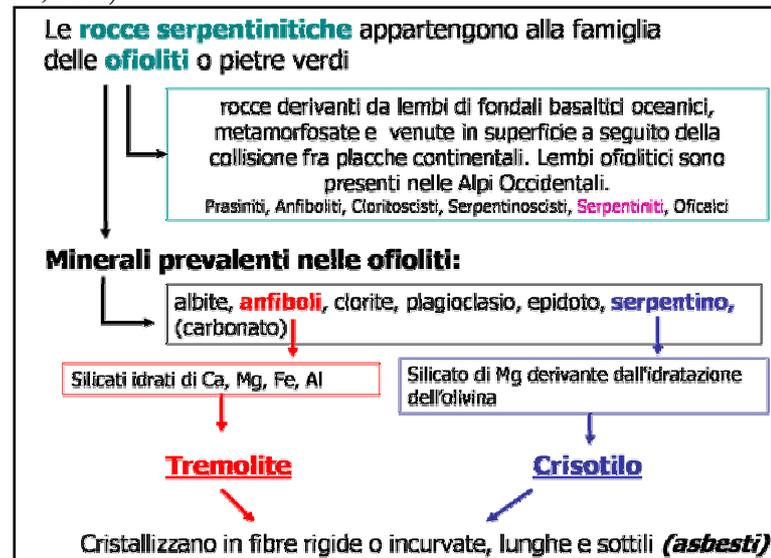
Le attività biochimiche che i funghi, e i microrganismi in generale, possono attuare per modificare i substrati minerali, influenzano in maniera analoga la biogeochimica dei metalli nel suolo. Infatti i meccanismi attraverso cui i microrganismi determinano la speciazione e la mobilità dei metalli sono componenti fondamentali dei cicli biogeochimici dei metalli stessi, ma anche di elementi quali C, N, S e P. La capacità dei microrganismi di influenzare la speciazione dei metalli deriva dalla loro capacità di modificare e mediare i processi di mobilizzazione o immobilizzazione, che determinano gli equilibri tra le specie metalliche in forma solubile e insolubile (Gadd, 2004). Questi meccanismi, data la loro rilevanza per i processi di *bioweathering*, saranno elencati in questo paragrafo.

I funghi possono interagire con i metalli a vari livelli (extracellulare e intracellulare). A livello extracellulare il principale sito di interazione è la parete cellulare. Le pareti fungine sono complesse strutture tridimensionali costituite da macromolecole organiche, principalmente chitina, chitosano e glucani, ma anche proteine, lipidi ed altri polisaccaridi (Gadd, 1993). Questa varietà di componenti strutturali contiene diversi gruppi funzionali (carbossili, ammine, idrossili, fosfati e sulfidrilici) con una differente distribuzione di cariche e di conseguenza una diversa affinità per gli ioni metallici. Il legame dei metalli ai siti della parete cellulare viene definito con il termine *bioadsorbimento* (Gadd 1993, 2004) e si tratta di un processo rapido, passivo, indipendente dal metabolismo cellulare. La forza di tale legame dipende da interazioni di tipo elettrostatico fra gli ioni metallici ed i ligandi interessati, ed è correlata a fattori quali la forma chimica del metallo, il raggio ionico, l'elettronegatività e la carica. Con l'adsorbimento si riduce la mobilità dei metalli solubili. D'altronde, nel caso di metalli mobilizzati da matrici solide, come i minerali, i meccanismi di adsorbimento, diminuendo la concentrazione dello ione libero, favoriscono l'ulteriore rilascio dalla matrice insolubile alla fase solubile (Gadd, 2004). Sempre per quanto concerne le interazioni all'esterno della cellula, i funghi possono produrre composti extracellulari che modificano la biodisponibilità dei metalli aumentandola o riducendola. Ad esempio, agenti chelanti (acido citrico, siderofori), pigmenti con proprietà chelanti (melanine) e acidi organici hanno l'effetto di solubilizzare gli ioni, ma ci sono anche agenti responsabili della formazione di precipitati, come acido ossalico. Inoltre, i funghi possono effettuare trasformazioni chimiche dei metalli tramite i seguenti meccanismi:

- ossidazione-riduzione: in alcuni casi la riduzione comporta una diminuzione della mobilità e della tossicità dello ione.
- metilazione: è stata dimostrata in lieviti e funghi filamentosi; talvolta risulta nella volatilizzazione del metallo.
- dealchilazione: è un processo operato da alcuni funghi che prevede la detossificazione di composti organometallici, sia per via enzimatica, sia

facilitandone la degradazione abiotica, tramite alterazione del pH o rilascio di metaboliti nell'ambiente esterno.

Quando i metalli attraversano la barriera costituita dalla parete cellulare, si parla di *accumulo*, processo attivo metabolismo-dipendente (Morley et al., 1996). L'accumulo intracellulare include, per i metalli essenziali, sistemi di trasporto attraverso le membrane plasmatiche elemento-specifici (Hughes and Poole, 1989). Inoltre, metalli non essenziali possono, in alcuni casi, essere assunti tramite sistemi di trasporto specifici per metalli essenziali. A livello intracellulare le interazioni dei metalli con i componenti della cellula comprendono il legame con proteine metallo-chelanti (metallotioneine,  $\gamma$ -glutamyl-peptidi) e la compartimentazione vacuolare (Gadd, 1993).



**Figura 1.3 – Ambienti ofiolitici, rocce serpentinitiche e asbesto.** Le serpentinito fanno parte della famiglia delle ofioliti. Fra i minerali che compongono le serpentinito vi sono asbesti di anfibolo e asbesti di serpentino. / **Ophiolitic sites, serpentinitic rocks and asbestos.** Serpentinities belong to the family of ophiolites. Among the minerals found in serpentinites there are amphiboles and serpentines, two families of asbestos.

#### 1.4 Gli ambienti ofiolitici come area di studio delle interazioni funghi-metalli e funghi-minerali.

Gli ambienti ofiolitici, pur occupando una piccola porzione della superficie terrestre (<1%), sono da tempo oggetto di studi per la loro rilevanza scientifica e ambientale (Brooks, 1987; Baker et al., 1992).

Il termine *ofiolite* indica un complesso di rocce d'origine oceanica, affiorante su una crosta continentale. Nelle sequenze ofiolitiche si trovano più litologie differenti. Tra queste vi sono le rocce *peridotitiche*, che affiorano per lo più in forma serpentinitizzata a causa dei fenomeni di metamorfismo idrotermale che hanno subito. Infatti le peridotiti sono in origine per lo più costituite di olivina e pirosseni (silicati di ferro e magnesio), i quali vengono trasformati in silicati idrati di magnesio (antigorite, crisotilo) sul fondo oceanico (quindi in presenza di acqua) e in prossimità della dorsale oceanica calda. Tale processo è detto *serpentinizzazione*. Le peridotiti e le serpentinito sono rocce di natura ultrabasica ( $\text{SiO}_2 < 45\%$ ). Nelle sequenze ofiolitiche si trovano anche rocce *gabbriche* e *basalti* che derivano dalle peridotiti per fusione parziale, e sono rocce di natura basica ( $45\% < \text{SiO}_2 < 52\%$ ).

Le rocce serpentinitiche danno origine a suoli che presentano forti limitazioni di fertilità. La particolare composizione dei minerali delle rocce serpentinitiche determina infatti la predominanza del magnesio rispetto agli altri cationi e la presenza di metalli quali nickel e cromo in quantità tali da superare largamente le soglie previste per la bonifica di suoli inquinati.

A causa delle loro peculiari caratteristiche geologiche e pedologiche, i territori con substrato ofiolitico presentano originali caratteristiche. La scarsità di nutrienti nel substrato (Ca, K, P, N) accompagnata dall'abbondanza di magnesio e dalla presenza di altri elementi con potenziale tossicità per le piante (es. Cd, Ni, Cr, Pb, Co, Zn), sono tra gli elementi che hanno causato un'alta selettività nel popolamento vegetale, di regola caratterizzato da povertà di individui e specie. I siti ofiolitici sono divenuti siti di rifugio e di approdo da parte di specie floristiche esclusive, rare. L'aspetto più interessante è costituito dalla capacità di alcune specie tipiche di questi siti di accumulare metalli pesanti, soprattutto nickel, mediante meccanismi di chelazione e compartimentazione selettiva. Si tratta quindi di substrati altamente selettivi per gli organismi vegetali ma anche per altri organismi stress-tolleranti, quali funghi, muschi e licheni (Piervittori and Siniscalco, 2004). Per questo motivo sono particolarmente interessanti dal punto di vista naturalistico.

Per esempio è stato condotto uno studio delle caratteristiche funzionali e molecolari di alcuni ceppi di funghi micorrizici ericoidi isolati da un suolo serpentinitico (Parco naturale del Mt Avic, Valle d'Aosta). E' emerso che in suoli naturalmente ricchi di metalli pesanti è presente una microflora fungina generalmente tollerante a questi elementi. I dati dimostrano che il fungo esercita anche per questi elementi un notevole ruolo di protezione nei confronti della pianta ospite. Questi primi risultati sono considerati incoraggianti e potrebbero porre le basi per eventuali processi di recupero ambientale (Tesi di Laurea S. Picarella, 2004).

Nelle serpentinitiche sono diffusamente presenti crisotilo (asbesto di serpentino) e tremolite (asbesto di anfibolo), minerali fibrosi che rivestono particolare interesse da un punto di vista ambientale ed epidemiologico (Favero et al., 2003). Lavori recenti dimostrano che il rilascio di metaboliti ad attività chelante da parte di licheni che crescono a contatto con rocce serpentinitiche contenenti crisotilo, a lungo termine modifica la morfologia del minerale, che da cristallino diventa amorfo, e la sua reattività chimica (Favero et al., 2005).

Non esistono molti studi dell'interazione di funghi con rocce serpentinitiche in ambiente naturale. Alcuni studi riguardano ceppi fungini saprotrofi che attaccano i silicati principalmente tramite il rilascio di acido ossalico. Tra questi *Aspergillus niger*, che degrada olivina, serpentino, feldspato e altri minerali, *Penicillium simplicissimum* che degrada il basalto, *Penicillium expansum* e *Scopulariopsis brevicaulis* che estraggono alluminio dagli alluminio-silicati (Sterflinger, 2000).

L'interesse ambientale costituito dagli asbesti presenti negli affioramenti di rocce serpentinitiche, ha indotto ad approfondire in questo lavoro di tesi, lo studio dell'interazione fungina con questi minerali, e delle eventuali alterazioni dei minerali conseguenti alle attività dei funghi *in vitro*.

Tali interazioni sarebbero di particolare interesse soprattutto alla luce del rischio ambientale costituito dagli affioramenti di rocce contenenti minerali serpentinitici in forma fibrosa: infatti, come verrà spiegato in dettaglio in seguito, le fibre di asbesto sono classificate come carcinogeni di classe I (IARC 1987), e qualora inalate, costituiscono un rischio che è correlato con le loro caratteristiche chimico-fisiche, tra cui anche la morfologia e composizione chimica (Fubini, 1997).

## 1.5 Il problema ambientale amianto: il caso della regione Piemonte

In Italia le aree ofiolitiche sono presenti soprattutto nelle Alpi nord-occidentali e nell'Appennino settentrionale e sono importanti patrimoni di varietà ambientale e di

biodiversità (Piervittori and Siniscalco, 2004). In Piemonte, e più in generale nelle Alpi occidentali, esistono vari affioramenti di rocce contenenti amianti (termine commerciale per indicare complessivamente i minerali appartenenti alla famiglia degli asbesti). Le possiamo individuare in quella che viene chiamata “Falda dei Calcescisti e Pietre Verdi”, costituita da diversi tipi di ofioliti metamorfiche (prasiniti, anfiboliti, metagabbri, eclogiti e serpentiniti) e da subordinati paraderivati mesozoici, e nella gran massa ultrabasica del “Massiccio di Lanzo” formata in prevalenza da peridotiti, lherzoliti, lherzoliti serpentinite e serpentinite massicce.

Il crisotilo è un costituente accessorio più o meno abbondante delle serpentinite. E' soprattutto situato nelle fessurazioni e microfessurazioni della roccia senza mai essere contenuto nelle serpentinite massicce. Gli anfiboli e le loro varietà fibrose possono essere presenti in percentuale più o meno ampia sia nelle serpentinite massicce che in rocce di genesi simile e spesso associate (es. talcoscisti) (Progetto di Massima, 1993).

Studi epidemiologici, che verranno descritti in maggior dettaglio nei prossimi paragrafi, hanno dimostrato che l'esposizione all'amianto è correlata allo sviluppo di patologie quali asbestosi, mesotelioma e diversi tipi di carcinomi. L'amianto in matrice compatta per sua natura non tende a liberare fibre: il pericolo sussiste quando tale materiale viene abraso o deteriorato. La dispersione di fibre di amianto dalle rocce può essere quindi dovuta a fenomeni puramente naturali quali erosione o trasporto oppure ad operazioni di origine antropica come ad esempio (Belluso et al., 1997):

- Estrazione dell'asbesto da rocce contenenti una certa percentuale del minerale.
- Estrazione ed uso dei materiali contenenti amianto quale componente accessoria. Esempi di questo tipo di materiali sono alcune qualità di talco provenienti da giacimenti contenenti anfiboli fibrosi, e soprattutto il pietrisco proveniente da rocce serpentinitiche.
- Liberazione dal materiale fine (pietrisco e ghiaia) utilizzato per la pavimentazione di strade e dal calpestio e/o traffico veicolare in dette aree.
- Attività di rimozione dei manufatti contenenti amianto.
- Lavorazioni industriali dell'amianto per la produzione di manufatti.
- Usura di manufatti contenenti amianto.

Le Alpi piemontesi sono particolarmente ricche di affioramenti di rocce serpentinitiche che possono essere mobilizzate indipendentemente dall'estrazione dell'amianto, e presentano sul loro territorio alcuni esempi di zone a rischio a causa dell'intervento umano.

Si può ricordare la situazione creatasi nel Comune di Trana (TO) a causa dell'attività di sfruttamento di una cava di pietrisco in cui venivano estratti anche minerali serpentinitici. In tal caso si è potuta rilevare un'importante quantità di fibre di amianto aerodisperse (in particolare crisotilo associato a tremolite) nell'area circostante la cava sia durante la lavorazione che nei periodi di riposo (Progetto di Massima 1993).

A Balangero (TO), nell'area del massiccio ultrabasico di Lanzo, si trova quella che fu la miniera di amianto più ampia d'Europa. Attiva sin dall'inizio del secolo scorso, venne chiusa definitivamente solo nel 1990. Il contenuto di fibra nella roccia è circa il 15%, di cui al massimo il 5% è utilizzabile. Nel 1969 la produzione annuale si aggirava all'incirca sulle 100.000 tonnellate di crisotilo e provvedeva a tutto il fabbisogno nazionale nonché al 50% di quello europeo. Le serpentinite venivano frantumate in frantoi, con una lavorazione giornaliera di oltre 5000 tonnellate di materiale al giorno, ed il materiale di recupero usato come pietrisco per massicciate ferroviarie e rivestimenti stradali. In questi luoghi, a causa del traffico veicolare, è stato dimostrato che la concentrazione di fibre nell'aria è superiore alle medie (Progetto di Massima 1993).

Oltre alla miniera di Balangero, in zone non distanti vi sono numerose altre località dove si sono svolte in passato attività di estrazione dell'amianto, tra cui Emaresè in Val d'Aosta, Bruzolo in Val di Susa ed in località Villar presso Sampeire in Val Varaita (Crema et al., 1971).

Inoltre furono attive nella nostra regione anche industrie impegnate nella lavorazione delle fibre. Dispersioni da attività di questo genere si sono verificate ad esempio a Casale Monferrato (stabilimento Eternit) e, con minore rilevanza, nelle località sede di impianti per la produzione di tessuti in amianto come la SIA (Società Italiana Amiantifera) di Grugliasco, dove la crocidolite veniva filata per la produzione di tessuti ignifughi.

In altre aree geografiche si riportano casi di contaminazione ambientale da amianto. Un esempio eclatante è costituito dalla regione del Da-yao nella Cina sud-occidentale, dove esiste un'area di 200 Km<sup>2</sup> che presenta affioramenti di rocce contenenti crocidolite a macchie. Fibre di crocidolite si disperdono nell'aria per effetto del vento o del passaggio dei mezzi di trasporto, quindi la popolazione intera è esposta quotidianamente. Inoltre la crocidolite è stata utilizzata per decenni come materiale per manufatti, per costruire strade e argini, e contamina anche le falde acquifere. Gli studi epidemiologici effettuati hanno dimostrato un tasso di placche pleuriche, asbestosi, mesotelioma e cancro ai polmoni molto più elevato rispetto a quanto atteso: la mortalità annuale solo per mesotelioma è 40 volte più alta rispetto al gruppo di controllo (Luo et al., 2003). Altri casi analoghi sono stati registrati in aree di estrazione della crocidolite situate in Sud Africa (Botha et al., 1986) e in Australia (Rogers *et al.*, 1995), e in alcuni villaggi in Turchia (Baris et al., 1979).

Il divieto di utilizzo dell'amianto, decretato in Italia nel 1992, ha ridotto di molto il numero dei lavoratori attualmente esposti, limitando il rischio al personale adibito alla rimozione, demolizione ed inattivazione dell'amianto già in opera. Tuttavia possono permanere situazioni di rischio dovute agli impianti di estrazione o di lavorazione chiusi e spesso contenenti materiali abbandonati, ma anche a terreni adibiti a discariche, rocce serpentinitiche a rischio di abrasione naturale o dovuta ad intervento umano, nonché suoli adiacenti, data l'estrema volatilità delle fibre (Progetto di Massima 1993).

L'amianto è quindi diventato principalmente un problema ambientale.

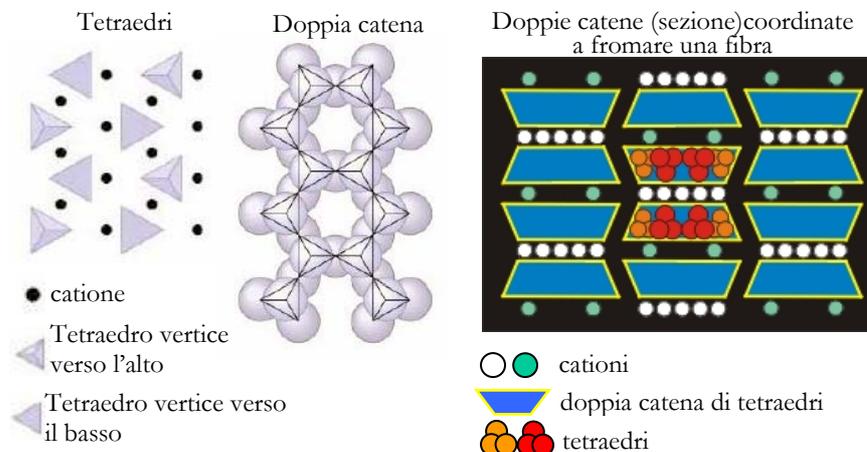
L'individuazione di strumenti adeguati ad affrontare tale problema è complessa e richiede la valutazione non solo del contesto ambientale in cui esso si presenta e i rischi di esposizione, ma anche l'origine del problema, ossia le cause e i meccanismi di tossicità. Per questo motivo i paragrafi seguenti saranno dedicati alla descrizione della struttura, delle caratteristiche chimico-fisiche e degli effetti a livello cellulare e molecolare degli amianti.

<i>Famiglia</i>	<i>Tipo</i>	<i>Formula</i>
<b>Serpentini</b>	Crisotilo	Mg <sub>3</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>
<b>Anfiboli</b>	Crocidolite	Na <sub>2</sub> (Fe <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> (Fe <sup>2+</sup> , Mg) <sub>3</sub> Si <sub>8</sub> O <sub>22</sub> (OH) <sub>2</sub>
	Amosite	(Fe <sup>2+</sup> , Mg) <sub>7</sub> Si <sub>8</sub> O <sub>22</sub> (OH) <sub>2</sub>
	Antofillite	(Mg, Fe <sup>2+</sup> ) <sub>7</sub> Si <sub>8</sub> O <sub>22</sub> (OH) <sub>2</sub>
	Actinolite	Ca <sub>2</sub> (Mg, Fe <sup>2+</sup> ) <sub>5</sub> Si <sub>8</sub> O <sub>22</sub> (OH) <sub>2</sub>
	Tremolite	Ca <sub>2</sub> Mg <sub>5</sub> Si <sub>8</sub> O <sub>22</sub> (OH) <sub>2</sub>

**Tabella 1.4: I minerali appartenenti alla famiglia degli asbesti.** Trattandosi di sostanze naturali, la formula chimica riportata è da considerarsi una di quelle possibili. / **Minerals belonging to the asbestos family.** As natural matter, the reported chemical formula is one of the possible.

## 1.6 La struttura.

Con il termine generico di amianto (più correttamente *asbesto*) si indicano svariati minerali silicati cristallini. La normativa di diversi paesi industrializzati, quella italiana inclusa (art. 23 D.L. n° 277/91), considera amianto esclusivamente i silicati fibrosi indicati nella tabella 1.4. Gli asbesti vengono classificati in due famiglie: *anfiboli* e *serpentine*.

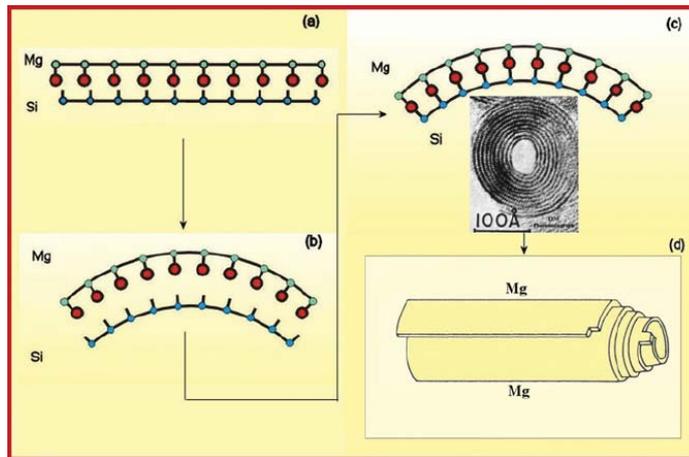


**Figura 1.5 - Schema della struttura dei silicati a doppia catena (anfiboli).** Lo schema mostra l'organizzazione dei singoli tetraedri  $\text{SiO}_4$  in una doppia catena e la struttura di una fibra, costituita da doppie catene coordinate ottaedricamente con varie specie cationiche. Immagini adattate da [http://academic.brooklyn.cuny.edu/geology/powell/core\\_asbestos/asbestoshome.htm](http://academic.brooklyn.cuny.edu/geology/powell/core_asbestos/asbestoshome.htm) e da Bernstein et al. 2005. / **Schematic representation of the double chain silica structure (amphiboles).** The drawing represents the formation of a double chain by coordination of singles  $\text{SiO}_4$  tetrahedra, and the formation of a fibre by octahedral coordination of the double chains with several cationic species. Images adapted from Bernstein et al., 2005 and from [http://academic.brooklyn.cuny.edu/geology/powell/core\\_asbestos/asbestoshome.htm](http://academic.brooklyn.cuny.edu/geology/powell/core_asbestos/asbestoshome.htm)

Gli anfiboli sono *inosilicati* (dal greco: silicati “a fibra”) a doppia catena di tetraedri  $\text{SiO}_4^{4-}$ . Una doppia catena é formata da tetraedri che condividono tra loro alternativamente tre o due atomi di ossigeno ed é rappresentata dalla formula  $(\text{Si}_4\text{O}_{11})_n^{6n-}$ . Gli atomi di ossigeno partecipano anche alla formazione di gruppi ottaedrici  $\text{MO}_6$ , in cui cationi quali  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  sono stratificati tra due doppie catene di tetraedri silicio-ossigeno (figura 1.5). Crocidolite e amosite contengono elevati livelli di ferro, come costituente della struttura cristallina (Hardy and Aust, 1995). L'amosite contiene esclusivamente  $\text{Fe(II)}$ , mentre la crocidolite contiene sia  $\text{Fe(II)}$  sia  $\text{Fe(III)}$ . Le singole fibre hanno un diametro di circa  $0.2 \mu\text{m}$  e tendono ad aggregarsi in fasci (Fubini and Otero-Arean, 1999).

Il crisotilo, membro della famiglia dei *serpentine*, contiene quantità minori di ferro rispetto agli anfiboli, presente per lo più come sostituito del  $\text{Mg}^{2+}$  nella struttura cristallina oppure come ossido contaminante. Il crisotilo è un fillosilicato (dal greco: silicato “a foglia”) costituito da uno strato di tetraedri silicio-ossigeno  $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n^{2n-}$  e da uno strato “tipo brucite” costituito da ottaedri  $[\text{Mg}_3\text{O}_2(\text{OH})_4]_n^{2n+}$ : i due strati condividono l'ossigeno apicale dei tetraedri silicio-ossigeno formando un doppio strato. A causa delle diverse dimensioni di un ottaedro rispetto ad un tetraedro, gli ioni che formano il legame tra i due foglietti non sono perfettamente allineati. Ciò porta a delle tensioni nella struttura tali per cui gli strati si incurvano a formare dei tubuli, come illustrato in figura 1.6, con il foglietto brucitico rivolto verso l'esterno. Poichè gli strati tollerano solo curvature entro certi limiti e la curvatura è minore all'interno che all'esterno del tubo, i tubi rimangono cavi e non possono eccedere un certo diametro. Il

diametro interno nel crisotilo è circa 5 nm, quello esterno 20-25 nm. Queste unità tubulari spiegano le proprietà fibrose del crisotilo. Fibrille di crisotilo possono aggregarsi a formare fasci che facilmente si disgregano e si disperdono in sospensione acquosa.



**Figura 1.6 - Struttura dei silicati a foglietto (crisotilo).** (a) Rappresentazione schematica che mostra il mancato allineamento degli atomi di Si e Mg dei due foglietti. (b) I due foglietti si incurvano per consentire l'allineamento. (c) Immagine al microscopio elettronico a trasmissione della sezione trasversale di una fibra di crisotilo, che mostra la struttura "arrotolata". (d) Rappresentazione schematica di una fibra di crisotilo, con lo strato brucitico rivolto verso l'esterno. / **Structural formation of the sheet silica (chrysotile asbestos).** Schematic representation of the structural formation of the sheet silica chrysotile asbestos, showing the positioning of the Mg molecule on the outside of the curl. (a) Mismatching of Mg and Si sheets. (b) How the sheets have to curl in order for the Mg and Si atoms to line up. (c) Transmission electron micrograph of the cross section of a chrysotile fiber showing the curled structure. (d) Chrysotile is formed as a rolled fiber. (Bernstein et al., 2005).

## 1.7 L'utilizzo dell'amianto: storia, epidemiologia e legislazione.

La storia dell'utilizzo dell'amianto a fini commerciali inizia durante gli ultimi anni del XIX secolo e il suo utilizzo vede un periodo di progressivo incremento fino alla fine degli anni '70 del secolo successivo, quando la produzione totale supera i cinque milioni di tonnellate/anno, crisotilo, crocidolite ed amosite (<http://www.arpa.piemonte.it/>). Il crisotilo veniva utilizzato circa nel 90% delle applicazioni dell'amianto (Hardy and Aust, 1995). Gli altri amianti hanno un interesse commerciale limitato.

Sia gli anfiboli che i serpentinei, sono caratterizzati dalla capacità degli ammassi fibrosi di suddividersi longitudinalmente in fibre sempre più fini. Questo particolare aspetto conferisce al materiale un'elevata resistenza meccanica, pur mantenendo buone doti di flessibilità. Grazie a queste caratteristiche l'asbesto è quindi facilmente filabile e può essere tessuto. Ha una buona resistenza termica e, pur non essendo un materiale refrattario, resiste fino a temperature superiori a 500°C: se miscelato con altre sostanze, resiste anche a temperature maggiori. Resiste all'azione di agenti chimici e biologici, all'abrasione e all'usura. Infine è un materiale dotato di proprietà fonoassorbenti e termoisolanti (Carnevale and Chellini, 1992).

Per le ottime qualità tecnologiche e per l'economicità, l'amianto è stato usato in varie attività industriali, in edilizia, in ambito domestico e nei mezzi di trasporto. Si stima che sia stato utilizzato per la produzione di oltre 3000 prodotti e manufatti industriali (<http://www.arpa.piemonte.it/>), in molti casi mescolato con altri materiali al fine di sfruttarne al meglio le caratteristiche. In particolare circa l'80% della produzione industriale di manufatti con amianto era destinata al settore delle costruzioni, in cui i prodotti in cemento-amianto erano largamente impiegati.

A partire dagli anni '50 lo sviluppo di patologie polmonari in lavoratori esposti all'amianto, come minatori e macinatori, è stato messo in relazione con la storia occupazionale dei soggetti. Da allora studi epidemiologici su popolazioni particolarmente esposte hanno permesso di stabilire che l'asbesto può causare varie patologie polmonari, tra cui l'asbestosi (fibrosi polmonare causata dall'esposizione all'asbesto), formazione di placche pleuriche o versamenti pleurici, mesotelioma pleurico, pericardico e del peritoneo, carcinoma polmonare, e altre forme tumorali a colon, laringe, esofago, fegato e ovaie (Hardy and Aust, 1995; Berry et al., 2000). Il tempo di latenza tra l'esposizione e lo sviluppo della malattia varia tra i 20 e i 40 anni. Infatti, nonostante la diminuzione dell'esposizione occupazionale e le opere di bonifica degli edifici per ridurre l'esposizione non occupazionale, uno studio condotto sulla popolazione americana ha evidenziato un aumento dell'incidenza delle patologie pleuriche negli ultimi 25 anni (Upadhyay and Kamp, 2003). Il numero di casi di malattie correlate all'esposizione all'amianto è quindi destinato ad aumentare nei prossimi anni, tanto che si stima che i decessi correlati potrebbero superare la quota di 200000 solo negli Stati Uniti entro il 2030 (Nicholson et al., 1982).

Studi epidemiologici indicano chiaramente che lo sviluppo dell'asbestosi avviene solo in casi di esposizioni molto abbondanti e che esiste una dose soglia approssimativamente tra le 25 e le 100 fibre/ml/anno, al di sotto della quale la patologia non si manifesta. Essa si sviluppa usualmente in lavoratori esposti a fibre e per molti anni, ad esempio minatori, addetti alla macinazione o alla tessitura dell'asbesto, oppure in persone esposte ad alte dosi ma per brevi periodi, come personale imbarcato per alcuni anni durante la Seconda Guerra mondiale sulle navi militari, dove si raggiungevano concentrazioni di centinaia di fibre per millilitro di aria. Il periodo di latenza dell'asbestosi è inversamente proporzionale al livello di esposizione. Ad esempio uno studio risalente al 1938 riporta un tempo di latenza medio di 5.2 anni, che riflette gli elevati livelli di esposizione dell'epoca, mentre dati più recenti indicano periodi di latenza sempre più lunghi, grazie alla riduzione dell'utilizzo e le opere di bonifica imposte dalla legge. Tuttavia l'esistenza di un livello di soglia, non esclude che una ridotta esposizione sia correlata con eventi subclinici di fibrosi, circoscritti dall'azione dei normali meccanismi di difesa polmonari, che sono in grado di rimuovere le polveri dall'apparato respiratorio se la quantità inalata non diventa troppo elevata. Spesso soltanto la presenza in sezioni istologiche del polmone dei "*corpi di asbesto*", permette di individuare la causa della fibrosi, che è altrimenti indistinguibile da altre forme della stessa patologia. I corpi di asbesto sono formati da fibre lunghe, ricoperte da ossoidrossidi di ferro e da uno spesso strato di mucopolisaccaridi e proteine. Un fattore che sembra agire sinergicamente all'esposizione all'amianto nello patogenesi dell'asbestosi nell'uomo è il fumo di sigaretta. Ci sono notevoli evidenze basate su studi radiografici che il fumo aumenti l'incidenza e/o la velocità di progressione dell'asbestosi (Mossman and Churg, 1998).

L'utilizzo dell'amianto a scopi commerciali è stato vietato, inizialmente negli Stati Uniti (anni '70) poi in molti altri paesi. Per quanto riguarda l'Italia, l'adeguamento normativo è stato lento: nel 1955 la comunità scientifica aveva riconosciuto il nesso causale tra l'esposizione all'asbesto e il cancro polmonare, ma l'asbestosi venne riconosciuta come malattia professionale solo in un decreto ministeriale del 18/4/73. Nel 1982, un Decreto del Presidente della Repubblica fissò all'1% in peso il contenuto di amianto (polvere o fibre libere) di un rifiuto, necessario a far scattare l'obbligo di invio ad una discarica ad alta protezione. Dieci anni dopo, furono approvati due decreti molto importanti in materia "amianti": il D.L. 277/91, recependo le direttive della commissione europea, si pronuncia in materia di tutela della salute dei lavoratori dai "rischi connessi all'esposizione ad amianto"; è questa la legge in cui si ha una definizione completa del termine amianto, indicando con esso i minerali antofillite, amosite, crocidolite, tremolite e actinolite, appartenenti alla famiglia degli anfiboli, e il crisotilo della

famiglia del serpentino. Il D.L. 257/92 contiene norme relative alla cessazione dell'impiego dell'amianto: l'art. 1 vieta "l'estrazione, l'importazione, la commercializzazione e la produzione di amianto o di prodotti contenenti amianto" che viene quindi bandito dal ciclo produttivo e commerciale. Questo D.L., arrestando ogni nuova immissione, demanda alle attività di bonifica il definitivo abbattimento del rischio. "Normative e metodologie per gli interventi di bonifica, ivi compresi quelli per rendere innocuo l'amianto" sono oggetto del Decreto Ministeriale 14/5/96, poi ampliato nel '99 (<http://www.arpa.piemonte.it/>). A livello europeo, un prima direttiva (76/769/CEE) concernente l'immissione sul mercato e l'uso di talune sostanze e preparati pericolosi, è stata più volte rivista e a proposito dell'amianto (83/478/CEE, 85/610/CEE, 91/659/CEE) fino a giungere alla direttiva 99/77/CEE che impone agli stati membri di disporre accorgimenti legislativi atti a vietare la commercializzazione e la produzione di manufatti contenenti fibre di amianto entro il 1/1/2005.

### 1.8 Cause e meccanismi della tossicità degli asbesti.

Gli studi condotti negli ultimi decenni hanno permesso di chiarire alcuni meccanismi della patogenesi delle malattie polmonari dovute all'esposizione ad amianto e ne hanno sottolineato la complessità (Kamp and Weitzman, 1999)

Particelle minerali inalabili che raggiungono gli alveoli polmonari, possono andare incontro a diversi processi, a seconda della loro forma e dimensioni (Fubini and Otero-Arean, 1999):

- Possono rimanere libere negli alveoli, ed eventualmente essere rimosse dal sistema mucociliare delle vie polmonari.
- Possono essere parzialmente o completamente dissolte, nell'arco di lunghi periodi di tempo. Il crisotilo, a causa dell'elevato contenuto in magnesio, viene progressivamente dissolto dai fluidi alveolari, mentre gli anfibioli sono meno solubili.
- Possono essere fagocitate dai macrofagi. Tali cellule hanno una vita media di 50 giorni, che viene ridotta a seguito della fagocitosi di una particella. Quando questi muoiono, le particelle vengono rilasciate ed eventualmente nuovamente fagocitate. I macrofagi hanno un diametro medio di circa 10µm, e possono internalizzare particelle di circa 5µm; particelle più grandi possono essere fagocitate solo parzialmente, danneggiando la membrana plasmatica e causando il rilascio di fluidi lisosomali (acidi) ed enzimi, che danneggiano il tessuto circostante: questi eventi precorrono la formazione di un tessuto fibroso.
- Possono migrare attraverso le membrane alveolari nel tessuto interstiziale del polmone, ed eventualmente passare nel sistema linfatico: in questo caso potrebbero essere filtrate nei linfonodi, dove rimangono indefinitamente. Tuttavia, alcune particelle passano nel sistema circolatorio, e, attraverso il sangue, possono raggiungere altri organi. Infine, le particelle inalate, specie se di forma fibrosa, possono passare dall'interstizio alla pleura, sebbene tale meccanismo di traslocazione non sia chiaro.

I fattori che sembrano determinare il destino di una particella solida inalata, e quindi gli effetti eventualmente patologici che essa può avere sui tessuti, sono *morfologia, dimensioni e persistenza*.

Per *morfologia* si intende un insieme di fattori quali la forma geometrica del solido (fibra o particella, con spigoli o arrotondato), la cristallinità (amorfo o cristallino) e la micromorfologia a livello atomico (irregolarità, frastagliature, scalini, bordi e vertici nel microcristallo, difetti e vacanze reticolari; Fubini, 2000). I materiali in forma fibrosa sono molto più patogeni dei corrispondenti in forma di particelle, in quanto le fibre penetrano facilmente nei tessuti, vengono rimosse con difficoltà e si depositano in luoghi particolari, come le biforcazioni delle vie aeree.

La struttura anatomica del sistema respiratorio, è tale per cui particelle di grandi *dimensioni* vengono intercettate a livello delle mucose nasali o bronchiali, e quindi non possono raggiungere le regioni distali del polmone. Particelle di forma sferoidale e dimensioni inferiori ai 5µm, possono facilmente raggiungere gli alveoli, mentre se avessero maggiori dimensioni si depositerebbero a livello delle alte vie respiratorie, per essere poi rimosse dal sistema mucociliare. Il caso delle fibre è più complesso, perché le loro proprietà aerodinamiche dipendono dal rapporto tra lunghezza e diametro e ne determinano la velocità di rimozione e la patogenicità (Fubini and Otero-Arean, 1999).

La definizione di fibra non è univoca. In ambito mineralogico si definisce "fibra" un minerale avente il rapporto tra lunghezza e diametro  $\geq 3$ . La legislazione italiana (D. L. 277/91) definisce "fibra" una particella avente lunghezza  $\geq 5 \mu\text{m}$ , diametro  $\leq 3 \mu\text{m}$  e rapporto lunghezza/diametro  $\geq 3$ . Infine in campo medico esistono tre distinte definizioni: "fibra" descritta come in ambito mineralogico, "fibra potenzialmente cancerogena" definita come una particella avente lunghezza  $\geq 8\mu\text{m}$  e diametro  $\leq 0,25 \mu\text{m}$  (Stanton, 1981) e "fibra respirabile" avente diametro  $<3 \mu\text{m}$ , lunghezza  $>5 \mu\text{m}$  e rapporto lunghezza/diametro  $\geq 3$  per gli esseri umani ( $\geq 5$  per alcuni animali da laboratorio, per es. topi). Il WHO (1985) definisce le fibre come una particella in cui la proporzione tra lunghezza e diametro è di 3:1.

Nella parte distale delle vie respiratorie fibre corte vengono fagocitate ed eliminate più facilmente dai macrofagi rispetto a quelle lunghe, che risiedono quindi più a lungo nei tessuti e possono interferire con la crescita e la divisione cellulare (Riganti et al., 2003). Secondo l'*ipotesi di Stanton*, fibre di dimensioni con diametro  $<0,25\mu\text{m}$  e lunghezza  $\geq 8\mu\text{m}$ , sufficientemente fini da raggiungere la parte distale del polmone, ma troppo lunghe per essere totalmente fagocitate dai macrofagi, sarebbero le più carcinogeniche (Stanton, 1981). Questa ipotesi è stata largamente discussa. Dati ottenuti dallo studio di modelli animali suggeriscono che fibre lunghe siano rimosse dalle cellule ciliate o attraverso i macrofagi molto più lentamente rispetto a fibre corte, e che oltre ad una certa lunghezza (16-20 µm) l'efficienza dei sistemi di rimozione sia severamente compromessa (Mossman and Churg, 1998). Esperimenti condotti da Davis (1986) hanno dimostrato che fibre lunghe ( $\geq 10\mu\text{m}$ ) sono più fibrogeniche di quelle corte ( $<5\mu\text{m}$ ) in ratti e topi. Tuttavia esistono meno dati riguardanti l'uomo e sono difficilmente conciliabili con i dati su modelli animali. Due studi epidemiologici riguardanti crisotilo e amosite hanno dimostrato una correlazione inversa tra lunghezza delle fibre e sviluppo di asbestosi (Churg et al., 1989 e 1990). L'interpretazione di questi risultati è però complicata dall'interferenza degli effetti del fumo di sigaretta sullo sviluppo della malattia nell'uomo. Infatti il fumo aumenta i tempi di ritenzione nel polmone delle fibre corte molto di più di quelle lunghe sia nell'uomo che negli animali, favorisce l'internalizzazione di fibre da parte delle cellule epiteliali polmonari e complessivamente aumenta l'incidenza e la rapidità della progressione dell'asbestosi (Mossman and Churg, 1998).

La fagocitosi delle fibre e la conseguente attivazione dei macrofagi induce un processo infiammatorio cronico mediante il rilascio di una complessa serie di mediatori. La fibra causa la rottura della membrana lisosomiale e la morte cellulare. Essa viene quindi nuovamente rilasciata, innescando un ciclo di fagocitosi-morte cellulare-rilascio che causa il danno tissutale. L'idrofobicità/idrofilicità della superficie influenza la capacità di internalizzazione della fibra da parte della cellula. Inoltre fibre lunghe provocano in genere una fagocitosi incompleta (detta anche *frustrata*) e, di conseguenza, il rilascio di materiale citoplasmatico e lisosomiale.

Sebbene l'abito fibroso dell'asbesto contribuisca a determinarne la patogenicità, le caratteristiche strutturali delle fibre non sono sufficienti per spiegarne i meccanismi di tossicità, nei quali intervengono fattori dipendenti dalle proprietà chimiche delle fibre ed in particolare della superficie (Fubini, 1997).

La *biopersistenza* può essere definita come la ritenzione nel tempo del particolato (Fubini and Otero-Arean 1999). Essa dipende da vari fattori. La dimensione e la forma della particella, come detto, influenzano la velocità della rimozione dal polmone. La composizione chimica e l'estensione della superficie esposta all'interfaccia solido/fluido biologico influenzano la velocità di dissoluzione, spesso mediata dall'attività di molecole o da chelanti endogeni, in grado di rimuovere ioni dalla superficie delle particelle (Fubini, 1997). Infine se l'anatomia del sito di deposizione favorisce l'accumulo di particolato e la velocità di deposizione è elevata il meccanismo di rimozione mediato dai macrofagi risulterà insufficiente, prolungando la biopersistenza. E' significativo il fatto che la patogenicità dei solidi aumenti al diminuire della loro solubilità e che crisotilo e anfiboli abbiano una bassa solubilità rispetto ad altri solidi, come le fibre di vetro (Fubini and Otero-Arean, 1999). Studi condotti sia sull'uomo che sugli animali hanno mostrato che l'esposizione continua agli anfiboli è associata ad un continuo aumento dei livelli di tali fibre nel polmone, mentre l'esposizione continua a fibre di crisotilo porta ad uno scarso accumulo di fibre. La biopersistenza stimata degli anfiboli nel polmone è dell'ordine di alcuni decenni, mentre quella del crisotilo è di alcuni mesi (Churg, 1994). Per questo motivo gli studi condotti sull'uomo hanno mostrato una predominanza delle fibre di anfibolo nelle sezioni istopatologiche, anche nei casi di esposizione al crisotilo, ed è quindi difficile accertare la relazione tra una fibrosi polmonare e l'esposizione a questo tipo di asbesto. Il crisotilo, al contrario degli anfiboli che permangono nell'organismo senza subire modificazioni della struttura cristallina, viene progressivamente suddiviso in fibrille più piccole, che possono essere rimosse o degradate. Questo può contribuire a spiegare perché gli anfiboli siano altamente cancerogenici sia in animali da laboratorio che negli esseri umani, mentre il crisotilo ha un effetto cancerogeno minore negli esseri umani (Hardy and Aust, 1995)

### 1.9 Caratteristiche chimiche coinvolte nella tossicità dell'asbesto.

Più recentemente, si è data maggior importanza alle reazioni chimiche correlate con la patogenicità da particolato, in quanto si ritiene che le sole caratteristiche morfologiche non siano sufficienti per spiegare la diversa tossicità di polveri con differente composizione chimica e struttura (Hardy and Aust, 1995; Fubini, 1997). Mentre la tossicità di composti solubili è determinata dalla struttura molecolare, nel caso del particolato solido, per lo più insolubile nei liquidi biologici, la reattività chimica di superficie è molto importante nel determinarne gli effetti tossici, e non è prevedibile solo sulla base della composizione chimica del bulk, ossia la struttura interna del minerale che è definita dalla sua formula (Fubini, 1997). Le superfici minerali infatti sono dinamiche e complesse e possono essere modificate chimicamente e fisicamente *in vitro* e *in vivo*.

L'area specifica della superficie del solido è la misura dell'estensione dell'interfaccia tra il solido e l'ambiente esterno, calcolata rispetto alla massa del solido stesso e quindi espressa in [m<sup>2</sup>/g]. Essa viene misurata tramite l'adsorbimento di gas, ed è particolarmente importante quando si valutino processi o reazioni dipendenti dalla chimica di superficie del solido, come l'estrazione o la deposizione di ioni e l'adsorbimento di molecole (Fubini, 1997) che avvengono ad esempio quando il minerale interagisce con i fluidi biologici (Mossman and Churg, 1998).

La superficie delle fibre di amianto è caratterizzata dalla presenza di diversi gruppi funzionali, quali legami idrogeno, legami instabili, ioni metallici con valenze coordinative libere, vacanze coordinative, acidi e basi di Lewis. Le superfici delle fibre minerali non sono piane (Fournier et al., 1991), ma presentano bordi, scalini e "avvallamenti". Le irregolarità di superficie costituiscono le porzioni del solido dove possono esistere legami instabili, gruppi silanolici e cationi con valenze di coordinazione libere. L'accessibilità dei gruppi funzionali di superficie nella forma nativa del minerale o in seguito a trattamenti fisici o chimici può

influenzare la reattività della superficie stessa. Ad esempio la macinazione causa rottura omolitica o eterolitica di legami: il risultato, nel caso dei silicati come le fibre di asbesto, è l'esposizione di ioni ferro e la formazione di ponti silossanici distorti, perossidi, atomi di Si radicalici, gruppi carichi come  $\text{Si}^+$  o  $\text{Si-O}^-$ , radicali perossido  $\text{Si-O}_2^-$  o superossido  $\text{Si}^+\text{O}_2^-$ . Questi gruppi funzionali di superficie giocano un ruolo importante nella reattività di fibre macinate di fresco. I gruppi funzionali formati o esposti in seguito a macinazione si dissiperebbero rapidamente se le fibre fossero inalate e venissero a contatto con l'ambiente umido dei polmoni: perciò è discutibile che questi gruppi contribuiscano all'effetto cancerogeno delle fibre, che non è un processo acuto, ma a lungo termine (Fubini et al., 1995).

Il grado di idrofobicità della superficie influisce sull'adesione cellulare, la denaturazione proteica all'interfaccia solido/liquido e determina la natura delle molecole che possono essere adsorbite sul solido, in termini di distribuzione di carica. L'idrofobicità della superficie contribuisce, insieme a forma e dimensioni, a determinare le possibili vie di traslocazione della fibra attraverso i tessuti e le possibili localizzazioni, più o meno vicine alle cellule bersaglio (Fubini, 1997). Superfici idrofiliche, come nel caso delle fibre di asbesto, manifestano forti interazioni con le molecole biologiche, che sono per lo più polari o contengono gruppi carichi. Questo favorisce anche l'adesione al solido delle membrane plasmatiche, cariche negativamente, la cui struttura può essere modificata fino alla membranolisi (Fubini and Otero Arean, 1999).

Quando la fibra è immersa nei fluidi biologici, l'adsorbimento di molecole endogene può contribuire alla patogenesi. Test cellulari *in vitro* hanno dimostrato che le immunoglobuline G vengono adsorbite alla superficie delle fibre, conferendo loro proprietà antigeniche che inducono l'attacco da parte dei macrofagi con il rilascio, potenzialmente dannoso, di anione superossido. Questa osservazione può essere significativa dell'interazione tra le fibre e i macrofagi alveolari *in vivo* e dell'induzione della risposta infiammatoria (Scheule and Holian, 1989). Al contrario si può avere un'inibizione degli effetti negativi delle fibre se l'adsorbimento di molecole endogene limita le interazioni dirette tra la superficie e le membrane cellulari. Ad esempio l'adsorbimento di fosfolipidi su particelle di quarzo riduce il danno al DNA cellulare *in vitro* (Liu et al., 1998).

L'adsorbimento di molecole esogene, prima dell'inalazione, può essere molto dannoso se tali molecole sono patogene. In questo caso la fibra agisce da *carrier* nei polmoni, e si può stabilire una sinergia di effetti tossici tra la particella e le molecole xenobiotiche. Un esempio è costituito dagli idrocarburi aromatici policiclici, il cui adsorbimento sulle fibre di amianto potrebbe essere correlato con l'effetto sinergico del fumo di tabacco e dell'esposizione all'asbesto sul rischio di sviluppare forme tumorali polmonari (Davis, 1996).

Sulla superficie di un minerale possono verificarsi eventi di scambio ionico e di deposizione di ioni. Il primo avviene se una specie ionica alla superficie della fibra viene scambiata con una specie ionica che si trova nel fluido circostante e che ha dimensioni e carica simili (Guthrie, 1997). Il crisotilo è un silicato di magnesio che contiene ioni ferro come impurezze dovute allo scambio tra  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Bowes and Farrow 1997) alla superficie. Il secondo meccanismo è stato osservato ad esempio immergendo fibre di crocidolite in soluzioni contenenti  $\text{FeCl}_3$  (Ghio et al., 1992) o  $\text{FeCl}_2$  (Hardy and Aust, 1995), in seguito alla quale si può misurare una diminuzione del ferro in soluzione. Questo meccanismo assume importanza *in vivo* in quanto associato alla formazione dei corpi ferruginosi (detti anche corpi dell'asbesto) che sono un esempio estremo di deposizione e adsorbimento alla superficie delle fibre di asbesto.

I corpi ferruginosi sono il prodotto finale di un processo di biomineralizzazione dovuto alla deposizione di ossidrossidi di ferro e di mucopolisaccaridi e materiale proteico (Churg and Warnock, 1981). Inizialmente si pensava che tale modificazione delle fibre avesse un

effetto protettivo, impedendo il diretto contatto della superficie del minerale con i tessuti circostanti. Tuttavia Lund e colleghi (1994) dimostrarono che il ferro alla superficie dei corpi dell'asbesto induce un danno ossidativo al DNA *in vitro*, e che tale effetto è aumentato in presenza di chelanti del  $Fe^{2+}$  e di molecole riducenti. Ciò suggerisce che se il ferro depositato alla superficie delle fibre è o diventa attivo nella catalisi di reazioni redox (coinvolte nella patogenesi correlata all'esposizione ad amianto; v. par successivi), cicli di estrazione e rideposizione del ferro di superficie possono costituire una sorgente continua di siti reattivi, e quindi di specie chimiche dannose come le ROS (*Reactive Oxygen Species*).

È noto che molecole chelanti possono promuovere la dissoluzione dei minerali, interagendo direttamente con i metalli alla superficie del solido e negli strati subsuperficiali (Lund and Aust, 1992; Mollo et al., 1994; Werner et al., 1995; Fubini and Mollo, 1995; Hardy and Aust, 1995). La solubilità dei minerali nei fluidi biologici contenenti molecole quali ossalato e cisteina, in grado di chelare ioni metallici, è molto diversa rispetto alla solubilità in acqua (Gold et al., 1997). L'estrazione di ioni dipende dalle proprietà dei chelanti e dalle caratteristiche di superficie del minerale e ne influenza la biopersistenza nei tessuti. L'incubazione di fibre di crisotilo *in vitro* in presenza di acido ossalico porta alla dissoluzione dello strato brucitico fino ad ottenere, in condizioni estreme, la sola struttura di tetraedri silicio-ossigeno. In questo modo i fasci di fibre, tipici del crisotilo, si disperdono in fibrille e la superficie di contatto solido/liquido aumenta, favorendo il processo stesso di solubilizzazione. Questo effetto è stato riscontrato anche in colture cellulari *in vitro*, ma potrebbe simulare ciò che avviene *in vivo*, dando ragione della ridotta biopersistenza delle fibre di crisotilo (Jaurand et al., 1984).

Il ferro di superficie può essere mobilizzato in modo analogo e tale argomento verrà approfondito nei paragrafi successivi.

Infine la reattività delle fibre di asbesto dipende dalla composizione chimica di superficie ed in particolare dalla presenza di ioni metallici in grado di fare da accettori e donatori o elettroni catalizzando reazioni di ossidoriduzione (Guthrie, 1997). Il particolare la generazione di radicali liberi (tra cui ROS) da parte delle fibre di asbesto contribuisce ai meccanismi di patogenesi a vari livelli (Kamp et al., 1992). Il rilascio di radicali liberi da parte delle fibre nel mezzo biologico richiede che alla superficie siano localizzate delle particolari funzionalità chimiche, ad esempio metalli di transizione, capaci di interagire con determinate molecole bersaglio (ad esempio l'ossigeno disciolto) che di conseguenza vengono convertite in specie chimiche dannose (ROS). Inoltre, affinché il meccanismo si produca in maniera prolungata *in vivo*, bisogna ipotizzare che i siti di superficie siano in grado di catalizzare la reazione, cioè che non vengano né modificati né consumati nel corso della reazione, oppure che possano venire rigenerati (Fubini and Mollo, 1995; Fubini, 1997b).

La chimica di superficie gioca un ruolo importante in diversi meccanismi che si ritiene contribuiscano alla patogenesi indotta da fibre di asbesto (Fubini, 1997b). In particolare la generazione di radicali liberi da parte delle fibre induce danni ossidativi a biomolecole (quali DNA lipidi e proteine; Hardy and Aust 1995), è correlata all'alterazione della regolazione di cascate di segnali intracellulari correlati con l'omeostasi cellulare (Shukla et al., 2003), contribuisce al processo infiammatorio cronico correlato con la formazione del tessuto fibroso caratteristico dell'asbestosi (Mossman and Churg, 1998), ed è sostenuta dall'attivazione dei macrofagi alveolari.

## 1.10 Il ruolo del ferro nella tossicità dell'asbesto.

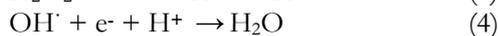
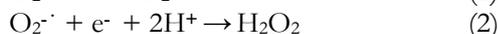
### 1.10.1 Generazione di radicali.

Il ferro è di gran lunga il metallo di transizione più abbondante nel corpo umano e in generale negli organismi viventi ed è essenziale per la vita. Gli organismi viventi hanno sviluppato dei sistemi di trasporto e accumulo che permettono di mantenere il ferro in forma non reattiva, utilizzandolo quando necessario. Se però la quantità di ferro assorbita supera la capacità di questi sistemi, esso può catalizzare l'ossidazione di DNA, lipidi e proteine, ed è associato a diverse patologie, come l'emocromatosi. Infatti i metalli di transizione sono in grado di ridurre l'O<sub>2</sub> generando specie radicaliche che possono reagire con molecole organiche. (Hardy and Aust., 1995b).

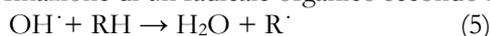
La reattività a lungo termine della superficie delle fibre di asbesto è in gran parte determinata dalla presenza di ferro alla superficie stessa e dalla sua attività ossidoriduttiva. Il meccanismo attraverso cui la superficie delle fibre promuova o catalizzi il rilascio di ROS, quali il radicale ossidrilico e lo ione superossido, non è ancora del tutto chiaro, ma diversi studi riportano che il ferro, presente nella fibra o depositato su di essa, gioca un ruolo cruciale: infatti, il trattamento con un chelante forte, come la deferoxamina, in grado di estrarre il ferro di superficie dalle fibre, inibisce *in vitro* il rilascio di radicali ossidrilici e gli effetti ossidativi su DNA e lipidi indotti da fibre di crocidolite (Gold et al., 1997; Turver and Brown, 1987; Gilmour, 1995; Weitzman and Weitberg, 1985).

I vari tipi di amianto contengono ferro in quantità variabile, ma questo ione è sempre presente sulla superficie delle fibre, per lo più sotto forma di ferro trivalente, in quanto il Fe<sup>2+</sup>, se esposto all'aria, viene tendenzialmente ossidato a Fe<sup>3+</sup>. Numerosi test hanno dimostrato che sospensioni acquose tamponate di amianti, generano radicali liberi che possono essere evidenziati con il metodo dello *spin trapping* (Weitzman and Graceffa, 1984).

Nel lavoro di Weitzman e Graceffa si dimostrò per la prima volta che le fibre di crisotilo, amosite e crocidolite catalizzano la produzione di OH<sup>·</sup> e O<sub>2</sub><sup>·-</sup> da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in sistemi *cell-free*: la produzione di radicali dipenderebbe quindi dalla disponibilità di perossido di idrogeno. Le fibre inducono la produzione di radicali tramite la riduzione dell'ossigeno molecolare, secondo un meccanismo del tipo (Pezerat et al., 1989):



e in presenza di molecole organiche del tipo RH, si può avere l'estrazione di un protone e la formazione di un radicale organico secondo il meccanismo:

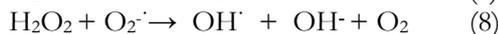
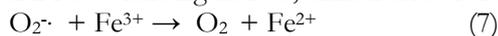


Il ferro può essere il donatore di elettroni in queste reazioni e per questo motivo, fibre contenenti ferro possono catalizzare la produzione di radicali, anche più stabili di OH<sup>·</sup>, secondo i seguenti meccanismi:

1. In presenza di perossido di idrogeno, si ha la *reazione di Fenton* e la formazione del radicale ossidrilico:

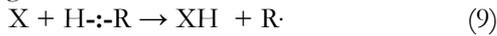


2. In presenza di ioni superossido si può instaurare anche il *ciclo di Haber-Weiss* (reazione 8), in cui il Fe<sup>2+</sup> viene rigenerato, alimentando la reazione di Fenton:



Entrambe le reazioni sono limitate *in vivo* a compartimenti biologici ben definiti, dove sia presente il perossido di idrogeno, tipicamente il fagolisosoma.

In presenza di molecole organiche, si può avere rottura omolitica di un legame tra idrogeno e carbonio, secondo lo schema:



e formazione di un radicale organico. Nel caso degli amianti, la specie X può essere una forma ossidata del Fe, oppure un altro radicale (ad esempio il radicale ossidrile che viene ridotto ad acqua). Questa reazione avviene con numerose molecole aventi un atomo di idrogeno relativamente labile, ed è quindi verosimile che avvenga *in vivo*, coinvolgendo biomolecole come proteine, lipidi e acidi nucleici (Kamp and Weitzman, 1999).

Il perossido di idrogeno, che reagisce molto lentamente con le biomolecole, e l'anione superossido, non sono considerate specie dannose per i sistemi biologici. Al contrario, il radicale ossidrile, che è meno stabile, ma, essendo privo di carica, diffonde più rapidamente anche attraverso le membrane, è più pericoloso. OH<sup>·</sup> si forma a partire da Fe<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quindi le reazioni intracellulari da considerare per identificarne le fonti, sono quelle che generano queste due specie. Lo ione ferroso può essere già presente, ad esempio sulla superficie della fibra, oppure può essere generato per riduzione dello ione ferrico Fe<sup>3+</sup> da parte di acido ascorbico, cisteina, glutatione o altri agenti riducenti. I macrofagi attivati possono produrre O<sub>2</sub><sup>·-</sup> che, a sua volta, è in grado di ridurre il Fe<sup>3+</sup> (Hardy and Aust, 1995).

Il perossido di idrogeno può derivare dai macrofagi attivati, oppure da reazioni di

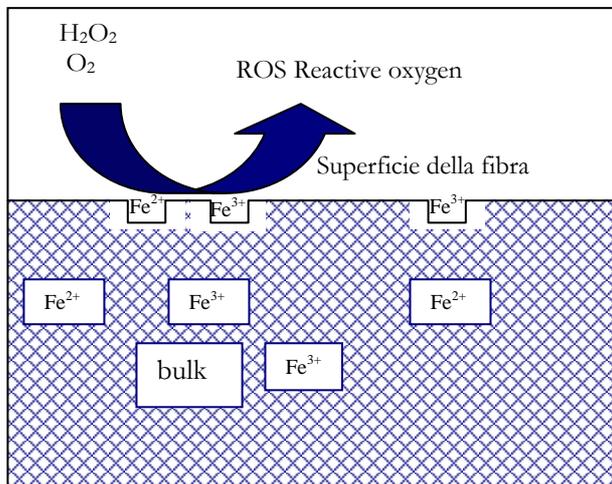


Figura 1.7 - Generazione di ROS alla superficie della fibra/ ROS generation at the fiber surface

dismutazione di O<sub>2</sub><sup>·-</sup> spontanee o catalizzate da enzimi (Kinnula, 1999) come la *superossido dismutasi*:  
 $O_2\cdot^- + O_2\cdot^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (10)$

Se il ferro ha un ruolo importante nella tossicità degli amianti, in quanto coinvolto nella produzione di radicali, rimane però da chiarire perché non tutti i minerali contenenti ferro siano tossici.

La reattività delle fibre sembra quindi principalmente correlata alla presenza di Fe<sup>2+</sup> naturalmente in superficie o che la raggiunge per progressiva dissoluzione del solido o per riduzione del Fe<sup>3+</sup> (Pezerat et al.,

1989).

Confrontando la capacità di catalizzare la formazione di radicali ossidrile, rilevati con la tecnica dello spin trapping, da parte di fibre con struttura cristallina e composizione chimica simili, si osservò una correlazione lineare tra l'attività ossidativa della superficie e la quantità di Fe<sup>2+</sup> accessibile, ossia estraibile con chelanti alla superficie del minerale (Fubini and Mollo, 1995).

Trattando le fibre con ferrozina, un chelante ad alta affinità per Fe<sup>2+</sup>, e con deferoxamina B (DFX B), che lega principalmente Fe<sup>3+</sup>, si osserva una diminuzione del rilascio di radicali liberi: ciò permette di ipotizzare che ioni Fe in entrambi gli stati di ossidazione siano necessari per generare radicali, riducendo O<sub>2</sub> (figura 1.7). La figura mostra come gli ioni Fe siano presenti sulla superficie e nella struttura cristallina delle fibre in entrambi gli stati di ossidazione, e come essi possano reagire con piccole molecole, ad esempio O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, per generare ROS. Il

trattamento con chelanti causa la rimozione degli ioni ferro dai siti catalitici e la diminuzione del rilascio di radicali (Fubini et al., 1993). Inoltre è stato proposto anche che i chelanti si adsorbano alla superficie delle fibre inattivando i siti reattivi e bloccando ad esempio la reazione di Fenton (Mollo et al., 1994). Quindi si può affermare che, oltre al  $\text{Fe}^{2+}$ , anche la coppia  $\text{Fe}^{2+}\text{-Fe}^{3+}$  sia uno dei possibili siti attivi in corrispondenza dei quali il perossido di idrogeno o l'ossigeno vengono ridotti a ROS. Inoltre si è ipotizzato che anche coppie costituite da ione ferrile  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}^{2+}$  e perferrile  $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}^{3+}$  costituiscano siti attivi nella generazione di radicali alla superficie delle fibre (Fubini and Mollo, 1995).

La reattività delle fibre non dipende quindi dalla quantità di ferro contenuto o dall'estensione della superficie esposta, ma piuttosto dalla presenza sulla superficie di siti reattivi con ioni ferro in un determinato stato di ossidazione. Inoltre ioni con valenze coordinative libere sono più reattivi di ioni completamente coordinati. La reattività di un solido può dipendere anche da pochi siti reattivi. Per esempio fibre di vetro contenenti ferro solo in tracce sono risultate più reattive di fibre di crocidolite, che contengono maggiori quantità assolute di ferro (Gulumian and Kilroe-Smith, 1987).

#### 1.10.2 Mobilizzazione del ferro.

Considerando l'elevata reattività del radicale ossidrilico, che risulta in una emivita molto breve, e la velocità di diffusione del radicale stesso, si è stimato che affinché esso possa reagire con le biomolecole, è necessario che la fibra di asbesto che ne catalizza la generazione, si trovi ad una distanza non superiore ai 10 Å dal target. Di conseguenza, il danno al DNA sarebbe possibile solo se la fibra si trovasse nel nucleo della cellula, cosa che è stata osservata raramente. Nonostante ciò l'incubazione di cellule *in vitro* in presenza di asbesto può causare alterazione della regolazione della sintesi del DNA e rottura delle eliche, anche se non si verifica la penetrazione delle fibre nei nuclei. Ciò suggerisce che la superficie delle fibre potrebbe avere un ruolo importante nel legame e rilascio di ferro, più che non nel rilascio diretto di radicali (Hardy and Aust, 1995).

Nonostante la solubilità dei minerali asbestiformi sia molto bassa, notevoli quantità di ferro vengono rilasciate a pH fisiologico in presenza di soluzioni acquose di chelanti *in vitro* (Lund and Aust, 1990; Werner et al., 1995). La mobilizzazione del ferro dalle fibre è stata spesso studiata utilizzando chelanti a basso peso molecolare, come la ferrozina, che forma dei complessi colorati con il  $\text{Fe}^{2+}$ , direttamente quantificabili con metodi spettrofotometrici. Altri chelanti molto usati sono la deferoxamina B, che forma complessi colorati con il  $\text{Fe}^{3+}$ , l'etilendiamino tetracetato (EDTA), il nitrilotracetato (NTA) e il citrato, che legano il ferro in entrambi gli stati di ossidazione (Hardy and Aust, 1995).

Inoltre la reattività di superficie delle fibre viene alterata in modo diverso a seconda del chelante utilizzato. Ad esempio il pretrattamento di fibre di crocidolite con deferoxamina B, chelante del  $\text{Fe}(\text{III})$ , inibisce il rilascio di radicali  $\text{OH}^{\cdot}$ , ma un analogo trattamento con ferrozina, chelante del  $\text{Fe}(\text{II})$ , non ha lo stesso effetto (Weitzman and Graceffa, 1984; Ghio et al., 1992; Gold et al., 1997). Questo sottolinea che la reattività di superficie non è correlata alla quantità di ferro in superficie, ma piuttosto allo stato chimico del ferro di superficie, che viene modificato in modo diverso da trattamenti diversi.

L'importanza di queste osservazioni in un contesto cellulare o *in vivo* deriva dal fatto che molecole endogene, quali ascorbato, citrato, cisteina, ossalato, ADP, ATP, possono avere un'attività chelante (Kamp and Weitzman, 1999): in questa forma chelata, il ferro può diffondere nella cellula, catalizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno in grado di reagire e alterare le biomolecole.

Complessi Fe-chelante diversi hanno reattività diversa in quanto la reattività del ferro dipende dal suo stato di ossidazione e di coordinazione. Ad esempio il ferro legato ad un

chelante a basso peso molecolare quale il citrato o l'ADP, ha attività redox, in quanto la geometria di coordinazione con tali chelanti consente al metallo di coordinare piccole molecole come l'H<sub>2</sub>O o l'O<sub>2</sub>. Per questo motivo i complessi del Fe(II) possono ridurre l'O<sub>2</sub> e generare specie altamente reattive. Al contrario quando tutti i siti di coordinazione del ferro sono occupati dal chelante, come nel caso della deferoxamina e della ferrozina, che legano rispettivamente Fe(III) e Fe(II), l'attività redox del ferro è inibita (Aust and Eveleigh, 1999). Queste differenze si riflettono anche sulla capacità di fibre di crocidolite di indurre danni ossidativi al DNA in presenza di diversi tipi di chelanti *in vitro*. Ad esempio l'incubazione con deferoxamina, che estrae elevate quantità di ferro dalla crocidolite, porta alla formazione di complessi inattivi, che non determinano danno al DNA (misurati come rotture della singola elica *DNA single strand break*). Al contrario l'estrazione di ferro dalle fibre con NTA e EDTA porta alla formazione di complessi attivi, che causano la formazione di DNA-SSB (Lund and Aust, 1992). Queste osservazioni, condotte su sistemi acellulari, suggeriscono che le proprietà ossidanti delle fibre dipendono dalla possibilità di mobilizzare il ferro dalle fibre stesse e dall'attività redox dei complessi Fe-chelante.

Altri lavori sottolineano invece il contributo del ferro associato alla superficie nel determinare la reattività biochimica delle fibre, in relazione alla già discussa capacità delle fibre di generare radicali all'interfaccia solido/fluido circostante *in vitro* (Weitzman and Graceffa, 1984).

Diversi lavori sperimentali basati sullo studio delle potenzialità ossidative delle fibre verso la molecola di DNA sostengono tale ipotesi. Il trattamento di DNA isolato con fibre di crocidolite induce un aumento della 8-idrossideossiguanosina, dovuto all'attività ossidativa delle fibre stesse. Tale induzione è ulteriormente accentuata dall'aggiunta di perossido di idrogeno nella soluzione di incubazione (Faux et al., 1994). La deposizione di ioni ferro sulla superficie di fibre di crocidolite in seguito ad incubazione in una soluzione contenente FeCl<sub>2</sub>, determina la presenza di una fonte di ferro addizionale e facilmente estraibile rispetto al ferro presente nella fibra non trattata, induce un aumento delle DNA SSB (Hardy and Aust, 1995b). Un esperimento complementare, basato sul depauperamento del ferro di superficie delle fibre tramite il trattamento con chelanti, ha dimostrato che fibre così modificate inducono in misura minore DNA SSBs (Chao e Aust 1994). Questa osservazione concorda con quella precedente di Ghio et al., (1992) secondo cui, pretrattando la crocidolite con deferoxamina B, si rileva una diminuzione della formazione di radicali OH<sup>•</sup> e dell'attività ossidativa delle fibre, che sarebbe secondo questi autori proporzionale alla quantità di Fe<sup>3+</sup> presente in superficie. Infine la preparazione di campioni di crocidolite arricchiti o depauperati in ferro di superficie ha permesso di osservare una relazione tra il ferro di superficie e reazioni diverse dal danno ossidativo al DNA, quali la capacità delle fibre di indurre lipoperossidazione, attivazione dei macrofagi *in vitro* e alveolite *in vivo* (Ghio et al., 1992b).

Ioni ferro possono migrare dall'interno alla superficie della fibra per rimpiazzare quelli estratti dai chelanti. Quindi il Fe in superficie viene attivato e rilascia radicali liberi; contemporaneamente, un ciclo di estrazione di ioni da parte di chelanti e rideposizione di ioni sulla superficie, permette una rotazione continua di ioni Fe che, sottoposti a reazioni redox successive, possono costituire una sorgente continua di radicali liberi (Lund and Aust, 1992).

In generale tutti i lavori sperimentali citati confermano il ruolo centrale del ferro nel determinare la reattività delle fibre. E' plausibile che *in vivo* si instauri una sinergia di effetti tra il ferro di superficie, che può trovarsi in stretto contatto con le membrane cellulari, e quello mobilizzato, che raggiunge più facilmente molecole target a livello intracellulare (Fubini and Mollo, 1995).

## 1.11 Ossidazione di proteine, lipidi e DNA.

I principali metaboliti mediatori della patogenicità dell'asbesto sono l'anione superossido, il perossido di idrogeno, il radicale ossidrilico e l'ossido nitrico. L'anione superossido ha un'emivita relativamente lunga nei sistemi biologici. Può essere dismutato non-enzimaticamente o enzimaticamente con la conseguente produzione di perossido di idrogeno, che è meno reattivo ma può esercitare un effetto tossico reagendo con altre biomolecole per produrre radicali ossidrilici. Tali radicali vengono formati via ciclo di Haber-Weiss o reazione di Fenton (Kinnula 1999). Infatti, come descritto in precedenza, la generazione di specie reattive dell'ossigeno è correlata alla presenza di ferro nelle fibre, ma anche alla attivazione di cellule mediatrici dell'infiammazione, come macrofagi e neutrofilo, in seguito al contatto con le fibre stesse (Kamp and Weitzman, 1999). L'attivazione di tali tipi cellulari comporta generazione di  $O_2^{\cdot-}$  e di  $H_2O_2$ , nonché la produzione di ossido nitrico ( $\cdot NO$ ) per via enzimatica, rilevata anche in cellule target dell'asbesto come le epiteliali polmonari (Park and Aust, 1998). Tale specie reagisce con l'anione superossido per formare l'anione perossinitrito (reazione 11).



Tale ione è in grado di reagire con diverse molecole target a livello cellulare, causando ossidazione, idrossilazione e nitrosazione. La sua stabilità contribuisce a determinarne l'elevata tossicità, in quanto nella sua conformazione più stabile è in grado di diffondere ed eventualmente attraversare le membrane cellulari. A pH fisiologico esiste in equilibrio con il suo acido coniugato (acido perossinitroso  $ONOOH$ ), il quale può a sua volta decomporsi per dare specie chimiche con potenti proprietà ossidanti quali  $NO_2^-$  e  $HO^{\cdot}$  (Aust and Eveleigh, 1999).

In condizioni di infiammazione cronica, le cellule possono essere esposte a elevate concentrazioni di  $\cdot NO$  e di altre specie prodotte in seguito a reazioni con l' $O_2$ , quali  $NO_2$  (diossido di azoto),  $N_2O_3$  (triossido di diazoto) e  $NO_2^-$  (nitrito). Tali specie promuovono la deaminazione di amine aromatiche primarie incluse purine e pirimidine, e possono quindi modificare in vario modo il DNA (Jourdeuil, 1997).

Fibre di asbesto inalate costituiscono quindi allo stesso tempo una fonte diretta e indiretta di ROS e RNS, che si aggiungono alle specie ossidanti di origine endogena prodotte da enzimi (es. NADPH ossidasi, mieloperossidasi, lipossigenasi) e catene di trasporto elettronico (es. catena respiratoria nei mitocondri o il sistema del citocromo P450). Nel corso dell'evoluzione si sono sviluppati diversi sistemi di difesa dall'attacco dei ROS e di altre specie ossidanti. Il più semplice è costituito da composti a basso peso molecolare con proprietà antiossidanti, quali la vitamina C ed E che intercettano i radicali liberi, prevenendo le reazioni con altre biomolecole. Sistemi più complessi sono costituiti da enzimi, quali le superossidodismutasi (SOD), le catalasi (CAT) e la glutatione perossidasi (GPX) che limitano i livelli di ROS nella cellula. Nonostante tali sistemi di difesa, le biomolecole subiscono danni ossidativi, che se contenuti ad un livello di "background", non hanno effetti a livello cellulare.

Tuttavia una fonte aggiuntiva di specie ossidanti come può essere l'asbesto, causa uno sbilanciamento tra i meccanismi pro- e anti-ossidanti a favore dei primi, inducendo un danno ossidativo a livello molecolare che si ripercuote sugli equilibri metabolici della cellula (Evans et al., 2004).

I bersagli molecolari delle specie ossidanti sono proteine lipidi ed acidi nucleici. L'entità del danno ossidativo dipende da diversi fattori tra cui: la concentrazione della molecola target, la velocità di reazione dell'ossidante con il target, la localizzazione delle due specie, l'induzione di danni secondari (ad es. reazioni a catena) e di meccanismi di riparazione.

### *Ossidazione di proteine*

L'ossidazione delle proteine può avvenire in corrispondenza di diversi siti, sia sullo scheletro di legami peptidici che sulle catene laterali degli amminoacidi.

I radicali reagiscono rapidamente con gli atomi che formano lo scheletro delle proteine, per lo più tramite l'estrazione di un atomo di idrogeno dal carbonio  $\alpha$ , dando origine ad un radicale centrato sul carbonio. Tale radicale può subire una serie di reazioni ulteriori (descritte in Davies, 2005) causando in ultima analisi la frammentazione della molecola.

Studi riguardanti l'ossidazione delle proteine da parte del ferro hanno permesso di ipotizzare che tale reazione sia sito-specifica, in quanto prolina, istidina, arginina, lisina e cisteina sono residui molto sensibili all'ossidazione mediata dal ferro. Si pensa che il Fe(II) si leghi in corrispondenza di siti sulla proteina probabilmente costituiti dagli amminoacidi sopra elencati, e che in questa forma chelata possa reagire con il perossido di idrogeno originando ROS (Welch et al., 2002).

L'ossidazione delle catene laterali di alcuni amminoacidi può causare perdita della struttura terziaria e cambiamenti conformazionali, con conseguente alterazione dell'attività catalitica e maggiore suscettibilità alla degradazione proteasoma-dipendente. Infatti le proteine ossidate non vengono riparate dai sistemi cellulari, e sono quindi destinate alle vie cataboliche (Davies, 2005).

L'ossidazione delle proteine sembra avere un ruolo importante nei fenomeni di invecchiamento, ma non è chiaro il contributo che essa può dare allo sviluppo del cancro.

Gli effetti dell'asbesto sulle proteine possono essere quindi ascritti ai generici meccanismi di stress ossidativo, e contribuiscono all'alterazione del funzionamento delle proteine. Tali alterazioni diventano particolarmente importanti se riguardano proteine o metaboliti con funzioni antiossidanti in quanto implicano una maggiore suscettibilità allo stress (Hardy and Aust, 1995). Alcuni lavori hanno dimostrato l'influenza delle fibre di asbesto sulle proteine coinvolte nella via dei pentoso fosfati (PPP), in particolare la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, che viene inibita in modo specifico da fibre di crocidolite in cellule epitaliali polmonari. Il PPP rappresenta una via di rigenerazione di molecole riducenti ed è quindi indirettamente coinvolto nel mantenimento del pool intracellulare di antiossidanti ed in particolare di glutatione ridotto (Riganti et al., 2002). Il glutatione ha un ruolo fondamentale nel controllo dello stato redox della cellula e determina l'attivazione di proto-oncogeni e fattori di trascrizione in cellule epiteliali polmonari trattate con fibre di asbesto (Shukla et al., 2004).

### *Ossidazione di lipidi*

La reazione di ossidazione dei lipidi inizia con l'estrazione di un atomo di idrogeno dai legami allilici presenti negli acidi grassi polinsaturi da parte di una specie radicalica. Il radicale ossidrilico è uno dei candidati più probabili, quindi molti ricercatori hanno ipotizzato un ruolo indiretto del ferro in quanto catalizzatore delle reazioni di Fenton. E' stata anche proposta l'ipotesi di un ruolo diretto del ferro, ed in particolare di complessi Fe(II)-Fe(III), nell'avvio della reazione di perossidazione lipidica (Welch et al., 2002).

Sono stati proposti diversi meccanismi di reazione (Del Rio et al., 2005; Bartsch and Jagadeesan, 2004), e la produzione di diversi prodotti secondari, per lo più aldeidi. I due principali prodotti finali sono il trans-4-idrossi-2-nonenale (HNE) e la malondialdeide (MDA). Entrambi possono reagire con le basi del DNA portando alla formazione di addotti promutagenici, particolarmente stabili e in grado di diffondere attraverso le membrane, quali 1,N<sup>6</sup>-etenodeossadenosina (edA), 3,N<sup>4</sup>-etenodeossicitina (edC), N<sup>2</sup>,3-etenodeossiguanosina e pirimido-[1,2- $\alpha$ ]purin-10(3H)-one desossiribosio (M<sub>1</sub>dG). Quest'ultimo si forma dalla reazione della MDA con la guanosina, e può indurre lo spostamento del *frame* di lettura delle basi e la

sostituzione di basi in batteri e mammiferi. Inoltre si è visto che l'PMDA può causare la formazione di *cross-links* tra le due catene che formano la molecola del DNA e tra DNA e istoni. I prodotti delle reazioni di lipoperossidazione sono quindi mutagenici e possono contribuire alla trasformazione cellulare.

La perossidazione lipidica è un meccanismo tramite il quale l'asbesto altera la struttura e le funzioni delle membrane cellulari. Il coinvolgimento di ROS generati del ferro associato alle fibre è dimostrato dall'osservazione che molecole antiossidanti e chelanti del ferro possono ridurre tale reazione (Ghio et al., 1992, Hardy and Aust, 1995). I prodotti della perossidazione lipidica sono stati rilevati *in vitro* in cellule epiteliali polmonari incubate con fibre di crocidolite (Gazzano et al., 2005), ma anche nel plasma di lavoratori esposti all'asbesto (Kamp and Weitzman, 1999).

### *Ossidazione del DNA*

L'ossidazione del DNA può determinare la modificazione delle quattro basi ma anche del desossiribosio. L'esposizione del DNA a specie ossidanti può causare la formazione di DNA-SSB, la formazione di lesioni delle basi come 8-osso-7,8-diidro-2'-desossiguanosina (8oxodGuo), la deplezione di nucleotidi a alto contenuto energetico (ATP, GTP), danni irreversibili che risultano nell'induzione dell'apoptosi o della necrosi cellulare oppure trasformazione cellulare in fenotipi maligni.

Le conoscenze attuali indicano che le specie chimiche maggiormente coinvolte nelle reazioni di ossidazione del DNA sono il radicale ossidrile e l'anione perossinitrito. L' $\text{OH}^\cdot$  è prodotto a livelli basali durante la respirazione, ma può aumentare in seguito ad uno stress esterno, ad esempio l'esposizione a metalli pesanti, o all'insorgere di una reazione infiammatoria, che parallelamente comporta la generazione dell'anione perossinitrito (Aust and Eveleigh, 1998). Tuttavia anche altre specie reattive dell'ossigeno possono contribuire indirettamente a tali reazioni. Ad esempio l'anione superossido, che di per sé è poco reattivo verso il DNA, può essere coinvolto in diverse reazioni biochimiche, tra cui la reazione con l'ossido nitrico per formare perossinitrito e la riduzione di metalli in forma ossidata. Il perossido di idrogeno, formato ad esempio per dismutazione dell' $\text{O}_2^\cdot$  o rilasciato dai macrofagi attivati, è inerte verso il DNA, con l'eccezione dell'ossidazione selettiva dell'adenina. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  può originare  $\text{OH}^\cdot$  via reazione di Fenton.

La reazione dei radicali ossidrile con il DNA può indurre diversi tipi di danni tra cui l'ossidazione di basi, la formazione di siti abasici, di addotti DNA-DNA e di addotti DNA-proteine e la rottura delle eliche di DNA (Cadet et al., 1999). L' $\text{OH}^\cdot$  può indurre tre tipi di reazioni: estrazione di un atomo di idrogeno, addizione, trasferimento di un elettrone.

La reazione con il desossiribosio avviene tramite estrazione di un atomo di idrogeno da uno dei cinque atomi di carbonio, formando un radicale carbonilico. Ulteriori reazioni (descritte nel dettaglio in Evans et al., 2004) possono portare alla rottura dell'elica e al rilascio di basi inalterate o di zuccheri modificati.

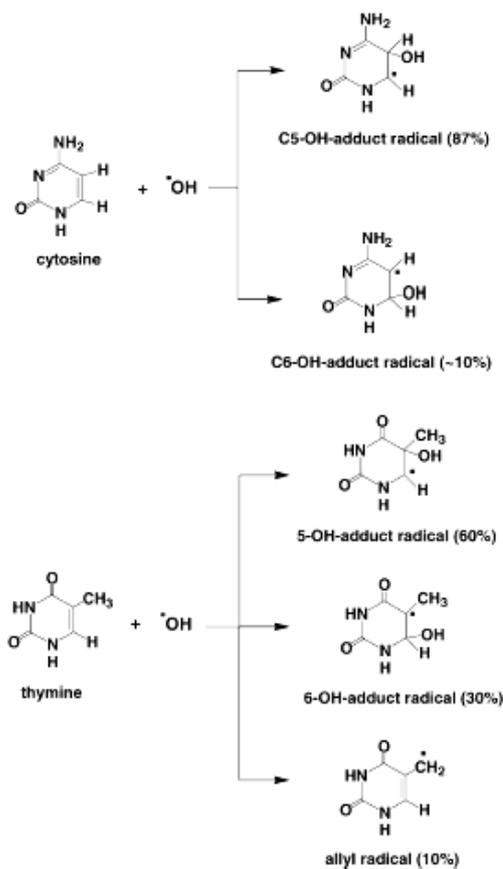


Figura 1.8 - Reazioni del  $\text{OH}\cdot$  con le pirimidine. / Reactions of  $\text{OH}\cdot$  with pyrimidines. (Evans et al, 2004)

Il radicale ossidrile reagisce con le basi del DNA tramite reazioni di addizione. L' $\text{OH}\cdot$  si addiziona al doppio legame C5-C6 nelle pirimidine, così che si formano delle basi che possono avere un radicale centrato in C5 o in C6. Inoltre esiste una reazione addizionale sulla timina, che comporta l'estrazione di un atomo di idrogeno dal gruppo metilico e la formazione di un radicale allilico (v. figura 1.8). Nel caso delle purine il radicale ossidrile si addiziona in C4, C5 o C8 (Aust and Eveleigh 1998). La guanina è il target più suscettibile ad un'ampia varietà di reazioni di ossidazione in quanto ha il più basso potenziale di ionizzazione tra i componenti del DNA. Tali reazioni coinvolgono per lo più il radicale ossidrile, l'ossigeno singoletto ( $^1\text{O}_2$ ) o il perossinitrito.

Le due reazioni predominanti nella decomposizione della 2'-desossiguanosina (dGuo) (figura 1.9) nel DNA isolato in soluzioni acquee comportano l'addizione iniziale di un  $\text{OH}\cdot$  in C4 o in C8. L'addizione in C8 determina la formazione di un radicale con proprietà riducenti (8-idrossi-7,8-

diidroguanile). Tale radicale può essere ossidato o ridotto a seconda delle proprietà della soluzione, ad esempio della concentrazione dell'ossigeno molecolare. Una reazione di ossidazione genera la 8oxodGuo, mentre una reazione di riduzione genera il derivato 2,6-diamino-4-idrossi-5-formamidopirimidina (FapydGuo). L'addizione in C4 porta, attraverso alcuni passaggi di reazione, alla formazione di un derivato ossazolone (dZ; figura 1.9, Cadet et al., 2003).

La formazione di 8oxodGuo può avvenire anche per reazione della dGuo con l'ossigeno singoletto (Cadet et al., 2003).

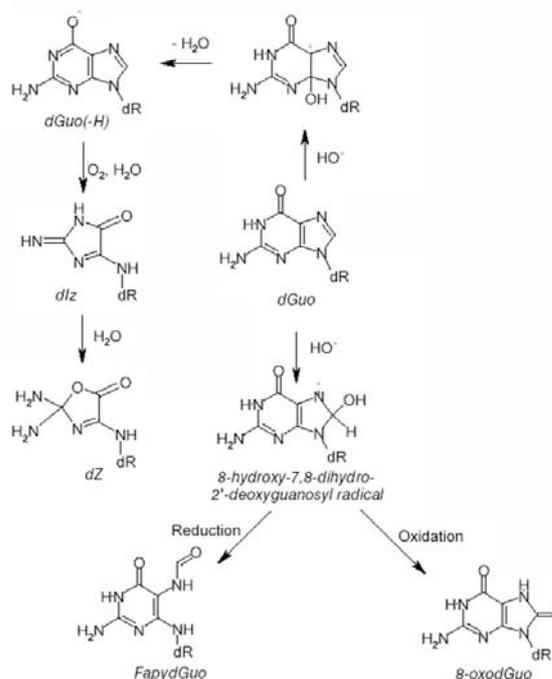
La reazione della dGuo con il perossinitrito può risultare nella formazione di 8oxodGuo o della 8-nitroguanina. La mutagenicità di tale base modificata deriva dal fatto che essa viene eliminata lasciando dei siti apurinici in corrispondenza dei quali possono avvenire trasversioni come il passaggio GC→AT. Resta da verificare se le reazioni con il  $\text{ONOO}\cdot$  avvengano anche in ambiente cellulare (Jour'dheuil et al., 1997). Dati sperimentali riguardanti l'ossidazione della dGuo ad opera di fibre di crocidolite in ambiente cellulare indicano una correlazione tra la presenza di ferro nelle fibre, la formazione di nitriti e la formazione di 8oxodGuo, dimostrando che l'inibizione della produzione di nitriti, è accompagnata dall'inibizione della ossidazione della guanosina (Chao et al., 1996).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'asbesto può generare radicali ossidrilici in ambiente cellulare causando la formazione di 8oxodGuo. Il ruolo del ferro e della reazione di Fenton nella modificazione del DNA indotta dall'asbesto è stata più volte sottolineata. Tuttavia diversi studi indicano che anche fibre non contenenti ferro generano DNA-SSB e 8oxodGuo, suggerendo l'esistenza di altri meccanismi. Studi condotti sulle cellule epiteliali polmonari hanno dimostrato che fibre di crocidolite inducono la formazione di 8oxodGuo e che un inibitore della NO-sintetasi riduce la formazione di NO' e la formazione di 8oxodGuo, lasciando ipotizzare un ruolo delle RNS nel danno al DNA indotto dalle fibre (Chao et al., 1996).

Diversi dati sperimentali supportano l'ipotesi che le ROS abbiano comunque un ruolo determinante nell'induzione del danno al DNA in cellule target quali epiteliali alveolari e mesoteliali (Upadhyay and Kamp, 2003):

1. Molecole chelanti del ferro e antiossidanti prevengono il danno al DNA indotto da asbesto e l'apoptosi cellulare. Inoltre, complessi Fe-chelante già formati non hanno un ruolo protettivo, suggerendo l'importanza del ferro in queste reazioni.
2. C'è una relazione diretta tra il ferro di superficie e l'induzione della rottura delle eliche del DNA.
3. L'asbesto induce la formazione di lesioni ossidative al DNA (ad es. 8oxodGuo), e l'entità di tale danno è dose-dipendente nelle RPMC (*rat pleural mesothelial cells*). Tale effetto è limitato se la fibra è pre-trattata con un chelante del ferro, sottolineando il ruolo centrale di ROS generate dal ferro associato alle fibre.
4. Alcuni lavori hanno dimostrato la mutagenicità dell'asbesto *in vivo*: la mutazione più frequente in cellule esposte a crocidolite è la trasversione G→T, causata dalla formazione di 8oxodGuo, che è quindi una lesione pre-mutagenica.

Figura 1.9 - Reazione della guanina con il radicale ossidrilico / Reaction of guanine with hydroxyl radical.



L'esposizione all'asbesto, come già detto, è correlata allo sviluppo di diverse patologie polmonari, tra cui anche alcune forme tumorali. Lo sviluppo di un tumore è un processo complesso, che avviene per tappe. La genotossicità è un evento chiave nella trasformazione neoplastica indotta da xenobiotici, in quanto le alterazioni genetiche sono determinanti nella fase di inizio di un tumore. Infatti la modificazione della sequenza del DNA determina l'alterazione dell'espressione genica (in particolare dei proto-oncogeni e dei "tumor suppressor genes") e quindi dei segnali intracellulari. Tutte le forme di asbesto inducono danni al DNA e alterano il meccanismo di controllo della proliferazione in cellule target come epiteliali polmonari e mesoteliali pleuriche (Upadhyay and Kamp, 2003). Tuttavia lo sviluppo del cancro dovuto ad uno stress di tipo ossidativo dipende da molti altri fattori, tra cui l'entità del danno al DNA (in quanto cellule troppo danneggiate vengono eliminate), le difese antiossidanti, l'efficienza dei sistemi di riparo del DNA, l'entità degli effetti citotossici delle ROS quando generate in elevate concentrazioni e dell'induzione della proliferazione delle stesse ROS se presenti a basse concentrazioni (Wiseman and Halliwell, 1996).

<b>Saggio</b>	<b>End point</b>	<b>procedura</b>	<b>strumento</b>
<b>Saggi in sistemi cellulari</b>	Quantità di 8oxodGuo o altre basi modificate o addotti.	Estrazione DNA cellulare	HPLC-EC, GC-MS/MS
	Rottura eliche DNA	Esposizione di cellule eucariote a fibre seguita da eluizione del DNA.	comet assay, denaturazione alcalina, nick-translation
	Retromutazioni in batteri, mutazione di specifici loci in eucarioti.	Esposizione a fibre di <i>S. typhimurium</i> o <i>E. coli</i> mutanti, o di linee cellulari eucariote.	Analisi vitalità
	Aneuploidia o poliploidia	Osservazione metafase	Conteggio cromosomi
	Aberrazioni cromosomiche, formazione micronuclei, scambio tra cromatidi fratelli	Esposizione di cellule a fibre seguita da estrazione DNA o osservazione morfologica <i>in situ</i> .	Southern blot, ibridazione <i>in situ</i> con sonde specifiche
<b>Saggi in sistemi acellulari</b>	Quantità di 8oxodGuo	Incubazione DNA+fibre	HPLC-EC
	Grado di avvolgimento dell'elica di DNA	Incubazione plasmide+fibre	Elettroforesi su gel
	Rottura di una (SSB) o entrambe (DSB) le eliche del DNA		

Tabella 1.10 - Metodi utilizzati per lo studio della genotossicità delle fibre di asbesto. / Methods used in the study of genotoxicity of asbestos fibres.

#### 1.11.1 Metodologie per lo studio della genotossicità dell'asbesto.

La tabella 1.10 riporta una sintesi delle tecniche più utilizzate per la valutazione della genotossicità delle fibre di asbesto in vitro. Una descrizione più dettagliata e riferimenti bibliografici vanno oltre lo scopo di questa trattazione e si possono trovare in Jaurand (1997).

La formazione di 8oxodGuo può essere misurata a seguito dell'incubazione dell'agente ossidante in una soluzione di guanosina o di DNA di origine bovina (DNA di timo di vitello; Berger et al., 1993) seguita da una tappa di idrolisi (acida o enzimatica, Helbock et al., 1999) della molecola di DNA in nucleosidi, che vengono poi separati tramite cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e rivelati tramite un sistema elettrochimico (Floyd et al., 1990). Questo tipo di rivelazione può essere utilizzata solo per prodotti che siano elettro attivi, ossia che possano ossidarsi o ridursi sull'elettrodo di lavoro. La separazione cromatografia e le differenze tra i potenziali di ossidazione dei vari composti fanno sì che questo metodo abbia un'elevata specificità. E' un metodo adatto alla rivelazione della 8oxodGuo in quanto questo composto ha un potenziale di ossidazione più basso rispetto alle basi non modificate e agli altri prodotti di ossidazione del DNA, che non vengono rilevati al potenziale applicato.

La stessa tecnica è stata utilizzata per il dosaggio della guanosina ossidata in seguito al trattamento di cellule con fibre di asbesto (Takeuki and Morimoto 1994, Chao et al., 1996). In questo caso si procede all'estrazione del DNA nucleare, attraverso un metodo caotropico, basato sull'utilizzo di ioduro di sodio e solventi, oppure tramite un'estrazione con fenolo (Helbock et al., 1999). Il DNA estratto viene sottoposto ad idrolisi e successiva analisi cromatografica come descritto nel caso del DNA isolato. L'utilizzo dell'HPLC, o in alternativa della gas-cromatografia, interfacciata ad uno spettrometro di massa in modalità tandem, consente l'identificazione sulla base della massa e il dosaggio di altre basi modificate, fornendo quindi uno strumento più versatile rispetto all'HPLC-EC (Cadet et al., 2003).

Il *comet assay*, detto anche SCGE (*single cell gel electrophoresis*), permette di rivelare gli eventi di rottura delle eliche del DNA cellulare. Esso comporta l'inclusione di cellule in un sottile strato di gel di agarosio, la lisi delle membrane e quindi la liberazione del DNA nel gel. Il DNA viene sottoposto ad elettroforesi in condizioni denaturanti e rivelato con bromuro di etidio al microscopio a fluorescenza. Il DNA intatto non migra nel gel, mentre se ha subito delle rotture può migrare generando un alone simile alla coda di una cometa. Tanto maggiore è il danno subito dalla molecola, quanto maggiore sarà l'estensione della migrazione (Singh et al., 1991). Spesso questo metodo è utilizzato in combinazione a specifici enzimi di riparazione del DNA quali la formamidopirimidina-DNA N-glicosilasi, che taglia il DNA in corrispondenza di purine modificate, e la endonucleasi III, che taglia il DNA in corrispondenza di pirimidine modificate: in questo modo si possono dosare specificamente le basi danneggiate così come la frequenza dei siti sensibili agli enzimi di riparazione. Tuttavia se le modificazioni delle basi non sono quantitativamente convertite in tagli delle eliche del DNA, questo metodo può portare a sottostimare il tasso di lesioni indotte (Pouget et al., 2000).

## 1.12 Risposte cellulari all'esposizione a fibre di asbesto

Le fibre di asbesto inducono molteplici e complesse risposte cellulari tramite meccanismi di interazione ancora non completamente chiariti, in cui però morfologia e reattività di superficie sembrano avere un ruolo importante.

L'asbesto induce **apoptosi** in cellule mesoteliali ed epiteliali polmonari, alterando sia la via di regolazione intrinseca (mitocondriale), che quella estrinseca (*death receptor pathway*). Il DNA mitocondriale è molto più sensibile allo stress ossidativo rispetto al DNA nucleare e questo può contribuire all'effetto di alterazione dell'espressione dei geni mitocondriali da parte delle fibre di asbesto. Le fibre di asbesto inoltre inducono il rilascio del citocromo C dai mitocondri al citoplasma, con la conseguente attivazione della caspasi 9 che porta all'apoptosi o all'arresto della crescita. La via "estrinseca" di induzione dell'apoptosi inizia allorché due citochine (TNF- $\alpha$  e FasL) si legano ai rispettivi recettori, attivando una cascata di segnali in cui sono coinvolte le caspasi. Diversi lavori riportano l'aumento dell'espressione di TNF- $\alpha$  e FasL o dei rispettivi

recettori dopo esposizione ad asbesto. Inoltre è stata dimostrata l'induzione del rilascio di TNF- $\alpha$  da parte di macrofagi alveolari dopo la fagocitosi di fibre, in cui sono coinvolte ROS derivate dal ferro presente sulle fibre (Upadhyay and Kamp, 2003). La formazione di una neoplasia o la progressione tumorale sono generalmente associate con la deregolazione della proliferazione cellulare e la soppressione dell'apoptosi. Infatti il danneggiamento del DNA induce l'attivazione di meccanismi apoptotici. Tuttavia diverse osservazioni indicano che l'apoptosi va considerata come un processo che contribuisce alle fasi iniziali della carcinogenesi. Infatti, nello stesso sito in cui è indotta l'apoptosi, possono avvenire fenomeni di proliferazione compensatoria di cellule che non sono destinate all'apoptosi, che potrebbe dare origine all'espansione clonale di cellule quiescenti trasformate, oppure di cellule che presentano danni al DNA a livelli sub-letali (Albrecht et al., 2004). L'apoptosi è un meccanismo di morte cellulare "programmata" che in condizioni fisiologiche impedisce la proliferazione di cellule,

L'asbesto altera la **regolazione dei segnali intracellulari** portando all'attivazione di fattori di trascrizione e all'alterazione dell'espressione genica. Agenti in grado di indurre un danno al DNA, quali l'asbesto e le ROS, possono stimolare le vie di trasduzione che coinvolgono le tirosin-chinasi (TK), la proteina chinasi C (PKC) e i membri della famiglia delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Questa famiglia di proteine include chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK1 e ERK2), chinasi della porzione N-terminale di *c-jun* (JNK) o chinasi attivate da stress (SAPK) e il fattore p38. Tali proteine attivano a cascata fattori di trascrizione quali AP-1 e NF $\kappa$ B che regolano l'apoptosi, la proliferazione e la risposta infiammatoria. (Upadhyay and Kamp, 2003).

Inoltre l'asbesto influisce sulla regolazione del **ciclo cellulare**. I danni al DNA causano il rallentamento in G1 in modo che il danno sia riparato prima della sintesi, o il blocco del ciclo cellulare in G2 onde evitare la duplicazione di DNA alterato. La famiglia di proteine p53 ha un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare in grado di bloccare la transizione G1/S attraverso un meccanismo p-21-dipendente. Se la modificazione del DNA è grave, p53 induce l'attivazione del fattore pro-apoptotico Bax. Diversi gruppi hanno riscontrato una relazione tra l'esposizione ad asbesto e la mutazione di p53, ad esempio in pazienti affetti da asbestosi. Il ruolo di p21 è meno chiaro, ma sembra anch'esso coinvolto nelle risposte cellulari all'asbesto (Upadhyay and Kamp, 2003).

Le fibre sono una fonte di stress ossidativo per le cellule, le quali attivano una serie di **sistemi di difesa**. Ad esempio cellule mesoteliali esposte *in vitro* a crocidolite attivano la proteina AP-endonucleasi 1 (APE-1) che è l'enzima più importante nei meccanismi di riparo del DNA attraverso la rimozione di basi (BER: base excision repair). APE-1 media anche il legame di fattori di trascrizione al DNA, quindi la sua attivazione a seguito di uno stress ossidativo determina un effetto di regolazione dell'espressione genica (Upadhyay and Kamp, 2003). Nella riparazione del DNA per rimozione di basi, le basi danneggiate vengono eliminate dalle DNA glicosilasi, le eliche di DNA sono tagliate in corrispondenza dei siti abasici formati dall'AP-endonucleasi, poi si ha la rimozione del desossiribosio fosfato, la sintesi del DNA ed infine ligasi. Il processo di unione delle estremità tagliate dell'elica è facilitato da PARP (poli-(ADP-ribosio)-polimerasi), che fornisce protezione alla molecola durante i primi stadi del processo di riparazione. Un eccesso nell'attivazione di PARP causa una deplezione delle risorse intracellulari di NAD<sup>+</sup> e ATP, e può portare all'apoptosi: si pensa che questo sia un meccanismo di eliminazione delle cellule che hanno subito danni irreparabili al DNA (Wiseman and Halliwell, 1996). L'inibizione di PARP in cellule mesoteliali pleuriche e epiteliali polmonari esposte a crocidolite favorisce la vitalità cellulare e la trasformazione in fenotipi maligni (Ollikainen et al., 2000).

L'esposizione a fibre di asbesto induce anche l'attivazione delle difese antiossidanti costituite da tre principali famiglie di enzimi: superossidodismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPx) e catalasi (CAT). Le SOD convertono l'anione superossido in perossido di idrogeno secondo la reazione (10), proteggendo i tessuti, ed in particolare quelli polmonari, da tensioni di ossigeno troppo elevate. Le cellule eucariote contengono tre tipi di SOD: la Mn-SOD mitocondriale, la Cu/Zn-SOD citoplasmatica e la (EC)SOD extracellulare. La CAT e la GPx sono enzimi in grado di convertire il perossido di idrogeno in acqua, secondo le reazioni (12) per la CAT e (13) per la GPx (in cui GSH e GSSG sono rispettivamente la forma ridotta e ossidata del glutatione).



Tali enzimi sono attivati in seguito a cambiamenti nello stato redox della cellula, e da parte di citochine infiammatorie quali TNF- $\alpha$  e interleuchine. Anche l'asbesto induce l'attività degli enzimi antiossidanti, e tra essi la Mn-SOD ha un ruolo principale. L'espressione della Mn-SOD è indotta sia da fibre di crisotilo che di crocidolite in fibroblasti polmonari umani. Una variante non fibrosa della crocidolite (riebeckite) non ha lo stesso effetto e inoltre l'induzione di tali enzimi dipende dal tipo cellulare. Gli effetti delle fibre di asbesto sugli altri enzimi antiossidanti sono meno intensi rispetto a quelli riscontrati per la MnSOD (Kinnula, 1999).

L'esposizione di cellule epiteliali polmonari a fibre di crocidolite causa l'inibizione della via dei pentoso-fosfati, attraverso la quale la cellula rigenera il NADPH, che costituisce la fonte di riducenti equivalenti necessari in molte vie di detossificazione dei ROS, tra cui le CAT. Inoltre il NADPH è fondamentale per il ripristino del pool intracellulare di GSH da cui dipende l'attività delle GPx. In questo modo la cellula risulta più sensibile allo stress ossidativo imposto dalle fibre (Riganti et al., 2002).

I meccanismi attraverso cui le fibre di asbesto inducono le risposte cellulari descritte non sono stati ancora completamente chiariti, ma numerosi studi hanno sottolineato il ruolo delle specie radicaliche generate dalle fibre e dell'interazione fisica fibre/cellule.

L'esposizione di cellule a fibre di asbesto in presenza di molecole in grado di reagire con i radicali bloccandoli indica che l'induzione di vie di trasduzione intracellulare è mediata dal rilascio di ROS, e quindi è dovuta alla proprietà di superficie delle fibre. L'attivazione di AP-1 e NF $\kappa$ B da parte di fibre di crocidolite in fibroblasti polmonari di ratto può essere ridotta trattando le cellule con vitamina E ( $\alpha$ -tocoferolo), e questo indica che reazioni di lipoperossidazione indotte da ROS sono co-responsabili degli effetti dell'asbesto (Shukla et al., 2003). Il coinvolgimento del perossido di idrogeno, generato dal ferro contenuto nelle fibre o in seguito alla reazione infiammatoria, è stato dimostrato utilizzando la catalasi come agente "bloccante". L'asbesto attiva ERK in cellule mesoteliali pleuriche di ratto e induce l'apoptosi, ma in presenza di un chelante del ferro o di enzimi antiossidanti, ciò non avviene, sostenendo la centralità delle ROS in tali meccanismi (Upadhyay and Kamp, 2003).

Non è chiaro se anche le RNS siano in grado di indurre l'attivazione di segnali intracellulari. Ad esempio il radicale NO $\cdot$  induce l'espressione di c-fos e c-jun (che attivano AP-1), ma l'anione perossinitrito non ha lo stesso effetto (Albrecht et al., 2004).

I recettori di membrana sono un possibile bersaglio dell'interazione tra cellule e particolato solido, così come dell'azione di ROS e RNS. In particolare il recettore del fattore di crescita epidermico (EGF-R) potrebbe avere un ruolo importante in quanto è genericamente coinvolto nell'attivazione delle MAPK. È stato infatti dimostrato che l'asbesto induce l'attivazione (per autofosforilazione) dell'EGF-R, che a sua volta attiva la via di trasduzione via ERK1/2 e AP-1 associata all'apoptosi. Esperimenti di colocalizzazione con fibre di asbesto ed anticorpi specifici anti-EGF-R hanno mostrato che cellule che vengono a contatto con fibre lunghe presentano un aumento di EGF-R e l'attivazione di vie di trasduzione via MAPK e AP-1.

Infatti fibre corte macinate non hanno lo stesso effetto. In questo caso l'interazione fisica cellula-fibra sembra essere la causa principale dell'induzione della risposta cellulare (Albrecht et al., 2004).

Questo dato è stato confermato da altri studi, che hanno evidenziato anche un ruolo delle proteine della matrice extracellulare (ECM) e delle integrine nel mediare l'attivazione dei segnali intracellulari. Il trattamento di cellule epiteliali polmonari con fibre di asbesto induce un aumento del rilascio della citochina pro-infiammatoria IL-8, ulteriormente aumentato in presenza di fibronectina, e al contrario inibito in presenza di peptidi in grado di bloccare i siti di legame delle integrine. Le proteine della ECM sono legate alle integrine via interazione proteina-proteina, quindi una modificazione delle prime, indotta da reazioni fisiche o chimiche con le fibre, viene recepita dalle seconde, con la conseguente alterazione dei segnali intracellulari. Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che, durante la cancerogenesi del mesotelioma indotto da fibre di asbesto, si ha un aumento dell'espressione di tre geni regolati da vie di trasduzione dipendenti dalle integrine, di cui uno coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare. (Albrecht et al., 2004). Infine esistono alcuni studi che dimostrano l'importanza della fagocitosi nell'induzione di segnali intracellulari (Churg, 1996; Albrecht et al., 2004).

La capacità delle fibre di asbesto di stimolare molteplici vie di segnalazione intracellulare suggerisce il coinvolgimento di una miriade di fattori di trascrizione e l'interazione tra essi nella regolazione dell'espressione genica. Uno schema che riassume i fattori di induzione e le risposte cellulari è presentato in figura 1.11.

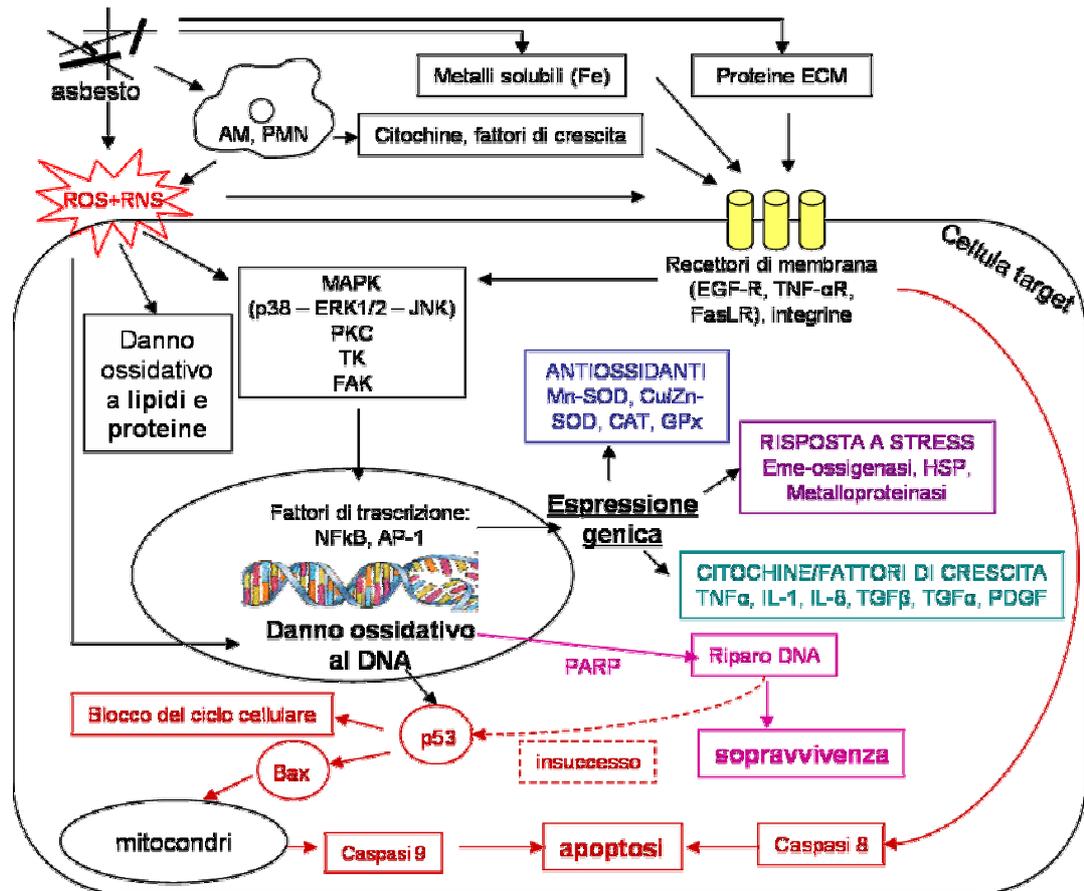


Figura 1.11: Possibili vie di segnalazione intracellulare attivate da fibre di asbesto./ Possible signalling pathways induced by asbestos fibres. AM: alveolar macrophage, PMN: neutrophil, EGF-R: epidermal growth factor-receptor, TNF- αR: tumor necrosis factor-α- receptor, FasLR: Fas ligand-receptor, MAPK: mitogen activated protein kinase, ERK: extracellular regulated kinase, JNK: c-jun-NH<sub>2</sub>-protein kinase, PKC: protein kinase C, TK: tyrosine kinase: FAK: focal adhesion kinase, NFκB: nuclear factor kappa-B, AP-1: activated protein-1, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase, HSP: heat shock protein, IL: interleukin, TGF: transforming growth factor, PDGF: platelet derived growth factor, PARP: poly(ADP-ribose) polymerase. (Modificato da Albrecht et al., 2004)

### 1.13 La bonifica dell'amianto

Le conoscenze attuali rispetto alle cause e ai meccanismi della tossicità dell'asbesto, indicano che la morfologia, la struttura e la composizione chimica sono fattori determinanti. (v. par. 1.8-1.11).

Le tecniche di bonifica fino ad oggi utilizzate, hanno come obiettivo la riduzione del rischio di inalazione delle fibre tramite la rimozione o tramite tecniche di isolamento del minerale dall'ambiente esterno. Si tratta di metodologie elaborate per i casi di presenza di amianto negli edifici, ad esempio tetti, pareti, controsoffitti, tubature.

L'*incapsulamento* consiste nel trattamento dell'amianto con prodotti penetranti o ricoprenti che (secondo il tipo di prodotto usato) tendono ad inglobare le fibre di amianto, a ripristinare l'aderenza al supporto e a costituire una pellicola di protezione sulla superficie esposta. L'incapsulamento non richiede la successiva applicazione di un prodotto sostitutivo e non produce rifiuti tossici. Il *confinamento* consiste nell'installazione di una barriera a tenuta impermeabile che separi l'amianto dalle aree occupate dell'edificio. Se non viene associato ad un trattamento incapsulante, il rilascio di fibre continua all'interno del sconfinamento (D'Orsi et al., 1995).

La *rimozione* è il procedimento di bonifica più diffuso perché elimina ogni potenziale fonte di esposizione e ogni necessità di attuare specifiche cautele per le attività che si svolgono nell'edificio. Comporta un rischio estremamente elevato per i lavoratori addetti e per la contaminazione dell'ambiente, in quanto produce notevoli quantitativi di rifiuti tossici e nocivi che devono essere correttamente smaltiti. È la procedura che comporta i costi più elevati e i più lunghi tempi di realizzazione. Un intervento di rimozione condotto impropriamente può incrementare la concentrazione di fibre aerodisperse aumentando, invece di ridurre, il rischio di patologie da amianto (D'Orsi et al., 1995). Qualora rimosso da un edificio o da un suolo contaminato, rimane la necessità di inattivare l'amianto, la cui pericolosità risiede, come descritto precedentemente, nella morfologia fibrosa della struttura cristallina che ne determina la persistenza, e nella struttura chimica di superficie che ne determina la reattività. Le varie metodologie di inattivazione proposte mirano ad una completa trasformazione del materiale che ne modifichi struttura cristallina e composizione chimica. Questo si può ottenere mediante reazioni allo stato solido, con una distruzione chimica del materiale con reattivi specifici come l'acido fluoridrico o mediante trattamenti termici a temperature elevatissime: sono entrambi trattamenti di difficile attuazione e molto costosi. D'altronde la rimozione dell'asbesto in mancanza di una completa trasformazione comporta il conferimento alla discarica e quindi la contaminazione di un sito diverso. Tale processo comporta inevitabilmente una certa dispersione delle fibre nell'ambiente circostante, per cui l'opportunità di rimuovere l'amianto in opera, se in buone condizioni, è stata ed è tuttora argomento di un acceso dibattito (Fubini, 2000a). Attualmente non si hanno informazioni su come la prolungata esposizione all'aria modifichi la patogenicità delle fibre. È possibile che la tossicità si attenui nel tempo e che la rimozione delle fibre, che mette a nudo superfici "fresche", le riattivi (Fubini, 2000a).

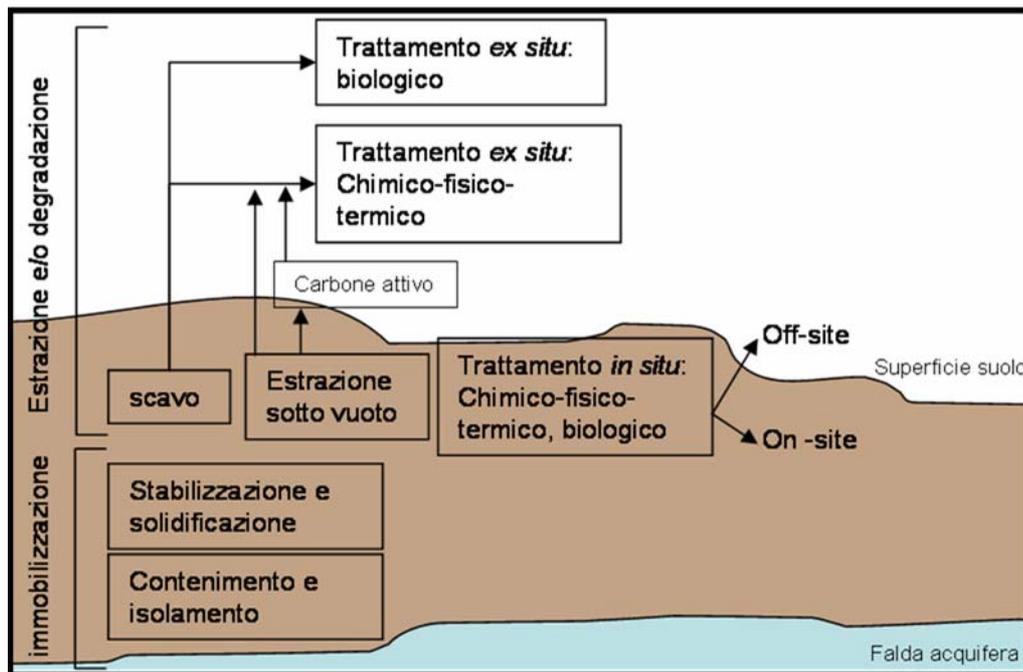
### 1.14 Le metodologie per il ripristino ambientale.

Gli interventi di bonifica descritti riguardano ambienti circoscritti, come edifici e mezzi di trasporto in cui è stato utilizzato il cemento-amianto o coibenti a base di asbesto. Tuttavia, l'amianto costituisce un problema ambientale legato non solo allo smantellamento di manufatti o strutture edilizie in opera, ma anche all'esistenza di aree di affioramento di rocce contenenti tale minerale, di aree estrattive o di lavorazione e ai rischi ad esse connessi di esposizione ambientale della popolazione. Il risanamento dell'asbesto nel suolo pone particolari problemi di bonifica a causa delle ampie superfici coinvolte e della maggiore dispersione delle fibre. Inoltre,

trattandosi di aree aperte, è importante che qualsiasi tecnica utilizzata abbia un basso impatto ambientale in termini di effetti sulla qualità dell'ambiente circostante (acque, aria, flora, fauna) e di effetti sulla salute dell'uomo e degli animali. Per esempio, non sarebbe possibile trasferire i suoli contaminati per bonificarli con trattamenti chimici o termici, come si fa nel caso dei manufatti, sia a causa delle enormi masse di suolo, sia a causa del rischio correlato proprio alla movimentazione dei minerali e alla dispersione delle fibre.

Le tecniche di ripristino ambientale dei suoli contaminati possono avere come obiettivo la messa in sicurezza permanente oppure la bonifica del sito, ossia l'eliminazione mediante estrazione e separazione del contaminante (Fig. 1.12).

Figura 1.12 - Metodiche possibili per il ripristino di siti contaminati / Possible approaches for remediation of contaminated sites.



La prima viene definita come l'insieme degli interventi atti a immobilizzare o isolare in modo definitivo le fonti inquinanti rispetto alle matrici ambientali circostanti (il suolo, le falde e l'aria). E' applicata solo quando non è possibile procedere alla rimozione degli stessi pur applicando le migliori tecnologie disponibili a costi sopportabili. Tale metodologia è spesso utilizzata per il trattamento di siti contenenti inquinanti inorganici, quali ad esempio i metalli pesanti.

La seconda strategia viene invece definita come l'insieme degli interventi atti a ridurre le concentrazioni delle sostanze inquinanti nel suolo ai valori limite di concentrazione stabiliti dalla legge ed accettabili per la destinazione d'uso prevista. A questo scopo il contaminante viene degradato, mobilizzato, estratto e smaltito altrove. La scelta della tecnologia più idonea è l'elemento più importante per la riuscita dell'intervento in termini sia di efficacia nella riduzione di concentrazione che di costi, ma è limitata dall'applicabilità alle diverse e specifiche situazioni ambientali.

Il programma di recupero di un sito prevede la caratterizzazione preliminare del sito contaminato. Il suolo è un sistema complesso, costituito da tre fasi, gassosa, liquida e solida,

anche se la componente vivente e il suo microambiente (per esempio i *biofilm*) può essere considerata una quarta fase. La contaminazione del suolo può essere costituita da una complessa miscela di più contaminanti, che possono interagire secondo infinite modalità con le componenti del suolo. Inoltre non esiste uno stato di equilibrio nel suolo, in quanto esso cambia continuamente, modificando anche il destino e gli effetti dei contaminanti. In una situazione così difficile da definire, per ottenere una visione completa e realistica delle caratteristiche del suolo e del rischio legato al contaminante, è necessario un approccio integrato, basato su diversi tipi di analisi:

- Analisi *chimico-fisiche* del suolo (tra cui pH, temperatura, potenziale redox, ossigeno disciolto, conduttività, CO<sub>2</sub> disciolta, dimensioni e densità delle particelle, omogeneità, permeabilità) e del contaminante (natura chimica, concentrazione, tipo di interazione con la fase solida, mobilità).
- Analisi *biologiche ed ecologiche*. Il tipo di caratterizzazione più frequente è lo studio delle densità e diversità di popolazione microbica e vegetale, seguita dalla caratterizzazione fisiologica delle singole specie o di una comunità.
- Analisi di *ecotossicità*, che si basano sulla valutazione, con test specifici, della tossicità, mutagenicità, cancerogenicità, teratogenicità, del bioaccumulo su diversi organismi modello. (Gruiz, 2005)

Effettuate queste valutazioni si procede alla progettazione di un intervento utilizzando la tecnica più idonea.

I trattamenti di bonifica si distinguono in: trattamenti *in situ* ed *ex situ*. I primi, cioè quelli che impiegano tecnologie che non richiedono la rimozione del terreno inquinato, sono meno costosi perché non prevedono le attività di scavo e di trasporto ma sono più difficili da controllare e da valutare in termini di prestazioni raggiunte e richiedono inoltre tempi più lunghi di trattamento. In circostanze di contaminazione al di sotto di strutture esistenti o al di sotto della linea di falda la scelta di intervenire *in situ* è peraltro obbligata. Nei trattamenti *ex situ*, il materiale inquinato viene rimosso e quindi decontaminato; l'intervento può essere eseguito *off site* o *on site* cioè al di fuori o all'interno dell'area da bonificare. In questo caso i trattamenti richiedono tempi di esecuzione più brevi in quanto più controllabili, poiché è più facile intervenire sui parametri del processo e ottimizzarli. Le attività di rimozione, stoccaggio e trasporto del materiale causano però un aumento dei costi del processo nonché eventuali problemi di sicurezza, per l'ambiente e per il personale addetto, a cui è necessario porre rimedio.

Attualmente esistono diverse tipologie di trattamento di bonifica, alcune ormai consolidate altre ancora in via di sviluppo, individuabili in tre gruppi principali: trattamenti termici, trattamenti chimico-fisici e trattamenti biologici.

#### 1.14.1 Trattamenti termici

I trattamenti termici offrono un ripristino rapido del sito contaminato, ma sono anche i più costosi, soprattutto se condotti *in situ*, a causa delle attrezzature e dell'energia necessaria a scaldare l'area di interesse.

Il calore permette di indurre il desorbimento e aumentare la volatilità del contaminante, che viene quindi separato dal suolo, oppure di bruciarlo, decomporlo o farlo esplodere per distruggerlo in modo definitivo. In questo secondo caso le temperature di esercizio si aggirano intorno ai 1500-2000°C, e garantiscono l'eliminazione di tutti i composti organici, ma causano la vetrificazione del suolo, che immobilizza le sostanze inorganiche e distrugge quelle organiche. I processi di desorbimento termico si svolgono a temperature inferiori (90-650°C), hanno una minore efficienza di eliminazione dei composti organici, ma permettono il riutilizzo

del suolo ripristinato e richiedono costi minori. (U.S. EPA 1990, 1991, <http://www.frtr.gov/index.htm>).

#### 1.14.2 Trattamenti chimico-fisici

Tali tecniche sfruttano le proprietà chimico-fisiche dei contaminanti o del mezzo contaminato per distruggere (ad esempio convertendo chimicamente i composti contaminanti in altri prodotti), separare o limitare la dispersione della contaminazione. Ad esempio l'ossidoriduzione chimica e la dealogenazione sono tecniche di distruzione, il lavaggio del suolo l'estrazione in vapore dal suolo e l'estrazione con solventi sono tecniche di separazione, mentre la solidificazione/stabilizzazione è una tecnica di immobilizzazione (<http://www.frtr.gov/index.htm>).

Alcuni esempi sono:

- La *ventilazione del suolo* (Soil Venting, SV) permette la decontaminazione della matrice solida sfruttando due proprietà fondamentali dei contaminanti: la volatilità e la biodegradabilità. E' una tecnica *in situ* rapida, relativamente economica e applicabile con efficacia al trattamento di terreni insaturi contaminati da composti altamente volatili (diclorometano, benzene, toluene, sostanze organiche volatili) e sostanze inquinanti non miscibili in acqua (NAPL). L'obiettivo può essere ottenuto attraverso sia l'iniezione che l'aspirazione (Soil Vapor Extraction, SVE) di aria dal suolo (U.S. EPA, 2002). L'aria estratta deve poi essere necessariamente avviata a una linea di trattamento.
- Il trattamento del terreno per *elutriazione* è una tecnologia *ex situ* che si basa su principi fisici per allontanare i contaminanti, sia organici che inorganici mediante una separazione dimensionale delle particelle. Sfruttando differenze di granulometria, gravità specifica, velocità di sedimentazione, proprietà chimiche superficiali, ecc. è possibile isolare o liberare le particelle di terreno contaminate da quelle non contaminate. Il lavaggio del terreno, quando utilizzato come tecnologia *in situ*, prevede l'estrazione dei contaminati che avviene per immissione di un fluido acquoso in una serie di pozzi ubicati a monte dell'area contaminata ed estratto a valle di essa, per essere poi adeguatamente trattato. Si utilizza come fluido estraente per lo più acqua, ricorrendo all'aggiunta di additivi chimici per migliorare eventualmente l'efficacia del trattamento. Tra i fluidi estraenti più utilizzati ci sono: acqua calda o fredda, acqua con tensioattivi, soluzioni acide o alcaline, agenti complessanti e solventi organici. Il trattamento dei terreni con tensioattivi (ancora in fase sperimentale) richiede un'attenta indagine preliminare per individuare il tensioattivo più indicato per la situazione in esame (Fava et al., 2002) ma può dare efficienze di rimozione confrontabili ad altre tecniche più consolidate. Le prestazioni del processo dipendono da molti fattori: tempo di contatto tra la soluzione dilavante e la zona contaminata, adeguatezza del fluido estraente utilizzato, umidità del terreno, contenuto organico, tessitura e permeabilità del terreno. La massima attenzione va anche posta nella valutazione preventiva delle reazioni possibili tra contaminanti diversi e agente estraente, al fine di evitare la formazione di composti ancora più dannosi per l'ambiente di quelli originari.
- La *decontaminazione elettrocinetica* è un processo innovativo che consiste nell'applicare una corrente elettrica ad un terreno contaminato caratterizzato da bassa permeabilità all'acqua (U.S. EPA, 1991; Fava, 1999). Attualmente è stato applicato con successo, anche con costi contenuti, sia all'estrazione di contaminanti inorganici (zinco, cadmio, cesio, piombo, rame, uranio) che organici (toluene, benzene, etilene, xilene, tricloroetilene, acido acetico, fenolo). Il processo consiste nell'applicare, grazie a

elettrodi infissi nel terreno, una corrente continua; in questo modo gli ioni positivi disciolti nella fase acquosa migrano, assieme alle molecole d'acqua, verso il catodo. Anodo e catodo sono integrati in speciali sistemi di circolazione all'interno dei quali si trova acqua eventualmente con additivi. L'importanza del sistema di circolazione è quello di fungere da mezzo di raccolta dei contaminanti che reagiscono agli elettrodi, permettendone l'aspirazione in superficie e quindi l'adeguato trattamento in impianti chimico-fisici esterni.

- Nei *processi di inertiizzazione* con la stabilizzazione/solidificazione in sito (SS) gli inquinanti vengono intrappolati fisicamente dentro una matrice solida (solidificazione) e/o vengono indotte delle reazioni chimiche che riducono la tendenza dei contaminati a lisciviare diminuendone la solubilità, la mobilità e la tossicità. Non è quindi una vera e propria bonifica perché ci si limita a fissare gli inquinanti e non a rimuoverli. I materiali che più si utilizzano per mescolare i contaminanti sono: argilla, carboni attivi, composti sintetici, monomeri organici, cemento e calce.

I trattamenti chimico-fisici sono economicamente vantaggiosi e richiedono tempi brevi (rispetto ai trattamenti biologici). L'attrezzatura necessaria non è molto costosa e non richiede elevato dispendio di energia (US EPA 2000).

### 1.14.3 Trattamenti biologici

I metodi di risanamento dei siti contaminati che si basano sull'impiego di processi biologici prendono il nome di **biorisanamento** (o *bioremediation* con il più utilizzato termine inglese) (Atlas, 1981; Baker, 1994). La *American Academy of Microbiology* definisce la *bioremediation* come "l'utilizzo di organismi viventi per ridurre o eliminare il rischio ambientale derivante dall'accumulo di sostanze chimiche tossiche o di altri residui pericolosi". La rimozione dei contaminanti ambientali tramite una tecnologia di tipo biologico può essere mediata sia da microrganismi (funghi e batteri) sia da piante (fitorisanamento) capaci di svolgere attività degradativa sugli inquinanti, sia da enzimi prodotti da questi stessi organismi (Adriano, 1999).

L'utilizzo di funghi nel ripristino di suoli o acque inquinate è chiamato "*micorisanamento*", o anche trattamento fungino. I funghi più utilizzati a questo scopo sono i funghi "del marciume bianco" in grado di degradare la lignina, in quanto il complesso apparato enzimatico da essi secreto per degradare tale polimero può agire e modificare chimicamente anche altre molecole complesse, in particolare molecole contenenti anelli aromatici (Šašek, 2005).

Il "*fitorisanamento*" è l'uso di piante per rimuovere inquinanti dall'ambiente o renderli innocui, ed è considerata una strategia molto promettente nell'ambito della *bioremediation* (Sacchi et al., 2005).

Durante un processo di degradazione in ambiente naturale, tutti gli organismi presenti possono potenzialmente prendervi parte, indipendentemente l'uno dall'altro o sinergicamente. Contaminanti poco solubili in acqua o che richiedano una fonte di carbonio aggiuntiva per essere trasformati, saranno degradati più rapidamente in presenza di una componente vegetale. Infatti le piante possono contribuire al rimedio di un suolo riducendo la dispersione del contaminante al di fuori del sito, aerando il suolo e rilasciando composti che favoriscano lo sviluppo dei microrganismi indigeni in grado di degradare il composto. Infatti in alcuni casi i microrganismi della rizosfera (definita come zona del suolo attorno alle radici delle piante, contenente microrganismi) sono i principali protagonisti della degradazione di componenti organiche: tale contributo è indicato col termine di "*rizorisanamento*". Le piante promuovono lo sviluppo dei microrganismi tramite il rilascio nella rizosfera di carboidrati, aminoacidi, acidi grassi e altre molecole. Parallelamente esse ne favoriscono le attività degradative. Viceversa, i microrganismi formano associazioni mutualistiche con le piante permettendo loro di crescere in suoli poveri di nutrienti, favorendo l'acquisizione di nutrienti

minerali, come l'azoto e il fosfato, e proteggendole da parassiti e patogeni. Pertanto, in un suolo vegetato, la degradazione di un contaminante è il risultato dell'azione, diretta o indiretta, di un consorzio di organismi differenti (Demnerova et al., 2005)

La tecnica del biorisanamento, o biodegradazione, è emersa come una delle principali tecnologie cui rivolgersi per avere un ambiente più pulito: è stata infatti riconosciuta come metodo non costoso e altamente efficiente per rimuovere i composti chimici tossici dai terreni e dalle acque.

Il principio cardine su cui si basa la *bioremediation* è la capacità dell'agente biologico di utilizzare la sostanza inquinante, mediandone così la mineralizzazione, ossia la conversione in CO<sub>2</sub> e acqua, la trasformazione in un prodotto meno tossico oppure la compartimentazione. Per esempio i funghi, grazie alle loro attività degradative, sono in grado di utilizzare composti organici xenobiotici come fonti di carbonio.

Gli inquinanti inorganici, come i metalli pesanti e i radionuclidi, non vengono biodegradati dai microrganismi, pertanto le tecniche applicabili per il risanamento di siti inquinati da tali composti possono avere come obiettivo l'immobilizzazione del contaminante, la modificazione dello stato chimico per renderlo meno tossico o il trasferimento ad una fase separabile dal suolo. Essi possono essere utilizzati come accettori finali di elettroni al posto dell'ossigeno, oppure possono essere adsorbiti a livello della membrana, o ancora accumulati nel vacuolo.

Nel paragrafo successivo saranno descritti alcuni possibili approcci al risanamento di siti contaminati da composti inorganici.

#### *Le tecniche di biorisanamento*

L'utilizzo dei microrganismi nei processi di risanamento ambientale necessita la conoscenza della trasformazione biochimica operata, al fine di verificare se la trasformazione porterà alla formazione di metaboliti a maggiore o minore grado di tossicità.

Per quel che riguarda il suolo, la scelta del metodo di *bioremediation* dipende da fattori quali: le caratteristiche chimico-fisiche del suolo, la biochimica del processo (substrati, intermedi e prodotti di reazione) e la biodisponibilità del contaminante. Inoltre nel suolo il movimento e l'eventuale trasformazione delle sostanze organiche sono determinati da processi chimici, fisici e biologici; tali processi sono fortemente influenzati dalle caratteristiche chimiche, chimico-fisiche, mineralogiche e biologiche del suolo.

La messa a punto di un'efficace strategia di *bioremediation* richiede conoscenze specifiche riguardanti sia i microrganismi (microrganismi presenti nell'ambiente inquinato; le loro capacità metaboliche; la loro risposta al variare delle condizioni ambientali) che la biodisponibilità del contaminante (cioè la disponibilità a subire una trasformazione di tipo biologico). Inoltre occorre considerare la *bioattività*, cioè l'efficacia del processo biologico messo in atto dal microrganismo decontaminante, e studiarne le condizioni di attività ottimali. In alcuni casi la bioattività può essere migliorata, ad esempio, selezionando *in vitro* microrganismi esogeni o endogeni con le caratteristiche metaboliche di interesse ed inoculandoli nel terreno insieme ai microrganismi già presenti (*bioaugmentation*). Talvolta possono essere attuati trattamenti chimico-fisici del suolo con la finalità di favorire la crescita dei microrganismi, ad esempio modificando il pH o migliorando l'ossigenazione del terreno: questo sistema viene chiamato *biostimolazione* (Agathos, 2005).

Negli ultimi anni un notevole contributo agli studi di microbiologia ambientale è derivato dai grandi progressi delle tecniche biomolecolari. (Lovley, 2003). Esse offrono notevoli vantaggi rispetto alle tradizionali tecniche microbiologiche di isolamento e identificazione, fornendo informazioni qualitative e quantitative sulla comunità microbica di un suolo, compresa anche la frazione di microrganismi non coltivabili *in vitro*. Tali tecniche hanno consentito di ottenere la sequenza dell'intero genoma per un numero sempre crescente di

microrganismi, permettendo inoltre sempre più sofisticate analisi dell'espressione e della funzione genica, anche di popolazioni complesse (Daffonchio, 2005).

#### *Approcci al risanamento di aree inquinate da composti inorganici*

Circa due terzi dei suoli sono contaminati da metalli pesanti e metalloidi o da metalli e composti organici. I metalli pesanti che più frequentemente si rinvergono in ambiente sono: alluminio, antimonio, arsenico, bario, berillio, cadmio, cromo, rame, manganese, mercurio, nickel, piombo, selenio, tallio. Rispetto agli inquinanti organici, hanno come caratteristiche quella di non poter essere distrutti e di bioaccumularsi (nei tessuti biologici degli animali e dell'uomo); inoltre, essendo in genere sotto forma di ioni e quindi più solubili, risultano mobili nell'ambiente.

Un possibile approccio per affrontare questo problema è l'aggiunta al suolo di additivi con lo scopo di immobilizzare i metalli in modo che essi non vengano dilavati nelle falde o assorbiti dalle piante. Questo processo può essere combinato con la crescita di piante metallo-tolleranti in modo da evitare l'ulteriore dispersione di metalli a causa del trasporto delle polveri dovuto al vento.

Un altro metodo sfrutta i processi di attenuazione naturale in cui i metalli sono immobilizzati attraverso processi naturali di tipo chimico, fisico (scambio ionico, precipitazione, adsorbimento) o biologico. Per esempio i metalli possono essere complessati dai gruppi carbossilici o fenolici degli acidi umici oppure essere assorbiti dalle piante. I batteri solfato riduttori (*SRB*, *sulfate reducing bacteria*) sono in grado di accoppiare l'ossidazione di composti organici o  $H_2$  molecolare con la riduzione di solfato, che fa da accettore esterno di elettroni, in condizioni aerobiche, secondo un processo detto "riduzione dissimilativa del solfato". Il prodotto finale di tale reazione è l'acido solfidrico, che sequestra i metalli pesanti sotto forma di precipitati stabili solfato-metallo. La bioprecipitazione di metalli *in situ* (*ISMP in situ metal bioprecipitation*) è un processo in cui i SBR sono stimolati tramite l'aggiunta nel suolo contaminato di donatori di elettroni quali molasse, lattato, etanolo o altre fonti di carbonio. In questo caso si parla di *enhanced natural attenuation*, ossia di processi di attenuazione naturale stimolati dall'intervento umano.

Un approccio economicamente vantaggioso può essere il fitorisanamento, che comprende differenti processi, tra cui la fitoestrazione e la fitostabilizzazione.

Nel caso della fitoestrazione, piante dette "iperaccumulatrici" estraggono i metalli pesanti da suolo e li accumulano in elevate quantità nelle radici o nel fusto. Il successo di questo metodo dipende dalla biodisponibilità del metallo nel suolo, dalla efficienza di estrazione della pianta e dalla capacità di accumulare metalli, che è tanto maggiore quanto più abbondante è la biomassa. La fitoestrazione può essere stimolata con l'aggiunta di molecole chelanti dei metalli quali acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA), nitriloacetato (NTA) e acido citrico. Alcune specie della famiglia delle angiosperme, per esempio *Thlaspi caerulescens*, sono iperaccumulatori naturali, ma presentano una crescita lenta e una ridotta biomassa.

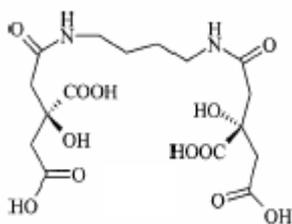
Nel caso della fitostabilizzazione le piante vengono utilizzate per ricoprire il suolo e prevenirne l'erosione, che comporterebbe la dispersione di polveri o particelle da parte del vento o dell'acqua. Per aumentare l'efficacia di questo metodo, esso è talvolta accompagnato dall'utilizzo di additivi per immobilizzare i metalli nel suolo, come compost, argille o idrossiapatite. La diminuzione della mobilità e della biodisponibilità dei metalli, favorisce lo sviluppo e la sopravvivenza delle piante in suoli contaminati (Diels et al., 2005).

### 1.15 Suoli naturalmente ricchi o contaminati da asbesto: ipotesi di una strategia di biorisanamento.

La presenza di minerali asbestiformi in forma non compatta, principalmente a causa dell'intervento umano (es. in aree di estrazione amiantifera) costituisce un importante fattore di rischio per la salute. In questi casi l'asbesto non può essere rimosso, e attualmente non esistono sistemi di inattivazione *in situ*. Una strategia di risanamento dovrebbe avere come obiettivo la modificazione delle caratteristiche che determinano la tossicità dell'asbesto, quali l'abito fibroso, la struttura cristallina che ne determina la biopersistenza e il contenuto di ioni ferro. Infatti, come descritto con maggiori dettagli al par. 1.6, gli asbesti sono silicati la cui struttura cristallina contiene Fe, Mg, Na, Al ed altri cationi in percentuali variabili a seconda del tipo di asbesto. La solubilità di questi minerali è molto bassa, ma si è visto che il trattamento con chelanti *in vitro* è efficace nel sottrarre ferro dalla struttura di superficie, e se prolungato, dagli strati subsuperficiali (Prandi, 2002). L'estrazione del ferro potrebbe essere particolarmente importante proprio perché questo ione metallico è stato identificato come uno dei fattori responsabili della tossicità delle fibre, in quanto catalizzatore di alcune reazioni chimiche dannose all'interfaccia tra fibra ed ambiente esterno, in particolare nei fluidi biologici qualora la fibra venga inalata. Il trattamento con chelanti infatti risulta inibire la reattività di superficie delle fibre (paragrafo 1.10.2).

I microrganismi del suolo sono in grado di interagire con i metalli modificandone la forma chimica e la solubilità (Gadd, 1993; Gadd, 2000b). Le interazioni microrganismi/metalli sono già ampiamente utilizzate nel biorisanamento di siti inquinati da metalli pesanti (Watanabe, 2001) e nella bioidrometallurgia allo scopo di estrarre metalli con un elevato valore economico quale rame, oro, zinco, uranio, nickel (Jain and Sharma, 2004).

I metalli pesanti, come tutti gli elementi, non sono biodegradabili e possono solo subire trasformazioni da una forma chimica ad un'altra. I microrganismi svolgono un ruolo importante nel destino ambientale dei metalli tossici e dei radionuclidi, con una molteplicità di meccanismi che attuano trasformazioni fra le forme solubili ed insolubili. L'impatto dei microrganismi sullo stato chimico e quindi sulla mobilità di un metallo è complesso, e va da processi di tipo diretto come la trasformazione del metallo e l'accumulo intracellulare, ad un'azione di tipo più indiretto tramite la produzione di composti che rendono il metallo più o meno mobile attraverso la formazione di forme coniugate (Kurek et al., 1991). I meccanismi adottati sono numerosi e comprendono: precipitazione extracellulare, formazione di complessi, la cristallizzazione, trasformazioni quali ossidazione, riduzione, metilazione e dealchilazione, bioadsorbimento sulla parete cellulare o compartimentazione intracellulare (Gadd, 1993; Gadd, 2000b).



**Figura 1.13 - Rizoferrina**, un chelante del ferro derivato dal citrato / **Rhizoferrin**, an iron chelator synthesized from citrate

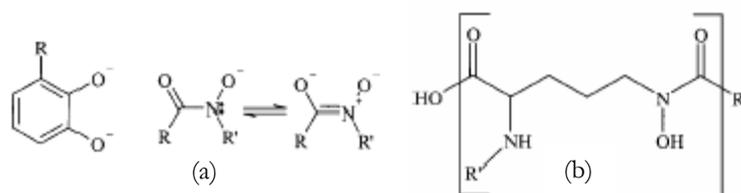
I meccanismi di interazione tra funghi del suolo e minerali sono già stati descritti al paragrafo 1.3. Tra essi si può ricordare in particolare la secrezione di acidi organici, che hanno la doppia funzione di acidificare il terreno aumentando la solubilità degli ioni e, in alcuni casi, come il citrato, di chelare gli ioni formando dei complessi. Il citrato rappresenta uno dei più semplici ed efficaci acidi organici che chelano il ferro. Inoltre recenti risultati suggeriscono che, in alcuni generi di funghi in cui gli idrossamati non sono ancora stati individuati, esistano composti più complessi contenenti acido citrico, coinvolti nel metabolismo del ferro. Per esempio, è stato dimostrato che *Rhizopus macrosporus* var. *rhizopodiformis* produce un

composto chelante detto rizoferina (figura 1.13), contenente due residui di citrato uniti da un legame amidico alla 1,4-butandiammina (putrescina) (Drechsel et al., 1991). Entrambi i costituenti sono prodotti comuni nel metabolismo primario dei funghi, e la loro combinazione in una sola molecola appare come una via semplice ed efficace per la sintesi di un chelante. Ulteriori ricerche hanno evidenziato come la capacità di produrre rizoferina non sia specifica di un solo genere fungino, ma sia estesa a diverse famiglie delle *Mucorales* (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998).

L'interazione tra funghi del suolo e ioni ferro è basata su specifici meccanismi di solubilizzazione ed assorbimento, mediati da molecole chelanti aspecifiche, gli acidi organici, e specifiche, i siderofori, che potrebbero essere sfruttati proprio allo scopo di mobilizzare questo ione dalla superficie delle fibre di asbesto. Per questa ragione il seguente paragrafo è dedicato alla descrizione della natura e delle funzioni dei siderofori fungini.

### 1.16 Meccanismi e mediatori dell'interazione funghi/ferro nel suolo

Il ferro è richiesto come nutriente dai funghi in quantità relativamente ridotte, ma svolge funzioni essenziali (Haselwandter, 1995) come donatore e accettore di elettroni nei processi di ossidoriduzione. Il ferro, date le sue proprietà chimiche, è estremamente insolubile (Skoog and West, 1976) e quindi difficile da acquisire per la maggior parte degli organismi viventi. Di norma è presente sotto forma di ione ferrico  $Fe^{3+}$ , insolubilizzato come ossido ferrico  $Fe_2O_3$  o idrossido ferrico  $Fe(OH)_3$  a pH maggiori di 5.5. Infatti, con un prodotto di solubilità di circa  $10^{-38}$  M per  $Fe(OH)_3$ , la massima concentrazione che lo ione ferrico può raggiungere a  $pH=7.4$  è di  $10^{-18}$  M. Tuttavia esistono altre forme di idrossidi di ferro che si aggiungono al ferro biodisponibile, la cui concentrazione totale in assenza di chelanti a  $pH=7.4$  è di  $10^{-10}$  M (Dhungana and Crumbliss, 2005). Nonostante ciò il ferro non è disponibile in quantità sufficienti per gli organismi, a meno che questi non mettano in atto dei sistemi per modificarne la solubilità, quali la variazione del potenziale redox e del pH del suolo, e la chelazione da parte di piccole molecole.



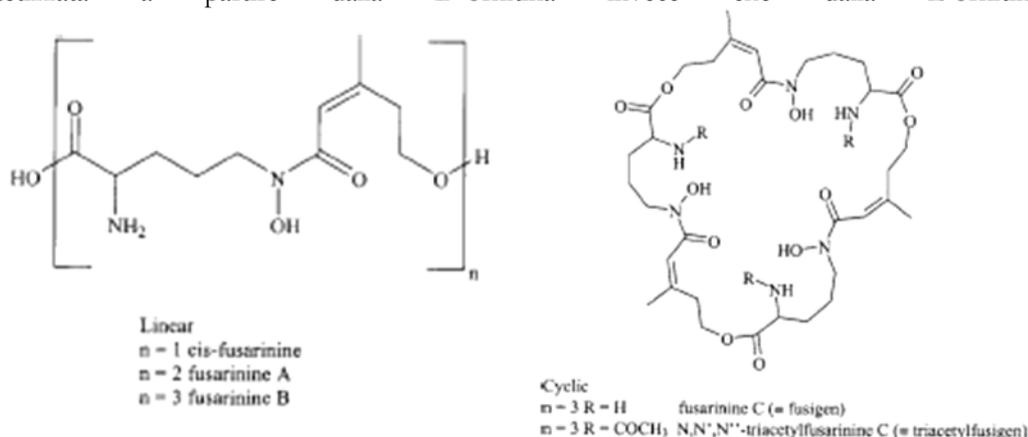
**Figura 1.14:** (a) Gruppi funzionali del catecolato (a sinistra) e dell'idrossamato (a destra). (b) *Nδ*-acil-*Nδ*-idrossioritina / (a) The catecholate (left) and hydroxamate (right) functional groups. (b). *Nδ*-acyl-*Nδ*-hydroxyornithine.

#### 1.16.1 Chelanti specifici del ferro: i siderofori

Tutti i siderofori fungini caratterizzati finora contengono gruppi del tipo idrossamato, mentre gruppi funzionali del tipo catecolato sono presenti in siderofori di origine batterica. La struttura base dei siderofori fungini è l'*Nδ*-acil-*Nδ*-idrossioritina (figura 1.14a-b). Essi vengono classificati in tre famiglie strutturali: fusarine, coprogeni e ferricromi.

Le fusarine possono essere monomeri, dimeri o trimeri lineari, o trimeri ciclici dell'unità base *Nδ*-acil-*Nδ*-idrossioritina, in cui il gruppo acilico è costituito da acido anidromevalonico (acido 5-idrossi-3-metil-pent-2-enoico, figura 1.15). Monomeri di *cis*- e *trans*-fusarina sono le

unità strutturali di un gran numero di siderofori fungini (Winkelmann, 1990). La neurosporina è l'unica molecola della famiglia dei siderofori fungini del tipo idrossamato che presenti acido 3-idrossi-butirrico come gruppo acilico dell'unità  $N^{\delta}$ -acil- $N^{\delta}$ -idrossioritina e che venga sintetizzata a partire dalla D-ornitina invece che dalla L-ornitina.

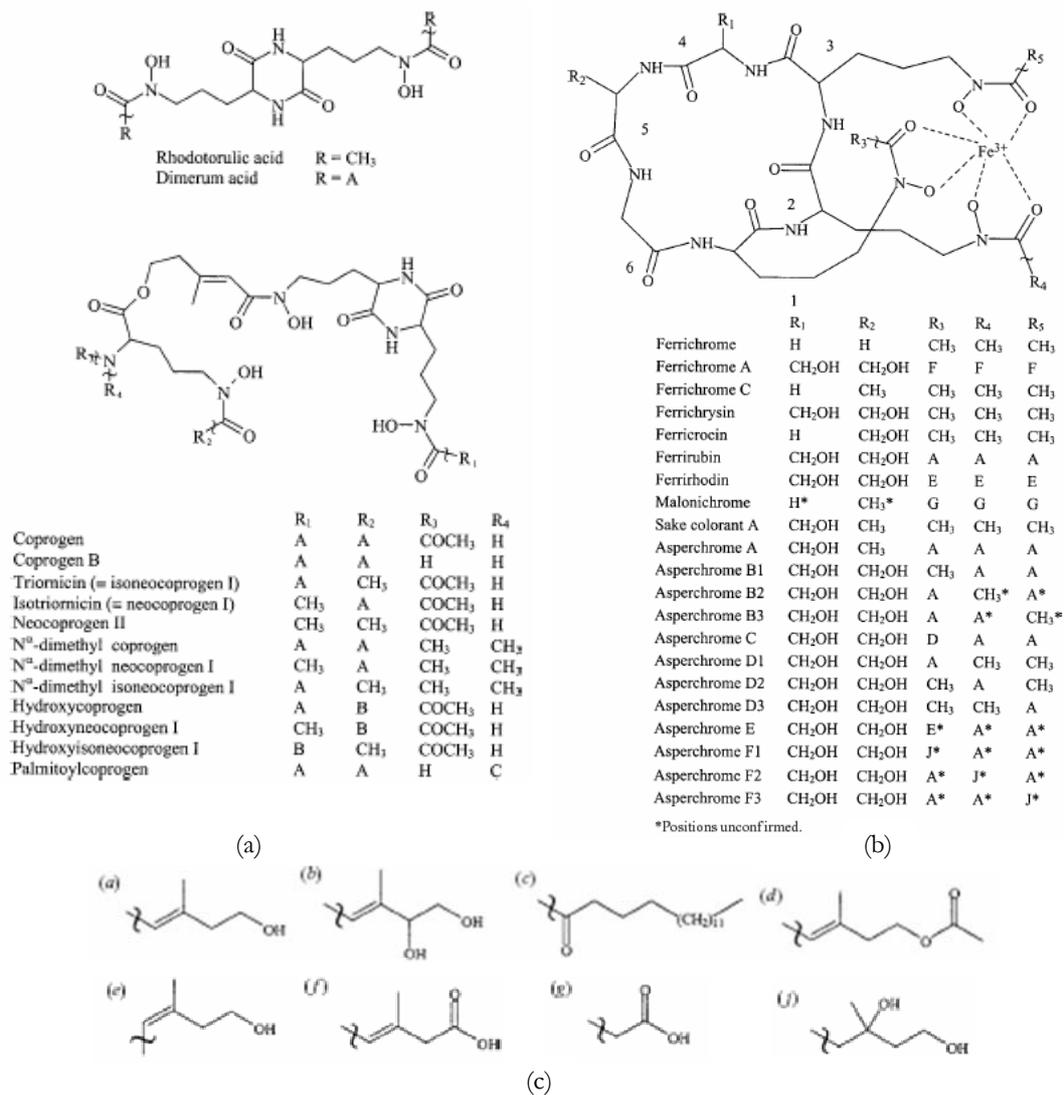


**Figura 1.15:** la struttura delle **fusarine** (modificato da Renshaw et al., 2002)/ **fusarinines** structure (modified from Renshaw et al., 2002)

I coprogeni sono molecole lineari di- e tri-idrossamato, costituiti da unità di *trans*-fusarina. L'acido dimerico e l'acido rodotulico sono entrambi costituiti da due unità di  $N^{\delta}$ -acil- $N^{\delta}$ -idrossioritina, ma differiscono per i gruppi acilici, acido *trans*- anidromevalonico nel primo, come nelle *trans*-fusarine, e gruppo acetile nel secondo (figura 1.16). Nei tri-idrossamati, una terza unità di *trans*-fusarina è esterificata all'OH terminale dell'acido dimerico. A seconda dei gruppi sostituenti dell' $\alpha$ - aminogruppo della terza ornitina e dei gruppi acilici, si hanno diversi tipi di siderofori, tutti appartenenti alla famiglia dei coprogeni.

Le molecole del gruppo dei ferricromi sono esapeptidi ciclici la cui formula generale è: -Orn1-Orn2-Orn3-A-B-Gly-, dove Orn1-2-3 sono unità di  $N^{\delta}$ -acil- $N^{\delta}$ -idrossi-L-ornitina e A e B sono residui di alanina, serina o glicina. I residui di ornitina sono legati tra loro in un peptide ciclico tramite tre residui aminoacidici, formando un ligando macrociclico (Renshaw et al., 2002).

I siderofori possono essere considerati virtualmente specifici per il Fe(III), in quanto non formano complessi altrettanto stabili con nessuno tra gli ioni metallici naturalmente abbondanti (Neilands, 1995). Tale ione ha un'elevata densità di carica (rapporto carica/raggio ionico) ed è classificato come un acido forte (Hider, 1984). Quindi il Fe(III) ha un'elevata affinità per le basi forti come l'ossigeno (Neilands, 1995) che contribuisce a determinare la specificità dei siderofori del tipo idrossamato per il tale ione e la stabilità termodinamica dei complessi, che hanno una costante di formazione  $k_f \sim 30$  (Renshaw et al., 2002).

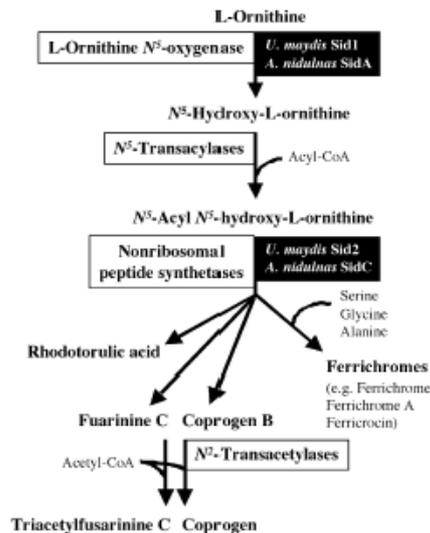


**Figura 1.16** - (a) Coprogeno; (b) Ferrichromi, (c) gruppi alchilici sostituenti nelle frazioni aciliche e nell'amino gruppo (A-F) / (a) Coprogens; (b). Ferrichromes; (c). the substituent alkyl groups in the acyl moieties and amino group (A-F). (modificata da Renshaw et al., 2002).

I siderofori esadentati predominano in natura (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998) formando complessi 1:1 con lo ione Fe(III). La preferenza per i siderofori esadentati deriva in natura da un effetto di concentrazione. Considerando che un complesso contenente un solo ligando polidentato è più stabile rispetto ad un analogo complesso formato da un numero equivalente di analoghi ligandi monodentati (meccanismo indicato con il termine “effetto chelato” Shriver and Atkins, 1999), ci si aspetterebbe che i complessi formati da siderofori poli-idrossamati siano più stabili dei complessi formati da siderofori mono-idrossamati, ma ciò non avviene (Kiss and Farkas, 1998). La costante di formazione dei complessi Fe(idrossamato)<sub>n</sub> è la stessa sia che gli n gruppi idrossamati appartengano alla stessa o a diverse

molecole. Questo è probabilmente dovuto al fatto che i gruppi leganti sono separati tra loro da catene lunghe, e possono quindi agire indipendentemente (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998).

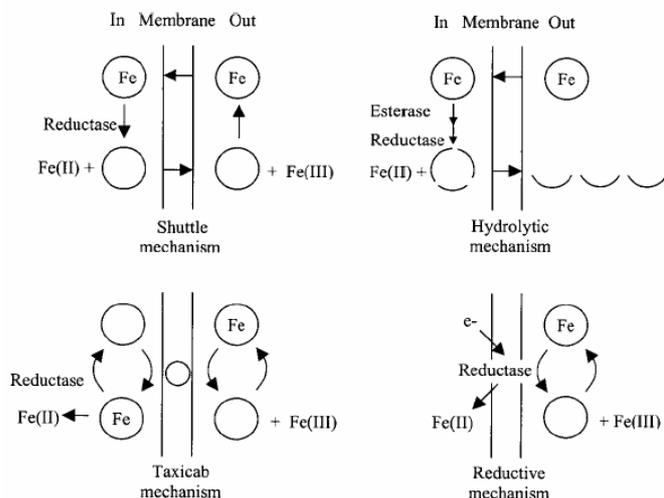
Data la scarsa influenza dell' "effetto chelato", la predominanza dell'utilizzo dei chelanti esadentati in natura può essere spiegato considerando l'effetto "concentrazione", dato dal fatto che per ottenere un certo rapporto tra concentrazione di ione legato e non legato con un ligando monodentato ed uno, per esempio, tridentato, a parità di costante di stabilità, sarà necessaria una concentrazione di ligando monodentato molto più elevata (Renshaw et al., 2002). Tale esempio riportato nel caso dei siderofori, illustra il motivo della maggior efficienza come chelanti del ferro dei siderofori poli-idrossamati rispetto ai siderofori mono-idrossamati.



**Figura 1.17** - via biosintetica dei siderofori fungini secondo Plattner and Diekmann (1994). Da Haas, 2003 / biosynthetic pathway for fungal siderophores according to Plattner and Diekmann (1994). From Haas, 2003.

Plattner and Diekmann (1994) hanno proposto una via di biosintesi dei siderofori fungini, simile a quella batterica. Tale via comporta tre passaggi (idrossilazione, acilazione, condensazione) per formare, a partire dalla L-ornitina, siderofori quali acido rodotulico, fusarina C e coprogeno B. Per la sintesi dei ferricromi intervengono ulteriori passaggi di condensazione e ciclizzazione (figura 1.17 da Haas 2003). Alcuni degli enzimi coinvolti in questa via biosintetica sono stati caratterizzati dal punto di vista genetico. Sono stati identificati i geni codificanti per l'ornitina- $N^5$ -ossigenasi, che catalizza il primo passaggio di idrossilazione dell'ornitina, in *Ustilago maydis* e in *Aspergillus nidulans*. L'espressione di tali geni è repressa dal ferro e ciò blocca la sintesi di tutti i siderofori idrossamati in queste due specie. Le transacetilasi che catalizzano l'acilazione della  $N^5$ -idrossiornitina sono state identificate in *Ustilago sphaerigena* e *Rhodotorula pilimanae*, ma non sono state caratterizzate geneticamente. La condensazione di diverse unità contenenti gruppi idrossamati e l'ulteriore incorporazione di tre aminoacidi nel caso dei ferricromi sono catalizzate da peptido-sintetasi non-ribosomiali, enzimi multifunzionali, caratterizzati da una struttura modulare, in grado di assemblare peptidi ma anche molecole diverse. Geni codificanti tali proteine sono stati identificati in *U. maydis*, in *A. nidulans* e in *Trichoderma virens*. La delezione di tali geni interferisce a livelli diversi con la sintesi dei siderofori più complessi. Inoltre sono stati identificati alcuni geni regolatori della via di sintesi dei siderofori: *urbs1* in *U. maydis*, *SRE* in *Neurospora crassa* e *SREA* in *A. nidulans*, inibiscono la biosintesi in presenza di quantità non limitanti di ferro (Haas, 2003)

Il trasporto del Fe(III) mediato dai siderofori è energia-dipendente. Il riconoscimento dei complessi Fe-sideroforo è specifico e stereoselettivo e dipende dalla geometria di coordinazione dello ione metallico e dai residui *N*-acilici che circondano il centro metallico (Winkelmann, 1992). Molti microrganismi posseggono più di un sistema di trasporto e possono quindi utilizzare più di un tipo di sideroforo. Sono stati proposti quattro diversi meccanismi di acquisizione del ferro tramite i siderofori nei funghi (figura 1.18, van der Helm and Winkelmann, 1994).



**Figura 1.18: meccanismi di assorbimento del ferro** attraverso la membrana plasmatica tramite siderofori nei funghi (van der Helm and Winkelmann, 1994). Il simbolo O rappresenta il sideroforo. / **mechanisms of siderophore iron uptake** across the cytoplasmic membrane in fungi (van der Helm and Winkelmann, 1994). The symbol O represents the siderophore.

Il meccanismo "shuttle" comporta il trasporto dell'intero complesso Fe-sideroforo attraverso la membrana. Il metallo viene rilasciato all'interno della cellula e il sideroforo libero nuovamente secreto. Il meccanismo "taxicab", utilizzato per l'acquisizione dei complessi Fe-rodotorulato nelle specie di *Rhodotorula* (Winkelmann and Huschka, 1987), prevede il trasferimento del Fe(III) dal sideroforo extracellulare ad un ligando intracellulare al livello della membrana. Nel meccanismo idrolitico, osservato in *Micelia sterilia* nell'acquisizione di Fe-tracetilfusarina C (Adjimani and Emery, 1987), il complesso Fe-sideroforo intatto viene trasportato all'interno della cellula, dove il Fe(III) è ridotto a Fe(II) e simultaneamente i legami estere delle triacetilfusarine C sono tagliati da specifiche esterasi, e le fusarine così prodotte vengono rilasciate. Il meccanismo riduttivo comporta la riduzione a livello della membrana dello ione ferrico a ferroso ed il successivo trasporto del solo ione all'interno della cellula.

I siderofori, in quanto composti in grado di chelare e portare in soluzione forme altrimenti insolubili di ferro, influenzano in vario modo lo sviluppo dei microrganismi e l'interazione con l'ambiente. Tali composti sono fattori di crescita per quasi tutti i funghi noti, indipendentemente dalla loro capacità di sintetizzarli (Winkelmann, 1992), ed esistono anche alcuni organismi auxotrofi per i siderofori. Gli organismi in grado di utilizzare i siderofori godono di un vantaggio competitivo rispetto agli altri, in quanto acquisiscono con maggior efficienza il ferro biodisponibile, riducendo la disponibilità di questo ione verso altri microrganismi, la cui crescita sarà quindi meno favorita (Renshaw, 2002). Inoltre molti microrganismi hanno sviluppato più di un sistema di acquisizione del ferro in quanto sono in grado di produrre e trasportare più di un tipo di siderofori, e ciò permette loro di crescere in varie condizioni ambientali (van der Helm and Winkelmann, 1994).

I siderofori sono anche fattori di virulenza per microrganismi patogeni (vegetali e umani). Infatti la restrizione del ferro disponibile è uno dei meccanismi di difesa dell'ospite, e quindi la produzione di siderofori da parte del patogeno risulta fondamentale per la sopravvivenza dello stesso (Weinberg, 2000). La produzione di siderofori da parte di microrganismi del suolo può

avere anche un effetto positivo nei confronti delle piante, in quanto media la solubilizzazione di ioni ferro altrimenti non disponibili alla pianta (Prabhu et al., 1996). Inoltre la produzione di siderofori da parte di microrganismi non patogeni può ridurre o sopprimere la crescita di microrganismi patogeni, deprivandoli delle risorse di ferro (Calvente et al., 1999). Infine i siderofori mediano l'accumulo intracellulare di ferro nei miceli e nelle spore, e può influenzare il processo di germinazione (Winkelmann, 1992).

### 1.17 Premesse e obiettivi del lavoro

L'amianto nei suoli costituisce un problema ambientale per il quale al momento non sono state sviluppate strategie di recupero. L'ampiezza delle aree interessate e la natura del contaminante suggeriscono l'applicazione di metodiche di biorisanamento, caratterizzate da un basso impatto ambientale e applicabilità *in situ*. Il lavoro qui presentato vuole porre le basi per lo sviluppo di una possibile via di risanamento basata sull'utilizzo di funghi del suolo, tramite la caratterizzazione dell'interazione di alcuni ceppi fungini e fibre di amianto *in vitro*.

Il termine "amianto" indica genericamente la famiglia degli asbesti, che comprende silicati la cui composizione chimica è variabile, ma tutti contenenti ferro, in diversi stati di ossidazione, come parte della struttura cristallina o in tracce come sostituenti di altri cationi. Il ferro contribuisce ai meccanismi di tossicità degli asbesti, catalizzando reazioni chimiche dannose per le biomolecole. Inoltre l'estrazione di ioni ferro dalle fibre ad opera di chelanti *in vitro* è stata messa in relazione in lavori precedenti con l'inibizione della reattività chimica di superficie e del danno a DNA e lipidi *in vitro* (Weitzman and Weitberg, 1985; Chao and Aust, 1994; Poser et al., 2004). Per questo motivo si propone che una possibile strategia di inattivazione e detossificazione degli asbesti sia la diminuzione della quantità di ferro contenuto tramite un'estrazione ad opera di chelanti organici. L'estrazione di cationi da un minerale ne modifica la composizione chimica degli strati superficiali o sub-superficiali. Lavori precedenti hanno riportato che l'estrazione di magnesio con acido ossalico da fibre di crisotilo, porta alla modificazione della struttura delle fibre stesse (Jaurand et al., 1984).

I microrganismi fungini sono in grado di estrarre ioni anche da substrati minerali poco solubili, tramite meccanismi di tipo biomeccanico e biochimico. E' noto infatti dalla letteratura che i funghi sono in grado di interagire con i metalli modificandone la forma chimica e la solubilità grazie alla produzione di composti organici. L'impatto dei microrganismi sullo stato chimico e quindi sulla mobilità di un metallo è complesso, e va da processi di tipo diretto come la trasformazione del metallo e l'accumulo intracellulare, ad un'azione di tipo indiretto tramite la produzione di composti che ne modificano la mobilità. Chelanti ed agenti sequestranti (es. acido citrico e siderofori), agenti precipitanti (es. acido ossalico ed H<sub>2</sub>S) e pigmenti con capacità di legare i metalli come le melanine, sono alcuni dei metaboliti extracellulari prodotti dai funghi (Gadd and White, 1989). In particolare i funghi del suolo hanno sviluppato meccanismi specifici di mobilitazione ed assorbimento del ferro da forme più o meno solubili, che risultano di particolare interesse nell'ottica del trattamento di suoli contenenti asbesti la cui struttura cristallina sia ricca di questo ione, quali crocidolite, amosite e, sebbene in quantità minori, crisotilo.

Al fine di individuare ceppi fungini adatti all'interazione con l'asbesto, durante le fasi precedenti di questo lavoro, è stata compiuta una selezione tra diverse specie fungine scelte in quanto rappresentanti di diverse strategie trofiche, e in grado di crescere facilmente in coltura pura. Furono scelti funghi saprotrofi del suolo, tra cui alcuni simbiotici facoltativi in grado di instaurare associazioni micorriziche con le piante appartenenti alla famiglia delle *Ericaceae* (Martino et al., 2004). A livello morfologico sono state rilevate differenze significative fra miceli cresciuti in assenza e in presenza di fibre di crocidolite UICC (Union International

Contre le Cancer) per quanto riguarda la pigmentazione del micelio stesso e del liquido di coltura. In assenza del fungo le fibre rimangono in sospensione nel liquido di coltura, che appare torbido. La crescita del fungo in tale terreno, invece, rende il mezzo completamente trasparente. Ciò è dovuto all'interazione che si viene a creare fra le fibre di crocidolite ed il micelio fungino.

Tutti i funghi utilizzati sono stati in grado di crescere in presenza di fibre di crocidolite. Essi hanno dimostrato, anche se in misura diversa, la capacità di solubilizzare il ferro dalle fibre, misurata come un aumento della concentrazione del ferro solubile nel mezzo di crescita di funghi cresciuti in presenza di fibre rispetto ai funghi cresciuti in assenza delle stesse. Particolarmente attivo si è dimostrato *F. oxysporum*, noto produttore di siderofori (Domsh et al., 1980). La quantità di ferro liberato dalle fibre di crocidolite in presenza delle colture fungine è dovuta alla produzione da parte del fungo di molecole chelanti solubili.

Il ceppo fungino *F. oxysporum* è stato ulteriormente testato per estendere l'analisi ad altri due tipi di fibre, amosite UICC e crisotilo di tipo A (rhodesiano). *F. oxysporum* si è dimostrato efficiente nella mobilitazione del ferro dalla superficie da tutti i tipi di fibre. Prolungando l'incubazione il fungo ha dimostrato di essere in grado di protrarre questa attività di estrazione del ferro. La quantità di ferro mobilitata ad opera del microrganismo dalle diverse fibre varia a seconda del tipo di fibra, e per pari quantità della stessa dipende dalla abbondanza di ioni ferro nella struttura cristallina del minerale e dalle caratteristiche di superficie del minerale (Daghino et al., 2005).

Dalla letteratura è noto che trattamenti con chelanti del ferro *in vitro* riducono il rilascio di radicali da parte di fibre di minerali asbestiformi (Ghio et al., 1992) confermando il coinvolgimento di questo ione nella produzione di ROS. I risultati ottenuti confermano che il trattamento con il microrganismo, analogamente al trattamento *in vitro* con chelanti, ne riduce la produzione da parte di crisotilo rhodesiano e crocidolite UICC (Daghino et al., 2005).

Poste queste premesse, che dimostrano la capacità di microrganismi fungini di varia origine di interagire con le fibre di amianto *in vitro* e modificarle, ci si è chiesti se funghi isolati da suoli ricchi di minerali della famiglia degli asbesti possano avere caratteristiche particolari che favoriscano tale interazione. Per questo, uno degli obiettivi di questa tesi è l'isolamento di specie fungine da suoli serpentinitici con due obiettivi. Il primo è quello di identificare le specie più abbondanti, in particolare nei suoli ricchi di rocce serpentinitiche affioranti nell'area delle Alpi Occidentali. Il secondo è quello di selezionare i ceppi più adatti ad interagire con fibre di asbesto. Tale selezione si è basata sull'efficacia nell'estrazione di ioni dalle fibre di asbesto, avendo come termine di paragone l'attività già accertata di *F. oxysporum*. Sono state prese in esame le modificazioni di entrambe i partner di questa interazione, ossia le fibre e i funghi.

Si è indagata l'alterazione della composizione chimica e della reattività di superficie delle fibre, e le fibre modificate sono state utilizzate per condurre alcune prove di reattività all'interno di sistemi biologici *in vitro*, per ottenere indicazioni sulla tossicità delle fibre.

Le fibre di amianto possono costituire una fonte di stress ossidativo per i funghi, così come lo sono per le cellule animali. Per questo motivo si è voluto studiare la risposta metabolica fungina, con un approccio basato sul confronto dei profili proteici e delle attività enzimatiche espresse in presenza e in assenza di fibre.

Tale lavoro rappresenta un esempio di studio di geomicrologia, in cui i partner fungini sono stati isolati in campo, ma le loro interazioni con i minerali è studiata *in vitro*, in un sistema che consente di indagare non solo la modificazione del minerale, ma anche le caratteristiche del microrganismo.

I risultati saranno di seguito presentati in tre capitoli, riguardanti rispettivamente l'isolamento della componente fungina di suoli serpentinitici, lo studio della modificazione delle fibre indotta dal trattamento con i funghi e le risposte metaboliche fungine espresse in presenza di fibre di asbesto. Per chiarezza, ogni capitolo di risultati sarà immediatamente seguito dalla rispettiva discussione.



## Capitolo 2

### Materiali e metodi

#### 2.1 Descrizione degli asbesti utilizzati.

In tutti gli esperimenti descritti sono stati utilizzati un campione di crisotilo commerciale estratto nella ex-cava di Balangero e messo a disposizione dalla RSA- Amiantifera (denominato 6D) e crocidolite UICC (Union International Contre le Cancer). Le caratteristiche di tali fibre sono riportate in tabella 2.1.

fibre	Superficie specifica (m <sup>2</sup> /g)	% in peso di ioni Fe	% in peso di ioni Mg
Crocidolite $\text{Na}_2\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{Fe}^{\text{II}},\text{Mg})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$	8	27.3**	2-3%*
Crisotilo 6D Balangero $\text{Mg}_3[\text{Si}_2\text{O}_5](\text{OH})_4$	15***	2.18***	24.3***

**Tabella 2.1 – Caratterizzazione delle fibre di asbesto utilizzate in questo studio.** Si riporta la formula di struttura, l'area specifica, il ferro contenuto (% in peso), e il magnesio contenuto (% in peso) / **Characterization of the asbestos fibres used in this work.** The formula, the specific surface, the iron content (%wt) and the magnesium content (%wt) are reported. (\*Bowes and Farrow, 1997; \*\* Hardy and Aust, 1995; Groppo, comunicazione personale).

Per l'incubazione in presenza del micelio fungino, sono state preparate delle sospensioni 2.3% (w/v%) in acqua distillata di entrambe le fibre. Tali sospensioni sono state mantenute in agitazione magnetica per alcune ore per favorire la dispersione delle fibre. La dove fosse necessario recuperare le fibre dopo l'incubazione, sono stati preparate delle aliquote della sospensione di fibre racchiusa in una membrana da dialisi (BDH, Poole, U.K., cut off 12-14000 Da). Le membrane da dialisi, prima dell'utilizzo, sono state bollite due volte per 10 minuti e sterilizzate a 120° C per 20 min. Dopo sterilizzazione le fibre sono state aggiunte ai sistemi di coltura come tali o racchiuse in membrana.

Al termine del periodo di incubazione, le membrane contenenti le fibre sono state aperte, le fibre lavate due volte in acqua distillata e portate a secco utilizzando un essicatore sotto vuoto a temperatura ambiente. Tali aliquote di fibre sono state utilizzate per i successivi esperimenti di spin trapping, analisi SEM-EDS, XPS e test di ossidazione del DNA.

#### 2.2 Isolati fungini.

Uno degli oggetti di studio di questo lavoro di tesi è stato un ceppo fungino appartenente alla specie *Fusarium oxysporum*, isolato dalla rizosfera di *Cucumis sativus* in suolo coltivato (Girlanda et al., 2001). La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Fusarium* ha una distribuzione ubiquitaria ed è attiva nella decomposizione di substrati vegetali contenenti cellulosa. In particolare, *F. oxysporum* è presente in un'ampissima gamma di suoli dai quali può essere facilmente isolato con le più comuni tecniche. E' noto per la sua capacità di colonizzare suoli alcalini, ma è tuttavia in grado di proliferare in un intervallo di pH molto ampio. Prove di laboratorio ne hanno individuato un intervallo di crescita compreso tra valori di pH 2.2-9 con un valore ottimale di 7.7. Utilizza svariate fonti di carbonio fra le quali acido lattico e succinico, glicerolo, mannitolo, cellobiosio, amido, maltosio e saccarosio. E' in grado di solubilizzare il

fosfato di calcio e di ridurre lo ione ferrico, ed è stato scelto in quanto è un forte produttore di siderofori (Domsh and Gams, 1980) e presenta una crescita rapida ed abbondante.

Sono stati inoltre isolati altri ceppi fungini provenienti da suoli di tipo serpentinitico. A tale scopo sono stati scelti alcune aree nelle Alpi occidentali che presentassero affioramenti di rocce serpentinitiche. Sono stati raccolti campioni di rocce, frammenti di rocce e suolo, successivamente utilizzati per l'isolamento di ceppi fungini con la tecnica delle "dilution plates". Tale tecnica consente di isolare ceppi fungini presenti in grado di crescere su malto, senza particolari esigenze nutrizionali. Essa comporta la risospensione del suolo (1 g) in esame in H<sub>2</sub>O distillata (250 ml), il prelievo di un'aliquota di H<sub>2</sub>O che viene aggiunta ad un mezzo di coltura costituito di malto (Merk) 2%, agar (Sigma) 1,8%, gentamicina (gentamicina solfato, Essex Italia) 40ppm, streptomycin 30 ppm. Le rocce intere e i frammenti di roccia sono stati pesati per stimarne le differenze e lavati con 250 ml di acqua distillata, poi utilizzata per l'isolamento. Le colonie fungine si sviluppano in piastre Petri (Ø 12 cm).

Le piastre sono state mantenute per una settimana a temperatura ambiente, onde permettere lo sviluppo delle colonie, per poi procedere ad una valutazione comparativa delle colonie sviluppatesi dai diversi campioni. In seguito si è proceduto all'isolamento dei ceppi fungini in coltura pura, su un terreno agarizzato contenente malto (Merk) 2%, agar (Sigma) 1,8%. Dopo alcuni giorni di crescita i tubi sono stati conservati a 4° C in modo da mantenere le colonie quiescenti e permetterne l'identificazione tassonomica, attraverso osservazione morfologica. A tale scopo una piccola quantità di micelio viene prelevata con un'ansa sterilizzata alla fiamma, posizionata su un vetrino portaoggetti, e lavata con acqua e acido acetico. Si aggiunge una goccia di acido lattico ed il vetrino coprioggetto e si procede all'osservazione al microscopio ottico (condotta dalla dott.ssa Mariangela Girlanda).

I ceppi isolati verranno descritti nel dettaglio nel capitolo 3.

### 2.3 Microanalisi campioni di suolo

Campioni di rocce serpentinitiche e non, da cui sono stati isolati i ceppi fungini utilizzati in questa tesi, sono stati macinati per ottenere una polvere omogenea e sottoposti a microanalisi SEM-EDS. Tale analisi, ripetuta 6 volte in punti diversi del campione, ha fornito una composizione chimica media in ossidi delle rocce analizzate. Il dott. S. Favero Longo ha gentilmente fornito i campioni di rocce e condotto l'analisi.

### 2.4 Terreni e sistema di coltura

I funghi sono stati cresciuti su un terreno minerale liquido (Czapek), con l'aggiunta di glucosio (2%, Carlo Erba) come fonte di carbonio. Il terreno Czapek contiene NaNO<sub>3</sub> (Sigma, 3 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, 1.31 g/l), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma, 0.5 g/l), KCl (Carlo Erba, 0.5 g/l), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Fluka, 0.01 g/l), adjusted to pH 5.5 with MES (2-[N-Morpholino] ethane sulphonic acid (Sigma, 20 mM)). Dopo l'inoculo dei funghi, le colture sono state posizionate su un piano basculante (120 rpm) alla temperatura costante di 25°C. Tutti i terreni, prima dell'utilizzo, sono stati sterilizzati in autoclave a 120°C per 20 minuti e tutte le operazioni di inoculo sono state effettuate in ambiente sterile.

Per ogni coltura sono stati utilizzati 80 ml di terreno di crescita a cui sono stati aggiunti 8.7 ml di una sospensione 2.3% di fibre (corrispondente a 200 mg di fibra) sia direttamente che all'interno di membrane da dialisi. In ogni esperimento sono state fatti crescere in parallelo miceli in assenza e in presenza di fibre.

Al termine del periodo di crescita (20 gg), i terreni di crescita sono stati separati dai miceli per filtrazione (filtro di carta su un imbuto Buchner). I miceli sono stati fatti essiccare per

valutarne la biomassa tramite misurazione del peso secco. I filtrati di coltura sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  e poi utilizzati per lo studio della componente proteica fungina extracellulare e per la titolazione del ferro e del magnesio in soluzione. Le fibre sono state recuperate ed utilizzate come descritto al paragrafo 2.1.

## 2.5 Incubazione di fibre di crocidolite con deferoxamina.

Fibre di crocidolite (1mg/ml) non trattate o pre-incubate 20 gg con *F. oxysporum*, sono state risospese (volume finale 200 ml) in una soluzione 0.15 M di NaCl contenente la deferoxamina in concentrazione 1mM, e mantenute in continua agitazione al buio a  $37^{\circ}\text{C}$ . Il pH= 4.5 iniziale è stato riaggiustato ad intervalli regolari di tempo (ogni 7 giorni) per prevenire eventuali alterazione della velocità di mobilizzazione del ferro. Ogni settimana sono state prelevate aliquote di soluzione di 4.5 ml, filtrate per eliminare i residui di fibra e conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentrazione del ferro nel surnatante è stata determinata spettrofotometricamente (Uvikon 930 a doppio raggio) misurando l'assorbanza del complesso  $\text{Fe}^{3+}$ -deferoxamina ( $\text{EmM} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 428 nm.

## 2.6 Saggio per evidenziare la presenza di molecole chelanti del ferro.

La produzione di chelanti organici (siderofori) è stata studiata su piastre contenenti il seguente mezzo di coltura, specifico per tale tipo di saggio (Schwyn and Neilands, 1987).

<b>Soluzione 1:</b>		60 ml totali
CAS (chrome azurol S)		60.5 mg in 50 ml H <sub>2</sub> O
Soluzione cloruro ferrico		
	Per 100 ml di H <sub>2</sub> O distillata	
FeCl <sub>3</sub> 1 mM	0.016 g	10 ml
HCl 10 mM	83 $\mu\text{l}$ HCl fumante	
<b>Soluzione 2:</b>		40 ml totali
HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium bromide)		72.9 mg
<b>Soluzione 3</b>		900 ml totali
Soluzione sali 10 X	per 1 l di H <sub>2</sub> O distillata	100 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g	
NaCl	5 g	
NH <sub>4</sub> Cl	10 g	
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2.48 g	
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.148 g	
PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid)		30.24 g
Glucosio		4 g
H <sub>2</sub> O distillata		750 ml
NaOH 50% (p/v)		Fino a pH 6.8
Agar		15 g

**Tabella 2.2 – Saggio per evidenziare la presenza di molecole chelanti del ferro.** Composizione dei tamponi. / **Assay to reveal iron chelating molecules.** Buffers composition.

La soluzione 1 viene addizionata alla 2 lentamente e in costante agitazione, per ottenere 100 ml di una soluzione di colore blu scuro. Dopo aver sterilizzato le soluzioni separatamente, si aggiunge la soluzione 1+2 alla 3 lentamente, evitando la formazione di schiuma.

Le piastre ottenute sono di colore blu e la produzione di chelanti è resa evidente dalla formazione di aloni chiari. Infatti il mezzo contiene un complesso intensamente colorato costituito da Chrome azurol S, Fe(III) e HDTMA. Se il campione di interesse contiene

chelanti, essi legano il ferro del complesso, che si stacca così dal cromoforo. Ciò causa la variazione di colore del substrato.

Tali piastre sono state utilizzate sia per evidenziare la presenza di molecole chelanti in frazioni di filtrati colturali di funghi cresciuti in liquido (v. par 2.18.1), sia per testare la produzione di chelanti da parte di miceli fungini (v. par 2.18.2).

### 2.6.1 Saggio di filtrati colturali fungini

Un filtrato colturale completo di *F. oxysporum* cresciuto in Czapek-glucosio 2% (v. paragrafo 2.4) è stato sottoposto ad un frazionamento per esclusione su colonna (Columns PD-10, Sephadex G-25M, Pharmacia): sono state recuperate cinque frazioni a peso molecolare diverso. Queste frazioni sono state testate depositate in appositi pozzetti su piastre agarizzate per evidenziare la presenza di molecole coinvolte nella chelazione del ferro.

### 2.6.2 Saggio di miceli fungini.

Miceli di diversi ceppi fungini sono stati fatti crescere sulle piastre blu per evidenziare in modo diretto le produzione e il rilascio di molecole chelanti del ferro. I miceli sono stati fatti crescere su membrane di cellophane (tagliate, bollite in EDTA 0.38 g/l, conservate in H<sub>2</sub>O ultrapura milliQ, sterilizzate e depositate in ogni piastra in condizioni di sterilità). I miceli sono stati osservati periodicamente durante la crescita per misurare il diametro della colonia e, là dove si formasse, il diametro dell'alone chiaro di produzione dei chelanti. Al termine della crescita, le membrane e i miceli sono stati prelevati dalle piastre e ciò ha permesso la misurazione del pH delle piastre stesse, con l'utilizzo di un elettrodo di superficie (Hamilton).

## 2.7 Inclusione dei campioni per la microscopia elettronica a scansione (SEM)

Allo scopo di osservare l'interazione diretta fra il fungo e le fibre di crocidolite UICC e crisotilo 6D, una piccola aliquota di micelio di *V. leptobactrum* cresciuto in presenza e in assenza delle fibre è stata prelevata dalle colture in liquido per l'allestimento di preparati per il SEM. I campioni così ottenuti sono stati processati secondo il seguente protocollo:

<b>Fissazione:</b>		
Gluteraldeide 2.5% in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.2	O.N.	4°C
Lavaggi in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.2	2x10 min	RT
Postfissazione in OsO <sub>4</sub> 1%	1h	RT
Lavaggi in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.2	2x10 min	RT
<b>Disidratazione:</b>		
etanolo 30%	15 min	RT
etanolo 50%	15 min	RT
etanolo 70%	15 min	RT
etanolo 90%	15 min	RT
etanolo 100%	15 min	RT
etanolo 100%	15 min	RT
acetone 100%	15 min	RT
acetone 100%	O.N.	4°C
<b>Punto critico</b>		
<b>Metallizzazione</b>		

Tabella 2.3 – Preparazione di campioni per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione / Preparation of samples for scanning electron microscope observation.

## 2.8 Identificazione molecolare degli isolati fungini.

### 2.8.1 Estrazione del DNA

Da alcuni frammenti di micelio cresciuto in terreno liquido è stato estratto il DNA genomico seguendo il metodo CTAB (Henrion et al., 1992) con alcune modificazioni. Il micelio è stato frantumato con un pestello in 600 µl di tampone di lisi (2% CTAB; 0.1 mM Tris-HCl pH 9; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8; 0.2% β-mercaptoetanol). Il lisato è stato incubato a 65°C per 1 ora. Si sono quindi effettuate due estrazioni con un ugual volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1; v:v:v); la fase acquosa è stata recuperata dopo centrifugazione (5 min a 14 krpm). Il DNA è stato quindi precipitato con un volume di isopropanolo, lasciato 2 ore a -20°C e centrifugato per 30 min a 14 krpm a 4°C. Il precipitato è stato lavato con 70% etanolo e risospeso in un volume adeguato di tampone TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA). Il DNA è stato conservato a -20°C.

### 2.8.2 Amplificazione della regione ITS del gene ribosomale

I geni che codificano per l'rRNA sono molto conservati nell'evoluzione e ripetuti in più copie nel genoma. Questo implica il vantaggio che sulle sequenze conservate possono essere disegnati primers utilizzabili su organismi diversi. I primers utilizzati (ITS1F e ITS4) riconoscono e quindi amplificano la regione dei geni che codificano per l'rRNA compresa tra la fine della subunità 18S e l'inizio della subunità 25S. La regione dei geni per l'rRNA che viene amplificata è formata da un tratto conservato (5.8S), e da due tratti a livello dei quali si possono verificare delle mutazioni (ITS) e quindi la distanza filogenetica gli organismi considerati.

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un volume finale di 50 µl contenenti 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% di gelatina; 0.2 mM dei quattro desossiribonucleotidi; 25 pmoli di ciascun oligonucleotide e 1 unità di RedTaq DNA polimerasi (Sigma). La miscela di reazione è stata sottoposta al seguente programma di amplificazione: 3 min a 94°C (1 ciclo), 45 sec a 94°C, 45 sec a 55°C, 45 sec a 72°C (35 cicli), 5 min a 72°C, utilizzando un apparecchio GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem). Per ogni reazione di PCR è stato sempre effettuato un controllo negativo dove il DNA templato è stato sostituito con H<sub>2</sub>O sterile. I prodotti della reazione sono stati controllati in elettroforesi su gel d'agaroso 1.3% in tampone TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato; 0.5 mM EDTA; pH 8) e poi purificati utilizzando il PCR purification kit (Qiagen).

### 2.8.3 Sequenziamento e analisi bioinformatica delle sequenze

Le sequenze nucleotidiche sono state determinate dal servizio di sequenziamento GeneLab (S.M di Galeria – Roma, Italy), utilizzando i primers ITS1F e ITS4. I cromatogrammi delle sequenze sono stati verificati utilizzando il programma Sequencher (versione 4.1.4 - Gene Codes Corporation). Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalX. Il programma PAUP\* 4.0B8 (Swofford, 2001) è stato utilizzato per creare gli alberi filogenetici e calcolare i valori di bootstrap. Sono state condotte analisi di distanza (*Neighbour joining*), di parsimonia e di somiglianza (*Maximum likelihood*). Le sequenze sono state inoltre confrontate con quelle depositate nella banca dati *Gene Bank* utilizzando il programma BLASTn (Altschul et al., 1997), disponibile presso il sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 2.9 Isoelettrofocalizzazione preparativa

Il terreno colturale di *F. oxysporum*, concentrato di circa 10 volte con un evaporatore rotante (Rotovapor) e dializzato in acqua distillata, è stato sottoposto a isoelettrofocalizzazione

(IEF) preparativa in fase liquida mediante un apparecchio Rotofor (Bio Rad). Tale apparecchio permette di separare le diverse componenti grazie ad un gradiente di pH creato dalle anfoline (miscele complesse di acidi sintetici poliammino policarbossilici) per effetto del passaggio di corrente in una camera di focalizzazione orizzontale. Gli elettrodi sono rappresentati da H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M (anodo) e NaOH 0,1M (catodo). Come veicolante per la IEF sono state usate anfoline Bio Lyte con intervallo di pH 3-10.

La miscela caricata nell'apparecchio Rotofor è costituita da 20 ml di campione (terreno colturale concentrato) a cui sono aggiunti 1 ml di anfoline, in concentrazioni cioè del 4% (v/v). La focalizzazione è stata effettuata in 4h a 12 W costanti con un limite massimo di 2000 V e 120 mA. Le proteine migrano lungo il gradiente di pH e si focalizzano ad un valore di pH corrispondente al loro pI. Conclusa la separazione, il campione, suddiviso in 20 frazioni, è stato raccolto in 20 provette mediante aspirazione. E' stato misurato il pH delle frazioni, le quali sono state successivamente sottoposte ad SDS-PAGE.

## 2.10 Quantificazione delle proteine con il metodo di Bradford.

Aliquote dei filtrati colturali e di estratti intracellulari (v. paragrafo 2.16) sono state utilizzate per la determinazione del contenuto totale di proteine tramite il saggio di Bradford (1976). Questa tecnica si basa sull'osservazione dello spostamento del massimo di assorbimento (da 495 nm a 595 nm) del colorante Comassie Brilliant Blue che avviene quando questa molecola si lega a catene laterali di aminoacidi carichi positivamente come lisina e arginina.

Si prepara una miscela contenente un'aliquota del campione stesso e 1 ml di reattivo di Bradford (Sigma) e si vortexa. Si lascia reagire 15 min a temperatura ambiente e poi si fa una lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 595 nm. Si misurano tre ripetizioni per campione. Dal valore di assorbanza si calcolano i µg di proteine presenti nel campione, basandosi su una retta di taratura precedentemente preparata.

## 2.11 Preparazione dei campioni proteici dalla frazione extracellulare per SDS-PAGE

Per lo studio delle proteine totali secrete, aliquote di terreno colturale sono state precipitate a freddo, con acido tricloroacetico e acetone, risospese nel tampone di Laemmli 1X (v. tabella 2.4) contenente il 10% di β-mercaptoetanolo e bollite per 3-5 minuti. Procedura:

- aggiungere al campione ¼ del volume di una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) 100%, deossicolato (DOC) 0.4%
- lasciare su ghiaccio 15 min
- centrifugare a 2°C a 14500 rpm per 10 min
- eliminare il surnatante
- aggiungere un volume di acetone 100%
- centrifugare a 2°C a 14500 rpm per 10 min
- eliminare il surnatante
- lasciare asciugare il pellet
- risospingere nel tampone di Laemmli.

## 2.12 SDS-PAGE

Le aliquote di terreno colturale in cui sono cresciuti i funghi sono state sottoposte ad SDS-PAGE per avere un'indicazione del contenuto totale di proteine e per evidenziare eventuali differenze dovute alla presenza di fibre di asbesto nei terreni colturali.

Con questa tecnica le proteine vengono separate sulla base del loro peso molecolare in un gel di poliacrilammide grazie all'applicazione di un campo elettrico. La separazione SDS-PAGE è stata effettuata mediante un apparecchio MINI-PROTEAN II Dual Slab Cell (Bio Rad) secondo il metodo discontinuo di Laemmli (1970), basato sull'utilizzo di tamponi a diverso pH e sul diverso voltaggio all'interno del gel. La composizione dei gel e dei tamponi utilizzati è descritta in tabella 2.4. Per il gel di separazione è stata utilizzata acrilammide ad una concentrazione del 12.5%. È stato applicato un voltaggio di 100V nella fase di impaccamento (stacking gel) e di 120V nella fase di separazione (running gel), per il tempo necessario alla fuoriuscita del fronte di corsa. I gel, terminata la corsa elettroforetica sono stati sottoposti a colorazione con nitrato d'argento.

<b>ricetta per 2 gel di acrilammide:</b>	<b>gel di separazione 12.5%</b>	<b>gel di impaccamento</b>
Acrilammide 40%	3.1 ml	0.5 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-	1.25 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl	50 µl
TEMED	15 µl	5 µl
APS 10%	50 µl	25 µl
Blu di bromofenolo 0.1%	-	50 µl
H <sub>2</sub> O	4.3 ml	3.25 ml

<b>tampone di caricamento - Laemmli 4X</b>	<b>tampone di corsa 10X - Tris- glicina pH 8.3</b>
Tris-HCl 0.25 M pH 6,8	Tris 30 g/l
SDS 0.05 g/ml	Glicina 144 g/l
Glicerolo 50% (v/v)	SDS 10 g/l
EDTA 5 mM	
Blu di bromofenolo q.b.	

Tabella 2.4 – Tamponi per SDS-PAGE / SDS-PAGE buffers

## 2.13 Colorazione con nitrato d'argento delle proteine su gel di poliacrilammide

La colorazione delle proteine con i sali d'argento è basata sulla riduzione differenziale dei medesimi sali (formando legami con i gruppi sulfidrilici e carbossilici delle proteine). Questo tipo di colorazione ha una sensibilità tale da rilevare su gel bande contenenti da 3 a 100 ng di proteine. Procedura:

- due lavaggi di 15' in metanolo 50%, alternativamente si può lasciare il gel in metanolo al 50% per tutta la notte;
- 1 lavaggio di 10' in metanolo 5%;
- risciacqui veloci in acqua distillata;
- 1 lavaggio di 20' in DTT 5 µg/ml (1.62 µl di DTT 1 M in 50 ml di acqua distillata);
- 1 lavaggio di 20' in AgNO<sub>3</sub> 0.1%;
- 1 risciacquo veloce in acqua distillata;

- sviluppo in 100 ml di una soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3% a cui vanno aggiunti, poco prima dell'uso, 50 µl di formaldeide 37%.
- blocco della reazione con acido citrico 2.3 M (circa 5 ml per 100 ml di soluzione di sviluppo).

## 2.14 Western blot

Dopo la separazione elettroforetica le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante elettroblotting. E' stato utilizzato l'apparecchio MINI TRANS-BLOT Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad), effettuando il trasferimento per 50 min a 100 V in tampone di trasferimento (Tris 3.3/l, glicina 14.4 g/l, metanolo 20% v/v). Le bande proteiche sono state evidenziate tramite un procedimento di immunomarcatura con Mn-Superoossido dismutasi (anticorpo EnVirtue, Biotechnologies, Inc. California USA; diluizione 1:5000

## 2.15 Gel di attività enzimatica: visualizzazione dell'attività superossidodismutasi

Allo scopo di visualizzare l'attività enzimatica delle superossido dismutasi, è stato condotto un saggio su gel secondo il metodo di Davis (1964) che prevede la separazione delle proteine in condizioni native. E' stata quindi condotta una precipitazione della componente proteica extracellulare in condizioni non denaturanti in (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (v. paragrafo successivo). Il tampone di caricamento (Tris-saccarosio) è stato addizionato ai campioni (nella proporzione 1:5 v/v) prima della corsa elettroforetica. La corsa elettroforetica è condotta a corrente costante di intensità 15 mA in tampone di corsa (Tris-Glicina pH 8.3) su un gel di poliacrilammide al 10%. La composizione del gel e del tampone di caricamento è riportata in tabella 2.5.

La visualizzazione dell'attività superossido dismutasi avviene direttamente su gel tramite il metodo descritto in Beauchamp & Fridovich (1971), basato sulla inibizione (in presenza della SOD) della riduzione del nitro blu di tetrazolio (NBT) da parte dei radicali superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) generati fotochimicamente. Le bande di attività appaiono incolore su fondo blu, quest'ultimo corrispondente all'NBT ridotto da parte dei radicali superossido.

Procedimento:

- ⇒ incubazione del gel al buio a 25°C su piano basculante per 20 min in 100 ml di soluzione NBT 2.45 mM in tampone K-fosfato 50 mM, pH 7.8
- ⇒ incubazione del gel al buio a 25°C su piano basculante per 15 min in 100 ml di soluzione contenente riboflavina 28 µM, TEMED 4.17 ml, in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.8
- ⇒ lavaggio in tampone K-fosfato 50 mM pH 7.8
- ⇒ esposizione del gel, mantenendolo nello stesso tampone, ad una intensa sorgente di luce bianca, fino alla visualizzazione delle bande di attività.

	Gel di separazione	Gel di impaccamento		Tampone di caricamento
Acrilamide 40%	2.45 ml	0.48 ml	Tris-HCl	0.5 M
Bisacrilamide 2%	1.34 ml	0.26 ml	Saccarosio	60 % (p/v)
Tris-HCl 3 M pH 8.8	1.25 ml	-	Blu di bromofenolo	0.04% (p/v)
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-	1.26 ml	Sodio azide	0.02% (p/v)
H <sub>2</sub> O distillata	4.67 ml	2.85 ml		
APS 10%	70 µl	50 µl		
TEMED	15 µl	5 µl		

**Tabella 2.5 – Gel di attività enzimatica SOD.** Composizione dei tamponi / **SOD enzymatic activity gel.** Buffers composition.

## 2.16 Saggi di attività enzimatica

Si é voluto verificare se la presenza delle fibre di asbesto nei sistemi colturali influisse sull'attività di enzimi correlati con la risposta agli stress ossidativi. Il saggio SOD (v. paragrafo successivo) é stato condotto sia sulla componente proteica extracellulare che su quella intracellulare, mentre gli altri saggi hanno riguardato solo la componente intracellulare.

### *Preparazione di precipitati delle proteine extracellulari in forma nativa*

Il filtrato colturale (40 ml) di miceli cresciuti in presenza e assenza di fibre é stato sottoposto a precipitazione con ammonio solfato (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (561 g/l per portare a saturazione). L' (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> viene fatto sciogliere in agitazione in ghiaccio per 1 h e successivamente sottoposto a centrifugazione 13000 g per 45 min. Si ottiene un pellet proteico, che viene risospeso in tampone Na-fosfato 50 mM pH=7 e conservato a -20°C fino all'utilizzo.

### *Preparazione di estratti di proteine intracellulari.*

I miceli fungini dopo filtrazione vengono conservati a -80°C. Tale materiale é stato polverizzato in azoto liquido e risospeso in un tampone di estrazione contenente tampone Na-fosfato (20 mM) pH 7.5, PVPP (polivinilpolipirrolidone) 0.08g/ml, PMSF (fenil metil sulfonil fluoride) 2 mM, EDTA (acido tetracetico etilendiamina) 1 mM. Dopo centrifugazione (30 min a 13000) si recuperano i surnatanti su cui vengono condotti i saggi di attività.

### 2.16.1 Superossido dismutasi (SOD)

Si tratta di un saggio spettrofotometrico basato sullo stesso principio del saggio su gel (v. paragrafo 2.15). 100 µl di estratto enzimatico (se il volume dell'estratto enzimatico é inferiore a 100 µl, si porta a volume con H<sub>2</sub>O) vengono incubati con 1775 µl di H<sub>2</sub>O e 625 µl di una miscela di reazione costituita da:

- 50 mM K-fosfato pH 7.8
- 75 µM NBT
- 2 µM Riboflavin
- 13 mM Methionin
- mM EDTA

Le cuvette contenenti tale soluzione vengono esposte alla luce per 15 min per consentire lo sviluppo della reazione fotochimica. Ogni lettura include un controllo negativo privo di estratto enzimatico, un controllo positivo contenente 6µl SOD purificata (Sigma, 2.5 U/µl) e

un bianco per ogni campione identico al campione stesso ma tenuto al buio durante la reazione. E' stata condotta una lettura spettrofotometrica a 560 nm.

La quantità di SOD é espressa in U/ $\mu$ l calcolate rispetto ad una retta di taratura preparata utilizzando una SOD purificata da ravanella (Sigma, 2.5 U/ $\mu$ l).

### 2.16.2 Catalasi (CAT)

Per tali saggi sono stati utilizzati estratti intracellulari grezzi, ottenuti secondo la procedura descritta sopra.

Il saggio si basa sulla preparazione di una miscela tra l'estratto e un tampone, la cui assorbanza a 240 nm varia dopo l'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La miscela di reazione, per 1 ml di volume finale, è così costituita:

- 800  $\mu$ l Na-fosfato 50 mM pH 7
- 100  $\mu$ l estratto enzimatico
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM

Il bianco è costituito da 1 ml di tampone .

Il valore di assorbanza misurato sulla miscela costituita dall'estratto e dal tampone costituisce il valore di iniziale. Dopo l'aggiunta di perossido d'idrogeno che provoca l'inizio della reazione enzimatica, l'assorbanza diminuisce. Si rileva il valore dell'assorbanza dopo 1 minuto di reazione. Tale valore esprime l'attività dell'enzima catalasi ed viene rapportato con i microgrammi di proteine presenti nei campioni, precedentemente quantificati con il reattivo di Bradford. Il risultato finale deriva dal seguente calcolo:

$$[(dA / \text{minuto}) / (\epsilon \times \text{fattore di diluizione} \times \text{ml di estratto})] / \mu\text{g proteine}$$

$$\text{dove } \epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

### 2.16.3 Glutazione perossidasi (GPx)

Per tali saggi sono stati utilizzati estratti intracellulari grezzi, ottenuti secondo la procedura descritta sopra

Le componenti della miscela di reazione, per 1 ml di volume finale, sono:

- buffer K-fosfato pH 7.0 125 mM
- cumene idroperossido 1.2 mM
- EDTA 1.25 mM
- sodio azide 1.25 mM
- GSH 1 mM
- NADPH 0.25 mM
- glutazione reduttasi di lievito 0.6 IU
- estratto enzimatico

Si prepara una miscela con tutti i reagenti eccetto il cumene idroperossido. Si lascia reagire per 10 minuti a temperatura ambiente. Poi si aggiunge il cumene idroperossido, che dà avvio alla reazione, determinando una diminuzione dell'assorbanza a 340 nm, che viene misurata dopo 15 min di reazione. I valori di assorbanza sono rapportati al contenuto proteico dei campioni, come descritto in precedenza, con  $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.17 Saggio per valutare la perossidazione lipidica

I radicali liberi rilasciati dalle fibre d'amianto possono danneggiare le macromolecole biologiche, tra cui i lipidi.

Modificando un protocollo già sperimentato con cellule in coltura, è stato messo a punto un test per valutare l'entità della perossidazione lipidica su miceli fungini cresciuti in assenza e in presenza di fibre di asbesto.

A questo scopo sono state allestite delle colture fungine di *F.oxysporum* e *V.leptobactrum* su terreno agarizzato (agar Sigma 1.8% malto Merk 2%). Sulle piastre di coltura sono stati depositati 3 ml di una sospensione 2.3% (w/v) delle diverse fibre in condizioni di sterilità. Sulle fibre è stata appoggiata una membrana di cellophan di dimensioni pari alla superficie della piastra (le membrane vengono bollite per 10 minuti in EDTA 0.38 g/l e sterilizzate a 120° C per 20 min prima dell'utilizzo). L'inoculo fungino, costituito da micelio su agar, viene fatto crescere sulle membrane, che lo separano fisicamente dalle fibre ma, grazie ad un cut off di 12-14kDa, consentono l'assorbimento di nutrienti dal terreno di crescita e l'interazione con il minerale tramite molecole solubili rilasciate dal micelio. Dopo incubazione con le fibre, i miceli vengono recuperati dalle piastre, immersi in una soluzione PBS pH=7 Triton X-100 5% e omogenati per 2 min l'utilizzo di un apparecchio Turax. Gli omogenati vengono centrifugati 30min a 13000g, e il test viene condotto sui surnatanti.

Un'aliquota del surnatante viene utilizzata per il dosaggio delle proteine (BCA protein assay kit, Pierce) secondo le indicazioni del fabbricante.

A 500 µl di surnatante (eventualmente diluito in modo che in ogni campione contenga la stessa quantità di proteine totali) si aggiungono 5 µl di Triton X-100 e 500 µl di soluzione di acido tiobarbiturico (TBA, costituita da uguali volumi di TBA 0,375 % in HCl 0.5 M e acido tricloroacetico (TCA) 30 % in HCl 0.5 M). I campioni vengono riscaldati a 100°C per 20 minuti, poi sottoposti a raffreddamento rapido e centrifugazione a 4°C per 5 min. 300 µl del surnatante sono caricati su una piastra da 96 pozzetti e si effettua la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 532 nm, con un lettore di micropiastre.

In questo test si valuta la formazione di malonildialdeide (MDA), un prodotto della reazione dei radicali con i lipidi. L'MDA forma un complesso con 2 molecole di TBA per dare un addotto che presenta un picco di assorbanza 532 nm.

Il risultato viene espresso come il rapporto tra le pmoli di MDA misurate e i mg di proteine totali presenti in ogni campione.

### 2.18 Determinazione spettrofotometrica del ferro nel terreno di coltura.

Dopo aver separato per filtrazione il micelio dal terreno di coltura, è stata utilizzata un'aliquota del filtrato, per determinare la quantità di ferro in essa presente. A questo scopo si è fatto uso della ferrozina (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid, Sigma), un chelante specifico per il Fe(II), in grado di formare con esso un complesso di colore viola intenso con un massimo di assorbimento a 562 nm. Data la specificità del chelante per il Fe(II), si è utilizzato acido ascorbico per ridurre preventivamente il Fe(III), e poi titolare il Fe totale in soluzione. Il metodo seguito è quello indicato da Lund and Aust (1990).

Strumento utilizzato: KONTRON Instrument UVIKON Spectrophotometer 930.

### 2.19 Determinazione complessimetrica del magnesio nel terreno di coltura.

Per la titolazione del magnesio nei filtrati colturali è stato scelto il metodo riportato sul testo Skoog and West (1976) che utilizza EDTA come titolante. Poiché l'EDTA possiede quattro protoni acidi, la formazione del complesso ione metallico/EDTA è dipendente dal pH. Per la titolazione del Mg<sup>2+</sup>, occorre usare una soluzione tampone a pH 10 affinché la formazione del complesso possa essere quantitativa.

Il punto finale della titolazione è determinato, dopo l'aggiunta della calmagite, che è in grado di formare con il Mg<sup>2+</sup> un chelato di colore rosa, dall'aggiunta di una soluzione di

EDTA a concentrazione nota: la calmagite subisce un cambiamento di colore quando il  $Mg^{2+}$  viene rilasciato per formare un chelato con l'EDTA e la titolazione si considera completa quando il colore della soluzione è stabilmente virato al blu.

I reagenti utilizzati sono: EDTA (acido etilendiaminotetracetico  $C_{10}H_{16}N_2O_8$  Merck) 1 mM; Calmagite (1-[1-Hydroxy-4-methyl-2-phenylazo]-2-naphthol-4-sulfonic acid Sigma, 0.05 g in 50 ml di acqua distillata).

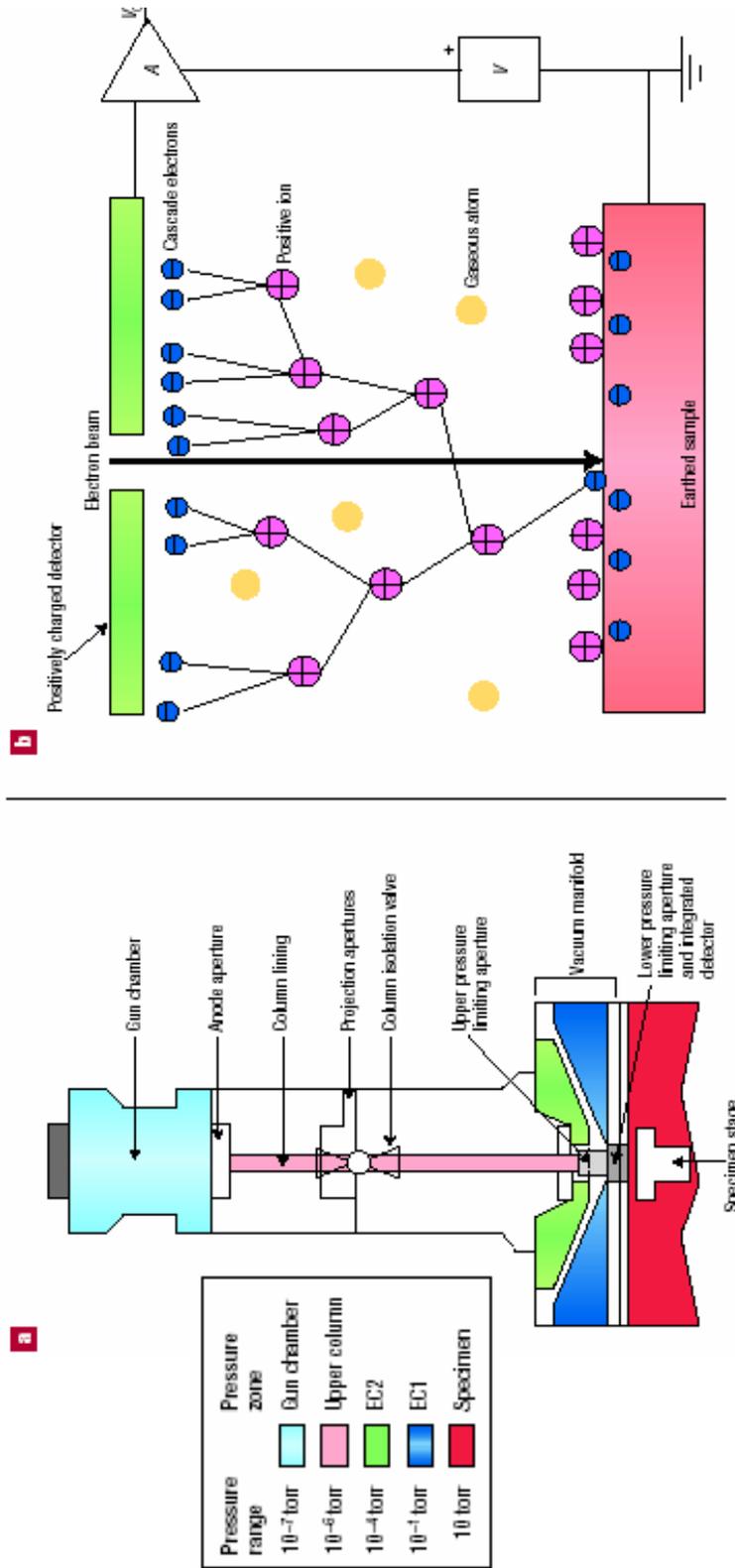
## 2.20 Analisi delle fibre al microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM)

Il microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM) è il diretto discendente del SEM convenzionale (CSEM), ma differisce da esso per due aspetti cruciali. Il primo è che invece di mantenere il campione sotto alto vuoto, esso viene osservato in un ambiente gassoso caratterizzato da una pressione di circa 10 torr: questo significa che se il gas utilizzato è vapor d'acqua, si possono osservare campioni idrati (compresi campioni di origine biologica) nel loro stato nativo, senza alcuna preparazione preliminare. La seconda importante differenza tra ESEM e CSEM è che non è necessario ricoprire il campione con uno strato metallico che ne aumenti la conduttività. Infatti quando gli elettroni primari inducono l'emissione di elettroni secondari dalla superficie del campione, questi collidono con le molecole d'acqua che lo circondano, che a loro volta perdono elettroni amplificando il segnale e trasmettendolo al detector. Le molecole d'acqua cariche positivamente a seguito della perdita di elettroni sono attratte e neutralizzano la superficie del campione carica negativamente (Athene M. Donald 2003). Nella figura 3.12 è mostrato uno schema dello strumento e del principio del suo funzionamento.

Sono stati osservati tre campioni:

- Micelio di *V.leptobactrum* immerso in terreno di coltura liquido Czapek-Glucosio 2% per 60 gg.
- Micelio di *V.leptobactrum* immerso in terreno di coltura liquido Czapek-Glucosio 2% e cresciuto per 60 gg a diretto contatto con fibre di crisotilo 6D proveniente dalla cava di Balangero.
- Fibre di crisotilo 6D proveniente dalla cava di Balangero e incubate per 60 gg nel solo terreno di coltura Czapek-glucosio 2%.

L'osservazione è stata condotta dalla Dott.ssa Putzu del Dipartimento di Traumatologia, Ortopedia e Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Torino, servizio di Tossicologia ed Epidemiologia Industriale. Lo strumento utilizzato è un SEM PHILIPS modello XL-30 ESEM corredato di microanalisi EDX Digital Controller a dispersione di energia.



**Figura 2.6: Schema dello strumento ESEM.** A) Nella colonna dell'ESEM vengono ammenute zone a pressione differente. La sorgente del fascio di elettroni viene mantenuta sotto alto vuoto, mentre un sistema di pompe e valvole permette di mantenere la camera di alloggiamento del campione ad una pressione di alcuni torr (1 torr = 133 Pa). B) L'amplificazione a cascata del segnale. Questo processo avviene nella camera in cui è alloggiato il campione, dove le molecole di gas (ad esempio acqua) sono ionizzate dagli elettroni emessi dal campione. Ogni collisione ionizzante dà origine ad una cascata di elettroni che, come gli elettroni originali, vengono accelerati verso il detector carico positivamente, andando incontro ad ulteriori collisioni durante il percorso (amplificazione). Gli ioni carichi positivamente generati dall'emissione di elettroni ritornano verso la superficie del campione, neutralizzandola. / **ESEM description.** Modified from Donald 2003.

## 2.21 Spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica.

La risonanza di spin elettronico (ESR) o risonanza paramagnetica elettronica (EPR) è una tecnica sperimentale utile all'identificazione e alla caratterizzazione di sistemi chimici aventi uno o più elettroni spaiati, ossia paramagnetici: in presenza di un campo magnetico esterno, il momento angolare ad essi associato (spin), può assumere degli orientamenti definiti, e gli elettroni si possono distribuire tra vari livelli energetici. Se irradiati ad adeguate lunghezze d'onda, gli elettroni possono compiere delle transizioni tra i livelli, che si manifestano come assorbimenti di energia originando uno spettro EPR.

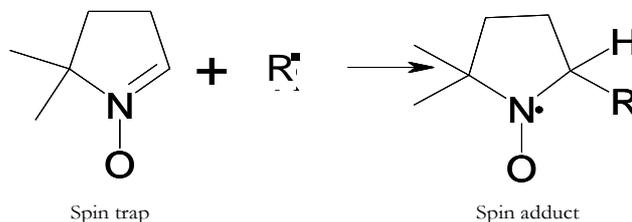
Le caratteristiche di uno spettro EPR dipendono dall'interazione tra i campi magnetici locali, generati da elettroni o nuclei con momento magnetico diverso da zero, o campi magnetici applicati, e l'elettrone spaiato in questione.

### *La tecnica dello spin-trapping.*

Lo spin-trapping è una tecnica indiretta per la determinazione quantitativa e qualitativa di radicali liberi in soluzione. Si tratta infatti di specie estremamente reattive ed instabili, che possono, in generale:

- ⇒ Ricombinarsi tra loro  $R^\bullet + R^\bullet \rightarrow R-R$
- ⇒ Reagire con altre molecole e dare reazioni a catena del tipo  $R^\bullet + A-H \rightarrow R-H + A^\bullet$
- ⇒ Acquisire elettroni liberi e trasformarsi in anioni  $OH^\bullet + e^- \rightarrow HO^-$

La tecnica si basa sulla reazione dei radicali liberi con molecole dette *spin-trap*: la formazione di un legame tra tali molecole e le specie radicaliche consente la delocalizzazione dell'atomo spaiato sulla molecola e la stabilizzazione del radicale stesso. La reazione produce quindi addotti la cui emivita è sufficientemente lunga da consentirne la determinazione. Negli esperimenti effettuati, è stata utilizzata la 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-ossido (DMPO), che va incontro a reazioni del tipo mostrato in figura 2.7.



**Figura 2.7 – Formazione di un addotto radicalico** tra la molecola DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-ossido) e una specie radicalica  $R^\bullet$  / **Radical adduct formation** between DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) and a radical specie  $R^\bullet$ .

In base al radicale  $R^\bullet$  e al tipo di interazione tra l'elettrone libero e i campi magnetici generati dai nuclei con  $spin \neq 0$  circostanti (in questo caso l'N), gli spettri hanno caratteristiche diverse e diventano l' "impronta" del radicale "intrappolato".

Il radicale  $OH^\bullet$  studiato negli esperimenti fatti, produce l'addotto mostrato in figura 2.8.

il cui spettro è costituito da quattro righe di intensità 1:2:2:1 che corrispondono alle transizioni tra i livelli energetici generati dall'accoppiamento dell'elettrone con l'atomo di azoto ( $I=1$ ) e con l'idrogeno in  $\beta$  ( $I=1/2$ ). Le costanti di accoppiamento sono uguali  $a_N = a_H = 14,9G$  e  $g=2.0054$ .

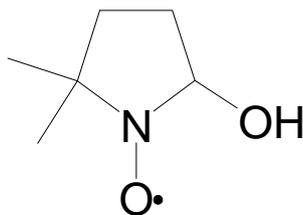
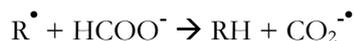


Figura 2.8 – Addotto formato dal radicale ossidrilico con il DMPO / Hydroxyl radical adduct with DMPO



Figura 2.9 – Spettro EPR dell'addotto [DMPO-OH]• / [DMPO-OH]• adduct EPR spectrum.

I radicali ossigenati sono molto reattivi: sono in grado di estrarre un atomo di idrogeno da diverse molecole. Per valutare la capacità di un sistema di provocare la rottura omolitica di legami in molecole organiche si ricorre ad un test in cui viene utilizzato il formiato di sodio, che può andare incontro alla reazione:



Dove R può essere un sito attivo alla superficie della fibra oppure un altro radicale, ad esempio in OH•. Questo test è rappresentativo di quello che può avvenire in vivo su molecole più complesse che però presentino un gruppo funzionale simile a quello del formiato, con un legame C-H labile.

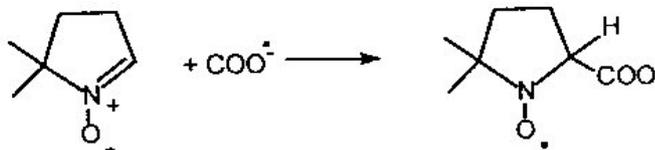


Figura 2.10 - Addotto formato dal radicale carbossilico con il DMPO / Carboxyl radical adduct with DMPO



Figura 2.11 - Spettro EPR dell'addotto [DMPO-CO<sub>2</sub>]• / [DMPO-CO<sub>2</sub>]• adduct EPR spectrum.

Il DMPO reagisce con il radicale carbossilico per dare l'addotto (figura 2.10). La concentrazione del formiato in soluzione è tale che la formazione del radicale carbossilico eccede rispetto a quella degli altri radicali per il segnale rilevato deriva dal solo addotto [DMPO-CO<sub>2</sub>]•, mentre i segnali di eventuali altri addotto non si rilevano.

Lo spettro è caratterizzato da sei righe di uguale intensità. (figura 2.11), date dall'interazione dell'elettrone spaiato con gli atomi di azoto e di idrogeno. Le costanti di accoppiamento sono  $a_N = 15.6$  G e  $a_H = 19$  G con  $g = 2.0055$ .

Gli spettri sono stati registrati utilizzando lo spettrometro PS100.X Adani EPR (centro del campo 3390 G, ampiezza della scansione 100G, Ampiezza della modulazione 1G; v. figura 4.13) oppure lo strumento Miniscope MS 100 (Magnettech, Berlin; centro del campo 3375 G, ampiezza della scansione 120G, ampiezza della modulazione 1G; v. figure 4.14 e 415).

### 2.21.1 Spin trapping: radicale ossidrilico

Il test per l'individuazione dei radicali ossidrilici da parte delle fibre di amianto, viene condotto in ambiente acquoso, in presenza di tampone fosfato a pH=7.4 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reazione viene fatta avvenire in un botticino scuro, in quanto il DMPO è fotosensibile. La formazione di OH• è seguita registrando gli spettri dell'addotto [DMPO-OH]• a 10, 30 e 60 minuti. I reattivi utilizzati sono:

- ⇒ 25 mg di solido
- ⇒ 0.5 ml di tampone fosfato 0.5 M
- ⇒ 0.5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.196 M
- ⇒ 0.250 ml DMPO 0.15 M (pre-filtrato su carbone vegetale per eliminare ogni traccia di impurezza)

### 2.21.2 Spin trapping: radicale carbossilico

La procedura per la rilevazione della formazione di radicali carbossilici da parte delle fibre di amianto, è simile a quella descritta per il radicale ossidrilico, salvo i reagenti in soluzione. In questo caso si utilizzano

- ⇒ 25 mg di solido
- ⇒ 0.5 ml di tampone fosfato 0.5 M
- ⇒ 0.5 ml di Formiato di sodio (COONa, Fluka)
- ⇒ 0.250 ml DMPO 0.15 M (pre-filtrato su carbone vegetale per eliminare ogni traccia di impurezza)

gli spettri dell'addotto [DMPO-CO<sub>2</sub>]• vengono registrati a 10, 30 e 60 minuti.

## 2.22 Saggio ossidazione DNA isolato.

Tale saggio permette di rilevare la 8-oxo-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxodGuo), marker dello stress ossidativo a carico del DNA. Il metodo si basa sull'incubazione di DNA

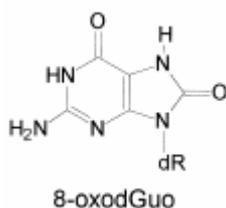


Figura 2.12 - 8-oxo-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8oxodGuo)

liofilizzato con una fonte di stress ossidativo: il DNA viene poi digerito enzimaticamente per ottenere i singoli nucleosidi, i quali vengono separati tramite un sistema di HPLC. La 8-oxodGuo è dosata tramite un sistema di rivelazione elettrochimico (EC). Tale sistema di rivelazione è costituito da tre elettrodi, di cui uno fa da riferimento mentre gli altri due (I e II), in serie l'uno rispetto all'altro, hanno un potenziale regolabile. Si tratta di un sistema

coulometrico, analogo, ma più sensibile dei sistemi amperometrici, in cui i composti cedono o acquistano elettroni (cioè si ossidano o riducono) sulla superficie di un elettrodo di lavoro: la corrente dovuta a questo passaggio elettronico è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Il principio della misura elettrochimica è quello di fissare l'elettrodo I (EI) ad un potenziale inferiore di quello del composto da dosare in modo che tutte le molecole più ossidabili e senza interesse vengano ossidate senza dare origine ad alcun segnale. L'elettrodo II (EII) è fissato ad un potenziale leggermente più elevato di quello del composto da dosare, in modo che questo si ossidi su EII generando una corrente proporzionale alla quantità di prodotto ossidato, che viene amplificata e registrata. Tale tecnica, accompagnata dall'utilizzo di standard esterni permette un dosaggio preciso delle basi modificate. In particolare per quantificare la 8oxodGuo si applica una potenziale di 200mV a EI e di 450 mV a EII. L'aggiunta di uno spettrofotometro UV in serie al rivelatore elettrochimico permette di quantificare le basi normali. Quindi il risultato ottenuto è il rapporto tra la quantità di guanosina ossidata e il totale di nucleosidi normali. La sensibilità di tale tecnica è di 1 lesione ogni 10<sup>6</sup> basi normali (Cadet *et al.*, 2003).

Sono stati condotti alcuni esperimenti per individuare le condizioni operative ottimali (v. figura 4.17). E' stato scelto il seguente protocollo sperimentale:

1. Incubazione (nell'ordine):

- DNA 0.05 mg/ml in NaCl 50 mM (liofilizzato da timo di vitello, Sigma)
- EDTA 1 mM in NaCl 50 mM
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM per la crocidolite (2 mM per il crisotilo)
- Fibre 2 mg/ml in NaCl 50 mM

Tempo di incubazione 4 h a temperatura ambiente.

2. Separazione delle fibre dal DNA (centrifugare 10 min 7500 g e recuperare il surnatante)

3. Precipitazione

- Aggiungere 0.1 vol NaCl 4M e 2.5 vol etanolo 100%
- Raffreddare 10 min a -20°C e riportare a temperatura ambiente.
- Centrifugare 5 min 7500 g ed eliminare il surnatante
- Risospendere in 100 µl di etanolo 70 % e agitare
- Centrifugare 5 min 7500 g ed eliminare il surnatante
- Lasciare asciugare i pellet 10 min
- Risospendere i pellet di DNA in 100 µl Deferoxamina 0.1 M e conservare a -20°C

4. Digestione enzimatica

- Nucleasi P1 (Roche): aggiungere 2U enzima ogni 100 µl campione in buffer 10X acetato di ammonio/Zn pH= 5.3 ed incubare 2h 37°C.
- Fosfatasi alcalina (Sigma): aggiungere 4U enzima ogni 100 µl di campione in buffer 10X ed incubare 1h 37°C.

Trasferire in tubi di vetro per HPLC e conservare a -20°C

5. HPLC-EC

I campioni sono sottoposti a separazione in una colonna di gel di silice a fase inversa di tipo C18 (Uptisphere, 5 µM, 4.6 mm x 250 mm), in una fase mobile costituita da un tampone KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Riedel-de Haën) 25 mM contenente l'8% di metanolo. Il flusso è fissato a 1 ml/min. La 8oxodGuo è misurata utilizzando un rivelatore di tipo colorimetrico (Coulchem II) dotato di una cella elettrochimica 5011 (ESA, Chelmsford, MA). Il potenziale degli elettrodi è fissato a 200 e 450 mV. Un rivelatore UV (Waters 484, Millipore) impostato a 280 nm permette di rivelare la presenza di nucleosidi normali. Vengono utilizzate delle soluzioni calibrate di

8oxodGuo e dGuo come standard per quantificare rispettivamente il nucleoside ossidato e normale nei campioni analizzati.

### 2.23 Test cellulari di genotossicità delle fibre di asbesto.

Al fine di testare l'ossidazione del DNA cellulare, sono state allestite colture cellulari utilizzando due linee: HL60 e A549. Tutti i prodotti utilizzati per le colture cellulari sono stati acquistati presso Life Technologies Invitrogen (Cergy, Pontoise, France).

#### 2.23.1 Allestimento delle colture cellulari e incubazione con fibre di asbesto.

Le cellule HL60 sono state coltivate in un terreno RPMI 1640 con aggiunta di HEPES e Glutamax, siero fetale bovino inattivato 10%, streptomina 50 µg/ml, penicillina 50 U/ml, cirpofloxacina 10 µg/ml. Il differenziamento è indotto trattando le cellule con forbol-miristato acetato (Sigma) 250 nM per 20 h. Il trattamento con fibre di asbesto ha comportato l'aggiunta di una sospensione di fibre al termine delle 20 h di differenziamento e per un tempo di 8 o 24 h al termine del quale le cellule sono state raccolte utilizzando una soluzione di tripsina/EDTA e con l'aiuto di una spatola. La sospensione cellulare è stata sottoposta a due lavaggi successivi in PBS e centrifugata per ottenere un pellet cellulare che è stato congelato a -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Le cellule A549 sono state coltivate in HAM-F12 con Glutamax, siero fetale bovino inattivato 10%, streptomina 100 µg/ml, penicillina 100 U/ml. Prima che le cellule raggiungessero la subconfluenza, è stata aggiunta una sospensione di fibre per un'incubazione di 24 h. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state staccate dalle piastre con una soluzione di tripsina/EDTA, e la sospensione cellulare ottenuta è stata trattata come nel caso delle HL60.

#### 2.23.2 Test MTT di misura della citotossicità.

L'MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) è un composto solubile in acqua e di colore giallo, che, se aggiunto ad una coltura cellulare, viene ridotto dagli enzimi mitocondriali, diventando insolubile e acquisendo un colore blu-viola. Tale reazione avviene solo nelle cellule vitali, e ciò permette di avere un test colorimetrico di vitalità, che viene espressa in percentuale rispetto ad un controllo che rappresenta il 100%.

Il test di citotossicità è stato utilizzato per verificare la vitalità cellulare al termine delle incubazioni in presenza di fibre di amianto.

Il test viene condotto in piastre Petri di 35 mm di diametro. Il numero di cellule seminate e la quantità di fibre dipende dall'estensione della superficie della piastra, nel rispetto delle proporzioni utilizzate durante i test di genotossicità delle fibre. Il controllo è costituito da cellule mantenute per un uguale periodo di tempo in assenza di fibre. Vengono preparate tre piastre per ogni tipo di fibra testata, e in parallelo tre piastre di cellule senza fibre. Al termine del periodo di incubazione si aggiungono ad ogni piastra 200 µl di MTT (5 mg/ml in PBS). Dopo 2 h di reazione in incubatore, si elimina il terreno di coltura, le piastre vengono sciacquate con 1 ml di PBS e vengono aggiunti 3 ml di DMSO (dimetilsolfossido) per sciogliere l'MTT diventato insolubile, per un tempo di 20 minuti. In seguito il surnatante di ogni piastra viene trasferito in un tubo e centrifugato a 2500 rpm per 3 minuti in modo da far precipitare eventuali fibre risospese nella soluzione rendendola limpida. Si legge l'assorbanza di tale soluzione a 570 nm utilizzando un lettore di micropiastre. Il bianco di lettura è costituito da DMSO solo.

### 2.23.3 Estrazione del DNA cellulare

Il protocollo consiste di due tappe:

#### 1. Lisi delle membrane

Lisi delle membrane plasmatiche: il pellet cellulare è risospeso in 0.75 ml di un tampone A (desferriossamina 0.1 mM, saccarosio 320 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris/HCl 10 mM, Triton X-100 1% v/v, pH 7.5) e omogeneizzato in un potter. Tale sospensione viene centrifugata 5 min a 1500 g a 4°C. Il surnatante viene eliminato e il pellet nuovamente risospeso in 0.75 ml di tampone A e centrifugato 5 min a 1500 g a 4°C.

Lisi delle membrane nucleari: il pellet ottenuto è risospeso in 0.3 ml di un tampone B (DFX 0.15 mM, EDTA 5 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 8) tramite agitazione su un vortex. Vengono aggiunti 18 µl di SDS 10% e la sospensione è di nuovo mescolata utilizzando un vortex.

#### 2. Isolamento degli acidi desossiribonucleici.

Degradazione dell'RNA per via enzimatica: si aggiungono 3 µl di RNAsi A (100 mg/ml, Sigma) e 3.5 µl di RNAsi T1 (1 U/ µl, Roche) e i campioni vengono incubati per 15 min a 50° C. Successivamente si aggiungono 15 µl di proteasi (20 mg/ml, Qiagen) e si lascia incubare 1 ora a 37° C.

Precipitazione del DNA: si aggiungono 0.6 ml di una soluzione di NaI (NaI 7.6 M, EDTA 20 mM, Tris/HCl 40 mM, DFX 0.3 mM, pH 8) e 1 ml di isopropanolo 100%. I campioni sono agitati dolcemente per inversione dei tubi, per permettere la precipitazione del DNA. In seguito vengono centrifugati 5 min a 5000 g e il surnatante viene eliminato. Seguono lavaggi successivi in isopropanolo 40% e etanolo 70%, dopo il quale si elimina accuratamente l'alcool residuo e lo si lascia evaporare, senza però lasciar essiccare i pellet di DNA, che verranno risospesi in 100 µl di una soluzione di DFX 0.1 mM ed eventualmente congelati a -20° C.

### 2.23.4 Digestione enzimatica del DNA di origine cellulare.

Ad ogni campione contenente DNA di origine cellulare risospeso in 100 µl di DFX 0.1 mM, si aggiungono 0.5 µl di fosfodiesterasi II (0.1 U/µl, Sigma), 0.5 µl di DNAsi II (10 U/µl, Sigma), 5 µl nucleasi PI (0.2 U/µl in un tampone 300 mM acetato di ammonio, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, pH 5.3; MP Biomedicals), 5 µl di un tampone MN/SPDE (200 mM acido succinico, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6) e si lascia incubare per 2 ore a 37° C.

Poi si aggiungono 12 µl di un tampone per la fosfatasi alcalina (Palk: 500 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), 0.04 µl di fosfatasi alcalina (100 U/µl, Sigma) e 1 µl di fosfodiesterasi I (0.03 U/µl, USB). Si lascia incubare per 2 ore a 37° C, si aggiungono 7 µl di HCl 0.1 N e si centrifuga 5 min a 5000 g per far precipitare le fibre (nei campioni che le contengono). Il surnatante, contenente i nucleosidi, viene sottoposto ad analisi HPLC-EC (v. par. 2.21).

## 2.24 Comet assay

Tale tecnica permette di quantificare gli eventi di rottura delle eliche del DNA, sulla base dell'osservazione della migrazione della molecola stessa in un gel di agarosio in cui vengono incluse le cellule.

Sono state preparate delle colture di cellule A549 esposte a fibre secondo la modalità descritta al paragrafo 22.2.1. Al termine dell'incubazione le cellule sono state recuperate e 50 µl di sospensione cellulare contenente 15000 cellule è stata aggiunta a 450 µl di una soluzione di Low Melting Agarose (Promega) 0.6% in PBS, mantenendola a 37 °C. 100 µl di tale sospensione sono stati poi depositati su un vetrino portaoggetti zigrinato precedentemente preparato con due strati di agarosio 1% (per ogni ripetizione sono stati preparati tre vetrini) e il

tutto appoggiato per 10 min su uno strato di ghiaccio affinché l'agarose si indurisse, con le cellule incluse. I vetrini sono poi stati immersi per una notte in un tampone di lisi (44.5 ml di una soluzione a pH 13 costituita da NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10 mM, sodio-lauril-solfato 10g/l, NaOH q.b.; 5 ml DMSO; 0.5 ml Triton X-100). Successivamente essi sono stati trasferiti in un apparecchio per l'elettroforesi e immersi in un tampone di migrazione (30g NaOH, 5 ml EDTA 0.5M pH 8, 2.5 l H<sub>2</sub>O). Dopo 40 min di stabilizzazione si è dato avvio alla migrazione del DNA, durata 30 min sotto una corrente di 300A e un potenziale di 25V. Al termine della corsa i vetrini sono sottoposti a tre lavaggi in Tris-HCl 0.4 M pH 7.4. Ogni vetrino è stato coperto con 50 µl di bromuro di etidio (1 mg/ml) diluito 1:300 in PBS e con un coprioggetto. I vetrini possono essere conservati su carta umida fino al momento dell'osservazione al microscopio a fluorescenza. Un software (KOMET 3.0) gestisce l'analisi delle immagini e la quantificazione della distribuzione della luminescenza, corrispondente al DNA marcato con bromuro di etidio, nel nucleo delle cellule piuttosto che nel gel. Tanto maggiore è il numero di eventi di rottura dell'elica del DNA, quanto maggiore sarà la migrazione del DNA stesso al di fuori del nucleo. Il risultato è espresso come estensione della zona di migrazione del DNA ed è la media di 50 cellule osservate.

### **2.25 Analisi statistica**

L'analisi statistica di tutti i dati presentati in questa tesi è stata effettuata utilizzando il programma ANOVA con il Tukey test come post-hoc test. Sono state considerate significative le differenze con  $P < 0.05$ . Tutti gli esperimenti illustrati sono stati ripetuti almeno 3 volte ed i grafici riportano la media ottenuta dalle tre ripetizioni, con la visualizzazione grafica della deviazione standard.

## Capitolo 3

### Isolamento di ceppi fungini da suoli serpentinitici

#### **Résumé**

La présence de serpentinites dans la surface lithosphérique est à l'origine de contaminations naturelles en amiante. Ces sites sont écologiquement importants car ils comprennent de hautes concentrations en métaux lourds dans le sol et, par conséquent, ils sont composés d'une flore et d'une microfaune adaptées à la croissance sur ces substrats riches en métaux lourds.

L'analyse de la communauté fongique trouvée dans les sols serpentinitiques a permis d'identifier les espèces les plus abondantes sur ce substrat et de tester leurs capacités d'interactions avec les fibres d'amiantes (voir chapitre 4).

Le premier site étudié correspond à une ancienne mine d'amiante, pour laquelle *Verticillium leptobactrum* semble être l'espèce fongique dominante. Cette espèce a aussi été isolée dans autres sites serpentinitiques des Alpes de l'Ouest. Au contraire, *V. leptobactrum* n'a pas été isolé à partir de sols serpentinitiques d'autres origines géographiques. En fait, cette espèce n'avait jusque là été que rarement isolée, ce qui rend ces résultats intéressants.

L'identification morphologique de *V. leptobactrum* a été confirmée par l'identification moléculaire. En effet, l'analyse *Neighbour joining* a montré que les séquences de l'ADN ribosomal, obtenus à partir des isolats provenant des sols serpentinitiques, forment un unique *cluster* incluant la séquence de *V. leptobactrum* présente dans la banque de donnée Genbank, confirmant ainsi l'appartenance des isolats à l'espèce *V. leptobactrum*. Ce *cluster* est phylogénétiquement proche, mais distinct, des *clusters* formés par les autres espèces du genre *Verticillium*. Enfin, il n'existe pas de correspondance entre les *clusters* formés par les séquences des isolats et leur origine géographique.

#### **Abstract**

Areas where serpentinites are present on the lithosphere surface (ophiolitic sites) are naturally interested by asbestos contamination. These sites are ecologically important because the peculiarity of the mineral substrate results in a high concentration of heavy metals in the soil and, consequently, in the presence of a special flora and microflora adapted to grow on heavy metal rich substrates.

The analysis of the fungal community dwelling in serpentine soils was aimed to identify the most abundant species in this substrate and to test their ability to interact with asbestos fibres (for this part, see chapter 4).

The first site considered was the detritus from a dismissed asbestos mine, that yielded as dominant *Verticillium leptobactrum*, a species which was subsequently isolated from other serpentine substrates in the Western Alps. This species was not isolated from serpentinites of different geographical origin. *V. leptobactrum* raised particular interest because it has been seldom isolated before.

This fungal species was identified by both morphological and molecular criteria. Neighbour joining analysis showed that ribosomal DNA sequences obtained from the strains isolated from serpentinites form a cluster that includes a recognized *V. leptobactrum* sequence from databases, thus confirming the identity of the field isolates. This cluster is

phylogenetically close to, but distinct from, clusters formed by other species previously comprised in the genus *Verticillium*. There is no correspondence between sequences clustering and the geographical location of isolation sites.

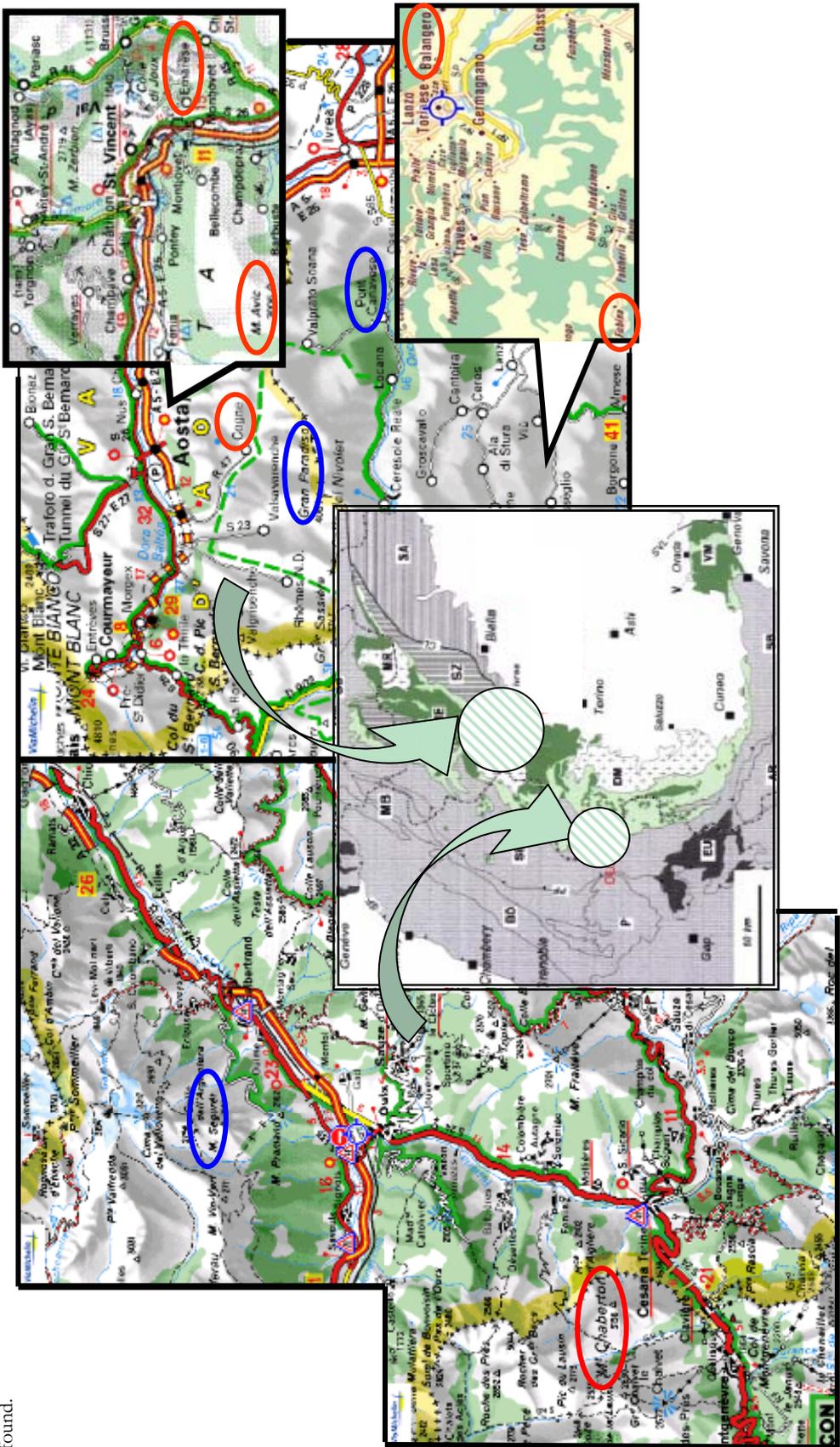
### 3.1 Introduzione

Nell'ottica di attuazione di un processo di biorisanamento, si possono scegliere diverse strategie. Una di queste è la selezione *in vitro* di microrganismi esogeni con le caratteristiche metaboliche di interesse e il successivo inoculo nel terreno in aggiunta ai microrganismi già presenti (*bioaugmentation*, Agathos, 2005). Oppure si può caratterizzare la comunità microbica endogena, già adattata alle caratteristiche del sito contaminato, selezionando ceppi di interesse sulla base delle loro capacità degradative/detossificanti nei confronti dell'inquinante e del vantaggio competitivo rispetto ad altri microrganismi. Questi ceppi possono essere reintrodotti nel terreno dopo isolamento e preparazione *in vitro* dell'inoculo, per favorire il loro sviluppo. In questa seconda prospettiva è importante conoscere le caratteristiche della comunità microbica dell'area di interesse.

A questo scopo la prima tappa di questa ricerca è stata l'isolamento di funghi coltivabili *in vitro*, a partire da campioni di suolo contaminato.

Sono stati raccolti campioni di rocce e detriti rocciosi da aree caratterizzate da affioramenti di serpentiniti (figura 3.1). Tali rocce appartengono alla famiglia delle ofioliti (dette anche pietre verdi, rocce di origine metamorfica derivanti da peridotiti, gabbri o basalti) che sono costituite in proporzioni diverse da minerali quali albite, anfiboli, clorite, plagioclasio, epidoto, serpentino. I minerali classificati come asbesti si distribuiscono nelle due famiglie degli anfiboli e dei serpentini. I primi sono silicati idrati di Ca, Mg, Fe e Al, mentre i serpentini sono silicati idrati di Mg.

**Figura 3.1 - Aree di campionamento:** sono indicati in rosso alcuni i siti in cui è stato isolato *Verticillium leptobactrum*, in blu siti in cui non è stato isolato il ceppo. Nella cartina geologica al centro della figura è messa in evidenza in colore verde la Zona Piemontese dei calcescisti (verde chiaro) con ofioliti metamorfiche (verde scuro) che contiene la maggior parte delle masse di serpentiniti. / **Sampling zones:** the sites in which *Verticillium leptobactrum* was isolated from soil are marked in red, while in blue are the sites in which it was not isolated. In the centre a geologic map shows in green the Piedmont Zone of the Calceschists (light green) with meta-ophiolites (dark green) where mass of serpentinites can be found.



Località	Descrizione della zona di prelievo e del campione	Numero campioni
1. Balangero (ex-cava di amianto)	detrito di rocce contenenti crisotilo e balangeroite, area campionata 2 km <sup>2</sup>	34
2. Val di Cogne (Vallone delle acque rosse)	Rocce serpentinitiche	1
3. Emarese (Val d'Aosta)	Detrito di rocce serpentinitiche	1
4. Emarese (Val d'Aosta)	roccia serpentinitica	2
5. Emarese (Val d'Aosta)	Roccia contenente serpentino e clorite (fillo silicato di ferromagnesio)	1
6. Parco del Mt. Avic, Col de la Croix (Val d'Aosta)	area di affioramenti serpentinitici, raccolta di detrito roccioso, area campionata 500 m <sup>2</sup>	12
7. Fubine (Val di Lanzo)	area di affioramenti serpentinitici, raccolta di detrito roccioso, area campionata 500 m <sup>2</sup>	9
8. M.te Chaberton	Detrito di calcari magnesiaci misti a metabasiti	1
9. Cina (Cava di Suoloshu)	Roccia (peridotite)	1
10. Cina (Cava di Suoloshu)	Roccia (serpentinite)	2
11. Parco dell'Orsiera (Val di Susa)	Calcescisti	1
12. M.te Seguret (alta val di Susa, Salbertrand)	Calcescisti zona vegetata ( <i>Pinus silvestris</i> )	2
13. M.te Seguret (alta val di Susa, Salbertrand)	Calcari: detrito da pietraia, non vegetati	2
14. Valle dell'Orco (Sparone, Pont Canavese, Sesia-Lanzo)	Micascisti eclogitici (detrito)	1
15. Valle dell'Orco (Sparone, Pont Canavese, Sesia-Lanzo)	gneiss minuti (detrito)	1
16. Gran Paradiso (Val d'Aosta)	gneiss (detrito)	1

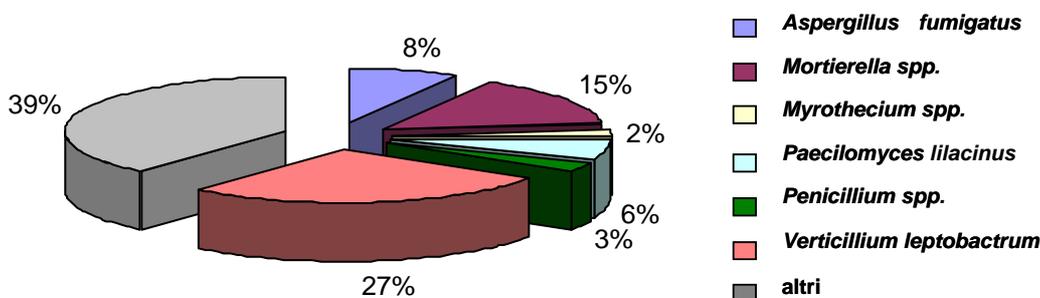
**Tabella 3.2 - Descrizione dei siti di campionamento.** *V. leptobactrum* è stato isolato dai campioni 1-8, ma non dagli altri campioni. / **Sampling sites description.** *V. leptobactrum* was isolated from samples 1-8, but not from the others.

### 3.2 Descrizione campioni utilizzati.

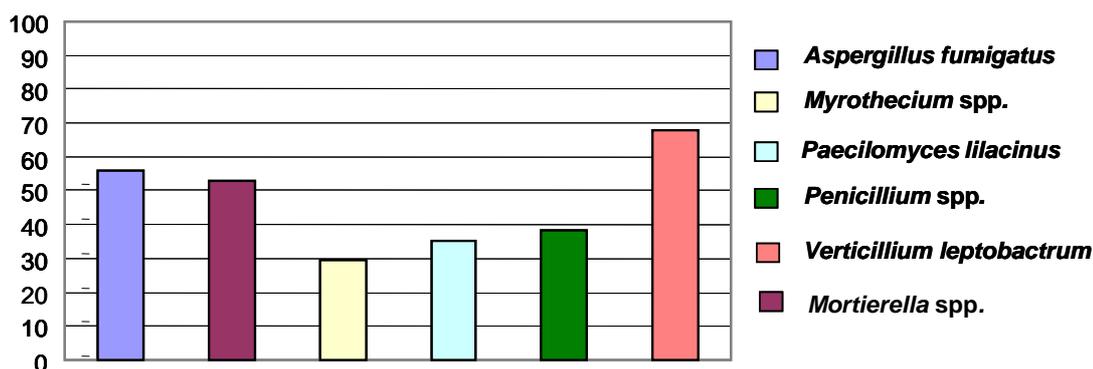
Sono stati campionati diversi siti dislocati tra il Piemonte e la Valle d'Aosta (figura 3.1), nell'area geografica descritta geologicamente come complesso piemontese dei calcescisti con pietre verdi. In particolare grazie alla collaborazione con la società RSA, che gestisce la miniera di Balangero, è stato effettuato un campionamento del suolo della cava, situata all'interno del massiccio ultrabásico di Lanzo, sito tipicamente serpentinitico, ricco di crisotilo a fibra corta e lunga associato ad una varietà di fibra di colore bronzeo detta balangeroite ed appartenente alla famiglia degli anfiboli. Dato il particolare interesse per la comunità fungina in grado di crescere naturalmente in presenza di rocce serpentinitiche, nella raccolta dei campioni di suolo è stata privilegiata la componente detritica, costituita principalmente da frammenti di rocce e raccolta in zone scarsamente o per nulla vegetate. Per confronto sono stati raccolti campioni di terriccio umido e vegetato nelle stesse aree di campionamento. Inoltre sono stati raccolti frammenti di rocce mineralogicamente diverse dalle rocce serpentinitiche, per evidenziare eventuali differenze nella comunità fungina associata. Infine sono state prese in considerazione rocce serpentinitiche e peridotiti (rocce ignee ultramafiche, contenenti olivine e pirosseni; sono protoliti delle serpentiniti) provenienti dalla Cina (Cava di Suoloshu, Rizhao County, Su-Lu meridionale, Regione del Shandong) cortesemente fornite dal prof. Compagnoni del Dipartimento di Scienze Mineralogiche e Petrologiche, Università di Torino. Dopo il prelievo nei siti in Piemonte e della Valle d'Aosta, i campioni sono stati conservati a

4°C fino al momento degli isolamenti. I campioni sono descritti nella tabella 3.2.

Dai campioni di terriccio, pietrisco e rocce prelevati nei vari siti si è proceduto all'isolamento dei funghi coltivabili presenti tramite la tecnica delle 'dilution plates' (v. paragrafo 2.2). Per ogni campione sono state preparate due piastre a partire da una sospensione in acqua del campione corrispondente ad una diluizione 1:500 (p/v) di detrito/suolo in acqua (1:1000 per i campioni presumibilmente più ricchi). In seguito alla crescita delle colonie fungine nelle piastre, si è proceduto al conteggio delle CFU (*colony forming units*) e all'identificazione morfologica delle colonie isolate.



**Figura 3.3 - Abbondanza percentuale** delle CFU (*Colony Forming Units*) isolate, tramite la tecnica delle *dilution plates*, dai campioni di suolo/detrito prelevati dall'ex cava di Balangero / **Abundance** of colony forming units (CFU, % of the total number) isolated by *dilution plates* from samples of rocks and soil collected in the Balangero mine.



**Figura 3.4 - Frequenza percentuale** (% del numero totale di campioni) delle specie isolate nei campioni di suolo/detrito prelevati dall'ex cava di Balangero, tramite la tecnica delle *dilution plates*. / **Frequency** (% of total number of samples) of the isolated species in the rocks and soil samples collected in the Balangero mine.

Il campionamento nella ex-cava di Balangero effettuato ha interessato un'area ampia circa 2 km<sup>2</sup>, sono stati prelevati 34 campioni di detrito e sono state isolate 888 CFU, riconducibili a circa 60 specie diverse. I generi *Mortierella*, *Myrothecium* e *Penicillium* e le specie *Verticillium leptobactrum*, *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces lilacinus* sono risultati dominanti sia per abbondanza (figura 3.3) sia per frequenza (figura 3.4).

Alcuni ceppi appartenenti a questi gruppi tassonomici sono stati successivamente studiati per le loro caratteristiche funzionali nelle prove di interazione *in vitro* con fibre di asbesto. Di particolare interesse è *V. leptobactrum*, in quanto si tratta di una specie segnalata solo sporadicamente da substrati vari, che invece è risultata la più abbondante e frequente nella cava di Balangero.

Alla luce dei risultati del campionamento che ha interessato l'area della ex-cava di Balangero sono stati condotti nuovi isolamenti della componente fungina da suoli serpentinitici scelti in Valle d'Aosta (Valle di Cogne e Emarese) e da campioni di rocce provenienti dalla Cina, per un totale di 8 campioni diversi. La tabella 3.5 riporta i risultati dell'identificazione morfologica dei ceppi fungini isolati con la tecnica delle *dilution plates* dai campioni di roccia raccolti in Valle d'Aosta, mentre la tabella 3.6 si riferisce ai campioni provenienti dalla Cina. Le specie identificate sono elencate in ordine di abbondanza e di frequenza nei campioni considerati.

Gli isolamenti condotti a partire dai campioni provenienti dalla Valle d'Aosta rivelano nuovamente la dominanza della specie *Verticillium leptobactrum*, presente nel 100% dei campioni considerati ed estremamente abbondante. E' stata inoltre identificata la specie *Penicillium citreoviride*, meno abbondante di *V. leptobactrum* ma presente in tutti i campioni. Infine, sono state isolate varie specie dei generi *Cladosporium* (per la gran parte *C. cladosporiodes*), *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Epicoccum* e *Alternaria*.

I risultati ottenuti dai campioni provenienti dalla Cina mostrano la dominanza del genere *Penicillium* ed in particolare di *P. citrinum*, anche se molti ceppi isolati devono essere ancora identificati. Alcune specie si ritrovano in entrambe le liste: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Epicoccum purpurescens*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium pinophilum* ed in particolare *Penicillium citreoviride* sebbene sia stato molto meno frequentemente isolato dai campioni cinesi che da quelli valdostani.

**Tabella 3.5 - Elenco floristico delle specie isolate da campioni raccolti in Valle d'Aosta.** Le specie identificate sono elencate in ordine di abbondanza e di frequenza nei campioni considerati. / **Floristic list of the species isolated from Valle d'Aosta samples.** Species are listed according to decreasing abundance and frequency.

SPECIE	Valori assoluti			Valori percentuali		
	Totali CFU	numero campioni positivi	numero piastre positive	Abbondanza %	Frequenza a su campione %	Frequenza su piastra %
<i>Verticillium leptobactrum</i>	1650	5	15	80.68	100	88.24
<i>Penicillium citreoviride</i>	167	5	15	8.17	100	88.24
<i>Cladosporium</i> spp. (non <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. herbarum</i> )	29	5	8	1.42	100	47.06
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	23	2	6	1.12	40	35.29
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	19	3	4	0.93	60	23.53
<i>Paecilomyces farinosus</i>	16	1	1	0.78	20	5.88
<i>Penicillium chrysogenum</i>	15	5	9	0.73	100	52.94
<i>Epicoccum purpurescens</i>	14	2	5	0.68	40	29.41
<i>Alternaria alternata</i>	8	3	5	0.39	60	29.41
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	1	1	0.39	20	5.88
<i>Verticillium lecanii</i>	6	1	1	0.29	20	5.88
Sferopsidale	5	1	2	0.24	20	11.76
<i>Cytospora</i> sp.	4	1	1	0.20	20	5.88
<i>Fusarium oxysporum</i>	3	2	2	0.15	40	11.76
<i>Coniothyrium fuckelii</i>	3	2	2	0.15	40	11.76
Micelio sterile demaziaceo 2	3	1	2	0.15	20	11.76
<i>Cladosporium herbarum</i>	2	2	2	0.10	40	11.76
<i>Penicillium oxalicum</i>	2	2	2	0.10	40	11.76
<i>Nigrospora</i> sp.	2	1	2	0.10	20	11.76
<i>Rhizoctonia</i> sp.	2	1	2	0.10	20	11.76
<i>Fusarium solanii</i>	2	1	1	0.10	20	5.88
Micelio sterile demaziaceo 6	2	1	1	0.10	20	5.88
<i>Phoma</i> sp. 1	2	1	1	0.10	20	5.88
<i>Arthrinium</i> sp.	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Aspergillus flavus</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Aspergillus niger</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Aspergillus</i> sp.	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Coniothyrium</i> sp.	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Curvularia lunata</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Drechslera bisptata</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Fusarium</i> sp.	1	1	1	0.05	20	5.88
Micelio sterile demaziaceo 1	1	1	1	0.05	20	5.88
Micelio sterile demaziaceo 3	1	1	1	0.05	20	5.88
Micelio sterile demaziaceo 4	1	1	1	0.05	20	5.88
Micelio sterile demaziaceo 5	1	1	1	0.05	20	5.88
Micelio sterile moniliaceo 1	1	1	1	0.05	20	5.88
Micelio sterile moniliaceo 2	1	1	1	0.05	20	5.88

SPECIE	Valori assoluti			Valori percentuali		
	Totali CFU	numero campioni positivi	numero piastre positive	Abbondanza %	Frequenza a su campione %	Frequenza su piastra %
Micelio sterile moniliaceo 3	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Penicillium griseofulvum</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Penicillium</i> sp.1	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Penicillium</i> sp.2	1	1	1	0.05	20	5.88
<i>Verticillium catenulatum</i>	1	1	1	0.05	20	5.88
Zigomicete	1	1	1	0.05	20	5.88
Non identificati	35	4	8	1.71	80	47.06

**Tabella 3.6 - Elenco floristico delle specie isolate da campioni raccolti in Cina.** Le specie identificate sono elencate in ordine di abbondanza e di frequenza nei campioni considerati. / **Floristic list of the species isolated from China samples.** Species are listed according to decreasing abundance and frequency.

SPECIE	Valori assoluti			Valori percentuali		
	Totali CFU	numero campioni positivi	numero piastre positive	Abbondanza %	Frequenza su campione %	Frequenza su piastra %
<i>Penicillium citrinum</i>	17	2	4	14.05	67	44
<i>Penicillium waksmanii</i>	11	1	1	9.09	33	11
<i>Penicillium</i> sp. 1	8	1	1	6.61	33	11
<i>Cladosporium</i>	6	2	4	4.96	67	44
<i>Penicillium simplicissimum</i>	6	1	1	4.96	33	11
<i>Alternaria alternata</i>	4	2	4	3.31	67	44
<i>Penicillium pinophilum</i>	4	2	3	3.31	67	33
<i>Penicillium brevicompactum</i>	4	2	2	3.31	67	22
<i>Penicillium diversum</i>	4	1	2	3.31	33	22
<i>Penicillium oxalicum</i>	4	1	2	3.31	33	22
<i>Penicillium citreoviride</i>	4	1	1	3.31	33	11
<i>Penicillium</i> sp. 2	4	1	1	3.31	33	11
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	1	1	1.65	33	11
<i>Aspergillus monoseriato</i>	2	1	1	1.65	33	11
<i>Penicillium islandicum</i>	2	1	1	1.65	33	11
<i>Penicillium paxilli</i>	2	1	1	1.65	33	11
<i>Phoma medicagenis</i> var. <i>pinodella</i>	2	1	1	1.65	33	11
<i>Acremonium murorum</i>	1	1	1	0.83	33	11
<i>Aspergillus niger</i>	1	1	1	0.83	33	11
<i>Aspergillus</i> sp. 1	1	1	1	0.83	33	11
<i>Aspergillus ornatus</i>	1	1	1	0.83	33	11
<i>Cytospora</i> sp.	1	1	1	0.83	33	11
<i>Epicoccum purpurescens</i>	1	1	1	0.83	33	11
<i>Penicillium</i> sp. 3	1	1	1	0.83	33	11

SPECIE	Valori assoluti			Valori percentuali		
	Totali CFU	numero campioni positivi	SPECIE	Abbondanza %	Frequenza su campione %	Frequenza su piastra %
<i>Penicillium</i> sp. 4	1	1	1	0.83	33	11
<i>Penicillium</i> sp. 5	1	1	1	0.83	33	11
Non identificati	26	3	7	21.49	100	78

Un analogo lavoro di isolamento di ceppi fungini del suolo tramite “*dilution plates*” è stato condotto utilizzando rocce serpentinitiche di provenienza diversa (campioni 6-7 tabella 3.2) e rocce di natura diversa dalle serpentiniti (campioni 8-16 tabella 3.2) allo scopo di verificare l'eventuale presenza della specie di interesse *V. leptobactrum*. Per questi campioni quindi, dopo una prima osservazione delle piastre di isolamento, si sono prese in considerazione solo le colonie morfologicamente simili a quelle di *V. leptobactrum*.

*V. leptobactrum* è stato isolato da campioni di rocce o frammenti di rocce serpentinitiche raccolte al Col de La Croix, all'interno del Parco Naturale del Mt. Avic, in Valle Chalamy e da un'area scelta nel territorio del comune di Fubine, entrambe collocate nell'ambito della Zona Piemontese dei calcescisti con ofioliti (dette anche pietre verdi). Inoltre esso è stato isolato da campioni misti di calcari magnesiaci e metabasiti raccolti sul Mt. Chaberton, ma da nessuno degli altri campioni scelti per la mineralogia diversa dalle rocce serpentinitiche (raccolte in Valle di Susa e in località Pont-Canavese).

La presenza di un determinato fungo in un suolo può essere influenzata da moltissimi fattori (ad esempio disponibilità di nutrienti e acqua, temperatura, interazioni con altri microrganismi o piante). L'isolamento da rocce prevalentemente calcaree, ma ricche di magnesio (Mt. Chaberton) ha indotto a ipotizzare una correlazione della presenza di *V. leptobactrum* con il chimismo del substrato in quanto i minerali che costituiscono le rocce serpentinitiche (come ad esempio il crisotilo) sono ricchi di magnesio.

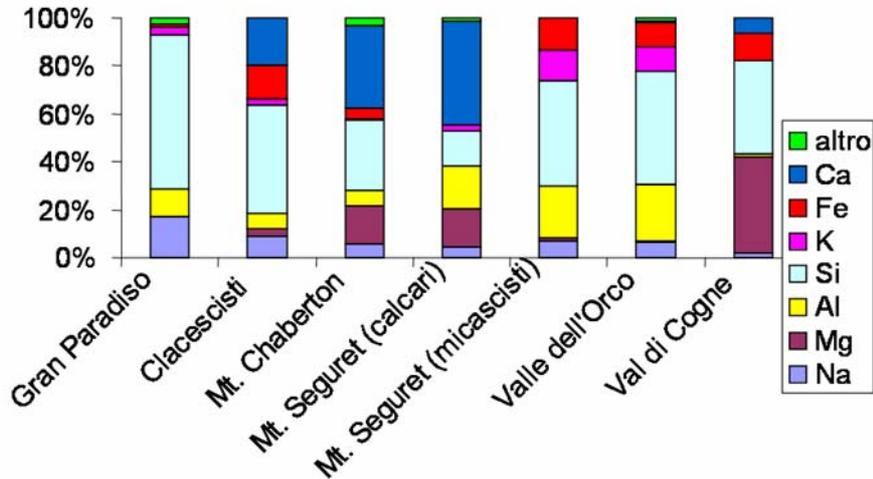
Per questo motivo si è voluta indagare la composizione chimica delle rocce utilizzate negli isolamenti, privilegiando i campioni non serpentinitici (tabella 3.2). A questo scopo frammenti di rocce sono stati macinati e sottoposti a microanalisi al SEM-EDS (sei punti analizzati per ogni campione) per ottenere una composizione chimica media.

I campioni analizzati sono stati:

1. Gran Paradiso: gneiss (rocce metamorfiche: la composizione chimica dipende da quella del protolito e dal tipo di metamorfismo subito; il termine definisce solo la granulometria; n° 16 tab. 3.2).
2. Calcescisti: derivati per metamorfismo da sedimenti argilloso-calcarei che ricoprivano i fondali oceanici (n° 11 tab. 3.2).
3. Mt. Chaberton; campione misto di calcari e metabasiti (n° 8 tab. 3.2) provenienti dallo stesso sito. La microanalisi riportata è data dalla media dei valori ottenuti per i due diversi tipi di roccia.
4. Mt. Seguret, Valle di Susa: calcari (rocce sedimentarie costituite da calcite ossia carbonato di calcio) da pietraia non vegetata (n° 13 tab 3.2).
5. Mt. Seguret, Valle di Susa: micascisti (rocce metamorfiche derivate da argille, in cui i minerali prevalenti sono le miche, silicati idrati di K, Al, Li Mg Fe; n° 12 tab 3.2).
6. Micascisti eclogitici (micascisti con presenza di eclogiti, ossia rocce derivanti dalla metamorfosi di basalti, contenenti minerali della famiglia dei pirosseni, ossia silicati di Fe e Mg) (n° 14 tab 3.2)
7. Serpentina (Valle di Cogne) (n° 2 tab 3.2).

La figura 3.7 riporta la percentuale dei singoli ioni nelle rocce (escluso l'ossigeno).

Come atteso, la roccia serpentinitica è ricca di magnesio. Il campione di roccia proveniente dal Mt. Chaberton, da cui è stato isolato un ceppo di *V. leptobactrum*, è costituito per il 15.9% da ioni Mg, valore molto simile a quello ottenuto dal campione di calcari provenienti dal Mt. Seguret, che al contrario non ospitano il fungo di interesse. Le altre rocce analizzate presentano composizione diversa, con percentuali ridotte di Mg e prevalenza di Al, Ca, Na, K e Fe.



**Figura 3.7 – Microanalisi (SEM-EDS) di alcuni campioni di suolo utilizzati per gli isolamenti fungini.** Le rocce sono state macinate in modo che la polvere ottenuta fosse rappresentativa della composizione media della roccia. Si riporta la percentuale dei singoli ioni nelle rocce (escluso l'ossigeno). Ogni dato è la media di 6 analisi. / **SEM-EDS analysis of some soil samples used for fungi isolation.** Rocks were milled to obtain a mixed dust whose composition is representative of the mean composition of the rock. The amount of each ion is reported (as % of the total, without oxygen). Each data is the mean of 6 analyses.

### 3.3 Identificazione molecolare di *V. leptobactrum* e analisi filogenetica.

*Verticillium leptobactrum* è una specie rara, associata a substrati come l'esoscheletro di insetti o altri funghi (Gams 1971, <http://www.cbs.knaw.nl/nccb/>).

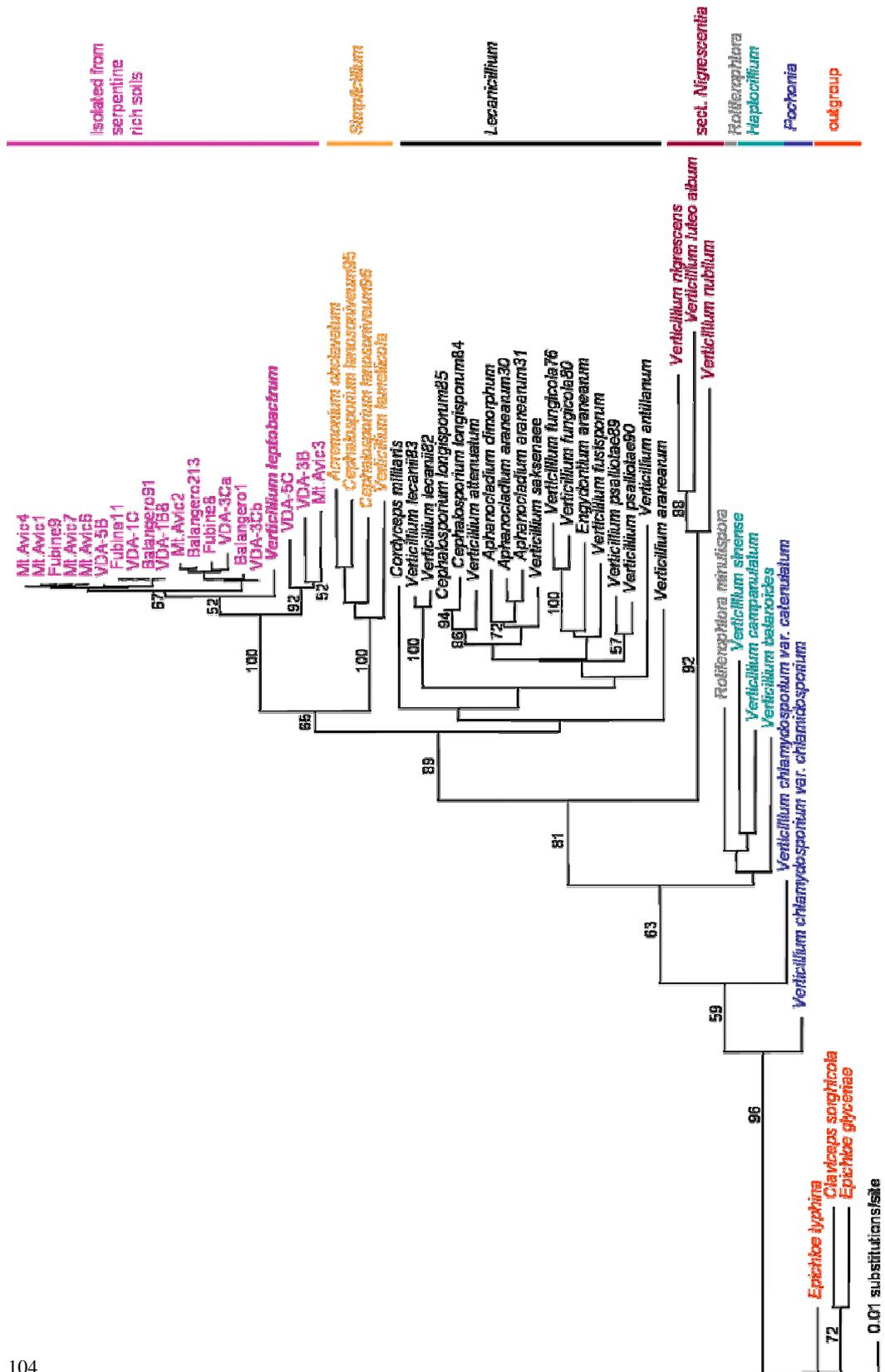
Il ritrovamento di tale specie in quantità abbondanti nei siti serpentinitici presi in esame ha indotto ad approfondire l'aspetto filogenetico, con il duplice scopo di confermare con tecniche molecolari l'identità della specie, identificata morfologicamente, e di collocarla nei generi recentemente istituiti a seguito della revisione della sezione *Prostrata* del genere *Verticillium*, cui questa specie appartiene (Gams and Zare, 2001).

Per l'amplificazione della regione ITS sono stati utilizzati i primers ITS1F e ITS4, il primo specifico per i funghi e il secondo universale per i geni ribosomiali eucarioti. Le sequenze così ottenute sono state sequenziate ed analizzate per ottenere un albero filogenetico. Le sequenze derivanti da 19 ceppi isolati dai siti di Balangero, Fubine, Mt. Avic, Emares e Valle di Cogne sono state allineate con alcune sequenze scelte in banca dati tra di funghi appartenenti al genere *Verticillium*, tra cui anche una sequenza di *V. leptobactrum*, e con tre sequenze di generi diversi (*outgroup*).

La figura 3.8 mostra l'albero filogenetico ottenuto dall'allineamento delle sequenze tramite analisi di distanza (*neighbour joining*). I ceppi isolati da suoli serpentinitici formano un gruppo unico, vicino ma distinto dagli altri 5 generi individuati da Gams (2001). Tale gruppo è supportato da un elevato valore di *bootstrap* e comprende anche la specie *V. leptobactrum* la cui sequenza è già depositata in banca dati. Le sequenze dei ceppi isolati nei diversi siti di

campionamento non generano gruppi distinti, quindi non emerge una correlazione tra la specie isolata e la distribuzione geografica.

**Figura 3.8 - Albero filogenetico** ottenuto dall'analisi di distanza (*neighbour joining*) delle sequenze ITS dei ceppi di *V. leptobactrum* (già identificati morfologicamente), con sequenze di altre specie appartenenti al genere *Verticillium*. E' riportato il valore di *bootstrap*, quando  $\geq 50\%$  (1000 repliche)./ **Phylogenetic tree** obtained from neighbour joining analysis of ITS sequences of *V. leptobactrum* strains (already identified by morphological analysis) with other *Verticillium* species from databases. Bootstrap support is shown when  $\geq 50\%$  (1000 replicates).



### 3.4 Discussione

#### 3.4.1 Isolamento e identificazione di specie fungine da suoli serpentinitici

Gli ambienti ofiolitici rappresentano ecosistemi unici, caratterizzati da comunità vegetali e microbiche peculiari, e proprio per questo di elevato interesse naturalistico (Piervittori and Siniscalco, 2004). In tali ambienti si ha l'affioramento di rocce ofiolitiche, tra cui anche le serpentiniti, che possono essere costituite di minerali appartenenti alla famiglia degli asbesti, quali anfiboli e serpentini. Le serpentiniti affiorano estesamente nell'area delle Alpi Occidentali, ad esempio nel Massiccio Ultrabasico del Mt. Avic e nel Massiccio Ultrabasico di Lanzo, ma anche in altre zone della Valle d'Aosta e Valle di Susa.

Una delle caratteristiche che determina la peculiarità della flora e microflora di tali ambienti è l'elevato contenuto in metalli pesanti tipico dei suoli serpentinitici, che sono ricchi in particolare di Cr, Ni e Co. L'elevata concentrazione di metalli pesanti limita la biodiversità in tali aree, in cui, analogamente a ciò che avviene in suoli artificialmente inquinati da metalli pesanti (Weissenhorn et al., 1993), si ha lo sviluppo di specie batteriche e fungine più resistenti ai metalli rispetto a quelle rinvenute in suoli non serpentinitici, e di piante iperaccumulatrici (Pal et al., 2005a; Freitas et al., 2003). Secondo dati di letteratura e recenti risultati ottenuti nel nostro laboratorio (tesi di laurea S. Picarella, 2004), il tipo di contaminazione è importante nel determinare la selezione delle specie fungine. Infatti ceppi del fungo micorrizico ericoide *Oidiodendron maini* rinvenuti da suoli serpentinitici sono particolarmente tolleranti nei confronti dei metalli presenti in questi siti, mentre ceppi della stessa specie isolati da suoli ricchi di Zn e Cd, sebbene tolleranti a tali metalli, non lo sono verso Ni e Cr, abbondanti nei siti serpentinitici. Specie fungine, ma anche batteriche e vegetali, sviluppatasi in presenza di una pressione selettiva dovuta all'elevata concentrazione di metalli, suscitano interesse come possibili agenti di biorisanamento di siti inquinati da substrati inorganici, quali appunto metalli e radionuclidi. Infatti uno dei sistemi per potenziare un processo di biorisanamento è quello di arricchire la comunità microbica di specie competitive rispetto a quelle già presenti, scelte nella comunità endogena del sito stesso, e attive nel processo voluto (*bioaugmentation*, Agathos, 2005). L'isolamento di specie da suoli serpentinitici ha permesso di valutare la diversità della comunità fungina, e in seguito di saggiare le potenzialità di alcune delle specie identificate nell'interazione e nella modificazione di un substrato minerale quali sono le fibre di asbesto.

Un ampio spettro di specie fungine è stato isolato da campioni di suolo e rocce raccolti all'interno della ex-cava di amianto di Balangero e da alcune aree con affioramenti serpentinitici situate in Valle d'Aosta. Tra queste si trovano molte specie caratterizzate da un'ampia diffusione, quali *Paecilomyces lilacinus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mortierella* spp., *Penicillium* spp., *Myrothecium* spp. (v. appendice 1). Specie degli stessi generi sono state isolate anche da un suolo serpentinitico situato in India (Pal et al., 2005b). La specie più abbondante e frequente nei campioni di Balangero è però *Verticillium leptobactrum*, che diversamente dalle precedenti è una specie rara, fino ad ora isolata solo da substrati come legno marcio, esoscheletro di insetti, nematodi e altri funghi, e quindi poco conosciuta anche dal punto di vista fisiologico (Gams 1971, <http://www.cbs.knaw.nl/nccb/>). Tale specie è presente in tutti i campioni di substrato serpentinitico raccolti nell'area delle Alpi Occidentali (zona Piemontese delle calcescisti con pietre verdi), ma non è stata isolata da un analogo substrato proveniente dalla Cina. L'isolamento di *V. leptobactrum* da un campione di roccia di natura calcarea, proveniente dal massiccio dello Chaberton e ricco di magnesio, ha suggerito un'associazione del fungo con substrati ricchi di magnesio. L'ipotesi è stata tuttavia smentita dal fatto che il fungo non è stato isolato da un campione calcareo ricco di magnesio, ma di diversa provenienza (Mt. Seguret), né dalle rocce serpentinitiche e peridotiti provenienti dalla Cina. Il chimismo del substrato non è quindi sufficiente a spiegare l'assoluta dominanza di *V. leptobactrum* nei campioni esaminati,

anche perché esistono altri fattori che possono influenzare la composizione della comunità microbica di un suolo, e in particolare i fattori climatici, di cui in questo studio non si è tenuto conto. Per la prima volta tale specie è stata isolata in quantità molto abbondanti da più suoli diversi, che hanno in comune la collocazione geografica nelle Alpi Occidentali.

Un'altra specie estremamente abbondante negli isolati dell'area valdostana è *Penicillium citreoviride*, che è stato isolato anche nei campioni cinesi, sebbene in quantità minori. *P. citreoviride*, sebbene non sia una specie isolata frequentemente, è ampiamente distribuito. Si tratta di un fungo del suolo ma è stato talvolta isolato anche da riso in Giappone (Pitt, 1979). Negli isolati dai campioni di rocce provenienti dalla Cina, la specie più abbondante è *Penicillium citrinum*, specie isolata frequentemente nel suolo, ma anche su vegetazione marcescente, alimenti, tessuti e altri materiali biodegradabili (Pitt, 1979).

#### 3.4.2 Analisi molecolare di *V. leptobactrum*

Per l'identificazione molecolare di specie, una tecnica semplice è l'analisi della sequenza dei geni che codificano per l'rRNA ribosomiale. Tali geni sono altamente conservati anche tra organismi filogeneticamente diversi e quindi sono facilmente confrontabili tramite allineamento delle sequenze nucleotidiche. Essi sono però separati da regioni non codificanti (Internal Transcribed Spacer, ITS) caratterizzate da una maggiore variabilità, che consentono la distinzione tra taxa vicini (specie diverse nell'ambito di uno stesso genere, o generi diversi, a seconda dello specifico gruppo fungino considerato). Nei funghi la regione ITS consiste di due spaziatori non codificanti, ITS1 e ITS2, separati dalla regione altamente conservata 5.8s dei geni per l'rRNA. Questa regione viene tipicamente amplificata utilizzando dei primers universali eucariotici oppure primers fungini specifici, disegnati sulle regioni conservate all'estremità 3' del gene della subunità 18S dell'rRNA (small subunit, SSU) e all'estremità 5' della subunità 28S (large subunit, LSU) che affiancano la regione ITS. In virtù di tali caratteristiche questa regione è stata estesamente utilizzata nella sistematica fungina (Bidartondo and Gardes, 2005).

*Verticillium leptobactrum* è una specie rara, associata a substrati come l'esoscheletro di insetti o altri funghi. Il frequente ritrovamento di tale specie, spesso con notevole abbondanza, nei siti serpentinitici presi in esame, ha indotto ad approfondire l'aspetto filogenetico con il duplice scopo di confermare con tecniche molecolari l'identità, accertata su basi morfologiche, della specie, e di collocarla nel contesto della recente revisione della sezione *Prostata* del genere *Verticillium* (Gams and Zare, 2001), cui appartiene *V. leptobactrum*. Tale revisione ha comportato l'assegnazione delle specie della sezione a 5 nuovi generi (*Simplicillium*, *Lecanicillium*, *Pochonia*, *Haptocillium* e *Rotiferophthora*). La costruzione di un albero filogenetico con le sequenze dei *Verticillium* isolati da suoli serpentinitici e con altre sequenze appartenenti ai cinque generi sopra elencati, ha mostrato che i funghi "serpentinitici" formano un raggruppamento ben sostenuto (100% *bootstrap*), che include anche l'unica sequenza di *V. leptobactrum* disponibile in banca dati, a conferma dell'identificazione morfologica della specie. All'interno di tale gruppo, non sono riconoscibili raggruppamenti su base geografica dei diversi isolati. Il gruppo rappresentato dal complesso degli isolati "serpentinitici" e dall'unico *V. leptobactrum* sequenziato risulta poi "sister group" del genere *Simplicillium*, anch'esso ben sostenuto nell'analisi (100% *bootstrap*), entrambi ben distinti da *Lecanicillium*, nuovamente gruppo monofiletico (89% *bootstrap*). La topologia dell'albero sembra quindi suggerire uno *status* di genere per il cluster in questione; il sequenziamento e l'analisi di altri loci sarebbero auspicabili per arrivare a formalizzare tale status. Analogamente, per quanto si riferisce all'assenza di corrispondenza tra i cluster di sequenze e i siti serpentinitici di isolamento, l'analisi di geni funzionali potenzialmente coinvolti nell'adattamento ai substrati considerati permetterebbe di verificare se il sito di prelievo influenza la variabilità intraspecifica di *V. leptobactrum*.

## Capitolo 4

### Modificazione di fibre di asbesto ad opera di funghi del suolo

#### Résumé

Le minéral amiante contient du fer, qui contribue à la toxicité des fibres de part sa réactivité chimique. Pour cette raison, le fer dans les fibres est considéré comme une cible potentielle pour les stratégies de «*remediation*» pour détoxifier les fibres dans le sol.

Dans ce chapitre, les modifications des fibres par les champignons du sol ont été analysées en relation à la composition chimique, à la réactivité et aux dommages induits à l'ADN *in vitro* et *in vivo*.

Les champignons utilisés ont été choisis parmi ceux qui avaient été isolés du sol de une ancienne mine d'amiante (voir chapitre 3). Sur la base de essais préliminaires *Paecilomyces lilacinus* et *Verticillium leptobactrum*, ont été sélectionnés et testés en parallèle à *Fusarium oxysporum* dont l'activité de modification des fibres d'amiante est déjà connue (Martino et al., 2003; Daghighi et al., 2005). Les fibres choisies pour cet étude sont crocidolite UICC et chrysotile 6D. Celui-ci avait été extrait de la même mine d'origine des champignons.

L'observation morphologique de la croissance fongique en présence de fibre a montré des modifications dans la morphologie et la pigmentation du mycelium et du milieu de culture. La production de pigments, comme les mélanines, avait déjà été associée à la réponse des champignons aux stress environnementaux. Le mycélium de *V. leptobactrum* apparaît affecté par les fibres de chrysotile, soit à cause du stress mécanique imposé aux hyphes soit à cause de dommages dus aux réactions chimiques qui ont lieu à l'interface champignon-fibre. Dans tout les cas, le développement de la biomasse n'a pas été affecté.

Les deux champignons isolés à Balangero ont montré une meilleure capacité d'extraction du fer et du magnésium que *F. oxysporum*. Les fibres de chrysotile ont été plus modifiées que celles de crocidolite probablement à cause d'une surface spécifique plus importante fournissant ainsi une plus grande surface aux chélatants. Toutefois, l'identité de ces molécules chélatantes, et ainsi le mécanisme de extraction, sont encore inconnus.

L'extraction du fer par *P. lilacinus* et *F. oxysporum* a conduit à une réduction de la réactivité des fibres. En effet une diminution de la génération de radicaux libres à la surface des fibres a été observée après le traitement. Nous suggérons que les chélatants fongiques éliminent ou modifient le fer responsable de la réactivité de surface. Par contre *V. leptobactrum* induit la réactivité du chrysotile. Ce résultat peut être expliqué par l'exposition, à cause de la forte modification de la surface, de ions fer peu coordonnés, qui représentent des sites réactifs.

La mesure de la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine a montré que les fibres traitées par les champignons sont moins oxydatives sur l'ADN isolé. Les résultats indiquent un rôle prédominant du fer mobilisé des fibres, mais n'excluent pas une contribution du fer associé à la surface.

Afin d'analyser les propriétés oxydatives des fibres sur l'ADN *in vivo*, les lignées cellulaires HL60 et A549 ont été choisies. Les fibres de chrysotile traitées par *F. oxysporum*, *P. lilacinus* et *V. leptobactrum* se sont révélées moins cytotoxiques sur la lignée HL60 et les fibres de crocidolites traitées par *F. oxysporum* et *P. lilacinus* se sont révélées moins cytotoxiques sur la lignée A549. Ces différences de réactivité en fonction de la fibre utilisée et de la lignée cellulaire

n'est pas surprenant étant donné que les fibres ont différentes propriétés chimiques et qu'elles interagissent avec différentes molécules cibles dans les différentes lignées cellulaires.

Les fibres de crocidolite provoquent plus de dommages à l'ADN des cellules HL60 après 8 heures qu'après 24 heures d'incubation, suggérant qu'il existe une activation de systèmes de réparation. La crocidolite traitée par *F. oxysporum* et *V. leptobactrum* induit moins de dommages à l'ADN que les fibres non traitées sur les HL60. Ces différences n'ont pas été observées avec les cellules A549.

Les fibres de chrysotile induisent un dommage pendant les premières 8 heures d'incubation, qui est efficacement réduit après 24 heures. A la fin d'une incubation de 24 heures, les fibres de chrysotile traitées par les champignons n'ont pas montrées de différences que les non traitées en ce qui concerne leur effet sur l'ADN des cellules HL60 et A549.

Les résultats suggèrent que le chrysotile induit un dommage intense et rapide, qui est pourtant réparé après 24 heures, alors que la crocidolite induit un dommage plus faible, mais durable.

Alors que les champignons réduisent la capacité des fibres à oxyder l'ADN *in vitro*, cette réduction n'a été retrouvée que dans deux cas lors des expériences *in vivo*. Cette variabilité dans la réponse cellulaire peut être expliquée par les différences physico-chimiques entre les types de fibres et/ou par la complexité des réponses cellulaires à l'amiante qui impliquent différentes voies cellulaires dans les différents types cellulaires, l'altération de l'expression des gènes et l'activation de différents types de systèmes de défense.

### **Abstract**

Asbestos minerals contain iron that, because of its chemical reactivity, contributes to the overall toxicity of the fibres. For this reason, iron in the fibres is considered as a potential target of remediation strategies to detoxify the mineral in soil.

In this chapter, fibres modification by soil fungi was investigated, in particular in relation to their chemical composition and reactivity, and to the oxidative damages induced to DNA *in vitro* and *in vivo*.

The fungal strains were chosen among those isolated from the Balagero mine (see chapt. 3). On the basis of preliminary assays, *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium leptobactrum* were selected and tested in parallel with *F. oxysporum*, whose ability to modify asbestos fibres was already known (Martino et al., 2003; Daghino et al., 2005). Crocidolite UICC and chrysotile 6D, a commercial sample extracted from the same mine of origin of the fungi, were the fibres used in this study.

The morphological observation of fungi grown in the presence of fibres revealed some modifications in the growth morphology and in the pigmentation of mycelia and culture media. Production of pigments, such as melanins, has already been associated with the response of fungi to environmental stress. In this respect, the mycelium of *V. leptobactrum* appeared affected by chrysotile fibres, either because of a mechanical stress imposed to the hyphae, or because of the damaging chemical reactions that could occur at the fungus-fibres interface. In any case, fibres did not affect biomass development.

Mobilized Fe and Mg were quantified in the fungal culture medium. *F. oxysporum* showed a good extracting activity for both iron and magnesium, but the two fungi isolated from Balagero were more active in solubilization of these metals. Chrysotile was modified more than crocidolite (more ions were extracted in percentage, if considered the total amount in the fibre), likely because of its higher specific surface (m<sup>2</sup>/g) and thus the wider surface exposed to potential chelators. This hypothesis was supported by a direct composition analysis on the

fibres, that demonstrated how the main modifications involved the surface of the fibres, and not the overall structure.

The identity of the chelating compounds that are likely to mediate iron and magnesium extraction from the fibres remains unknown, as well as the mechanism(s) underlying this activity.

An experiment with an iron-chelator *in vitro* showed that it would be possible to further extract iron by extending the duration of fungal treatment, thus suggesting that a prolonged treatment with chelators continuously produced by fungi growing in proximity of the minerals, could lead to stronger fibres modification.

Iron extraction by *P. lilacinus* and *F. oxysporum* led to a significant reduction in fibres reactivity, as the production of reactive radicals was blunted after treatments. This suggests that the reactive iron sites responsible for surface reactivity are removed and/or modified by iron chelation by fungi. However, *V. leptobactrum* reactivated the fibres. This unexpected result may be explained by the exposure of new and poorly coordinated, thus highly reactive, iron ions at the surface following the strong extracting activity of the fungus.

Both chrysotile 6D and crocidolite UICC were able to induce an oxidative damage to isolated DNA. The fungal treatment strongly reduced the ability of both fibres to oxidize DNA, as measured by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation. The experiments suggest that iron mobilized from fibres has a major role in DNA oxidation, although they do not exclude a contribution of surface iron.

In order to investigate the oxidative properties of fibres on DNA *in vivo*, cell lines HL60 (macrophage-like, able to phagocytose fibres) and A549 (target cells of asbestos *in vivo*) were chosen.

Surface iron influenced the cytotoxic effects of fibres and induced lipoperoxidation of the fungal cell membranes. *F. oxysporum*-, *P. lilacinus*- and *V. leptobactrum*-treated chrysotile was less cytotoxic to HL60, whereas *F. oxysporum*- and *P. lilacinus*-treated crocidolite was less cytotoxic to A549. In the other cases, no significant difference were revealed between control and treated fibres. The observation that cytotoxic effect varied according to the fibre used and the cells tested is not surprising, since fibres have different chemical properties, and their interaction with different cell lines may involve different molecular targets.

Crocidolite induced a DNA damage to HL60 cells higher after 8 than 24 h of incubation, thus suggesting the activation of repair systems. Crocidolite pre-treated with *F. oxysporum* e *V. leptobactrum* induced a significantly decreased damage compared to the control fibres. This difference was not observed by incubating crocidolite with A549 cells.

Chrysotile fibres induced a more extensive damage than crocidolite after 8 hours of treatment, that was however efficiently repaired over 24 h. After 24 h incubation, no significant differences were observed between control and fungi-treated chrysotile, neither on HL60, nor on A549.

The time-dependence of DNA damages induced by the two fibres (untreated and fungus-treated) on HL60 cells suggests that chrysotile rapidly induces a strong damage, which is completely repaired within 24 h, while crocidolite induces a weaker but long lasting effect.

Whereas the fungi had a straightforward effect in decreasing the fibres' ability to oxidize *in vitro* isolated DNA, the same fibres modification resulted in their inactivation only in two cases when a cellular system was considered. This variability in the cell response could be related either to the physico-chemical differences between the types of fibres or to the high complexity of the cellular responses to asbestos, that involves a number of intracellular pathway in the different cell types, with alteration of gene expression and activation of different defence systems.

## 4.1 Introduzione

I diversi tipi di amianto (o asbesti) contengono ferro in percentuali diverse e tale caratteristica concorre a determinarne la tossicità in quanto il ferro è catalizzatore di alcune reazioni chimiche, quale il rilascio di radicali dell'ossigeno, potenzialmente dannosi verso proteine lipidi e DNA (Fubini and Mollo, 1995), all'interfaccia tra fibra ed ambiente esterno, in particolare fluidi biologici qualora la fibra venga inalata. Quindi un processo di biorisanamento applicato agli asbesti potrebbe essere basato sul depauperamento del ferro dalla struttura delle fibre, ottenibile mediante un meccanismo di chelazione ad opera di molecole secrete dal microrganismo fungino. Per questo motivo uno dei parametri considerati nella valutazione dell'interazione tra funghi del suolo e fibre di asbesto è stata la rimozione di ioni ferro dalle fibre ad opera dei miceli. Tuttavia gli asbesti contengono altri cationi, oltre al ferro. Ad esempio il crisotilo è un silicato di magnesio, ed in particolare le fibre i crisotilo utilizzate in questo studio, contengono circa il 24% in peso di magnesio. Per questo motivo si è valutata anche l'attività dei ceppi fungini nell'estrazione del magnesio dalle fibre.

Lo studio si è focalizzato su due tipi di fibre: la crocidolite UICC, già utilizzata in precedenza nello studio dell'interazione con i funghi del suolo e ben caratterizzata per la sua struttura, reattività e tossicità, e il crisotilo denominato 6D, ossia un campione commerciale di crisotilo estratto nella ex-cava di amianto di Balangero (Torino, Italia) e scelto in quanto proveniente dall'area di interesse, ossia la regione piemontese delle Alpi Occidentali. I ceppi fungini utilizzati sono stati scelti tra quelli isolati dal suolo della cava di Balangero (v. capitolo 3). Inoltre in tutti gli esperimenti è stato utilizzato il ceppo *F. oxysporum* già precedentemente studiato (Martino et al., 2003; Daghino et al., 2005), come riferimento per valutare l'efficacia dei nuovi ceppi in studio. In particolare, tenendo in considerazione la capacità dei vari ceppi fungini di crescere in presenza di asbesto e di estrarre ioni ferro e magnesio da fibre di crisotilo 6D, si è proceduto ad una selezione preliminare dei ceppi più efficienti tra quattro scelti tra quelli dominanti (v. capitolo 3). Successivamente i due ceppi più efficaci sono testati anche in presenza di crocidolite, e le fibre trattate sono state caratterizzate dal punto di vista della composizione, della reattività chimica e della genotossicità *in vitro*.

## 4.2 Estrazione di ioni ferro e magnesio da fibre di asbesto

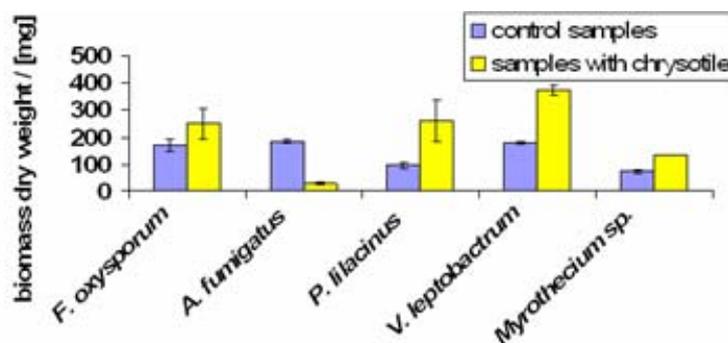
### 4.2.1 Selezione dei ceppi più efficienti

Sulla base dei valori di abbondanza e frequenza percentuale dei vari ceppi fungini isolati nel solo sito della ex-cava di Balangero, sono stati scelti ceppi appartenenti alle specie *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactrum* e un ceppo del genere *Myrothecium sp.*. I miceli sono stati fatti crescere in terreno liquido czapek-glucosio 2% in presenza e in assenza di fibre di crisotilo 6D, ed è stata valutata la morfologia di crescita, lo sviluppo della biomassa e l'estrazione di ioni ferro e magnesio. Parallelamente è stato utilizzato il ceppo *F. oxysporum* in tutte le prove.

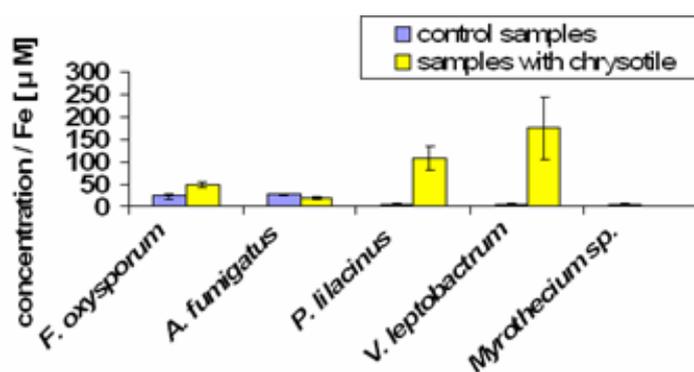
Le caratteristiche morfologiche delle specie fungine prese in esame sono riportate in appendice 1. L'osservazione della morfologia di crescita di questi funghi in presenza delle varie fibre ha rivelato una grande variabilità per quel che riguarda: tipo di crescita, sviluppo della biomassa, pigmentazione del micelio, pigmentazione del terreno.

In alcuni casi (*A. fumigatus*, *P. lilacinus*, *Myrothecium sp.*) il fungo, in presenza di fibre, forma uno strato compatto al fondo della coltura aderendo alle fibre stesse (appendice 1), mentre i miceli di *F. oxysporum* e *V. leptobactrum* sembrano intrappolare le fibre al loro interno. Si è inoltre osservato che la presenza della fibra può provocare una variazione della pigmentazione del micelio (*V. leptobactrum*) ma anche del terreno di coltura (*F. oxysporum*).

Dal punto di vista quantitativo le prove di crescita hanno messo in evidenza che nessuno dei quattro ceppi studiati risulta inibito quando in presenza di fibre, a parte il ceppo appartenente alla specie *Aspergillus fumigatus*, (figura 4.1) la cui crescita subisce un decremento rispetto al controllo.



**Figura 4.1 - Crescita fungina** misurata come mg di peso secco in assenza (control samples) ed in presenza (samples with chrysotile) di fibre. Ad eccezione del ceppo appartenente alla specie *A. fumigatus*, tutti i funghi analizzati non mostrano una inibizione significativa della crescita in presenza del materiale asbestiforme. Al contrario, in alcuni casi, alla presenza di fibre si associa un incremento significativo della crescita per alcuni dei ceppi studiati. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard / **Fungal growth** (biomass dry weight in [mg]) in the absence (control samples) or in the presence (samples with chrysotile) of fibres. *F. oxysporum* shows no differences, *A. fumigatus* growth is inhibited, while *P. lilacinus*, *V. leptobactrum* and *Myrothecium sp.* growth is even enhanced in the presence of the fibres. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.



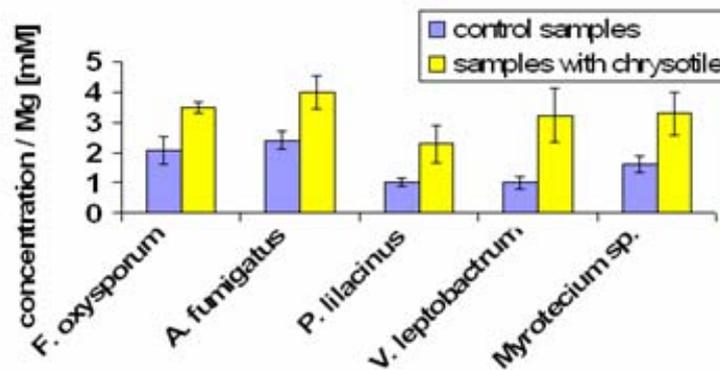
**Figura 4.2 - Estrazione del ferro dalle fibre di crisotilo 6D.** Il grafico mostra la concentrazione totale di ferro [µM] misurata nel mezzo colturale dei funghi cresciuti in assenza (control samples) o in presenza (samples with chrysotile) di fibre. Il ferro è stato estratto dalle fibre con una diversa efficienza dai vari ceppi. I ceppi appartenenti alle specie *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* si sono dimostrati i più attivi. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard / **Extraction of iron from chrysotile 6D fibres.** Total iron concentration [µM] in the filtered culture media of fungi grown in the absence (control samples) or in the presence (samples with chrysotile) of fibres is reported. The different fungi extracted different amount of iron. *P. lilacinus* and *V. leptobactrum* were the most active. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

*P. lilacinus*, *V. leptobactrum* e *Myrothecium sp.* mostrano invece un incremento della biomassa in presenza di crisotilo.

Per valutare la capacità dei vari funghi di estrarre il ferro dalle fibre, la concentrazione di questo ione nel terreno di coltura dopo incubazione del fungo con la fibra è stata misurata tramite un metodo spettrofotometrico (v. par. 2.18; figura 4.2).

Per quanto riguarda il ceppo *F. oxysporum* la quantità di ferro estratta dal crisotilo 6D è risultata superiore rispetto agli esperimenti condotti in precedenza con il crisotilo di tipo A, il quale ha un contenuto di ferro inferiore rispetto al crisotilo 6D (Daghino et al., 2005, tabella 2.1). I ceppi di *A. fumigatus* e *Myrothecium sp.* non hanno fatto registrare alcuna solubilizzazione di ferro dalle fibre di crisotilo, questo probabilmente a causa del ridotto sviluppo della biomassa in presenza di fibre rispetto agli altri tre ceppi. *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* hanno mostrato una forte capacità di solubilizzazione nei confronti del ferro contenuto nel crisotilo (figura 4.2).

Poiché il magnesio è una delle componenti prevalenti nella struttura del crisotilo, è stata misurata l'eventuale capacità dei funghi di estrarre magnesio dalle fibre di crisotilo 6D, tramite una titolazione complessimetrica del magnesio nei filtrati colturali (v. par. 2.19).



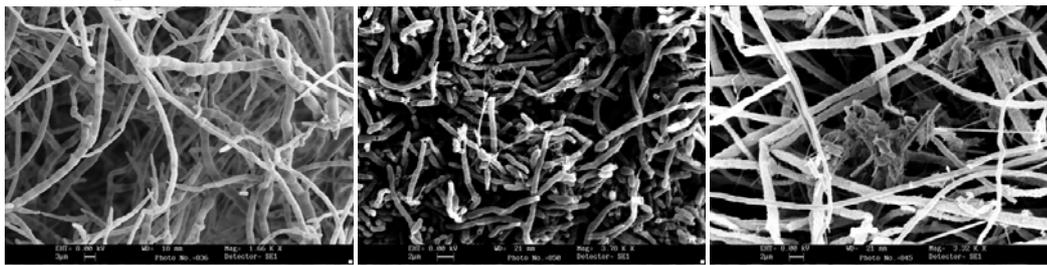
**Figura 4.3 - Estrazione del magnesio dalle fibre di crisotilo 6D.** Il grafico mostra la concentrazione [mM] di magnesio nel mezzo colturale dei funghi cresciuti in assenza (control samples) o in presenza (samples with chrysotile) di fibres. Tutti i ceppi, si sono dimostrati in grado di estrarre una quantità significativa di magnesio dalle fibre di crisotilo. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard / **Magnesium extraction from chrysotile 6D.** Total magnesium concentration [mM] in the filtered culture media of fungi grown in the absence (control samples) or in the presence (samples with chrysotile) of fibres is reported. The five strains are active in magnesium extraction. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

I ceppi appartenenti alle specie *F. oxysporum*, *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* ed il ceppo *Myrothecium sp.* sono risultati in grado di estrarre una quantità significativa di magnesio dalle fibre di crisotilo (figura 4.3). Si tratta degli stessi ceppi già dimostratisi attivi nella solubilizzazione del ferro dal crisotilo, tranne quello appartenente al genere *Myrothecium* (figura 4.3).

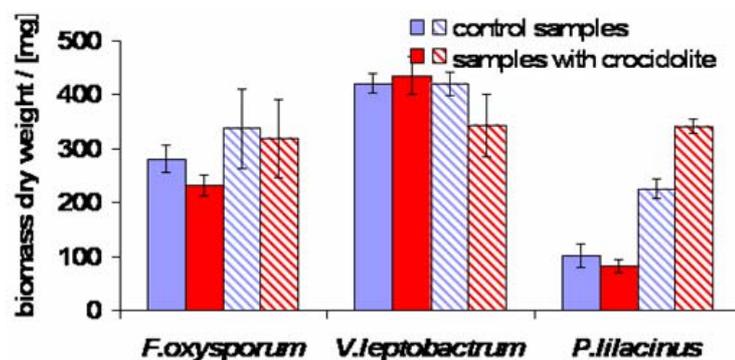
Considerati i risultati sopra esposti, gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando esclusivamente i ceppi *F. oxysporum*, *P. lilacinus* e *V. leptobactrum*, in quanto rivelatisi essere i più attivi nel meccanismo di solubilizzazione del ferro e del magnesio dalla struttura delle fibre, e quindi candidati interessanti per uno studio più approfondito dell'interazione fungo/fibra.

Nelle fasi successive l'analisi è stata estesa alle fibre di crocidolite UICC. Lo studio sul crisotilo 6D risulta di particolare importanza considerando che si tratta di una fibra proveniente dalla cava da cui sono stati isolati i ceppi fungini oggetto di questa seconda parte

del lavoro. L'utilizzo della crocidolite permette invece di effettuare un confronto con i dati raccolti in precedenza e con i dati di letteratura.



**Figura 4.4 - Immagini al SEM di *V. leptobactrum*.** (a), *V. leptobactrum* a contatto con fibre di crisotilo 6D (b), *V. leptobactrum* a contatto con fibre di crocidolite UICC / **SEM observation of *V. leptobactrum* mycelia** (a), *V. leptobactrum* in direct contact with chrysotile 6D fibres (b) and *V. leptobactrum* in direct contact with crocidolite fibres.

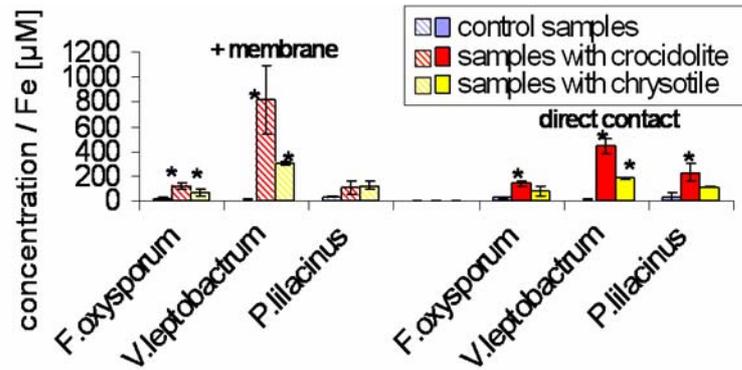


**Figura 4.5 - Crescita fungina** misurata come mg di peso secco in assenza (control samples) ed in presenza (samples with crocidolite) di fibre aggiunte sia a diretto contatto (barre piene) con il micelio, sia all'interno di una membrana da dialisi (barre tratteggiate). I funghi analizzati non mostrano una inibizione significativa della crescita in presenza del materiale asbestiforme. Al contrario, in alcuni casi, alla presenza di fibre si associa un incremento significativo della crescita (*P. lilacinus*, nell'esperimento con fibre in membrana). I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard / **Fungal growth** measured as dry weight [mg] of biomass of fungi grown in the absence (control samples) or in the presence (samples with crocidolite). The fibres were added either in direct contact with the mycelia (full bars) or separated by a dialysis membrane (dashed bars). The fungi don't show any significant growth inhibition. Only the growth of *P. lilacinus* is increased in the presence of the fibres in membrane. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

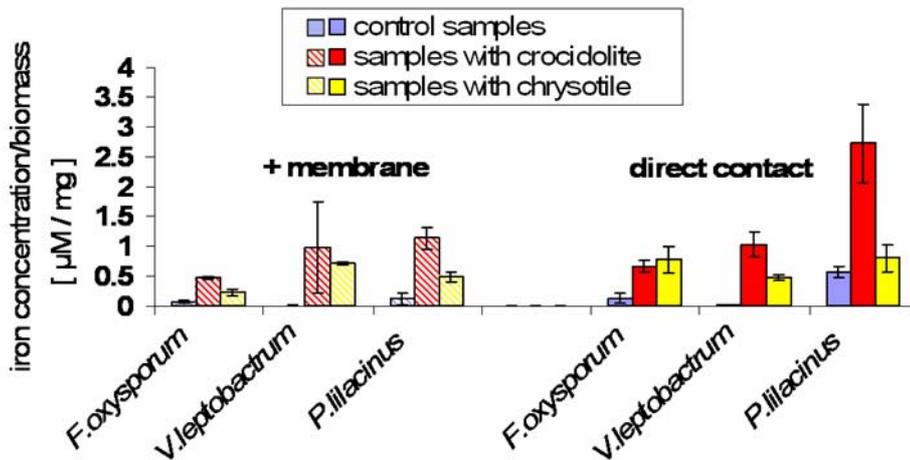
#### 4.2.2 Tre ceppi selezionati modificano le fibre di crisotilo e crocidolite.

I miceli sono stati fatti crescere in terreno liquido czapek-glucosio 2% in presenza e in assenza di fibre e secondo due modalità: le fibre sono state aggiunte sia direttamente al mezzo di coltura ("T contatto", i relativi controlli indicati con "C contatto"), sia in un tubo di membrana da dialisi ("T membrana"), in modo da tenerle fisicamente separate dal micelio. Anche nelle colture di controllo è stato addizionato un analogo tubo di membrana da dialisi ("C membrana") contenente il terreno colturale, al fine di avere come unica differenza fra controlli e trattati la presenza delle fibre.

Le caratteristiche morfologiche dei funghi in esame sono riportate nelle tavole in appendice. Dal punto di vista macroscopico, si è osservato che la presenza sia di crisotilo che di crocidolite induce una pigmentazione più o meno pronunciata nei diversi ceppi.



**Figura 4.6 - Estrazione del ferro dalle fibre di crisotilo 6D e crocidolite.** Il grafico mostra la concentrazione [µM] di ferro misurata nel filtrato colturale dei funghi cresciuti in assenza (control samples) o in presenza (samples with crocidolite or chrysotile) di fibre, addizionate sia a diretto contatto (barre piene) con il micelio fungino oppure all'interno di una membrana da dialisi (barre tratteggiate). Il ferro è stato estratto dalle fibre con una diversa efficienza dai vari ceppi. *V. leptobacterium* è il fungo più attivo, sia in presenza che in assenza della membrana da dialisi. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard. I valori significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) dai rispettivi valori di controllo sono indicati con \* / **Extraction of iron from chrysotile 6D and crocidolite.** Total iron concentration [µM] in the filtered culture media of fungi grown in the absence (control samples) or in the presence (samples with crocidolite or chrysotile) of fibres is reported. The fibres were added either in direct contact with the mycelia (full bars) or separated by a dialysis membrane (dashed bars). The different fungi extracted different amount of iron. *V. leptobacterium* was the most active, both in the presence and in the absence of the membrane. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation. The values statistically different from their control value are indicated by\*.



**Figura 4.7 - Normalizzazione della concentrazione di ferro nei filtrati colturali e peso secco della biomassa** al termine dell'esperimento in assenza (control samples) e in presenza (samples with crocidolite o chrysotile) di fibre. Le fibre sono state addizionate sia a diretto contatto con il micelio fungino (barre piene) sia all'interno di una membrana da dialisi (barre tratteggiate). Il confronto di questa figura con la precedente indica che lo sviluppo della biomassa determina in parte l'attività estrattiva. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard. / **Elaboration of iron extraction data. The ratio between iron concentration in the culture media and the biomass dry weight** is reported for fungi grown in the absence (control samples) or in the presence (samples with crocidolite or chrysotile) of fibres. The fibres were added either in direct contact with the mycelia (full bars) or separated by a dialysis membrane (dashed bars) . The

comparison between this figure and the last one outlines that biomass development determines in part iron extraction. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

E' stata condotta un'osservazione al microscopio elettronico a scansione dell'interazione tra il micelio di *V. leptobactrum* e fibre di asbesto (figura 4.4). Il micelio cresciuto in presenza di crisotilo sembra più frammentato rispetto a quello cresciuto in assenza di fibre (la qualità dell'immagine non permette di fare molte considerazioni in quanto l'osservazione é complicata dalla presenza nei campioni sia di micelio fungino che di fibre di asbesto, che hanno caratteristiche di riflettanza molto diverse). Il micelio cresciuto in presenza di crocidolite sembra integro; inoltre si osserva in alcuni punti la presenza di un materiale apparentemente mucillaginoso tra le ife e le fibre.

A conferma del dato precedentemente presentato (figura 4.1), in presenza di crisotilo nessuno dei tre ceppi studiati mostra un'inibizione significativa della crescita, così come in presenza di crocidolite (figura 4.5). La misura della quantità di ferro presente nei terreni di coltura in seguito alla crescita dei funghi in presenza di fibre è stata effettuata secondo il protocollo esposto nel paragrafo 2.18.

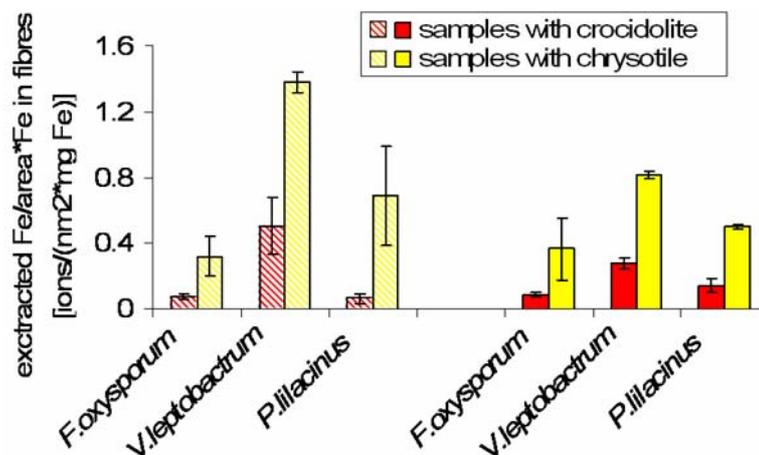
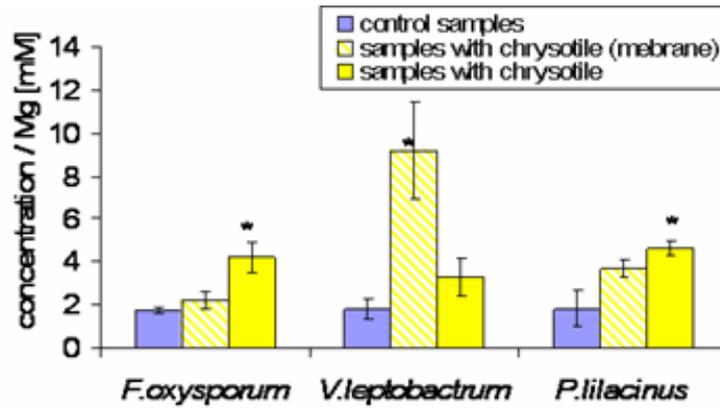
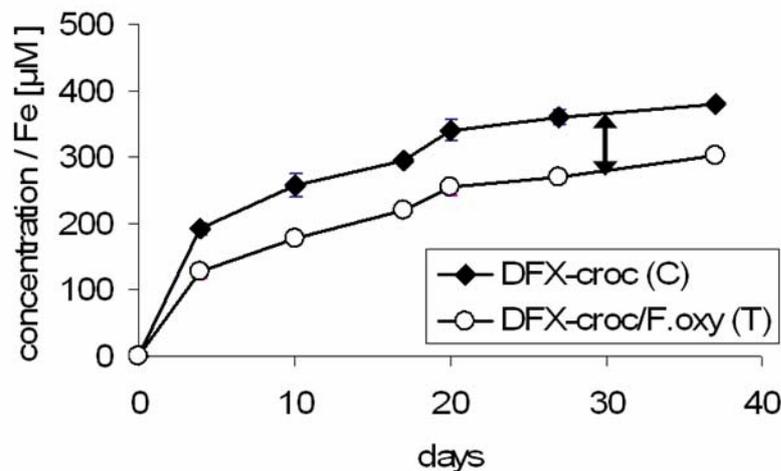


Figura 4.8 - Rapporto tra ioni ferro nei filtrati culturali e un fattore rappresentativo dell'area specifica ( $[m^2/g]$ ) e del contenuto di ioni ferro nelle fibre utilizzate (% in peso,  $[mg]$ ). Il grafico riporta i risultati sia dell'esperimento in cui le fibre di crocidolite UICC e crisotilo 6D sono state addizionate a diretto contatto con il micelio fungino (barre piene) sia di quello in cui sono state mantenute separate grazie ad una membrana da dialisi (barre tratteggiate). Dato il basso contenuto in ferro e l'elevata area specifica (v. tabella 2.1), i valori relativi al crisotilo sono maggiori di quelli relativi alla crocidolite. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard. / **Iron ions in the culture media divided by a factor representing both the specific surface ( $[m^2/g]$ ) and the amount of iron present in the fibres used (%wt).** The results of the experiments with the fibres either in direct contact with the mycelia (full bars) or separated by a dialysis membrane (dashed bars), are reported. The low iron content and the wide specific surface (see table 2.1) are responsible for the higher values obtained from chrysotile than crocidolite. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.



**Figura 4.9 - Estrazione di magnesio da fibre di crisotile 6D.** Il grafico mostra la concentrazione [mM] di magnesio misurata nel mezzo colturale dei funghi cresciuti in assenza (control samples) o in presenza (samples with chrysotile) di fibre addizionate a diretto contatto con il micelio fungino (barre piene) o mantenute separate grazie ad una membrana da dialisi (barre tratteggiate). Il ceppo appartenente alla specie *V. leptobactrum* si è dimostrato il più attivo. I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard. / **Magnesium extraction from chrysotile 6D.** Total magnesium concentration [mM] in the filtered culture media of fungi grown in the absence (control samples) or in the presence (samples with chrysotile) of fibres is reported. Fibres were added either in direct contact with the mycelia (full bars) or separated by a dialysis membrane (dashed bars). *V. leptobactrum* is the most active. The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.



**Figura 4.10 – Estrazione di ferro da fibre di crocidolite con deferoxamina.** Quantità di ferro (espressa come concentrazione [µM] nel surnatante) estratta da fibre di crocidolite incubate con una soluzione 1 mM di deferoxamina (DFX), un chelante forte del ferro. (DFX-croc/F.oxy) rappresenta l'andamento dell'estrazione del ferro da fibre precedentemente incubate (per 40 giorni) con *F. oxysporum*. (DFX-croc) rappresenta l'andamento dell'estrazione del ferro da parte di DFX da fibre di crocidolite tal quali. Si nota la minore quantità di ferro estraibile dalle fibre precedentemente incubate con il fungo, a conferma del ferro già estratto da *F. oxysporum*. / **Iron extracted from crocidolite fibres into a solution of 1mM deferoxamine.** The result is reported as [µM] iron concentration in the supernatant of the incubating solution. (DFX-croc/F.oxy) shows the rate of iron extraction from crocidolite previously incubated (40 days) with *F. oxysporum*. (DFX-croc) shows the rate of iron extraction from untreated crocidolite. The amount of iron available for extraction is lower in fungus-treated fibres than in untreated fibres, confirming the iron depletion due to fungal activity.

*F. oxysporum* ha confermato i dati già ottenuti nelle fasi precedenti di questo studio, rivelandosi un buon estrattore di ferro sia dalle fibre di crisotilo che da quelle di crocidolite (figura 4.6). *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* mostrano un'attività pari o maggiore di *F. oxysporum* nell'estrazione di ferro da entrambe le fibre testate. È da notare che nel caso di *V. leptobactrum*, quando la fibra è stata mantenuta all'interno della membrana da dialisi, ne è derivata una più elevata estrazione del ferro rispetto al trattamento in cui la fibra era a diretto contatto con il micelio. Il rapporto tra quantità di ferro estratto ad opera dei diversi ceppi e dalle diverse fibre e il peso secco della biomassa al termine dell'incubazione (figura 4.7), riflette l'andamento del dato relativo alla quantità assoluta di ferro estratto, escludendo quindi effetti della crescita della biomassa sull'efficienza dell'estrazione. L'unica eccezione è il dato relativo all'estrazione di ferro da parte di *P. lilacinus*, che spicca rispetto al dato assoluto se lo si normalizza per il peso della biomassa.

Inoltre la maggiore quantità di ferro estratto da fibre di crocidolite che da fibre di crisotilo riflette le diverse composizioni chimiche e caratteristiche di superficie delle due fibre (v. tabella 2.1). Infatti fattori quali l'area specifica del solido (espressa come  $\text{m}^2/\text{g}$ ) e l'abbondanza di ioni ferro nella struttura (espressa come % in peso) determinano l'entità dell'estrazione di ioni dal solido stesso. La tabella 2.1 mostra che la crocidolite ha area specifica più bassa del crisotilo, ma contiene più ferro. Per tenere conto di entrambi questi parametri chimico-fisici, la figura 4.8 rappresenta il rapporto tra il numero di ioni ferro portati in soluzione dall'azione del fungo e un fattore derivato dalla moltiplicazione dell'area specifica per il contenuto in peso di ioni ferro nelle due diverse fibre. Questa normalizzazione mostra come l'azione fungina, a dispetto dei valori assoluti di concentrazione di ioni ferro misurata nei filtrati colturali, abbia un effetto maggiore su fibre di crisotilo, rispetto a quelle di crocidolite.

Il crisotilo è un silicato di magnesio e nello specifico del campione utilizzato, questo ione costituisce circa il 24% in peso (v. tabella 2.1). Per questo motivo si è voluto verificare se l'attività dei funghi sulla struttura delle fibre comportasse anche l'estrazione di ioni magnesio, oltre che l'estrazione di ferro.

La misura del magnesio è stata effettuata nei terreni di coltura a seguito dell'incubazione del fungo con le fibre racchiuse in membrana tramite un metodo complessimetrico (v. paragrafo 2.19).

I ceppi *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* si sono dimostrati in grado di estrarre una quantità significativa di magnesio dalle fibre di crisotilo in entrambe le modalità di crescita, a differenza di *F. oxysporum* che mostra una differenza significativa tra il trattato e il controllo solo se cresciuto a diretto contatto con le fibre (fig. 4.9). Inoltre *V. leptobactrum* è il fungo che risulta avere un'efficienza maggiore in questo processo di solubilizzazione, avendo solubilizzato, nella condizione di maggior efficienza, in media una quantità di magnesio corrispondente al 33% del totale presente nelle fibre.

Come nel caso dell'estrazione del ferro, *V. leptobactrum* ha estratto una quantità di magnesio maggiore se cresciuto con fibre racchiuse in membrana da dialisi. *P. lilacinus* invece ha mostrato una capacità estrattiva simile in entrambe le modalità di crescita.

È stata inoltre effettuata una titolazione del magnesio nei terreni di coltura in cui è stata incubata la fibra in assenza del microrganismo fungino: la concentrazione di magnesio rilevata corrisponde a quella misurata nei controlli senza fibra. Questo dato dimostra che non vi sia rilascio spontaneo di magnesio nel mezzo colturale da parte delle fibre.

La stessa misura è stata condotta su filtrati colturali dei tre ceppi cresciuti in presenza di crocidolite, ma coerentemente col fatto che la crocidolite contiene Mg in piccole quantità, non si è riscontrata alcuna differenza rispetto ai campioni di controllo (dato non mostrato).

#### 4.2.3 Estrazione di ferro da fibre di crocidolite con deferoxamina.

Allo scopo di verificare la possibilità di estrarre ulteriormente ferro dalle fibre dopo l'incubazione con il fungo, un'aliquota di fibre precedentemente incubate con *F. oxysporum* e recuperate, è stata incubata in una soluzione di un chelante forte del ferro quale la deferoxamina (DFX). Le fibre sono state risospese in una soluzione contenente deferoxamina pH= 4.5. Ogni settimana sono state prelevate aliquote di soluzione di 4.5 ml, filtrate per eliminare i residui di fibra e utilizzate per misurare la concentrazione del ferro nel surnatante. La deferoxamina estrae in 35 giorni una quantità di ferro simile a quella estratta da *F. oxysporum* in 50 giorni (Daghino et al., 2005). L'andamento dell'estrazione di ferro dalla crocidolite precedentemente incubata e non con il fungo è simile, ma la quantità estratta è minore dopo l'incubazione con il fungo. La quantità di ferro disponibile per l'estrazione con chelanti è quindi ridotta dopo un'incubazione di 20 giorni con il fungo, confermando indirettamente la deplezione di ferro dalla superficie delle fibre ad opera del microrganismo. Tuttavia tale deplezione non impedisce che molecole chelanti (o eventualmente una incubazione prolungata con funghi attivi) possano ulteriormente estrarre ioni ferro dalle fibre (figura 4.12).

#### 4.2.4 Analisi al microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM) delle fibre di crisotilo 6D dopo incubazione con *V. leptobactrum*.

Questo esperimento è stato condotto grazie alla collaborazione della dott.ssa Putzu del Dipartimento di Traumatologia, Ortopedia e Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Torino, servizio di Tossicologia ed Epidemiologia Industriale.

Lo strumento utilizzato (v. paragrafo 2.20) permette di osservare campioni biologici idratati non metallizzati. E' stato quindi possibile osservare un campione a fresco di micelio e di fibre e di eseguire una microanalisi delle fibre per evidenziare l'eventuale variazione della loro composizione in seguito all'incubazione con il fungo stesso. Come controllo, sono stati osservati: un campione di micelio cresciuto nello stesso mezzo di coltura ma in assenza di fibre, e un campione di fibre di crisotilo 6D incubate nel solo mezzo di coltura fungino, in assenza del micelio.

Le immagini ottenute al ESEM, sebbene poco nitide a causa della bassa conduttività del campione non metallizzato, hanno confermato la stretta interazione tra le fibre e le ife fungine già osservata su campioni appositamente preparati (v. figura 4.4).

La microanalisi ha mostrato una significativa alterazione della composizione delle fibre in seguito all'incubazione con *V. leptobactrum*, resa evidente dal cambiamento delle percentuali in peso dei diversi ossidi. In particolare è interessante osservare l'alterazione delle percentuali di MgO, rispetto al SiO<sub>2</sub>, che costituisce lo scheletro della fibra: il crisotilo di controllo, ossia non incubato con il fungo, presenta MgO e SiO<sub>2</sub> in quantità simili (rispettivamente 42% e 47%, tabella 4.11). In seguito all'incubazione con il fungo queste percentuali passano a 21% di MgO e 50% di SiO<sub>2</sub> (tabella 4.11), confermando il depauperamento di ioni Mg già evidenziato tramite la sua titolazione nei terreni di coltura. Questa misura è stata ripetuta in corrispondenza di tre diversi punti della componente fibrosa del campione, ottenendo risultati simili. Inoltre, per escludere l'interferenza della componente miceliare del campione nella misura, è stata condotta la stessa microanalisi su un campione di micelio cresciuto in assenza di fibre, ottenendo una maggiore abbondanza di Na<sub>2</sub>O (7,9 Mol%), SO<sub>3</sub> (19,3 Mol%) e K<sub>2</sub>O (19,7 Mol%) prevedibile per la materia vivente, rispetto a SiO<sub>2</sub> (16,1 Mol%), e una quantità di MgO di 37 Mol%.

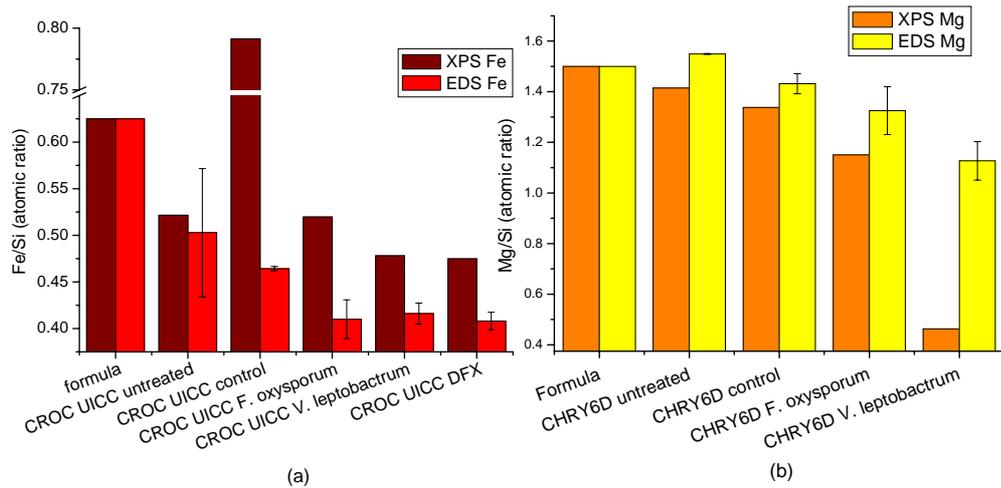
	Crisotilo 6D nel mezzo di coltura		Crisotilo 6D nel Mezzo di coltura + <i>Verticillium sp.</i>	
	Wt %	Mol %	Wt %	Mol %
Na <sub>2</sub> O	0.00	0.00	4.32	4.13
MgO	42.41	54.91	21.59	31.73
SiO <sub>2</sub>	47.61	41.35	50.79	50.07
SO <sub>3</sub>	1.28	0.83	8.52	6.30
K <sub>2</sub> O	0.29	0.16	8.84	5.56
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8.42	2.75	5.93	2.20
Total	100	100	100	100

**Tabella 4.11 - Risultato della microanalisi condotta all'ESEM di fibre di crisotilo 6D** (metodo descritto al par. 2.20). Le fibre sono state precedentemente incubate per 60 gg in mezzo di coltura liquido, o nello stesso mezzo in presenza di *V. leptobactrum* (colonne indicate con \*) / **ESEM microanalysis of chrysotile 6D fibres** (see 2.20 for the methods). The fibres were previously incubated for 60 days in a liquid culture medium, or in the same medium in the presence of *V. leptobactrum* (columns marked with \*).

#### 4.2.5 Analisi XPS e EDS di fibre di crisotilo 6D e crocidolite dopo incubazione con *F. oxysporum* e *V. leptobactrum*.

Tali analisi sono state condotte dal dott. F. Turci grazie alla collaborazione del prof. M.F. Hochella (Virginia Polytechnic Institute and State University, USA). L' XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*) è un metodo analitico che permette di ottenere la composizione e lo stato di legame di elementi che si trovino alla superficie del solido in esame, ossia tra i 5-10 strati atomici esterni, per una profondità inferiore ai 10 nm. L'analisi SEM-EDS invece fornisce la composizione chimica del bulk del solido (Werner et al., 1995).

Sono state prese in esame fibre di crisotilo 6D e fibre di crocidolite UICC non trattate (*untreated*), incubate nel mezzo di coltura in assenza di micelio (*control*) e in presenza di *F. oxysporum* e *V. leptobactrum*. Le fibre incubate nel solo mezzo di coltura Czapek-glucosio sono considerate come "controllo" in quanto hanno subito lo stesso trattamento delle fibre "trattate", salvo la presenza del micelio. La prima colonna rappresenta il valore calcolato sulla base delle formula di struttura dei due diversi tipi di fibra (figura 4.12). Tetraedri di SiO<sub>4</sub> rappresentano lo scheletro delle fibre, quindi la composizione delle fibre viene espressa in rapporto al silicio.

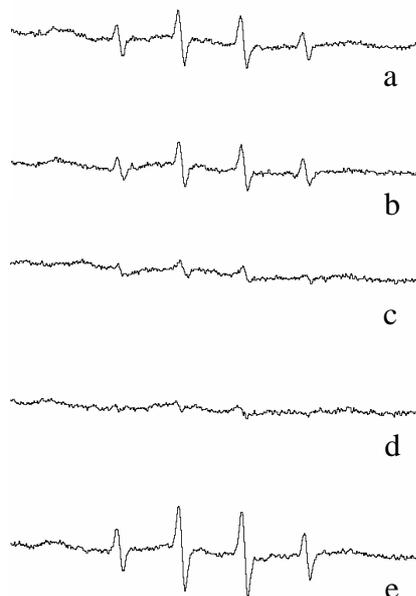


**Figura 4.12: Analisi SEM-EDS e XPS di fibre di crocidolite (a) e crisotilo (b)** tal quali (untreated), incubate nel mezzo di coltura in assenza di micelio (control), incubate in presenza delle specie fungine *F. oxysporum* o *V. leptobactrum*. Formula: dato calcolato sulla base della formula di struttura dei due minerali. CROC UICC DFX= crocidolite preincubata in una soluzione di deferossamina. / **SEM-EDS and XPS analysis of crocidolite (a) and chrysotile (b)** fibres either untreated, or incubated in the fungal culture medium alone (control), or incubated in the same culture medium and in the presence of *F. oxysporum* or *V. leptobactrum*. Formula: data calculated on the basis of the structural formula of the minerals. CROC UICC DFX= crocidolite pre-treated with deferoxamine.

La figura 4.12b mostra il rapporto atomico Mg/Si misurato per le fibre di crisotilo. La misura riguardante la fibra nel complesso (EDS) mostra una diminuzione del valore di tale rapporto per le fibre incubate con i due ceppi fungini, che, nel caso di *V. leptobactrum*, risulta statisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) rispetto al controllo (ossia le fibre incubate nel solo mezzo di coltura). Tale riduzione è più accentuata se si considera il valore misurato alla superficie delle fibre (XPS), soprattutto se incubate con *V. leptobactrum*.

L'analisi all' XPS della crocidolite (Figura 4.12a) mostra un aumento del rapporto Fe/Si nelle fibre incubate nel solo mezzo di coltura rispetto alle fibre non trattate, forse imputabile ad un fenomeno di deposizione di ferro proveniente dal mezzo di coltura sulla superficie delle fibre. Le fibre trattate con *F. oxysporum* sono caratterizzate da un rapporto atomico Fe/Si ridotto rispetto alle fibre di controllo. Il trattamento con *V. leptobactrum* causa una diminuzione del rapporto Fe/Si a causa del depauperamento del ferro di superficie pari a quello ottenuto con il trattamento delle fibre con deferossamina, un chelante forte del Fe(III). Una tendenza alla diminuzione del rapporto Fe/Si si rileva anche con le misurazioni al SEM-EDS, sebbene le differenze tra le varie fibre non siano statisticamente significative ( $P > 0.05$ ).

### 4.3 Valutazione della reattività delle fibre dopo l'incubazione *in vitro* in presenza di funghi



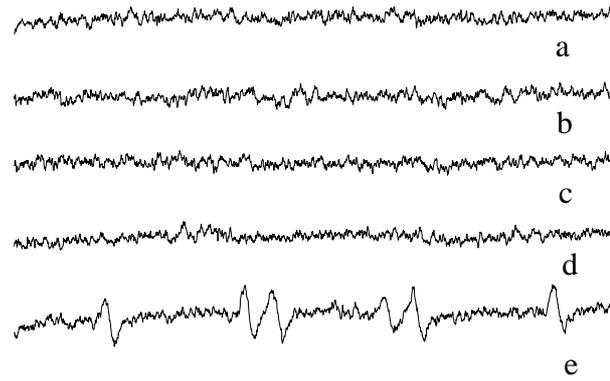
**Figura 4.13 - Rilascio di radicali OH<sup>•</sup> (segnale dell'addotto [DMPO-OH]<sup>•</sup>) da fibre di crisotilo 6D tal quali (a), incubate nel solo mezzo di coltura (b), incubate nel mezzo di coltura in presenza di *F. oxysporum* (c), *P. lilacinus* (d), *V. leptobactrum*. (e). Due delle specie testate causano la diminuzione della reattività di superficie delle fibre. / OH<sup>•</sup> radical release (signal of the adduct [DMPO-OH]<sup>•</sup>) from chrysotile fibres untreated (a), incubated in the culture medium alone (b), incubated with *F. oxysporum* (c), *P. lilacinus* (d) and *V. leptobactrum* (e). Two of the tested species lead to the blunting of fibres surface reactivity.**

È stata indagata la capacità delle fibre di crisotilo e crocidolite di catalizzare la formazione di radicali ossidrilici (OH<sup>•</sup>) e carbossilici (CO<sub>2</sub><sup>•-</sup>) in presenza rispettivamente di perossido di idrogeno e sodio formiato, tramite la tecnica dello spin-trapping (EPR).

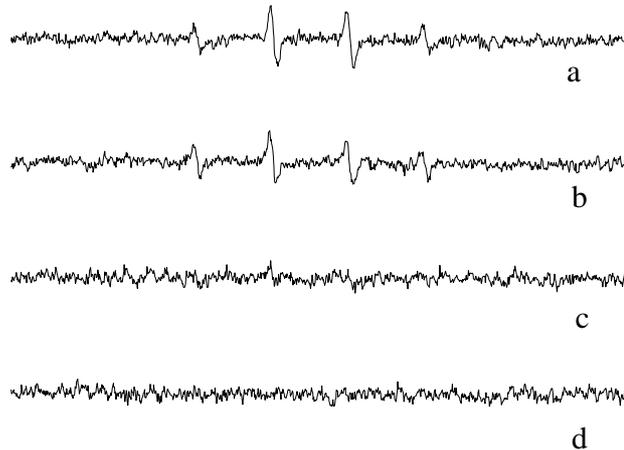
Fibre di crisotilo 6D non trattate o incubate nel solo terreno di coltura sono attive nella formazione di radicali ossidrilici. Questa attività risulta inibita in seguito all'incubazione con *F. oxysporum* e *P. lilacinus*, mentre è mantenuta in seguito all'incubazione con *V. leptobactrum* (figura 4.13a-e).

Le stesse fibre standard, ossia non trattate in alcun modo, risultano inattive nel rilascio di radicali CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> in presenza di formiato (figura 4.14a). L'incubazione nel solo terreno Czapeck, o in presenza dei ceppi *F. oxysporum* e *P. lilacinus*, non modifica questa caratteristica. La formazione di radicali organici, che dipende dalla presenza di ioni Fe in stato ridotto, è però riattivata in seguito all'incubazione con *V. leptobactrum* (figura 4.14e). Quindi *F. oxysporum* e *P. lilacinus* hanno causato, parallelamente al depauperamento di ioni ferro dalle fibre, l'inibizione del rilascio di radicali ossidrilici crisotilo (figura 4.13c-d); al contrario *V. leptobactrum* nonostante sia un efficiente solubilizzatore, ne ha aumentato il rilascio, così come ha riattivato il rilascio di radicali CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> (figura 4.13e e 4.14e).

Per quanto riguarda la crocidolite, è stato misurato il rilascio di radicali ossidrilici con la stessa tecnica. Nei lavori precedenti era già stata evidenziata la capacità di *F. oxysporum* di inibire il rilascio dei radicali (Martino *et al.*, 2003; Daghino *et al.*, 2005). Anche in seguito all'incubazione con *V. leptobactrum* e *P. lilacinus* si osserva un'inibizione della reattività (figura 4.15c-d) rispetto alle fibre di controllo (figura 4.15a-b).



**Figura 4.14 - Rilascio di radicali  $\text{CO}_2^{\cdot-}$  (segnale dell'addotto  $[\text{DMPO-CO}_2]^{\cdot-}$ ) da fibre di crisotilo 6D** tal quali (a), incubate nel solo mezzo di coltura (b), incubate nel mezzo di coltura in presenza di *F. oxysporum* (c), *P. lilacinus* (d), *V. leptobactrum*. (e). La modificazione causata da *V. leptobactrum* sulle fibre, attiva il rilascio di radicali  $\text{CO}_2^{\cdot-}$ . /  **$\text{CO}_2^{\cdot-}$  radical release (signal of the adduct  $[\text{DMPO-CO}_2]^{\cdot-}$ ) from chrysotile fibres** untreated (a), incubated in the culture medium alone (b), incubated with *F. oxysporum* (c), *P. lilacinus* (d) and *V. leptobactrum* (e). *V. leptobactrum* activity on the fibres, induce the  $\text{CO}_2^{\cdot-}$  radical release.



**Figura 4.15 - Rilascio di radicali  $\text{OH}^{\cdot}$  (segnale dell'addotto  $[\text{DMPO-OH}]^{\cdot}$ ) da fibre di crocidolite UICC** tal quali (a), incubate nel solo mezzo di coltura (b), incubate nel mezzo di coltura in presenza di *V. leptobactrum*. (c) e di *P. lilacinus* (d). Il trattamento con questi ceppi fungini porta all'inibizione della reattività di superficie delle fibre di crocidolite. /  **$\text{OH}^{\cdot}$  radical release (signal of the adduct  $[\text{DMPO-OH}]^{\cdot}$ ) from crocidolite UICC fibres** untreated (a), incubated in the culture medium alone (b), incubated with *V. leptobactrum* (c) and *P. lilacinus* (d). The treatment of fibres with these fungal strains leads to the inhibition of surface reactivity of crocidolite.

#### 4.4 Studio della genotossicità delle fibre.

Vista la modificazione della reattività chimica di superficie delle fibre a seguito dell'incubazione in presenza dei miceli fungini, sono state prese in esame le potenzialità ossidative delle fibre verso molecole biologiche, in particolare verso il DNA. E' stata valutata la formazione di guanosina ossidata (8-oxo-7,8-diidro-2'-deossiguanosina - 8-oxodGuo) come

marcatore dello stress ossidativo a carico della molecola, sia in un contesto acellulare (paragrafo 4.4.1), che cellulare (paragrafo 4.4.2).

#### 4.4.1 Ossidazione di molecole di DNA isolato

Studi presenti in letteratura hanno evidenziato come il danno ossidativo al DNA indotto da fibre di asbesto *in vitro* sia legato allo stato redox e alla mobilità del ferro (v. capitolo 1). L'incubazione di DNA isolato in una soluzione di  $\text{FeSO}_4$  e EDTA, quindi in presenza di  $\text{Fe}^{2+}$  in forma chelata, ha indotto la formazione di 8oxodGuo, con un valore massimo corrispondente ad una concentrazione di EDTA di 1mM, doppia rispetto alla concentrazione di  $\text{FeSO}_4$  (figura 4.17a).

Dallo studio bibliografico è emerso che esperimenti analoghi a quello qui descritto vedevano l'utilizzo di sospensioni di fibre e DNA plasmidico, in presenza di EDTA e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Lund and Aust, 1992). I primi esperimenti sono stati quindi volti a definire le condizioni sperimentali ottimali, ossia la concentrazione di fibre, di EDTA e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e il tempo di incubazione. A questo scopo sono state utilizzate le fibre tal quali. Lo schema sperimentale seguito è illustrato in figura 4.16.

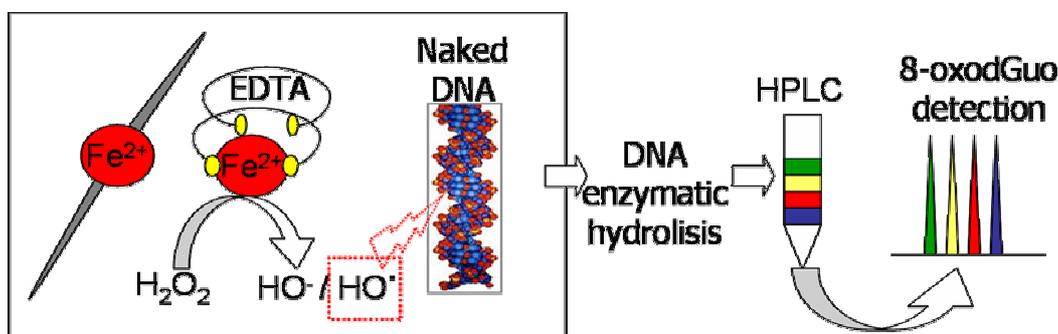
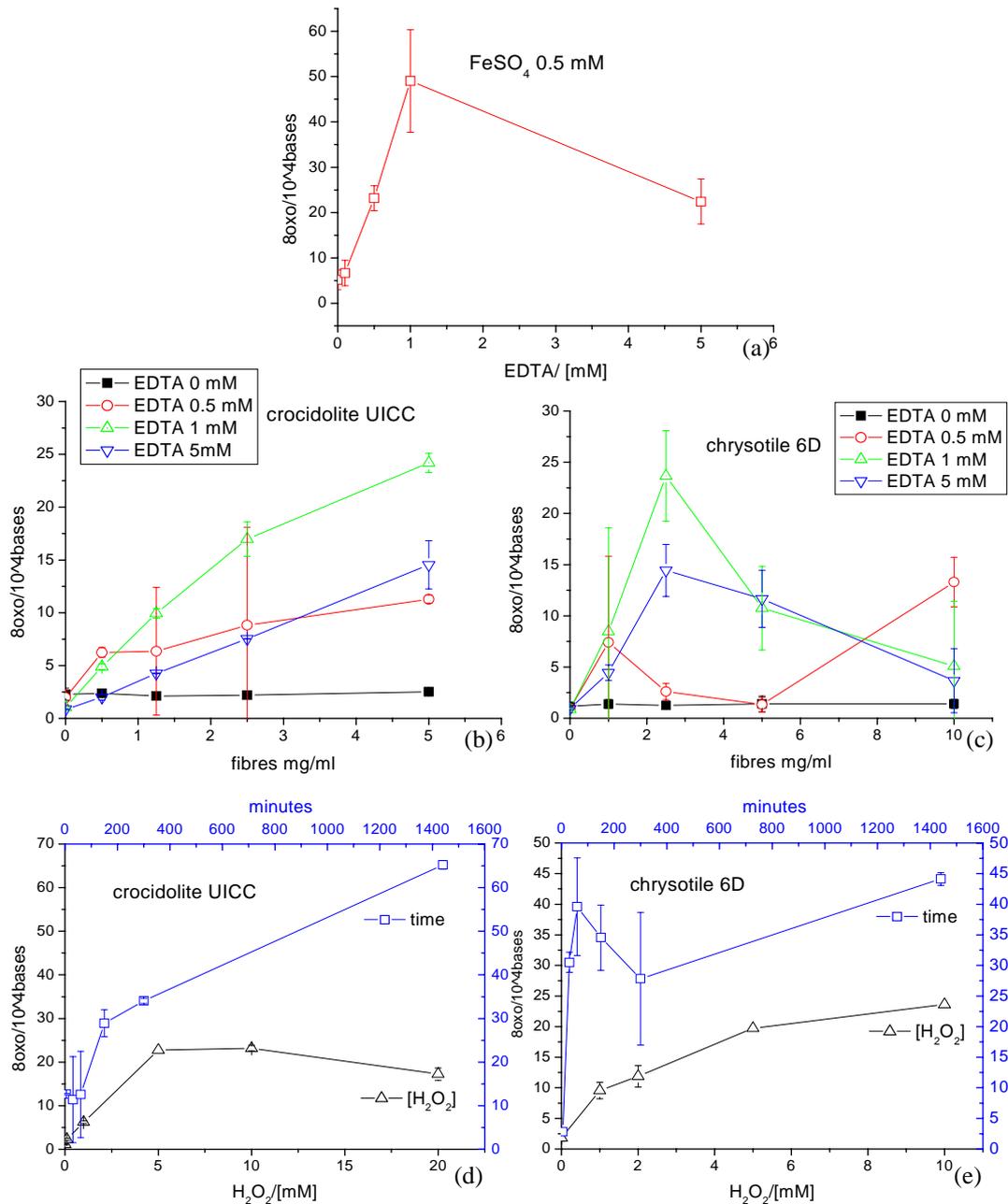


Figura 4.16 - Schema dell'esperimento allestito per lo studio dell'ossidazione del DNA isolato. / Schematic representation of the experiment set up for the study of naked DNA oxidation.



**Figura 4.17 - Messa a punto delle condizioni ottimali per la valutazione dell'ossidazione del DNA *in vitro*.** Condizioni sperimentali: in tutti gli esperimenti è stata utilizzata una soluzione di DNA 0.05 mg/ml in NaCl 50mM; (a) FeSO<sub>4</sub> 0.5 mM, concentrazione crescente di EDTA; (b-c) quantità crescenti di fibre di crocidolite UICC (b) e crisotilo 6D (c), concentrazioni crescenti di EDTA (da 0 a 5 mM), tempo di incubazione 1h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM; (d-e) asse X in basso: concentrazioni crescenti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fibre 2 mg/ml, EDTA 1 mM, 1 ora di incubazione; (d-e) asse X in alto: tempi di incubazione variabili, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM, fibre 2 mg/ml, EDTA 1 mM. Quantità di 8-oxodGuo espressa rispetto alla quantità di basi normali nel campione. I dati risultano dalla media di due ripetizioni ± deviazione standard. / **Set up of the experimental conditions for the study of naked DNA oxidation.** In each assay DNA 0.05 mg/ml in NaCl 50mM was used; (a): FeSO<sub>4</sub> 0.5 mM, increasing concentration of EDTA; (b-c): increasing amounts of crocidolite UICC (b) and chrysotile 6D (c) fibres, increasing concentration of EDTA (from 0 to 5 mM)

with 1h incubation and 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (d-e) lower X axis: increasing concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with fibres 2 mg/ml, EDTA 1 mM and 1 h incubation; (d-e) upper X axis: different incubation time, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM, fibre 2 mg/ml, EDTA 1 mM. 8-oxodGuo is expressed as ratio with the total amount of normal bases.

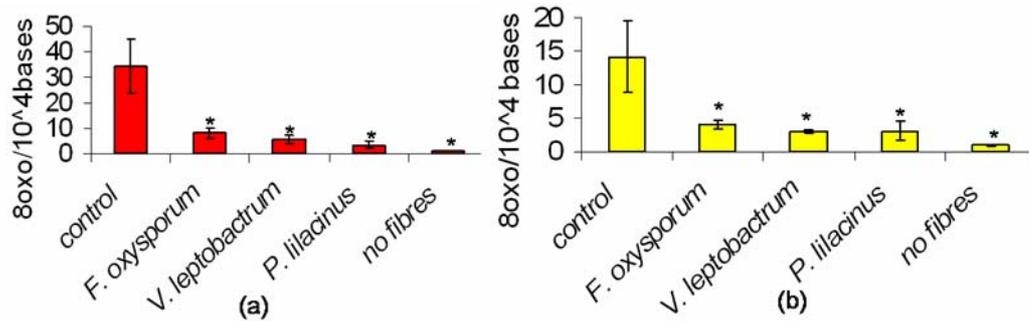
La figura 4.17b mostra che per la crocidolite, il danno ossidativo è proporzionale alla concentrazione di fibre in sospensione e che, a parità di concentrazione di fibre, si ottiene un massimo di stress ossidativo per una concentrazione di EDTA pari a 1 mM. Per quanto riguarda il crisotilo (figura 4.17c), si ottiene un massimo di danno ossidativo in corrispondenza di 2.5 mg/ml di fibre e di EDTA 1mM. La diminuzione del livello di guanosina ossidata rilevata per concentrazioni maggiori di fibre di crisotilo potrebbe essere dovuta a fenomeni di adsorbimento della molecola alle fibre stesse. Si può notare che, in accordo con i dati bibliografici, in assenza di EDTA si rileva un ridotto effetto di ossidazione del DNA, invariato all'aumentare della quantità di fibre in sospensione (figure 4.17b e 4.17c). Quindi i complessi EDTA-Fe(II) sembrano giocare un ruolo predominante nel mediare la reazione di ossidazione della guanosina. Inoltre per concentrazioni di EDTA maggiori di 1 mM si registra una diminuzione del danno ossidativo al DNA, come si era già visto utilizzando una soluzione di FeSO<sub>4</sub> al posto delle fibre (figura 4.17a). Tale diminuzione potrebbe essere dovuta ad un effetto di competizione tra il DNA e l'EDTA per la reazione con i radicali ossidrilici. Infatti le costanti di reazione con l'EDTA ( $4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) e con il DNA ( $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) sono simili, e quindi si può ipotizzare che aumentando la concentrazione dell'EDTA in soluzione, i radicali ossidrilici reagiscano con esso piuttosto che con il DNA, risultando in una diminuzione del danno ossidativo al DNA.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è substrato della reazione di Fenton che genera radicali ossidrilici, responsabili della formazione della 8-oxodGuo per idrossilazione della guanosina. L'aggiunta di tale reagente nel sistema sperimentale permette quindi la rilevazione della reattività di superficie delle fibre, altrimenti limitata dalla velocità di ossidazione del Fe(II) che catalizza la reazione (Lund and Aust 1992). In presenza di 2 mg/ml di fibre e 1mM EDTA, all'aumentare della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si rileva un aumento progressivo della 8-oxodGuo che raggiunge un plateau ad un valore di 5mM (figura 4.17d-e). Si può ipotizzare che per concentrazioni più elevate di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il fattore limitante la reazione sia costituito dal numero di siti reattivi sulla superficie delle fibre.

Sono state effettuate incubazioni del DNA in presenza di fibre per durate da 0 a 24 ore. I valori ottenuti durante le prime ore di incubazione con la crocidolite UICC (figura 4.17d) sono simili tra loro, mentre si registra un incremento rapido tra la seconda e la quarta ora, dopo la quale il valore cresce lentamente ma progressivamente fino alle 24 ore. Il crisotilo (figura 4.17e) sembra invece indurre un danno immediato, il cui valore si stabilizza dopo i primi 60 minuti.

Si è deciso di operare nelle condizioni ottimali che permettessero per ciascuna fibra la rilevazione del danno ossidativo al DNA. Sono state quindi scelte le seguenti condizioni sperimentali: 2mg/ml fibra, EDTA 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di 5 mM per la crocidolite e 2 mM per il crisotilo, e di condurre incubazioni di 4 ore a temperatura ambiente.

Fibre tal quali (standard), precedentemente incubate nel solo mezzo di coltura (control) o in presenza dei tre ceppi fungini selezionati (*F. oxysporum*, *V. leptobactrum*, *P. lilacinus*) sono state risospese ed incubate in una soluzione contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EDTA e DNA (v. paragrafo 2.22). Al termine del periodo di incubazione tale sospensione è stata centrifugata e il surnatante contenente il DNA è stato sottoposto a vari passaggi di digestione enzimatica per poi procedere al rilevamento della formazione della guanosina ossidata tramite HPLC-EC (v. paragrafo 2.22 e figura 4.16). Sono stati testati 3 campioni di fibre indipendenti (provenienti da colture distinte, cresciute in parallelo) per ogni fungo, ogni campione in triplo. Quindi le barre corrispondono alla media di valori ottenuti da fibre incubate in sistemi di coltura fungini distinti. Lo stesso vale per le fibre di controllo incubate nel solo mezzo di coltura. Le figure rappresentano i risultati complessivi, dati dalla media di tutte le ripetizioni.



**Figura 4.18 - Ossidazione di DNA isolato in presenza di crocidolite UICC (a) e crisotilo 6D (b)** precedentemente incubate nel solo mezzo di coltura fungino (control) in presenza di *F. oxysporum*, *V. leptobactrum* o *P. lilacinus*. (no fibres) indica valori basali misurati in assenza di fibre. La quantità di 8-oxodGuo è espressa rispetto alla quantità di basi normali nel campione ( $10^4$ bases). I valori indicati con \* sono significativamente diversi dai valori di controllo. / **Naked DNA oxidation by crocidolite UICC (a) or chrysotile 6D (b) fibres**, previously incubated in the growth medium of fungi, without mycelia (control) or in the presence of mycelia of *F. oxysporum*, *V. leptobactrum* or *P. lilacinus*. (no fibres) is the basal level of 8oxodGuo measured in the absence of fibres. 8-oxodGuo is expressed as ratio with the total amount of normal bases ( $10^4$ bases). The values marked with \* are significantly different from the control values.

Si riscontra una diminuzione significativa ( $P < 0.05$ ) dell'induzione di 8oxodGuo da parte di fibre di crocidolite e di crisotilo in seguito all'incubazione con i miceli fungini (Figura 4.17). Si considera come controllo la fibra incubata nel solo mezzo di coltura, che differisce dalle fibre incubate con i ceppi fungini solo per l'assenza degli stessi nel sistema di coltura. La differenza riscontrata tra il livello basale di 8oxodGuo in assenza di fibre e i livelli misurati in presenza di fibre trattate non è statisticamente significativa ( $P > 0.05$ ). I risultati sono ripetibili.

Lo stesso esperimento condotto utilizzando fibre standard ha rivelato che queste costituiscono una fonte di stress ossidativo per il DNA nelle condizioni sperimentali utilizzate: i valori di 8-oxodGuo ottenuti sono 11.95 ( $\pm 0.3$ ) per la crocidolite e 9.12 ( $\pm 2.3$ ) per il crisotilo (espressi come 8oxo/ $10^4$ bases) e sono superiori al valore di background ottenuto in assenza di fibre (1.04 ( $\pm 0.09$ )). Bisogna sottolineare però che tali valori sono inferiori a quelli ottenuti per le fibre di controllo, con uno scarto particolarmente elevato nel caso della crocidolite. Quindi l'incubazione nel mezzo di coltura attiva il potenziale ossidativo delle fibre nei confronti del DNA.

Questi risultati sono stati ottenuti analizzando la frazione di DNA separata per centrifugazione dalle fibre dopo l'incubazione (v. paragrafo 2.22). Dato il rischio che si verificasse un'adsorbimento della molecola di DNA sulla superficie delle fibre di crisotilo, particolarmente ampia e idrofila, è stata condotta la stessa analisi sul DNA eventualmente associato al pellet di fibre di crisotilo dopo la centrifugazione. In questo caso, dopo la separazione dal surnatante le fibre sono state risospese ed è stata condotta una digestione enzimatica direttamente su questa frazione: è stata rilevata la presenza di DNA, in quantità pari a circa il 40% di quello rilevato in totale nel campione, considerando sia il surnatante che le fibre. Si è osservata la produzione di 8oxodGuo anche nella frazione di DNA a contatto con le fibre, senza però riscontrare differenze tra i diversi campioni di crisotilo (standard, controllo e preincubato con i vari ceppi; dato non mostrato). Ciò suggerisce che il ferro associato alle fibre non sia più reattivo di quello in soluzione e che sia significativo analizzare la frazione di DNA in soluzione, la cui ossidazione è dovuta alla formazione di complessi Fe-EDTA.

#### 4.4.2 Ossidazione di DNA cellulare

Allo scopo di testare le proprietà ossidanti delle diverse fibre nei confronti del DNA cellulare, sono state scelte due linee cellulari, le HL60 e le A549.

La prima è una linea cellulare promielocitica (derivata da una leucemia di cellule precursori della linea mieloide). Le HL60 possono differenziare spontaneamente o possono essere indotte al differenziamento utilizzando butirrato, ipoxantina, forbol-miristato acetato, dimetilsolfossido, actinomicina D e acido retinico. Tali cellule differenziate esibiscono un'attività fagocitica (Takeuchi and Morimoto 1994).

La linea cellulare A549 deriva da un carcinoma polmonare umano. Si tratta quindi di cellule dell'epitelio polmonare, quindi possibili target *in vivo* dell'effetto tossico delle fibre di asbesto. Per questo motivo sono state utilizzate in molti precedenti studi volti a chiarire i meccanismi di tossicità dell'asbesto (Riganti et al., 2002).

Per definire le condizioni di incubazione si è testata dapprima la citotossicità delle fibre (tramite il test MTT, v. paragrafo 2.23.2) e poi sono state condotte alcune incubazioni caratterizzate da durata e dosi variabili di fibre tal quali, crocidolite UICC e crisotilo 6D. Tali esperimenti hanno permesso di determinare quale fosse un tempo di contatto tra cellule e fibre tale da permettere l'induzione di un danno ossidativo, senza però imporre effetti citotossici troppo elevati. Si è scelto di operare in condizioni tali da mantenere un tasso di vitalità cellulare superiore al 50%.

In seguito, le due linee cellulari sono state incubate in presenza delle diverse fibre, precedentemente trattate o meno con i diversi ceppi fungini, e poi sottoposte ad estrazione di DNA nucleare allo scopo di misurare i livelli di 8oxodGuo.

##### *HL60*

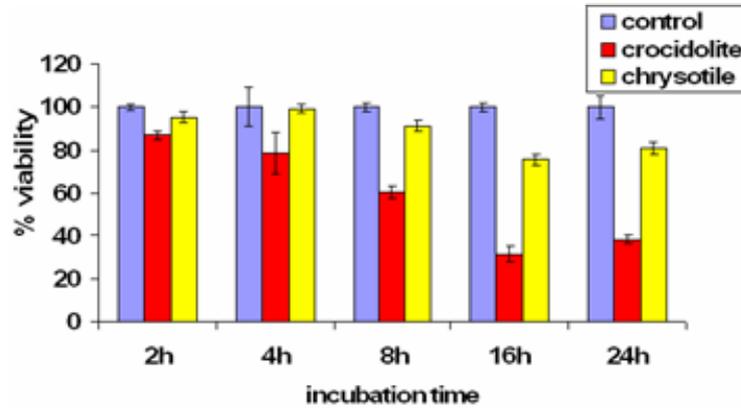
Per le HL60 ogni esperimento è stato preceduto da 20 ore di incubazione con PMA (forbol-miristato acetato 250 nM) allo scopo di indurre il differenziamento delle cellule stesse. In seguito a questo trattamento le HL60 diventano aderenti ed acquisiscono proprietà simili a quelle dei macrofagi, tra cui la fagocitosi. Tali cellule differenziate verranno indicate di seguito con la sigla PMA-HL60.

Le PMA-HL60, se sottoposte ad un'incubazione di 24 ore con crisotilo e crocidolite a 6, 12 e 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , hanno mostrato una vitalità rispettivamente dell' 80% e del 50% rispetto alle cellule non incubate con le fibre (controllo), indipendentemente dalla dose (dato non mostrato). Il test è stato ripetuto utilizzando la dose più alta (24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e diversi tempi di incubazione (figura 4.19). La percentuale di cellule vitali diminuisce con l'aumentare del tempo di incubazione fino a scendere al di sotto del 50% per la crocidolite dopo 16 ore. Il crisotilo non ha un effetto citotossico elevato, infatti anche dopo 24 ore la vitalità cellulare si attesta attorno all'80%.

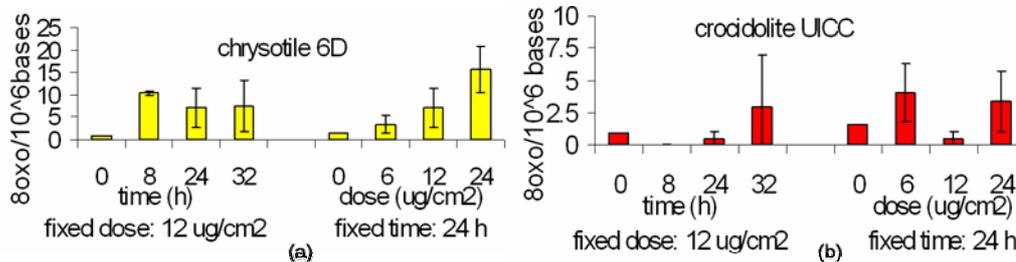
Le prove preliminari condotte utilizzando le fibre tal quali, hanno mostrato che il crisotilo 6D induce l'ossidazione della guanosina nelle prime 8 ore di incubazione, mentre nelle ore successive il valore non cambia. Si rileva un effetto della dose: sebbene i valori di 8oxodGuo ottenuti con dosi diverse di fibre non siano statisticamente diversi l'uno dall'altro, si rileva una tendenza all'aumento dose-dipendente dei valori medi. Al fine di ottenere un'induzione rilevabile del danno al DNA si è scelto di condurre delle incubazioni della durata di 8 ore in presenza di 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di fibre di crisotilo.

Considerando i risultati dei test di citotossicità, si è ritenuto opportuno mantenersi al di sopra della soglia di vitalità del 50%, anche per poter ottenere un numero di cellule sufficiente per consentire la successiva rivelazione della 8oxodGuo. Si è scelto quindi di esporre le cellule alle fibre per 8 ore. Inoltre, si è visto che i valori medi di 8oxodGuo rilevati in seguito ad

incubazione con crocidolite UICC sono maggiori rispetto a quelli di base, ma non statisticamente differenti né per incubazioni prolungate (32 ore) né per dosi elevate (24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; figura 4.20). Tuttavia, considerando che lo scopo dell'esperimento è il confronto tra fibre che hanno subito trattamenti diversi, si è valutato che anche una bassa induzione dell'ossidazione fosse sufficiente per evidenziare eventuali differenze. Si è scelto quindi, come per il crisotilo, di condurre delle incubazioni di 8 ore in presenza di 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di fibre di crocidolite.



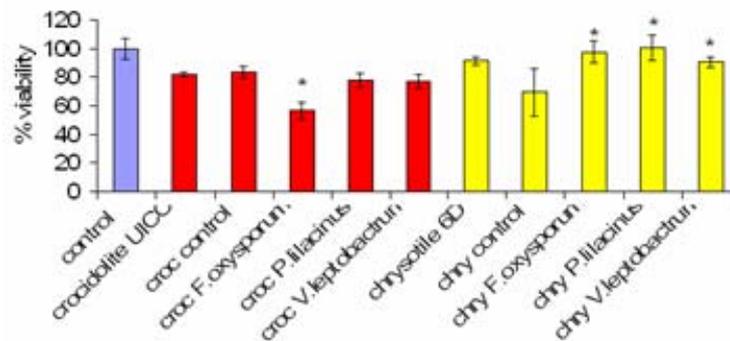
**Figura 4.19 – Saggio di citotossicità di cellule PMA-HL60** incubate con 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di crocidolite UICC o crisotilo 6D. La vitalità cellulare è espressa come percentuale rispetto ad un controllo costituito da cellule incubate per lo stesso periodo di tempo in assenza di fibre. / **Citotoxicity assay with PMA-HL60** incubated with 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of either crocidolite UICC or chrysotile 6D. The viability is expressed as percentage of a control cells incubated for the same time without fibres.



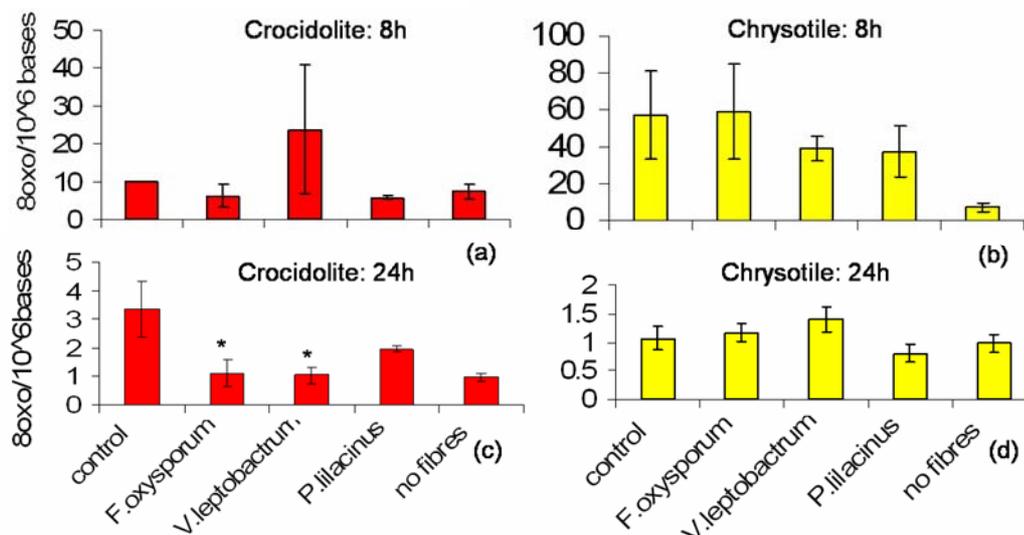
**Figura 4.20 – Induzione della formazione di 8oxodGuo in DNA nucleare di cellule PMA-HL60** da parte di fibre di crisotilo 6D (a) e crocidolite UICC (b). Sono stati testati diversi tempi di incubazione e dosi allo scopo di individuare le condizioni ottimali per gli esperimenti successivi. La quantità di 8oxodGuo formatasi è calcolata rispetto al numero di basi normali nel campione (8oxo/ $10^6$ bases). I valori riportati derivano dalla media di tre ripetizioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. / **8oxodGuo formation in nuclear DNA of HL60 cells**, induced by chrysotile 6D (a) and crocidolite UICC (b). Several incubation time and doses were tried to find the best experimental conditions for subsequent experiments. The amount of 8oxodGuo detected is calculated as ratio with the total amount of normal bases detected in the sample (8oxo/ $10^6$ bases). The data presented are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

Fibre di crocidolite tal quali (“crocidolite UICC” in figura 4.21) e incubate nel solo mezzo di coltura (“croc control” in figura 4.21) esercitano un effetto citotossico simile, che è invece aumentato in seguito al trattamento delle stesse fibre con *F. oxysporum*. Il pre-trattamento del crisotilo nel solo mezzo di coltura fungino (“chry control” in figura 4.21) non ne altera gli effetti citotossici, mentre le modificazioni indotte dall’incubazione con i tre ceppi fungini (fibre trattate) riduce la citotossicità del crisotilo sulle cellule PMA-HL60 (figura 4.21). Confrontando

i grafici 4.19 e 4.21 si può notare che i valori di vitalità cellulare ottenuti con la crocidolite UICC variano tra il 60 e l'80%, mentre quelli ottenuti con il crisotilo variano tra l'80 e il 100%.



**Figura 4.21 - Saggio di citotossicità di cellule PMA-HL60** incubate con  $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  di crocidolite UICC o crisotilo 6D (tal quali), o con le stesse fibre precedentemente incubate nel solo mezzo di coltura fungino (“croc control” e “chry control”) o nel mezzo di coltura in presenza dei miceli di *F. oxysporum*, *P. lilacinus*, *V. leptobactrum*. La vitalità cellulare è espressa come percentuale rispetto ad un controllo costituito da cellule incubate per lo stesso periodo di tempo in assenza di fibre (control). I valori significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) rispetto al controllo (rappresentato da fibre incubate nel mezzo di coltura fungino, in assenza dei miceli, “croc control” e “chry control”) sono indicate da un asterisco. / **Cytotoxicity assay with PMA-HL60** incubated with  $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  of either crocidolite UICC or chrysotile 6D (untreated), or with the same fibres previously incubated in the fungal growth medium alone (“croc control” and “chry control”) or in the growth medium in the presence of the mycelia of *F. oxysporum*, *P. lilacinus*, *V. leptobactrum*. The viability is expressed as percentage of a control cell sample incubated for the same time without fibres (control). Values significantly ( $P < 0.05$ ) different from their controls (i.g.: fibres incubated in the fungal growth medium, without mycelia, “croc control” e “chry control”), are marked with \*.



**Figura 4.22 - 8oxodGuo rilevata in DNA nucleare di cellule PMA-HL60** coltivate in assenza di fibre (no fibres) o incubate con crocidolite UICC per 8 (a) o 24 ore (c) o con crisotilo 6D per 8 (b) o 24 ore (d). Le fibre sono state pre-incubate nel mezzo di crescita fungino in assenza dei miceli (control) o in presenza di *F. oxysporum*, *P. lilacinus* o *V. leptobactrum*. La quantità di 8oxodGuo formateasi è calcolata rispetto al numero di basi normali nel campione ( $8\text{oxo}/10^6\text{bases}$ ). I valori riportati derivano dalla media di tre ripetizioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. I valori significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) rispetto al controllo (“control”) sono indicati da un asterisco. /

**8oxodGuo formation in nuclear DNA of PMA-HL60 cells**, either kept in the absence of fibres (no fibres) or incubated with crocidolite UICC for 8 h (a) and 24 h (c), or with chrysotile 6D for 8 h (b) or 24 h (d). The fibres were previously incubated in the fungal growth medium alone (control), or in the presence of *F. oxysporum*, *P. lilacinus* or *V. leptobactrum*. The amount of 8oxodGuo detected is calculated as ratio with the total amount of normal bases detected in the sample (8oxo/10<sup>6</sup>bases). The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation. Values significantly ( $P < 0.05$ ) different from their controls ("control") are marked with \*.

L'incubazione delle PMA-HL60 in presenza di crocidolite nelle condizioni scelte non permette di rilevare un'induzione significativa della formazione di 8oxodGuo, né da parte di fibre di controllo, né da parte dei trattati (figura 4.22a). Un'analoga incubazione protratta per 24 ore ha permesso di evidenziare l'induzione di uno stress ossidativo da parte delle fibre di controllo. In termini di quantità assolute tuttavia, si rileva un danno inferiore dopo 24 che dopo 8 ore, forse a causa dell'attivazione di sistemi di riparazione. L'attività ossidativa delle fibre di crocidolite viene ridotta in seguito al trattamento con *F. oxysporum* e *V. leptobactrum* in maniera significativa ( $P < 0.05$ ) rispetto alle fibre di controllo (figura 4.22c).

Si ha un aumento della 8oxodGuo se le cellule vengono trattate con fibre di crisotilo, sia di controllo che trattate, rispetto alle cellule non trattate (figura 4.22b) anche dopo 8 ore. Il pretrattamento con i diversi ceppi fungini non altera significativamente ( $P > 0.05$ ) l'entità del danno ossidativo causato dalle fibre di crisotilo al DNA, sebbene si rilevi una diminuzione dei valori medi per le fibre pre-incubate con *V. leptobactrum* e *P. lilacinus* (figura 4.22b). Dopo 24 ore di incubazione in presenza di crisotilo non si rileva alcuna differenza tra i diversi campioni (figura 4.22d).

Dal confronto dei risultati ottenuti dopo 8 (figura 4.22a-b) e 24 ore (figura 4.22c-d) di incubazione emerge che i valori assoluti di guanosina ossidata sono maggiori nel primo che nel secondo caso, sia per la crocidolite che per il crisotilo.

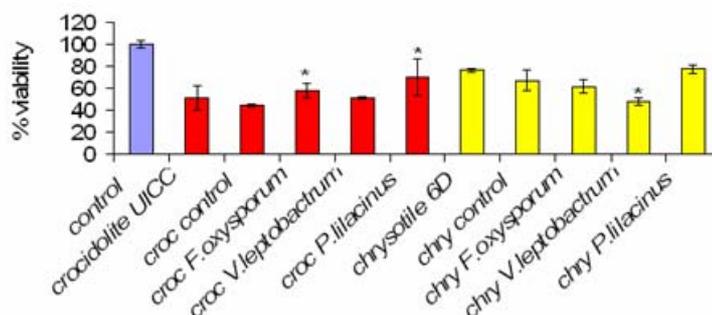
La tabella 4.23 riporta i valori di 8oxodGuo rilevati in seguito all'analisi del DNA nucleare di HL60 non differenziate, ossia non sottoposte al trattamento con PMA. Il PMA induce un danno ossidativo, rilevabile dopo 28 ore dall'inizio del differenziamento, ossia 20 ore di differenziamento più 8 ore equivalenti al tempo di incubazione con le fibre. I valori di 8oxodGuo indotti da fibre che non hanno subito alcun pre-trattamento (crocidolite UICC e crisotilo 6D) in cellule PMA-HL60 in 8 ore non sono significativamente maggiori dei valori di background rilevati in cellule PMA-HL60 non trattate con fibre (Tabella 4.23). Al contrario, le fibre che non hanno subito alcun pre-trattamento inducono la formazione di quantità inferiori di 8oxodGuo rispetto alle fibre di controllo (preincubate nel mezzo di coltura fungino, figura 4.22). Questo suggerisce che l'incubazione delle fibre per circa 20 giorni nel mezzo di coltura fungino sia sufficiente a modificarne la reattività, come già osservato in seguito all'incubazione delle stesse fibre con DNA isolato (figura 4.18).

Le fibre aggiunte nel mezzo di crescita cellulare vengono recuperate al termine delle 8 ore di incubazione insieme alle cellule e quindi rimangono a contatto con esse anche durante la fase di estrazione e digestione enzimatica del DNA, prima dell'analisi HPLC. Il danno ossidativo al DNA si può quindi produrre anche in questa fase dell'esperimento. Per verificare il contributo di tale effetto al danno ossidativo complessivo, un'aliquota di fibre è stata risospesa nel mezzo di crescita delle HL60 per un tempo equivalente al tempo di incubazione delle cellule con le fibre (8 ore) ed aggiunta alle PMA-HL60 subito dopo il recupero dalle piastre di crescita. Tali campioni sono stati processati come gli altri e si è potuto rilevare un effetto di ossidazione del DNA. Il valore di 8oxodGuo è più elevato di quello misurato in seguito all'incubazione effettiva di 8 ore in presenza delle stesse fibre (Tabella 4.23). In particolare la crocidolite aggiunta al termine dell'incubazione, induce un aumento della 8oxodGuo di circa 100 volte. Ciò può essere dovuto ad una parziale inibizione della reattività delle fibre aggiunte alle colture cellulari oppure al fatto che la quantità di fibre aggiunte al momento del recupero è sicuramente superiore alla quantità di fibre che rimane mescolata alle

cellule al termine della coltura effettiva, in quanto una parte delle fibre si perde durante i lavaggi necessari al recupero delle cellule. Pertanto l'aggiunta di fibre nella fase di estrazione del DNA non permette di valutare l'entità del danno prodotto in questa fase nei campioni effettivamente incubati con le diverse fibre.

cells treatment	8oxo/10 <sup>6</sup> bases
HL60 (no PMA)	4.0±0.6
PMA-HL60+ no fibres	7.2±2.1
PMA-HL60+ crocidolite UICC	12.6±0.5
crocidolite added after cells recovery	132.7±60.3
PMA-HL60+chrysotile 6D	6.1±1.9
Chrysotile 6D added after cells recovery	18.8±13.0

**Tabella 4.23 - 8oxodGuo rilevata in DNA nucleare di cellule HL60** non differenziate (no PMA); di cellule PMA-HL60 coltivate in assenza di fibre (+ no fibres) o in presenza di fibre tal quali (+ crocidolite UICC o +chrysotile 6D); di cellule PMA-HL60 coltivate in assenza di fibre, raccolte al termine dell'esperimento e a cui è stata aggiunta una sospensione di fibre tal quali per verificare il danno ossidativo dovuto alla presenza delle fibre nella fase di estrazione del DNA. La quantità di 8oxodGuo formatasi è calcolata rispetto al numero di basi normali nel campione (8oxo/10<sup>6</sup>bases). I valori riportati derivano dalla media di tre ripetizioni indipendenti ± deviazione standard. / **8oxodGuo formation in nuclear DNA** of undifferentiated HL60 cells (no PMA); of PMA-HL60 cells cultivated in the absence of fibres (+no fibres) or in the presence of untreated fibres (+ crocidolite UICC o +chrysotile 6D); of PMA-HL60 cells cultivated in the absence of fibres but that were added of a suspension of fibres after the recovery, to measure the oxidative damage raising during DNA extraction because of the presence of fibres. The amount of 8oxodGuo detected is calculated as ratio with the total amount of normal bases detected in the sample (8oxo/10<sup>6</sup>bases). The presented data are the means of three independent replicates ± standard deviation.

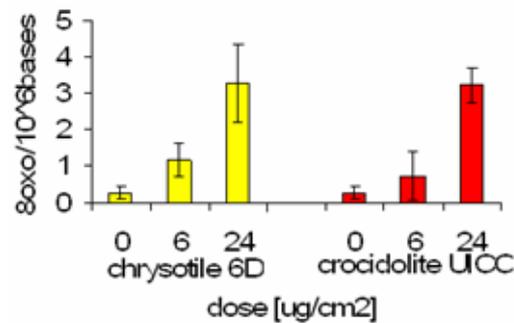


**Figura 4.24 - Saggio di citotossicità di cellule A549** incubate per 24 ore con 24 µg/cm<sup>2</sup> di crocidolite UICC o crisotile 6D (tal quali), o con le stesse fibre precedentemente incubate nel solo mezzo di coltura fungino ("croc control" e "chry control") o nel mezzo di coltura in presenza dei miceli di *F. oxysporum*, *P. lilacinus*, *V. leptobactrum*. La vitalità cellulare è espressa come percentuale rispetto ad un controllo costituito da cellule incubate per lo stesso periodo di tempo in assenza di fibre (control). I valori significativamente diversi (P<0.05) rispetto al controllo (rappresentato da fibre incubate nel mezzo di coltura fungino, in assenza dei miceli, "croc control" e "chry control") sono indicate da un asterisco. / **Cytotoxicity assay with A549** incubated along 24 h with 24 µg/cm<sup>2</sup> of either crocidolite UICC or chrysotile 6D (untreated), or with the same fibres previously incubated in the fungal growth medium alone ("croc control" and "chry control") or in the growth medium in the presence of the mycelia of *F. oxysporum*, *P. lilacinus*, *V. leptobactrum*. The viability is expressed as percentage of viability of control cells incubated for the same time without fibres (control). Values significantly (P<0.05) different from their controls (i.g.: fibres incubated in the fungal growth medium, without mycelia, "croc control" e "chry control"), are marked with \*.

## A549

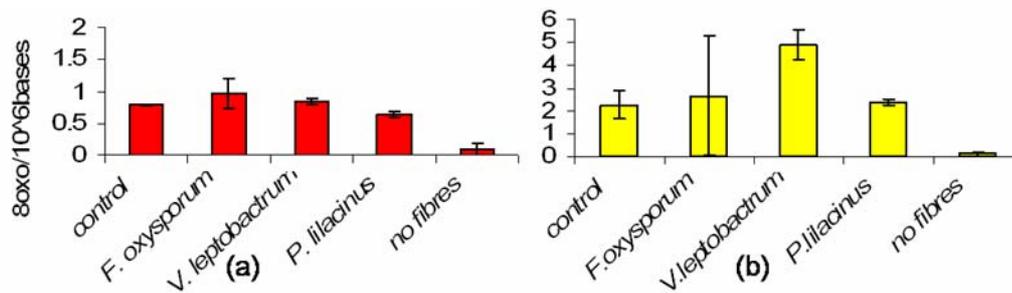
Si tratta di una linea di cellule aderenti. Il trattamento con fibre di asbesto è stato fatto iniziare prima che le colture cellulari raggiungessero la subconfluenza, ed è stato protratto per 24 ore (non sono stati testati tempi di incubazione più brevi). Al termine delle 24 ore, le cellule sono state staccate utilizzando una soluzione di tripsina/EDTA per poi procedere all'estrazione e digestione del DNA nucleare e all'analisi cromatografia necessaria per rilevare la 8oxodGuo.

Il test di citotossicità condotto utilizzando fibre tal quali ("crocidolite UICC" e "chrysotile 6D" in figura 4.24) ha permesso di evidenziare, come nel caso delle PMA-HL60, un maggior effetto citotossico delle fibre di crocidolite rispetto alle fibre di crisotilo. Il pre-trattamento nel solo mezzo di coltura ("croc control" e "chry control" in figura 4.24) non altera l'effetto citotossico delle due fibre in esame. Il trattamento con *F. oxysporum* e *P. lilacinus* diminuisce la citotossicità delle fibre di crocidolite, mentre l'incubazione con *V. leptobactrum* aumenta l'effetto citotossico del crisotilo (figura 4.24).

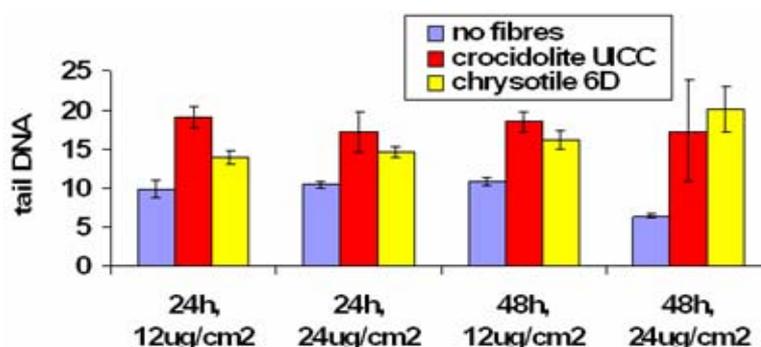


**Figura 4.25 – Induzione della formazione di 8oxodGuo in DNA nucleare di cellule A549** da parte di fibre di crisotilo 6D e crocidolite UICC. Sono state testate diverse dosi allo scopo di individuare le condizioni ottimali per gli esperimenti successivi. La quantità di 8oxodGuo formatasi è calcolata rispetto al numero di basi normali nel campione ( $8oxo/10^6bases$ ). I valori riportati derivano dalla media di tre ripetizioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. / **8oxodGuo formation in nuclear DNA of A549 cells**, induced by chrysotile 6D and crocidolite UICC. Several doses were tried to find the best experimental conditions for next experiments. The amount of 8oxodGuo detected is calculated as ratio with the total amount of normal bases detected in the sample ( $8oxo/10^6bases$ ). The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

Allo scopo di individuare le migliori condizioni sperimentali, le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni di fibre di crisotilo e crocidolite tal quali. Tale esperimento ha rivelato che, nel caso delle A549, la formazione di 8oxodGuo è dose-dipendente, e che gli effetti di crisotilo e crocidolite sono simili, dal punto di vista sia qualitativo che quantitativo (Figura 4.25). La concentrazione di fibre scelta per i successivi esperimenti è quindi 24 µg/cm<sup>2</sup>. I risultati ottenuti dall'incubazione delle cellule A549 con le fibre di controllo (ossia incubate nel mezzo di coltura fungino, in assenza dei miceli) e trattate con i diversi funghi sono riportati in figura 4.26. La crocidolite induce un danno ossidativo, la cui entità non è modificata dal pre-trattamento con i funghi. Il crisotilo induce un danno più elevato della crocidolite, che è accresciuto in modo non significativo in seguito al trattamento delle fibre con *V. leptobactrum*. ( $P > 0.05$ ; figura 4.26).



**Figura 4.26 - 8oxodGuo rilevata in DNA nucleare di cellule A549** coltivate in assenza di fibre (no fibres) o incubate per 24 ore con crocidolite UICC (a) o con crisotilo 6D (b). Le fibre sono state pre-incubate nel mezzo di crescita fungino in assenza dei miceli (control) o in presenza di *F. oxysporum*, *P. lilacinus* o *V. leptobactrum*. La quantità di 8oxodGuo formatasi è calcolata rispetto al numero di basi normali nel campione ( $8\text{oxo}/10^6\text{bases}$ ). I valori riportati derivano dalla media di tre ripetizioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. / **8oxodGuo formation in nuclear DNA of A549 cells**, either kept in the absence of fibres (no fibres) or incubated in the fungal growth medium alone, or in the presence of *F. oxysporum*, *P. lilacinus* or *V. leptobactrum*. The amount of 8oxodGuo detected is calculated as ratio with the total amount of normal bases detected in the sample ( $8\text{oxo}/10^6\text{bases}$ ). The presented data are the means of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

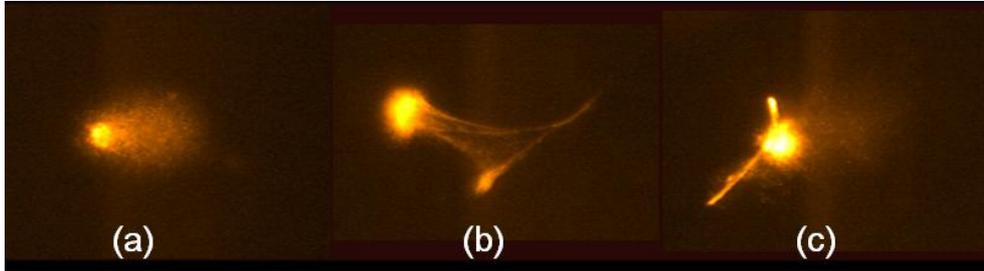


**Figura 4.27 – Comet assay condotto con cellule A549**, incubate per 24 o 48 ore con 12 o 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di fibre di crocidolite UICC o crisotilo 6D. Il controllo è costituito da cellule coltivate per la stessa durata di tempo, in assenza di fibre. Il risultato è espresso come estensione della “coda di DNA” calcolata tramite un programma di analisi d’immagine (KOMET 3.0) come media di 50 cellule osservate. / **Comet assay carried out on A549 cells**, incubated along 24 or 48 h with 12 or 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of crocidolite UICC or chrysotile 6D fibres. The control is represented by cells cultivated for the same time without fibres. The result is the DNA tail length, calculated by an image analyser (KOMET 3.0), as means of 50 observed cells.

Uno dei saggi utilizzati per lo studio della genotossicità delle fibre (v. capitolo 1) di amianto è il “comet assay”, che permette di rilevare eventi di rottura delle eliche di DNA, il quale viene fatto migrare in un sottile strato di agarosio in cui sono incluse le cellule intere. Se il DNA è stato danneggiato, esso sarà frammentato e migrerà al di fuori del nucleo. Tanto maggiore è la frammentazione della molecola, quanto più estesa sarà la migrazione. Il DNA viene visualizzato direttamente sul gel utilizzando il bromuro di etidio. Visivamente si osserva la formazione di un alone di DNA, che con il nucleo della cellula dà un’immagine simile ad una cometa (da cui il nome).

Tale saggio è stato condotto utilizzando le cellule A549 e diverse condizioni di dose e durata dell’incubazione. I risultati (figura 4.27) mostrano che sia le fibre di crocidolite UICC che le fibre di crisotilo 6D inducono la rottura delle eliche di DNA, a livelli simili per le diverse condizioni testate.

Le fibre vengono raccolte insieme alle cellule dopo l'incubazione e quindi vengono incluse con esse nel gel di elettroforesi. La presenza delle fibre durante la migrazione del DNA ha dato origine a immagini particolari (figura 4.28), che forniscono una chiara idea del danno causato, ma che allo stesso tempo rendono talvolta difficile la lettura dei risultati, che si basa proprio sull'osservazione delle cellule e sul calcolo dell'estensione della migrazione. Tale saggio potrà comunque essere utilizzato per investigare gli effetti delle fibre trattate con le diverse specie fungine.



**Figura 4.28 – Immagini al microscopio al fluorescenza di cellule A549 sottoposte a comet assay.** (a) immagine di migrazione “tipica”: si osserva la maggior parte della luminosità concentrata in corrispondenza del nucleo (“testa” della cometa) ed una luminosità diffusa dovuta alla migrazione del DNA all’esterno del nucleo stesso (alone). (b-c) immagini di migrazione irregolari, deformate dalla presenza delle fibre incluse nel gel. / **Fluorescence microscope images of A549 cells in a comet assay.** (a) “typical” migration image: the light is mostly in the nucleus (“head” of the comet) and there is a spread luminescence due to DNA migration in the gel. (b-c) irregular migration images due to the fibres included in the gel with the cells.

## 4.5 Discussione

### 4.5.1 Caratterizzazione dell'interazione tra funghi e fibre di amianto.

#### *Crescita in presenza di fibre di amianto*

Gli studi condotti per identificare le cause della tossicità delle fibre sull'organismo umano e animale hanno utilizzato principalmente sistemi cellulari e acellulari *in vitro* ed esperimenti su animali da laboratorio, ad esempio su ratti (Governa et al., 2000; Varga, 1996; Wartheit, 1996). Negli ultimi anni la comunità scientifica è risultata concorde nel sostenere che i meccanismi di patogenicità degli asbesti sono molteplici (Kamp and Weitzman, 1999).

Le caratteristiche di superficie e le reazioni chimiche che avvengono all'interfaccia tra il minerale e l'ambiente in cui esso si trova giocano un ruolo importante nei processi patogenici. In particolare, i metalli di transizione che si trovano a livello degli strati più esterni della struttura cristallina possono catalizzare la formazione di specie altamente reattive come i radicali dell'ossigeno (Weitzman and Graceffa, 1984), i quali reagiscono a cascata con biomolecole quali DNA, lipidi e proteine, contribuendo al processo di citotossicità (Fubini, 1997; Hardy and Aust, 1995). Di conseguenza un aspetto di questa tesi è stato lo studio dello sviluppo della biomassa fungina dei ceppi isolati dal suolo della cava di Balangero in presenza di fibre di asbesto.

Sono state riscontrate alcune variazioni nella resa di crescita, con alcune differenze evidenziabili fra i diversi ceppi. *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* mostrano una maggior crescita in presenza che in assenza di crisotilo 6D. Nessuno dei ceppi studiati ha mostrato una significativa riduzione della crescita in presenza di fibre, tranne nel caso di *A. fumigatus* in presenza del crisotilo 6D. La crocidolite non influisce sulla crescita fungina. Solo *P. lilacinus* ha presentato un significativo aumento della crescita quando l'incubazione è stata condotta in

presenza di una membrana da dialisi, con o senza fibre, forse dovuto al fatto che la membrana, costituita di cellulosa, fornisce un supplemento di nutrienti utilizzabile dal fungo. Da sottolineare che *V. leptobactrum* ha mostrato, in generale, una maggiore resa di crescita, rispetto agli altri ceppi, in presenza di fibre. Non sono noti in letteratura dati riguardanti l'interazione di funghi del suolo con minerali asbestiformi, ma gli studi effettuati in precedenza (Martino et al., 2004; Daghino et al., 2005) hanno messo in luce la capacità di diversi funghi del suolo di crescere in presenza di crocidolite, amosite e crisotilo.

Uno dei fattori determinanti la tossicità delle fibre è la forma fibrosa, che riduce l'efficacia dei naturali meccanismi di rimozione dalle vie respiratorie, favorisce la deposizione e la penetrazione nei tessuti e nelle cellule pregiudicandone l'integrità fisica (Fubini, 2000b). A questo proposito, è interessante osservare che i miceli fungini sono risultati in grado di interagire strettamente con le fibre di asbesto, intrappolandole tra le ife fino a chiarificare il mezzo di coltura. Questa stretta interazione è stata osservata anche a livello micromorfologico tramite un'osservazione al microscopio elettronico del micelio di *V. leptobactrum* in presenza e in assenza di fibre, che ha mostrato come la morfologia del micelio sia modificata, maggiormente dal crisotilo che dalla crocidolite. Questa modificazione potrebbe essere dovuta ad un effetto meccanico delle fibre sulle ife, oppure all'alterazione delle pareti cellulari dovuta alle reazioni chimiche sviluppatesi all'interfaccia fibra/fungo. Non si rilevano ripercussioni negative sullo sviluppo della biomassa. Tale stretta interazione era già stata osservata nel caso di *Oidiiodendron maius* e fibre di crocidolite (Martino et al., 2003).

Nonostante la mancanza di una significativa inibizione della crescita per i funghi studiati in presenza di fibre, sono state comunque evidenziate alcune reazioni di difesa indotte sia negli esperimenti di crescita a contatto sia in quelli dove era presente una membrana da dialisi. Fra questi, la produzione di pigmenti e l'induzione di proteine specifiche, di cui si discuterà nel capitolo 5. E' noto dalla letteratura che la produzione di pigmenti rappresenta una risposta dei microrganismi alle svariate condizioni ambientali. Fra questi, le melanine sono pigmenti che permettono la sopravvivenza di molte specie in risposta a condizioni di stress (Bell and Wheeler, 1986). Le melanine sono presenti sotto forma di depositi o granuli elettrondensi nella parete di molti funghi e possono anche essere rilasciate nel mezzo colturale (melanine extracellulari). Il fattore scatenante la produzione di questi composti in risposta alla presenza delle fibre di amianto potrebbe essere la presenza degli ioni ferro sulla superficie delle fibre, nonché il loro incremento nel terreno di coltura a seguito dell'attività di solubilizzazione da parte dei funghi. Le melanine contengono infatti unità fenoliche, peptidi, carboidrati, idrocarburi alifatici ed acidi grassi che rappresentano potenziali siti di legame per i metalli. Numerosi metalli pesanti possono indurre od accelerare la produzione di melanine nei funghi. E' dimostrato che forme cellulari melanizzate, come per esempio le clamidospore, mostrano maggiore impermeabilità e tolleranza ai metalli pesanti rispetto alle cellule ialine (Gadd, 1993).

#### *Estrazione di ioni ferro e magnesio da fibre di amianto*

E' noto dalla letteratura che i funghi sono in grado di interagire con i metalli modificandone la forma chimica e la solubilità (Gadd 1993; 2000a). I funghi hanno la capacità di produrre composti organici che modificano la mobilità dei metalli e la loro biodisponibilità. Chelanti ed agenti sequestranti (es. acido citrico e siderofori), agenti precipitanti (es. acido ossalico ed H<sub>2</sub>S) e pigmenti con capacità di legare i metalli come le melanine sono alcuni dei metaboliti extracellulari prodotti dai funghi (Gadd and White, 1989).

*F. oxysporum* ha confermato la sua capacità e la sua efficienza nella mobilizzazione del ferro dalle fibre di amianto prese in esame, mostrando anche una discreta capacità di estrazione nei confronti del magnesio. Tra i funghi isolati dai campioni di suolo/detrito provenienti dall'ex cava di amianto di Balangero, due ceppi rispettivamente di *V. leptobactrum* e *P. lilacinus* hanno

mostrato capacità di estrarre ferro da fibre di crocidolite UICC, e ferro e magnesio da fibre di crisotilo 6D. In particolar modo *V. leptobactrum* si è dimostrato un ottimo estrattore di ioni ferro e magnesio dalle fibre di crisotilo. Non è stato possibile rilevare l'eventuale estrazione di magnesio da fibre di crocidolite, in cui esso è presente in quantità ridotte. Se vi è stata estrazione di magnesio da fibre di crocidolite, essa è al di sotto dei limiti di sensibilità del metodo di titolazione utilizzato.

La normalizzazione del dato dell'estrazione del ferro rispetto al peso della biomassa permette di paragonare l'attività dei diversi funghi indipendentemente dalla crescita. Tale calcolo mostra un andamento simile a quello del dato assoluto tranne nel caso di *P. lilacinus*, che quindi si rivela efficiente nell'estrazione di ferro nonostante il ridotto sviluppo della biomassa rispetto alle altre specie.

La titolazione del ferro e del magnesio nel mezzo di coltura fungino costituisce un'evidenza indiretta dell'avvenuta estrazione di ioni dalle fibre da parte del fungo. Le analisi ESEM e SEM-XPS e SEM-EDS hanno confermato questo dato fornendo una misura diretta del ferro e del magnesio presenti nelle fibre. L'effetto del trattamento con i due ceppi fungini ha interessato soprattutto gli strati atomici superficiali delle fibre, mentre l'effetto è più limitato se si considera la fibra nel suo complesso (bulk). Coerentemente con i dati ottenuti dalla titolazione, *V. leptobactrum* è risultato più efficace di *F. oxysporum* nel modificare le fibre. La composizione di superficie e di bulk delle fibre di crocidolite è modificata in misura minore rispetto alla composizione delle fibre di crisotilo. Questo dato concorda con i quelli relativi alla estrazione di ferro e di magnesio dalle fibre in relazione all'area specifica e alla quantità in peso di tali ioni nelle fibre, che mostrano come l'azione dei funghi abbia effetti maggiori sul crisotilo che non sulla crocidolite. Inoltre, è noto che il crisotilo è più solubile, quindi più facilmente modificabile ad opera di molecole chelanti, e meno biopersistente rispetto alla crocidolite (Fubini and Otero-Arean, 1999). Tuttavia anche la crocidolite viene modificata. L'aumento della quantità di ferro alla superficie delle fibre incubate nel mezzo di coltura fungino, in assenza dei miceli, potrebbe essere dovuto ad un fenomeno di precipitazione di ferro dal mezzo sulla fibra, come già osservato in lavori precedenti in cui fibre di crocidolite venivano risospese in soluzioni contenenti ferro (Hardy and Aust, 1995b). L'attività chelante dei miceli controbilancia questo effetto di deposizione del ferro, diminuendo la quantità di ione presente alla superficie delle fibre. L'osservazione visiva al SEM delle fibre prima e dopo l'incubazione con i funghi non rivela differenze morfologiche, e ciò permette di ipotizzare che la struttura cristallina non sia stata intaccata dall'azione fungina, anche se non è stata condotta un'analisi specifica. La riduzione del rapporto Fe/Si e Mg/Si, dovuta all'estrazione di Fe e Mg dalle fibre ad opera dei funghi, non sarebbe accompagnata da una diminuzione di Si nella fibra. Studi precedenti mostrano infatti che l'incubazione di fibre di asbesto in vari chelanti non intacca la struttura cristallina del solido, ma determina una modificazione della micromorfologia e dell'organizzazione degli strati più esterni. Questo suggerisce che i siti lasciati vacanti dai cationi estratti, possano essere occupati da nuovi cationi presenti in soluzione (anche dagli stessi ioni ferro rilasciati, secondo una visione dinamica di scambio tra superficie e soluzione - Mollo 1994). Tuttavia un recente lavoro ha dimostrato che il trattamento delle fibre con acidi lichenici porta all'amorfezza delle fibre stesse (Favero et al., 2005).

Un'ipotesi plausibile è che la mobilizzazione del ferro e del magnesio dall'asbesto sia mediata da chelanti organici secreti dal fungo nel terreno di coltura. Infatti l'estrazione avviene anche quando la fibra è racchiusa in una membrana (cut off 12-14 KDa), di conseguenza il processo è mediato da fattori solubili a basso peso molecolare. *V. leptobactrum* mostra un'attività di mobilizzazione di ioni ferro e magnesio maggiore se le fibre sono mantenute in membrana. Questo potrebbe essere dovuto ad un effetto protettivo della membrana dallo stress fisico imposto dalle fibre sulle ife. *Myrothecium sp.* e *A. fumigatus* hanno mostrato una

capacità di estrarre ioni magnesio simile agli altri ceppi, ma una ridotta capacità di estrarre ferro. Ciò suggerisce che le molecole che mediano l'estrazione degli ioni non siano le stesse nei diversi funghi, e che vi possa essere una certa specificità nella formazione dei complessi chelante-metallo.

Un lavoro precedente (Martino et al., 2004) aveva messo in evidenza, per tutti i ceppi con buone capacità di solubilizzazione, almeno due categorie di composti chelanti: siderofori e acidi organici. I siderofori sono molecole chelanti specifiche per lo ione ferro rilasciate dai microrganismi in presenza di concentrazioni limitanti dello ione stesso, e la cui biosintesi è regolata dalla disponibilità di ferro (Winkelman, 1992). Acidi organici quali citrato e malato possono anch'essi agire come siderofori, sebbene non si tratti di chelanti specifici per il ferro (Jones 1998).

La produzione di siderofori è stata messa in evidenza in letteratura per alcune specie di *Aspergillus* quali *A. flavus*, *A. niger*, *A. tamarii* (Machuca, 2003), per alcune specie di *Paecilomyces* (Vala et al., 2000) e in particolare per *F. oxysporum* (Domsch et al., 1980).

L'esatta natura dei composti coinvolti nell'estrazione degli ioni dalle fibre rimane però da approfondire con ulteriori esperimenti, così come rimane da studiare quali siano i meccanismi e le molecole che mediano la solubilizzazione del magnesio, e se si tratti di meccanismi con qualche analogia con quelli che mediano la solubilizzazione del ferro.

Gli asbesti sono minerali altamente insolubili, ma in diversi lavori è stata dimostrata la capacità di chelanti organici di mobilizzare gli ioni ferro dalla superficie della fibra, portandoli in soluzione. La velocità di mobilizzazione dipende dal chelante usato, dalla geometria e dalle dimensioni del chelante e dalla complementarietà con la geometria di coordinazione del ferro.

Quando si confronta la mobilizzazione del ferro da fibre diverse, bisogna tener conto di fattori che potrebbero essere determinanti, quali la struttura cristallina, l'area superficiale e la quantità di ferro contenuto nelle fibre. Per esempio crocidolite e amosite, entrambi anfiboli, contengono quantità simili di ioni ferro, ma questo viene estratto da ferrozina e citrato più rapidamente dalla crocidolite che dall'amosite, a parità di peso della fibra. Tuttavia, se si normalizza il dato rispetto all'area specifica, che è maggiore per la crocidolite che per l'amosite, le velocità di mobilizzazione sono molto simili. Il contenuto in ferro del crisotilo è molto più basso, e di conseguenza anche la quantità di ione estratto dai chelanti, nonostante l'area specifica, e quindi la superficie esposta all'azione del chelante, sia molto più ampia rispetto alle altre due fibre (Lund and Aust, 1990).

Tali considerazioni rispetto alla modalità di estrazione di ioni dalle fibre ad opera di chelanti *in vitro* sono confermate dai dati raccolti rispetto alla quantità di ferro mobilizzata ad opera del microrganismo. La quantità di ferro solubilizzata dalle fibre di crocidolite a parità di peso delle fibre stesse è molto superiore rispetto a quella estratta dal crisotilo. Quindi l'efficacia del processo di solubilizzazione non dipende solo dall'attività fungina, ma anche dalle caratteristiche chimico-fisiche della fibra, quali composizione chimica e area superficiale. Infatti, se si normalizza la concentrazione di ferro mobilizzata nel mezzo di coltura rispetto alla quantità di ferro contenuta nei due tipi di fibra (crisotilo<<crocidolite) e rispetto all'area superficiale (crisotilo>>crocidolite), risulta che la solubilizzazione di ferro dal crisotilo è più efficace che dalla crocidolite. Nel valutare processi che coinvolgono la superficie delle fibre di asbesto, come l'estrazione di ioni, ma anche la reattività e l'interazione con biomolecole, è quindi importante considerarne le proprietà chimico-fisiche (Fubini, 1997).

Il trattamento di fibre di crocidolite, già depauperate in ferro dall'attività fungina, in una soluzione di deferossamina, ha mostrato indirettamente la differenza tra queste fibre e quelle non trattate, che presentano una quantità di ferro estraibile superiore. Inoltre tale esperimento ha dimostrato che è possibile estrarre ulteriormente ferro dal minerale suggerendo che le fibre potrebbero essere modificate tramite un trattamento prolungato nel tempo con chelanti, ad

esempio di origine fungina. Infatti le attività biochimiche dei microrganismi fungini, come il rilascio di chelanti organici, contribuiscono in ambiente naturale alla disgregazione di rocce e minerali (Sterflinger, 2000).

#### 4.5.2 Alterazione delle proprietà chimiche delle fibre di asbesto

##### *Reattività di superficie*

Studi precedenti hanno dimostrato che la reattività e la tossicità di superficie delle fibre di asbesto sono correlate con la presenza di ioni ferro alla superficie delle fibre stesse (Weitzman and Graceffa, 1984; Aust et al., 2000). Per questo motivo sono state indagate la reattività chimica e biochimica di fibre di asbesto depauperate in ioni ferro ad opera dei vari ceppi fungini *in vitro*.

La reattività di superficie delle fibre di asbesto è rappresentata dal rilascio di radicali, i quali possono essere rilevati con l'utilizzo della tecnica dello *spin trapping*. È stata esaminata la capacità delle fibre di generare radicale ossidrilico e carbossilico, che si formano *in vitro* in presenza di ioni Fe(II) e, rispettivamente, perossido di idrogeno o sodio formiato. La generazione *in vitro* di OH<sup>•</sup> è rappresentativa del contatto *in vivo* delle fibre con perossido di idrogeno prodotto da cellule coinvolte nella risposta immunitaria, quali i macrofagi attivati (Kamp and Weitzman, 1999). D'altro lato la generazione di CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> avviene per rottura omolitica di un legame carbonio-idrogeno, reazione che può portare *in vivo* alla alterazione delle biomolecole, per esempio i lipidi (Ghio et al., 1992; Fubini et al., 1995; Fenoglio et al., 2001; Tomatis et al., 2002). La generazione di radicali all'interfaccia fibre/mezzo circostante è funzione della presenza di specifici siti reattivi costituiti da ioni ferro ad uno specifico stato di ossidazione e di coordinazione (Fubini et al., 1995a). In questo lavoro è stata accertata quantitativamente l'estrazione di ioni dalle fibre di amianto, ma non vi sono dati relativi all'eventuale cambiamento dello stato di ossidazione degli ioni ferro alla superficie delle fibre dopo l'incubazione con i funghi. Tuttavia i dati presentati suggeriscono che l'attività chelante dei funghi coinvolga anche i siti reattivi alla superficie delle fibre, in quanto si riscontra una generale modificazione del rilascio di radicali.

Fibre di crisotilo non trattate o incubate nel solo mezzo di coltura inducono la formazione di OH<sup>•</sup>. La mobilizzazione di ioni ferro dalle fibre ad opera di *F. oxysporum* e *P. lilacinus* induce una conseguente inibizione del rilascio di radicali ossidrilici. *V. leptobactrum*, nonostante presenti una capacità estrattiva più alta degli altri ceppi, non modifica, o piuttosto riattiva, il rilascio di radicali ossidrilici. Inoltre l'incubazione con questo stesso ceppo fungino attiva la generazione di radicali carbossilici da parte di fibre di crisotilo, altrimenti inattive. *V. leptobactrum* è anche il più attivo nell'estrazione di ioni magnesio dalle fibre di crisotilo, che si può supporre avvenga in parallelo a quella del ferro e che è stata dimostrata anche tramite analisi ESEM e XPS. Gli ioni ferro e magnesio estratti dalla superficie delle fibre potrebbero essere sostituiti da altri ioni ferro per deposizione dal mezzo di coltura, e questo potrebbe riattivare il rilascio di radicali. In modo analogo, fibre di crocidolite risospese in soluzioni contenenti ferro possono acquisire tali ioni dalla soluzione e questo determina un aumento dei danni ossidativi al DNA indotti dalle fibre stesse (Hardy and Aust, 1995b; Fubini et al., 1995b). Tuttavia, nel sistema sperimentale utilizzato le fibre vengono risospese in presenza di miceli fungini in grado di estrarre ioni dalle fibre attraverso un'attività chelante che probabilmente annullerebbe un'eventuale deposizione di ferro sulla superficie delle fibre. La riattivazione delle fibre di crisotilo in seguito a trattamento con *V. leptobactrum* potrebbe allora essere dovuta proprio alla spiccata attività di estrazione di questo fungo, che potrebbe causare l'esposizione alla superficie di ioni ferro, a basso stato di coordinazione proprio a causa della avvenuta modificazione della superficie delle fibre, che costituirebbero nuovi siti reattivi. Tale ipotesi è stata formulata in analogia con

quanto già osservato in seguito all'incubazione prolungata di fibre di crocidolite con acido ascorbico, il quale causa la disgregazione degli strati più esterni delle fibre, porta all'esposizione di nuovi siti reattivi e altera la reattività di superficie delle fibre, inibendo il rilascio di radicali ossidrilici e aumentando il rilascio di radicali carbossilici (Martra et al., 2003).

La crocidolite UICC induce la generazione di radicali ossidrilici, confermando numerosi studi precedenti (Weitzman and Graceffa, 1984; Hardy and Aust, 1995) e l'incubazione nel mezzo di coltura non altera questa proprietà. La modificazione delle fibre dovuta all'interazione con *F. oxysporum* (Daghino et al., 2005), *V. leptobactrum* e *P. lilacinus* causa l'inibizione del rilascio di tali specie radicaliche. L'incubazione con *V. leptobactrum* quindi non ha lo stesso effetto sulla reattività dei due diversi asbesti, presumibilmente a causa della loro diversa struttura, solubilità e composizione chimica, in quanto la crocidolite presenta un'area specifica di superficie inferiore al crisotilo ed è meno solubile (Fubini and Otero-Arean, 1999) quindi più difficilmente modificabile.

*Proprietà ossidative in sistemi biologici: DNA isolato e DNA cellulare.*

La proprietà delle fibre di asbesto di generare radicali alla superficie è considerata uno dei fattori che ne determinano la tossicità e la cancerogenicità (Kamp and Weitzman, 1999). In particolare gli effetti genotossici *in vivo* delle fibre di crocidolite sono correlati con la capacità delle fibre stesse di indurre la formazione di mesoteliomi in animali da laboratorio (Adachi et al., 1994). Diversi studi sperimentali effettuati utilizzando il plasmide ΦX174 RFI DNA come molecola modello hanno dimostrato che fibre di crocidolite inducono un danno ossidativo mediato da radicali ossidrilici (Gilmour et al., 1995). La formazione di rotture della singola elica del DNA (*DNA single strand breaks*) è dovuta alla presenza di ferro nelle fibre, in grado di catalizzare la formazione di radicali. La reattività delle fibre aumenta se gli ioni ferro di superficie vengono portati in soluzione da chelanti formando complessi dotati di attività ossidoriduttiva (Lund and Aust, 1992). Una delle reazioni che consente di valutare la genotossicità dovuta all'attività ossidativa dell'asbesto è la formazione 8oxodGuo in molecole di DNA isolato oppure nel DNA cellulare (Jaurand, 1997).

Gli esperimenti descritti nei capitoli precedenti hanno confermato l'attività ossidativa delle fibre di crocidolite nei confronti del DNA in un sistema acellulare che era già stata osservata da Adachi (1994) e Faux (1994). Il crisotilo 6D è una fibra estratta nelle Alpi Occidentali, la cui genotossicità non è mai stata studiata in precedenza. I risultati esposti dimostrano che esso induce un effettivo stress ossidativo sulla molecola isolata di DNA *in vitro*. Un analogo studio aveva riguardato il crisotilo rhodesiano e canadese, rivelando la capacità di queste due fibre di indurre l'ossidazione guanina in una soluzione contenente solo tale base, ma non in una soluzione di DNA di timo di vitello (Berger et al., 1993). Il danno ossidativo indotto dal crisotilo 6D è inferiore a quello indotto dalla crocidolite. Tale differenza è imputabile al diverso contenuto di ioni ferro delle due fibre, molto abbondante nella crocidolite, scarso nel crisotilo, e ciò avvalorava l'importanza del ferro nel determinare la formazione di specie ossidanti da parte delle fibre. Tuttavia, come già detto, la reattività delle fibre non dipende solo dalle quantità presenti nelle fibre (Fubini and Mollo, 1995).

L'incubazione delle fibre, sia di crisotilo che di crocidolite, nel mezzo minerale Czapek induce un aumento delle capacità ossidative verso la molecola di DNA. Questo effetto potrebbe essere la conseguenza dell'aumento degli ioni ferro presenti sulla superficie delle fibre di crocidolite, che è stato misurato grazie all'analisi XPS della composizione chimica di superficie, e che potrebbe avvenire in modo analogo anche nel caso delle fibre di crisotilo. Inoltre, una prolungata incubazione in un mezzo acquoso, quale il mezzo di crescita fungino, potrebbe portare alla rimozione di molecole eventualmente adsorbite (Fubini, 1997) sulla

superficie delle fibre non trattate, risultando nell'esposizione di nuovi siti reattivi precedentemente "nascosti".

La rimozione di ioni ferro dalle fibre a causa dell'attività fungina ha ridotto la reattività biochimica sia della crocidolite UICC che del crisotilo 6D, la cui attività ossidativa nei confronti del DNA è significativamente inferiore rispetto a quella delle fibre di controllo. I risultati ottenuti durante la messa a punto del sistema sperimentale hanno inoltre mostrato che tale reattività non è rilevabile in assenza di EDTA, suggerendo che essa sia dovuta alla formazione di complessi EDTA-Fe(II), come già evidenziato dagli studi di Lund e Aust (1992) che evidenziarono l'importanza della mobilizzazione del ferro e dello stato di ossidazione nell'induzione di DNA-SSB da parte di fibre di crocidolite. Infatti il Fe(II) associato alle fibre di crocidolite si ossida in una sospensione acquosa, e ciò suggerisce che esso possa reagire con l'O<sub>2</sub> formando specie reattive (v. introduzione) in grado di danneggiare il DNA. Tuttavia la velocità di ossidazione del Fe(II) di superficie sembra essere troppo bassa per permettere di rilevare la formazione di radicali ossidrilici (Aust and Lund, 1991) o di DNA-SSB (Lund and Aust, 1992) *in vitro*. In molti lavori sperimentali è stato impossibile rilevare il rilascio di OH<sup>·</sup> da fibre di crocidolite in assenza di un agente riducente, ad esempio ascorbato, a meno che non si aggiungesse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o si utilizzassero elevate concentrazioni di fibre. L'attività di un agente riducente determina infatti un aumento di Fe(II) e di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nella sospensione di fibre favorendo la reazione di Fenton e la produzione di radicali. In alternativa l'aggiunta di un chelante del Fe(II), che consente la mobilizzazione dello ione e la formazione di complessi dotati di attività redox, ha permesso di misurare il danno ossidativo al DNA *in vitro*, in quanto il Fe(II) mobilizzato si ossida rapidamente formando specie reattive che ossidano il DNA (Lund and Aust, 1992). Analogamente incubando fibre di crocidolite in presenza di DNA o di deossiguanosina, si è osservato che l'aggiunta di ascorbato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e EDTA determina un aumento dei danni ossidativi misurati come formazione di 8-oxodGuo (Adachi et al., 1994). Il ruolo dei complessi Fe-EDTA nell'induzione del danno ossidativo avvalorava la scelta di misurare il danno ossidativo nella frazione in soluzione.

Le fibre di crisotilo ossidano anche molecole di DNA che rimangono associate ad esse e non in soluzione, forse a causa di fenomeni di adsorbimento (Tournay et al., 1987). La quantità di DNA associata alle fibre è inferiore di quella in soluzione e mostra anche un livello di ossidazione più basso. Ciò suggerisce che il contributo fornito da ferro associato alle fibre a tale reazione sia limitato e che quindi sia più significativo misurare l'ossidazione del DNA in soluzione.

Le fibre pre-incubate con i vari ceppi fungini presentano una ridotta quantità di ferro di superficie rispetto alle fibre di controllo, confermata dai dati XPS per la crocidolite, e quindi una minore possibilità che si formino complessi EDTA-Fe. Questo risulta in un'inibizione dell'attività ossidativa delle fibre stesse verso il DNA. Questa ipotesi è in accordo con i risultati di precedenti studi in cui si dimostrava che la rimozione di ioni ferro da crocidolite e amosite ad opera di chelanti inibisce la formazione di DNA-SSB causata dalle fibre stesse (Chao and Aust, 1994). Tuttavia l'estrazione spinta di ioni ferro dalla crocidolite a mezzo di chelanti e HCl aumenta l'attività ossidativa misurata come generazione di 8oxodGuo. Gli autori di tale studio suggeriscono però che questo effetto sia dovuto alla riduzione del peso specifico delle fibre a causa della deplezione di ioni ferro: a parità di massa, il numero di fibre incubate in presenza del DNA sarebbe più elevato per le fibre da cui è stato estratto il ferro che per le fibre di controllo, al punto di determinare un'aumentata reattività del campione (Adachi et al., 1994).

L'inibizione della reattività verso la molecola di DNA delle fibre di crocidolite in seguito al trattamento con i tre ceppi fungini trova riscontro nei risultati dei test chimici che mostrano l'inibizione del rilascio dei radicali ossidrilici da parte delle stesse fibre. Lo stesso tipo di parallelismo risulta dal confronto dei dati riguardanti le fibre di crisotilo incubate con *F.*

*oxyssporum* e *P. lilacinus*. Tuttavia, nonostante l'ossidazione del DNA, e in particolare l'idrossilazione della guanina, sia mediata da radicali OH<sup>•</sup>, si riscontrano alcune discrepanze tra i risultati degli esperimenti di *spin trapping* e quelli relativi all'ossidazione del DNA. Infatti l'incubazione delle fibre nel mezzo di coltura induce l'attività ossidativa verso il DNA, ma non aumenta il rilascio di radicali ossidrilici rispetto alle fibre non trattate. Viceversa, *V. leptobactrum* riattiva il rilascio di radicali da parte delle fibre di crisotilo 6D, ma ne inibisce la reattività biochimica. Queste discrepanze possono essere giustificate dalla presenza dell'EDTA, nel sistema sperimentale messo a punto per lo studio dell'ossidazione del DNA, ma non nel sistema utilizzato per la rivelazione del rilascio di radicali. I risultati suggeriscono che i radicali ossidrilici che mediano l'ossidazione del DNA siano generati grazie all'attività redox dei complessi EDTA-Fe(II) e quindi dipendano dalla porzione di ioni ferro che si trovano in uno stato di ossidazione e di coordinazione che permetta che essi vengano effettivamente portati in soluzione dal chelante. I radicali ossidrilici rilevati tramite gli esperimenti di *spin trapping* sono invece generati dagli ioni ferro che costituiscono dei siti reattivi alla superficie delle fibre e che reagiscono con il perossido di idrogeno presente in soluzione. Si tratta quindi di due sistemi sperimentali che danno entrambi un'indicazione della reattività delle fibre, pur basandosi su reazioni diverse.

La formazione di 8oxodGuo in una molecola di DNA isolata in soluzione dipende dalle caratteristiche chimiche della superficie della fibra. Le reazioni che avvengono all'interfaccia fibra/soluzione, per esempio la formazione di radicali direttamente alla superficie oppure la formazione di chelati con attività ossidoriduttiva, possono avere un effetto diretto sulla molecola di DNA. Le reazioni che avvengono in ambiente cellulare sono molto più complesse (v. capitolo 1). Molti studi hanno dimostrato che l'incubazione di diverse linee cellulari (macrofagi HL60, epiteliali polmonari A549, linee ibride uomo-criceto A<sub>L</sub> e mesoteliali MSTO211H) con fibre di crocidolite, induce un aumento della quantità di 8oxodGuo nel DNA nucleare (Takeuchi and Morimoto, 1994; Chao, 1996; Xu et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). In questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare come modelli di studio della genotossicità delle fibre di asbesto le cellule HL60 e A549.

Le HL60 appartengono ad una linea cellulare umana derivata da una leucemia promielocitica (quindi si tratta di monociti del sangue) e differenziano in macrofagi se trattate con forbol-miristato-acetato (PMA) esprimendo marcatori specifici che permettono di identificare il tipo cellulare (Murao et al., 1983). Tale differenziamento è visibile osservando le piastre di crescita al microscopio ottico, in quanto, mentre le HL60 sono tonde e non aderenti, le cellule differenziate PMA-HL60 diventano aderenti, non si distribuiscono uniformemente in piastra ma formano dei raggruppamenti e sono in grado di fagocitare fibre di crocidolite (Takeuchi and Morimoto, 1994). Quest'ultima proprietà sembra particolarmente legata agli effetti genotossici delle fibre di crocidolite, che non sono rilevabili su cellule HL60 non differenziate (Takeuchi et al., 1999).

Le cellule A549 appartengono ad una linea di cellule epiteliali polmonari umane, ossia derivano da uno dei tessuti *target* dell'attività tossica delle fibre di asbesto una volta inalate, in particolare della formazione di carcinoma bronchiale (Chao et al., 1996). Pertanto esse sono state spesso utilizzate per lo studio dei meccanismi della patogenesi dell'asbesto. L'esposizione di tali cellule alla crocidolite causa una ridotta disponibilità di equivalenti riducenti necessari per neutralizzare agenti ossidanti come le ROS (Riganti et al., 2002), induce la produzione di NO (Chao et al., 1996), il danno ossidativo al DNA e l'attivazione di endonucleasi con attività di riparo delle lesioni stesse (Kim et al., 2001). Esse possono internalizzare passivamente fibre di crocidolite (Chao et al., 1996).

L'esposizione di PMA-HL60 a fibre di crocidolite UICC tal quali (ossia che non avevano subito alcun trattamento precedente) ha causato una riduzione della vitalità cellulare tanto più

alta quanto maggiore era il tempo di esposizione, mentre gli effetti del crisotilo sono stati limitati. Il crisotilo ha esercitato minori effetti citotossici della crocidolite anche nel caso della A549. Un recente lavoro ha mostrato che un crisotilo di sintesi privo di ioni ferro, diversamente dal crisotilo naturale, non causa lisi cellulare. Il ferro presente nelle fibre, infatti, catalizza il rilascio di specie radicaliche che scatenano reazioni a catena di lipoperossidazione, danneggiando le membrane fosfolipidiche e inducendo la lisi cellulare (Gazzano et al., 2005). La differenza riscontrata tra crocidolite e crisotilo potrebbe quindi essere dovuta al minore contenuto in ferro di questo ultimo.

L'incubazione delle fibre nel solo mezzo di crescita, in assenza dei miceli fungini, risulta in un aumento del ferro alla superficie delle fibre di crocidolite (v. paragrafo 4.2.2), ma non influisce sugli effetti citotossici delle fibre in nessuno dei due tipi cellulari. Tali effetti risentono invece in alcuni casi della modificazione delle fibre indotta dall'attività fungina. La citotossicità del crisotilo trattato con *F. oxysporum*, *P. lilacinus* e *V. leptobactrum* è risultata ridotta sulle cellule HL60. In questi casi quindi la deplezione del ferro presente in superficie dovuta all'attività fungina ha portato ad un risultato analogo a quello ottenuto con il crisotilo di sintesi (Gazzano et al., 2005), anche se i due tipi cellulari danno una risposta diversa. La crocidolite trattata con *F. oxysporum* e *P. lilacinus* ha mostrato un ridotto effetto citotossico sulle A549, ma la crocidolite trattata con *F. oxysporum* è risultata più citotossica sulle HL60 delle fibre di controllo. Le altre fibre non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo. Non vi è quindi una risposta univoca, ma piuttosto essa varia con il tipo cellulare e con il tipo di minerale utilizzato. Infatti, cellule di tipo diverso rispondono diversamente se esposte alle fibre. I bersagli molecolari dell'azione delle fibre cambiano a seconda delle modalità di interazione con le cellule. Ad esempio si può supporre che se le fibre rimangono all'esterno della cellula, i *target* principali saranno le membrane cellulari, mentre se esse vengono fagocitate, vengono a contatto con le molecole nel citoplasma, inducendo quindi risposte diverse.

La presenza nel mezzo di coltura di forbol miristato acetato (PMA), necessario al differenziamento, causa un danno ossidativo al DNA. L'induzione della formazione di 8oxodGuo nelle PMA-HL60 esposte a crocidolite UICC, sebbene in quantità non correlate con la dose o il tempo di incubazione conferma il dato ottenuto da Takeuchi e Morimoto (1994), che utilizzando un analogo sistema sperimentale avevano rilevato un'induzione del danno ossidativo al DNA, ma non avevano rilevato differenze significative neanche triplicando la dose di fibre. Questo stesso studio mostra tuttavia che l'induzione della 8oxodGuo ha un andamento nel tempo simile a quello dell'internalizzazione delle fibre, che è massima tra le 8 e le 24 ore di incubazione, sostenendo l'importanza della fagocitosi e del contatto tra fibre e DNA per l'induzione di un danno ossidativo.

La scelta di operare alle minime condizioni di citotossicità compatibili con l'induzione di un danno ossidativo consente di rilevare l'ossidazione del DNA in condizioni non tossiche per le cellule. Il crisotilo 6D, al contrario della crocidolite, mostra un'induzione dose dipendente del danno ossidativo, il quale sembra ricorrere durante le prime otto ore di incubazione e non aumentare ulteriormente. Il crisotilo 6D sembra causare quindi un danno maggiore e più rapido alle HL60 rispetto alla crocidolite. I due tipi di fibra potrebbero essere fagocitati, e quindi raggiungere l'interno della cellula, con tempi e in quantità diverse. Per esempio il crisotilo è fagocitato più rapidamente della crocidolite da cellule epiteliali di ratto *in vitro* (Hesterberg et al., 1987). Inoltre si può supporre che tale differenza sia anche dovuta alle diverse caratteristiche di superficie delle fibre, in quanto il crisotilo, caratterizzato da una più ampia area specifica rispetto alla crocidolite, potrebbe esporre siti reattivi più accessibili della crocidolite.

Le due fibre tal quali inducono la formazione di 8oxodGuo in quantità simili nelle A549, proporzionale alla dose di fibre utilizzata. Uno studio precedente ha mostrato che tale

modificazione del DNA delle A549 generata da crocidolite dipende dalla presenza del ferro nelle fibre e dalla produzione di NO nelle cellule stesse (Chao *et al.*, 1996).

E' noto che la procedura di estrazione del DNA nucleare può determinare lo sviluppo di prodotti di ossidazione che sono artefatti dovuti alla manipolazione. Per questo motivo è stato seguito un protocollo (Ravanat *et al.*, 2002) in cui tutti i tamponi utilizzati contengono desferriossamina, che forma complessi privi di attività ossidoriduttiva con il ferro, bloccandone gli effetti. Inoltre negli esperimenti condotti, il DNA viene a contatto con le fibre durante la fase di estrazione, in quanto esse vengono in parte raccolte con le cellule al termine dell'incubazione e in parte eliminate durante i vari passaggi necessari al recupero delle cellule stesse. L'aggiunta, in campioni di cellule non trattate, di fibre al termine della crescita induce un danno ossidativo che è doppio rispetto a quello riscontrato dopo le normali incubazioni in piastra per il crisotilo, mentre aumenta di circa 100 volte con la crocidolite. Il fatto che il danno sia maggiore in seguito all'aggiunta di fibre dopo l'incubazione che non in seguito all'incubazione effettiva significa che l'ossidazione derivante dalla fase di estrazione non è rilevante negli esperimenti effettivi, che altrimenti dovrebbero mostrare tassi di ossidazione molto più elevati. L'aggiunta delle fibre solo in fase di estrazione del DNA porta a sovrastimare il danno che ne può derivare, in quanto è impossibile valutare con esattezza la quantità di fibre presenti nei campioni effettivamente trattati. Inoltre, le fibre incubate per molte ore a contatto con il mezzo coltura e con le cellule non hanno le stesse proprietà di superficie e di reattività delle fibre aggiunte al termine dell'incubazione. Non è stato quindi individuato un controllo ideale per valutare gli artefatti derivanti dal processo di estrazione. Tuttavia i dati ottenuti non escludono che essi possano contribuire in parte al danno complessivo misurato.

Lo studio degli effetti delle fibre tal quali sull'ossidazione del DNA cellulare ha consentito di mettere a punto il sistema sperimentale, con l'obiettivo principale di utilizzarlo per confrontare gli effetti di fibre modificate in seguito all'attività fungina e delle rispettive fibre di controllo incubate nel mezzo di coltura fungino, in assenza dei miceli.

I livelli basali di 8oxodGuo rilevati nel DNA di cellule PMA-HL60 non esposte a fibre sono maggiori dopo 8 ore di incubazione che dopo 24. Dopo 8 ore di incubazione, fibre di crocidolite di controllo e trattate non inducono un significativo aumento della 8oxodGuo nel DNA delle PMA-HL60 rispetto ai livelli basali. Tale induzione si rileva invece dopo 24 ore, anche se il danno, in valore assoluto, è inferiore a quello rilevato dopo 8 ore. In cellule PMA-HL60 si rileva 8oxodGuo, considerata basale, in quantità doppia rispetto alle cellule HL60 non differenziate. Il fatto che dopo 8 ore di incubazione i livelli di 8oxdGuo siano più elevati che dopo 24 ore, ma che non vi sia induzione da parte delle fibre di crocidolite suggerisce che in questa prima fase di contatto, gli effetti del PMA prevalgano su quelli delle fibre, che non vengono quindi rilevati. Nel corso dell'incubazione si ha probabilmente l'attivazione di sistemi di riparazione, che riducono i livelli basali di 8oxodGuo dovuti al PMA, i quali dopo 24 ore raggiungono i livelli misurati in assenza di PMA. In presenza di fibre, nonostante i sistemi di riparazione riducano i livelli assoluti di 8oxodGuo, l'ossidazione continua, per cui dopo 24 ore si rileva una differenza tra i campioni esposti a fibre e non. Le fibre di crocidolite sembrano quindi indurre un danno ossidativo limitato ma duraturo, visibile solo dopo 24 ore grazie alla diminuzione degli effetti del PMA. Un effetto della riparazione è riportato da Kim *et al.* (2001) per le A549, in cui i livelli di 8oxodGuo presentano un picco dopo 9 ore di incubazione con crocidolite e diminuiscono a 18 e 27 ore in quanto gli enzimi coinvolti nella riparazione si attivano con un certo ritardo, raggiungendo il massimo di attività dopo 27 ore di incubazione.

Dopo 24 ore di incubazione si rileva una differenza significativa tra il danno indotto dalle fibre di crocidolite di controllo e da quelle trattate con *F. oxysporum* e *V. leptobactrum*, che sono le due specie che hanno estratto la maggior quantità di ferro dalle fibre di crocidolite. Questa differenza è rilevata nelle PMA-HL60, ma non nelle A549.

I risultati indicano un aumento della 8oxodGuo nelle A549 esposte a fibre di crocidolite rispetto ai livelli basali dopo incubazione di 24 ore con tutti i tipi di fibre, di controllo o pretrattate con i vari funghi.

Il crisotilo di controllo induce un danno ossidativo elevato dopo 8 ore di incubazione con le PMA-HL60, che scende a livelli basali dopo 24 ore. L'estrazione di ferro e magnesio da queste fibre ad opera dei ceppi fungini causa una diminuzione dei valori medi di 8oxodGuo indotti. Tale diminuzione non è statisticamente significativa, e dopo 24 ore non è più rilevabile, in quanto tutti i campioni mostrano livelli di 8oxodGuo prossimi a quelli basali. Il crisotilo di controllo o incubato in presenza dei ceppi fungini, causa quindi un elevato danno ossidativo nelle prime 8 ore di incubazione, che però è efficacemente riparato nelle ore successive. Come il crisotilo tal quale, anche il crisotilo modificato dall'incubazione nel mezzo di coltura fungino (in presenza o assenza dei funghi stessi), induce un effetto di ossidazione del DNA immediato, mentre i dati ottenuti suggeriscono per la crocidolite (tal quale e modificata) un danno meno intenso ma protratto nel tempo. La diversa morfologia e reattività e solubilità di crisotilo e crocidolite è probabilmente alla base dei diversi effetti riscontrati nelle PMA-HL60.

Il crisotilo esercita un effetto ossidativo anche sulle A549. Il danno indotto da fibre trattate con *F. oxysporum* e *P. lilacinus* non è diverso da quello indotto dalle fibre di controllo, mentre fibre preincubate con *V. leptobactrum* inducono un danno mediamente maggiore, ma tale induzione non è statisticamente significativa.

Il *comet assay*, condotto utilizzando le cellule A549, ha permesso di osservare l'induzione di eventi di rottura delle eliche di DNA da parte di fibre di asbesto. Il metodo utilizzato non consente di sapere se tali eventi siano dovuti alla formazione di 8oxodGuo, ma gli esperimenti condotti in parallelo lo suggeriscono. Il *comet assay*, tra i metodi di studio delle lesioni al DNA, ha il vantaggio di richiedere un basso numero di cellule e di essere molto sensibile. Tuttavia esso non è specifico, e inoltre risente di una certa variabilità dovuta al fatto che il risultato viene espresso sulla base dell'osservazione di un'immagine da parte di un operatore. Questo passaggio è reso più difficile nel caso dello studio della genotossicità delle fibre di asbesto, dal fatto che le fibre sono a contatto con le cellule e possono interferire con la migrazione elettroforetica del DNA. Tuttavia tale metodica è già stata utilizzata per lo studio dei danni al DNA indotti da fibre di asbesto nella cellule A549 ed in altri tipi cellulari (Puhakka et al., 2002) con risultati positivi. Il *comet assay* potrebbe quindi essere utilizzato per investigare gli effetti genotossici delle fibre modificate dall'attività fungina.

I dati illustrati indicano che, salvo alcune eccezioni, la deplezione di ioni ferro dalle fibre dovuta all'attività fungina risulta nell'inibizione della reattività chimica di superficie. La modificazione delle fibre da parte di funghi causa la diminuzione dell'attività ossidativa delle fibre, sia crisotilo che crocidolite, nei confronti del DNA isolato. Lavori precedenti indicano che fibre di crocidolite il cui contenuto di ioni ferro è ridotto grazie al trattamento con chelanti *in vitro*, presentano ridotte capacità ossidanti nei confronti del DNA cellulare (Chao et al., 1996). In alcuni casi il trattamento fungino riduce le potenzialità ossidative delle fibre, principalmente grazie alla deplezione di ferro, il cui ruolo centrale nel determinare l'attività ossidativa delle fibre è stato più volte sottolineato. Tuttavia questo non avviene per tutte le fibre testate. La complessità dei sistemi e delle risposte cellulari non consente infatti di osservare una correlazione netta tra la modificazione chimica delle fibre e gli effetti a livello cellulare. Le cause di tale variabilità risiedono non solo nelle già discusse differenze chimico-fisiche tra le fibre, ma anche in molteplici fattori legati alla regolazione delle risposte cellulari in tipi cellulari diversi. In una coltura cellulare, la superficie delle fibre viene ad interagire con molecole endogene (per esempio proteine extracellulari, molecole rilasciate nel mezzo in seguito ad eventi di morte cellulare, lipidi di membrana) e con le componenti del mezzo di crescita (per esempio il siero fetale bovino), quindi la reattività del solido può essere modificata

in modo non prevedibile e non corrisponde necessariamente a quella rilevata *in vitro* nei saggi di rilascio dei radicali. Inoltre, cellule quali i macrofagi e i neutrofilari rispondono alla presenza di particolato solido con la produzione di ROS e RNS, che a loro volta contribuiscono a generare un ambiente ossidante e ai danni cellulari. La presenza di molecole di origine endogena dotate di attività chelante, e quindi in grado di estrarre ioni ferro dalle fibre come il citrato, media il danno ossidativo. Quantità più o meno elevate di tali molecole possono quindi contribuire al danno riscontrato (Hardy and Aust, 1995; Kamp and Weitzman, 1999). Le cellule hanno sviluppato sistemi di trasporto (transferrina) e accumulo (ferritina) che permettono di controllare la concentrazione di ferro intracellulare, limitando i rischi dei danni ossidativi ad esso correlati (Hardy and Aust, 1995). L'amianto costituisce però una fonte permanente di ferro e i suoi effetti dipenderanno quindi anche dalla regolazione di tali sistemi di controllo. Inoltre, bisogna considerare l'intervento delle difese antiossidanti e di riparo attivati dalle cellule stesse, e diversi tra diversi tipi cellulari. Ad esempio l'esposizione a fibre di asbesto induce elevati livelli di espressione della MnSOD nelle cellule mesoteliali, ma non nei fibroblasti (Kinnula, 1999). Nelle cellule A549, invece, si è riscontrata un'inibizione delle difese antiossidanti, che quindi aumenta gli effetti tossici delle fibre sulle cellule (Riganti et al., 2002). Inoltre si è già discusso il fatto che la reattività e la tossicità dei solidi non dipendano unicamente dal loro contenuto di ioni ferro, sebbene questo giochi un ruolo importante. Esperimenti condotti su cellule mesoteliali umane hanno mostrato che crocidolite e crisotilo, che contengono quantità di ferro molto diverse, hanno effetti genotossici simili. Lo stesso studio ha dimostrato che molecole chelanti dei metalli e molecole "scavenger" di radicali hanno un effetto protettivo dagli effetti genotossici della crocidolite, ma non del crisotilo (Poser et al., 2004).



---

## Capitolo 5

### Interazione funghi/asbesto: aspetti del metabolismo fungino

#### *Résumé*

Les mécanismes réglant les interactions entre champignons et fibres d'amiantes sont encore inconnus.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, tous les champignons testés sont capables de solubiliser le fer des fibres d'amiantes. Afin de caractériser les molécules impliquées dans l'extraction du fer, une séparation en fraction par la masse moléculaire des filtrats de *Fusarium oxysporum* a été effectuée. Les différentes fractions ont été testées pour leur capacité à lier le fer. Les fractions actives ont des poids moléculaires compris entre 300 et 2000 Da, correspondant à ce qui est trouvé en littérature pour les sidérophores qui sont connus pour lier le fer (Winkelmann, 1992). D'autre part, tous les champignons isolés sur serpentines relâchent des sidérophores dans le milieu, alors que le pH du milieu n'est pas modifié par les mêmes champignons. Ces résultats suggèrent un possible rôle des sidérophores, et non des acides organiques (qui auraient causé probablement une diminution du pH du milieu), dans l'extraction du fer des fibres.

A cause de la solubilisation du fer en présence des fibres, les champignons sont exposés à une augmentation de sa concentration dans le milieu, et donc à un stress oxydant du à la réactivité du fer. Des marqueurs moléculaires du stress oxydant déjà étudiés pour les cellules humaines ont été considérés pour chercher des homologies ou différences entre ces deux modèles eucaryotes.

La crocidolite induit la lipoperoxydation dans *V. leptobactrum* and *F. oxysporum*, alors que le chrysotile a un effet limité. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la réaction de lipoperoxydation est initiée par des radicaux engendrés par le fer, et que le chrysotile contient moins de fer que la crocidolite.

Afin de mieux connaître la réponse métabolique du champignon à ces conditions, une analyse protéomique a été réalisée. Certaines protéines sont induites par la présence de fibres alors que d'autres sont au contraire réprimées. L'activité de la superoxyde dismutase extra cellulaire augmente pour *V. leptobactrum* et *F. oxysporum* en présence de crocidolite alors qu'il n'y a pas d'effet sur l'activité SOD avec les fibres de chrysotile. Par contre, une analyse *immunoblot* révèle une augmentation de la MnSOD avec le chrysotile. Ce résultat associé au précédent résultats suggèrent que cette augmentation de expression n'est pas suffisant pour modifier l'activité de l'enzyme, qui n'est pas due que à la MnSOD, mais aussi à d'autres isoformes de l'enzyme (par exemple la Cu,ZnSOD).

L'analyse de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPx, enzymes du compartiment intra cellulaire) montre que l'activité de ces deux enzymes augmente en présence de chrysotile mais au contraire qu'elle diminue en présence de crocidolite. D'autre part, nous avons noté une augmentation de l'expression d'une MnSOD avec les deux fibres. Des tests d'activité de la SOD intracellulaire pourraient fournir les résultats nécessaires pour expliquer les résultats d'activité CAT et GPx. L'importante activité induite par les chrysotiles pourrait être le résultat de l'adaptation du champignon isolé sur des substrats riches en chrysotile. A l'opposé, la diminution de la CAT et GPx par la crocidolite est similaire à l'inhibition des défenses antioxydantes des cellules épithéliales de poumon incubées avec crocidolite (Riganti et al., 2002).

Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que les systèmes antioxydants des champignons et des cellules des mammifères exposées aux fibres d'amiantes soient les mêmes. L'utilisation des champignons pourrait donc aider à mieux connaître les réponses antioxydantes provoquées par l'amiante chez les cellules eucaryotes.

### **Abstract**

The molecular mechanisms that regulate the interactions between soil fungi and asbestos fibres are unknown.

As discussed in the previous chapter, all the fungi tested were able to solubilize iron from asbestos fibers. In order to characterize the molecules responsible for iron extraction, a molecular mass fractionation of *F. oxysporum* filtrates was performed. As siderophores are known to specifically bind iron, the different fractions were tested in an assay specific for iron chelators. The active fractions had a molecular weight ranging from 300 and 2000 Da, which is consistent with molecular weight of siderophores found in the literature (Winkelmann, 1992). The results obtained suggested a possible involvement of siderophores in the iron extractions process from the fibers.

In order to characterize the fungal strains isolated from serpentinitic soils, the siderophores assay was performed with fungal colonies growing on a specific substrate. All the fungi tested (except a "non serpentinitic" one) released siderophores in the medium, while the pH of the medium did not change. This results would confirm the involvement of low molecular iron chelators other than organic acids (which would probably have caused a decrease of the culture medium pH) in the iron solubilization process.

Siderophores represent a specific system evolved from fungal microorganisms to acquire iron from the environment (Haselwandter, 1995). Martino et al., 2003 found a good correlation between siderophores release and iron extraction from asbestos fibers for ten different fungal strains. Organic acids represent another iron acquisition system found in fungi (Winkelmann, 1992), but the pH measure of the plate substrate did not support their involvement in the iron extraction process from asbestos fibres.

Due to this iron extraction activity, the fungal medium will be enriched with iron when fungi are grown in the presence of asbestos fibers. This will cause fungi to be exposed to an oxidative stress as in the case of human lung tissues after fibers inhalation. This consideration led us to study the fungal metabolism in the presence of asbestos fibers. Molecular markers of the oxidative stress, already known for human cell, were studied with the aim to find analogies and/or differences in these two eukaryotic model systems.

An increase in lipid peroxidation, with the formation of malondialdehyde (MDA), is induced by asbestos fibres in animals and human beings and underlines fibers toxicity (Gulumian, 1999; Kamp and Weitzman, 1999). Generation of ROS (*reactive oxygen species*) by the iron associated with the fibers is supported by the observation that antioxidant molecules and iron chelators can reduce this reaction (Ghio et al., 1992; Hardy and Aust; 1995). Crocidolite induced MDA formation in both *F. oxysporum* and *V. leptobactrum*, and it could be considered a good marker of the oxidative stress caused by this fiber in fungi. On the other hand, chrysotile had little effect. The different behavior of the two different fibers could be explained by the lower iron content of chrysotile in comparison to crocidolite fibers.

On the other hand, all organisms possess a number of antioxidant enzymes which play an important role against oxidative stress. Thus, a number of experiments aimed to assess the molecular and biochemical aspects of the fungal response to asbestos fibers.

A proteomic analysis was performed in order to better characterize the metabolic fungal response in the presence of the fibers. Specific proteins were induced by asbestos fibers,

whereas others were inhibited. A more detailed analysis, taking into consideration antioxidant enzymes, was conducted both for the extracellular and for the intracellular fungal compartments. An increase of superoxide dismutase extracellular activity was detected for *V. leptobactrum* in the presence of crocidolite. Chrysotile had no effect on SOD activity, but immunoblot analysis revealed that this fibres induced and increased expression of a MnSOD. Taken together, these two results would suggest that the increase in MnSOD protein was not enough to affect the total extracellular SOD activity, which is likely to be not only related to MnSOD, but also to other SOD isoforms (i.e. Cu,Zn SOD). The correlation between the activity and the expression of these enzymes in the different conditions remains to be elucidated. Similarly to *V. leptobactrum*, an increase in extracellular superoxide dismutase activity was also observed for *F. oxysporum* in the presence of crocidolite. An immunoblot experiment with isoelectrofocusing fractions separated through SDS-PAGE visualised a protein band recognized by the anti-MnSOD antibody in the crocidolite treated sample.

Concerning the intracellular compartment, other antioxidant enzymes were tested: catalase and glutathione peroxidase. The activity of both enzymes increased in the presence of chrysotile but significantly decreased in the presence of crocidolite. On the other hand, increased expression of an intracellular MnSOD was observed with both fibers type. Data about intracellular SOD activity would help to clarify the CAT and GPx results, since all these enzymes are involved in the same pathway of detoxification of ROS. The high activity induced by chrysotile could be the result of adaptation of the fungus, isolated from chrysotile rich substrate, to this mineral. On the opposite, the decrease of the activity of CAT and GPx by crocidolite is similar to the inhibition of the antioxidant defences of epithelial lung cells incubated with crocidolite (Riganti et al., 2002).

The data, although still preliminary, suggest the involvement of the same antioxidant systems in fungi and in mammalian cells exposed to asbestos fibres, with some differences. The use of fungi could help to elucidate antioxidant responses raised by asbestos in eukaryotic cells.

## 5.1 Introduzione.

I meccanismi che presiedono all'interazione tra funghi del suolo e fibre di asbesto non sono noti. Come descritto nel capitolo precedente, i funghi sono in grado di modificare le fibre di asbesto, estraendo ioni ferro e magnesio dalle fibre. Le fibre, d'altro lato, inducono una modificazione della pigmentazione dei miceli. Considerata la reattività chimica delle fibre e le proprietà ossidative che esse esercitano verso tutte le biomolecole, con conseguenti danni a livello cellulare (v. capitolo 1), è verosimile che esse costituiscano una fonte di stress anche per i funghi. Tutti gli organismi eucarioti, e quindi anche i funghi, possiedono un pool di enzimi antiossidanti, che vengono attivati per limitare i danni causati da uno stress ossidativo.

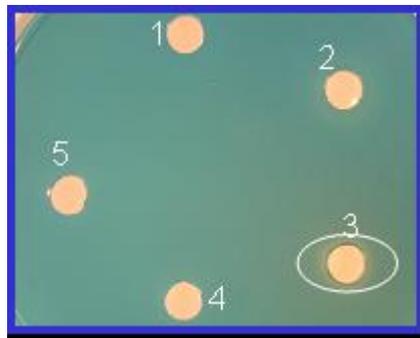
Sono stati svolti alcuni esperimenti con l'obiettivo di definire alcuni aspetti molecolari dell'attività dei funghi in risposta alle fibre.

## 5.2 Saggio di attività chelante fungina.

Tutti i ceppi fungini testati hanno mostrato di poter estrarre ioni dalle fibre di asbesto, sebbene in quantità variabili. La natura delle molecole che mediano questa attività fungina non è nota, ma sulla base dei dati di letteratura si può supporre che si tratti di siderofori o acidi organici. I siderofori hanno peso molecolare compreso tra i 300 e 2000 Da, mentre gli acidi organici hanno peso molecolare inferiore (Winkelman 1992).

Un filtrato culturale completo di *F. oxysporum* cresciuto a contatto con fibre di crocidolite è stato sottoposto ad un frazionamento su colonna (PD10, v. paragrafo 2.6.1), che consente di separare le molecole in soluzione sulla base del loro peso molecolare. Le diverse frazioni eluite dalla colonna sono state sottoposte ad un saggio su piastra (CAS, Chromo Azurol S, v. paragrafo 2.6) specifico per la messa in evidenza dei chelanti del ferro. Le piastre utilizzate sono di colore blu e la produzione di chelanti è resa evidente dalla formazione di aloni chiari intorno ai pozzetti in cui sono state depositate le frazioni da testare.

Le frazioni risultate positive a questo saggio sono state quelle corrispondenti a pesi molecolari compresi tra 1000 e 5000 Da (figura 5.1, pozzetto n° 3): questo risultato, sulla base della corrispondenza dei pesi molecolari con quelli riportati in letteratura, indicherebbe un possibile coinvolgimento di siderofori nell'estrazione di ferro da parte di *F. oxysporum*.



**Figura 5.1 - Saggio CAS (Chromo Azurol S)** per mettere in evidenza la presenza di chelanti specifici del ferro. Le frazioni di un filtrato culturale di *F. oxysporum* contenenti molecole di dimensioni diverse sono state applicate in diversi pozzetti sulla piastra. In corrispondenza del pozzetto 3, corrispondente alla frazione di peso molecolare compreso fra 1000 e 5000 Da, si osserva un alone più chiaro che indica la presenza di chelanti del ferro. / **CAS (Chromo Azurol S) assay** to reveal the presence of iron chelators on plate. The fractions of a filtered culture medium of *F. oxysporum*, containing molecules of different molecular weight, were loaded into the agar. The fraction loaded in 3, corresponding to molecular weights between 1000 and 5000 Da, showed a clear halo, due to its chelating activity.

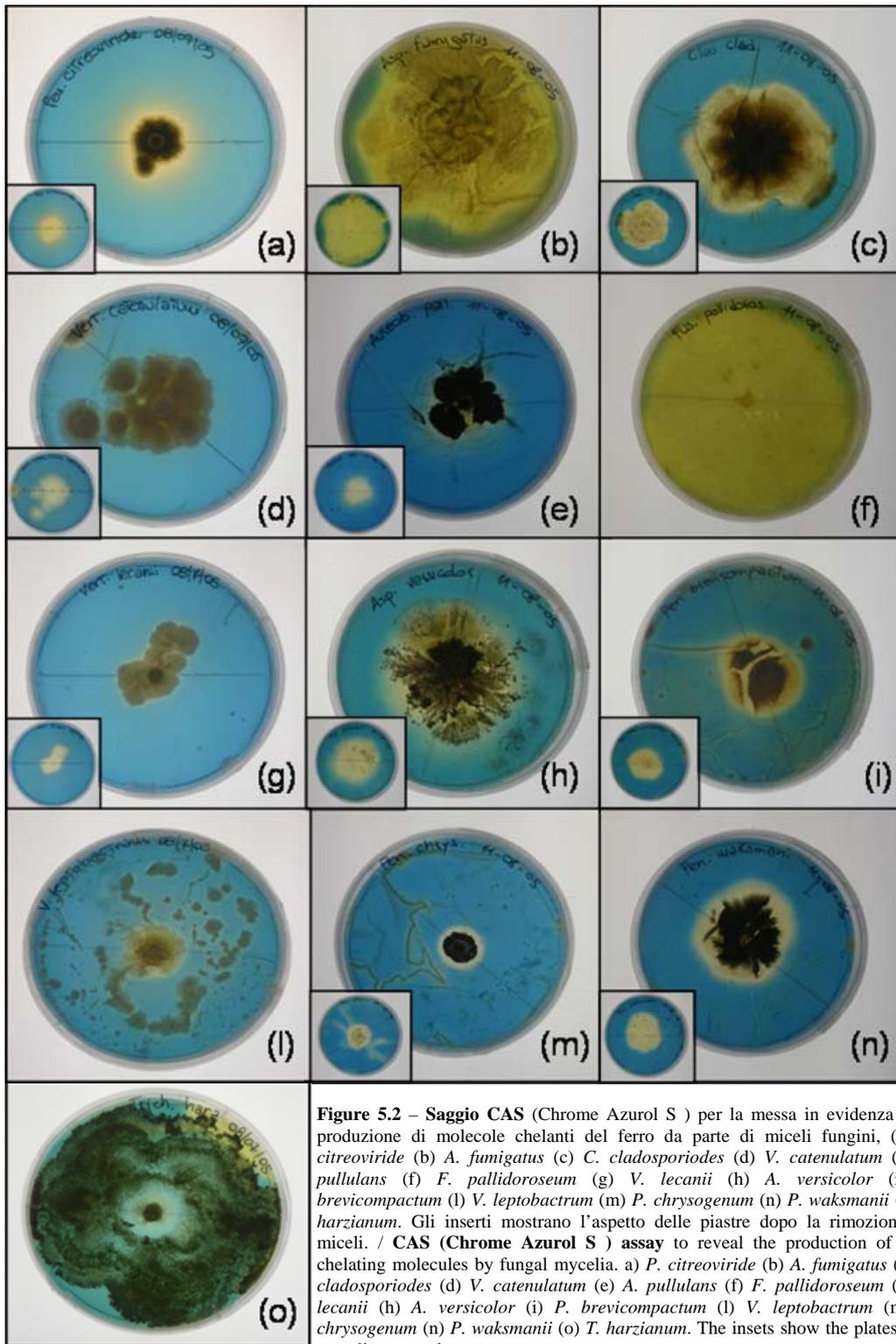
### 5.2.1 Produzione di siderofori da parte di miceli isolati da suoli serpentinitici.

Il saggio appena descritto è stato utilizzato anche per mettere in evidenza la produzione di molecole chelanti del ferro da parte di funghi isolati da suoli serpentinitici, in particolare scelti tra quelli elencati nelle tabelle 3.2 e 3.3. Inoltre sono state scelte alcune specie che sulla base dei dati di letteratura risultavano già isolate da substrati rocciosi di vario chimismo, quali *Aureobasidium pullulans* e *Trichoderma harzianum* (Burford et al., 2003a). In questo caso sulle piastre agarizzate contenenti cromo-azurol-S è stata deposta una membrana di cellophane sterile al di sopra della quale è stato fatto crescere il micelio. Attraverso la membrana il fungo può rilasciare molecole e assorbire nutrienti. La secrezione di molecole chelanti è osservata grazie alla formazione di un alone chiaro, tanto più esteso quanto maggiore è la quantità di chelanti rilasciati. L'attività di rilascio viene valutata considerando anche l'estensione della colonia. Al termine del periodo di crescita, la membrana e il micelio sono stati rimossi ed è stato misurato

il pH del mezzo, per verificare l'eventuale acidificazione, che potrebbe essere sintomo del rilascio di acidi organici, che spesso, come già accennato, hanno attività chelante.

Tutti i ceppi fungini testati, salvo *Trichoderma harzianum*, hanno rilasciato chelanti del ferro (figura 5.2). *Penicillium citreoviride*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium maksmanii*, e *Penicillium chrysogenum* hanno generato un alone lievemente più esteso rispetto alla colonia stessa, risultando quindi i più attivi. *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium pallidoroseum* hanno prodotto un'estesa area di chiarificazione, dovuta però all'abbondante crescita che ha portato a coprire rapidamente tutta la piastra. Le tre specie di *Verticillium* saggiate non hanno mostrato un rilascio di chelanti particolarmente spiccato rispetto alle altre specie, ma si è osservata la formazione di un alone al di sotto del micelio (inserti in figura 5.2 d-g).

Il pH delle piastre è stato misurato in corrispondenza del centro della colonia e a distanze crescenti da esso, fino al bordo della piastra. In nessun caso si è rilevata una variazione significativa del pH, né all'interno dell'area di crescita e di produzione dell'alone chiaro, né all'esterno di essa. L'esatta natura delle molecole chelanti rilasciate non è stata ulteriormente indagata.



**Figure 5.2 – Saggio CAS (Chrome Azurol S ) per la messa in evidenza delle produzioni di molecole chelanti del ferro da parte di miceli fungini.** (a) *P. citreoviride* (b) *A. fumigatus* (c) *C. cladosporioides* (d) *V. catenulatum* (e) *A. pullulans* (f) *F. pallidroseum* (g) *V. lecanii* (h) *A. versicolor* (i) *P. brevicompactum* (l) *V. leptobactrum* (m) *P. chrysogenum* (n) *P. waksmanii* (o) *T. harzianum*. Gli inserti mostrano l'aspetto delle piastre dopo la rimozione dei miceli. / **CAS (Chrome Azurol S ) assay** to reveal the production of iron-chelating molecules by fungal mycelia. (a) *P. citreoviride* (b) *A. fumigatus* (c) *C. cladosporioides* (d) *V. catenulatum* (e) *A. pullulans* (f) *F. pallidroseum* (g) *V. lecanii* (h) *A. versicolor* (i) *P. brevicompactum* (l) *V. leptobactrum* (m) *P. chrysogenum* (n) *P. waksmanii* (o) *T. harzianum*. The insets show the plates after mycelia removal.

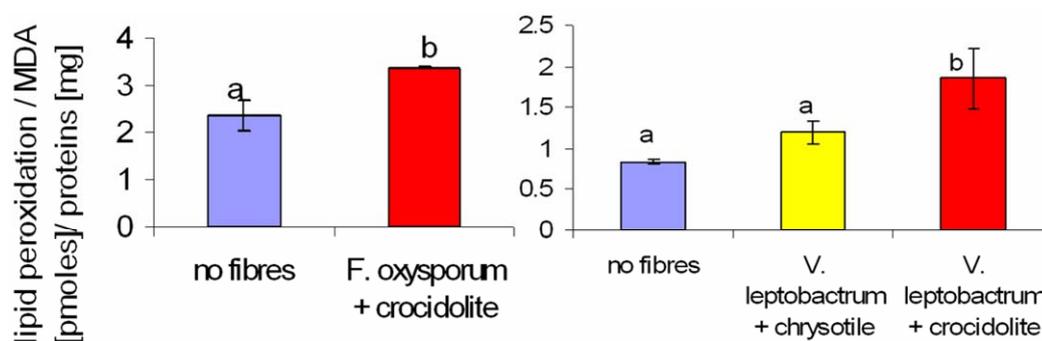
### 5.3 Saggio di perossidazione lipidica in miceli fungini.

Uno dei meccanismi molecolari di tossicità delle fibre di asbesto è la perossidazione dei lipidi delle membrane cellulari, che porta alla formazione di malonil-dialdeide (MDA). Tale molecola può essere quantificata tramite un saggio spettrofotometrico che si basa sulla formazione di un addotto con l'acido tiobarbiturico, che ha un massimo di assorbanza a 532 nm (v. paragrafo 2.17).

Tale saggio è stato adattato per indagare se la stessa reazione di ossidazione delle membrane avvenisse anche nei miceli fungini.

I miceli di *F. oxysporum* e *V. leptobactrum* sono stati fatti crescere su piastre agar-malto 15x15 per permettere un abbondante sviluppo della biomassa. Su tutte le piastre è stata aggiunta in condizioni di sterilità una membrana di cellophane, permeabile ai nutrienti, e solo alle piastre di trattamento è stata addizionata anche una sospensione di fibre di asbesto tra l'agar e la membrana, in modo da tenerle separate dal micelio. In questo modo, al termine di un periodo di 45 giorni, i miceli sono stati raccolti, omogenati con l'utilizzo di un apparecchio Turax in una soluzione contenente triton X-100 allo scopo di mantenere in soluzione la frazione lipidica. I campioni sono stati centrifugati e i surnatanti utilizzati per rivelare la presenza di MDA.

La crocidolite, testata su entrambi i ceppi fungini, induce la formazione di MDA in quantità significativamente ( $P < 0.05$ ) maggiori rispetto a quelle rilevate nei campioni di controllo. Il crisotilo, testato solo con *V. leptobactrum*, non ha un effetto significativo.



**Figura 5.3 - Saggio di perossidazione lipidica** in miceli cresciuti in piastra in assenza e in presenza di fibre: la presenza di crocidolite induce una maggiore ossidazione dei lipidi, rispetto al controllo. Il risultato è espresso in pmoli di malonildialdeide (MDA) rispetto ai mg di proteine totali misurati nel campione ed è il risultato della media di tre campioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. Lettere diverse indicano risultati significativamente diversi ( $P < 0.05$ ). / **Lipid peroxidation assay** in mycelia grown on plate in the presence or in the absence of fibres: crocidolite fibres induce lipid peroxidation. The result is expressed as MDA [pmoles]/proteins in the sample [mg] and is the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation. Different letters mark significantly different results ( $P < 0.05$ ).

### 5.4 Caratterizzazione della risposta fungina allo stress ossidativo: *V. leptobactrum*

#### 5.4.1 Alterazione dei profili proteici extracellulari in seguito all'incubazione di funghi del suolo con fibre di asbesto

Lo studio delle variazioni metaboliche indotte dalle fibre nel microorganismo fungino è stato basato sull'analisi del proteoma.

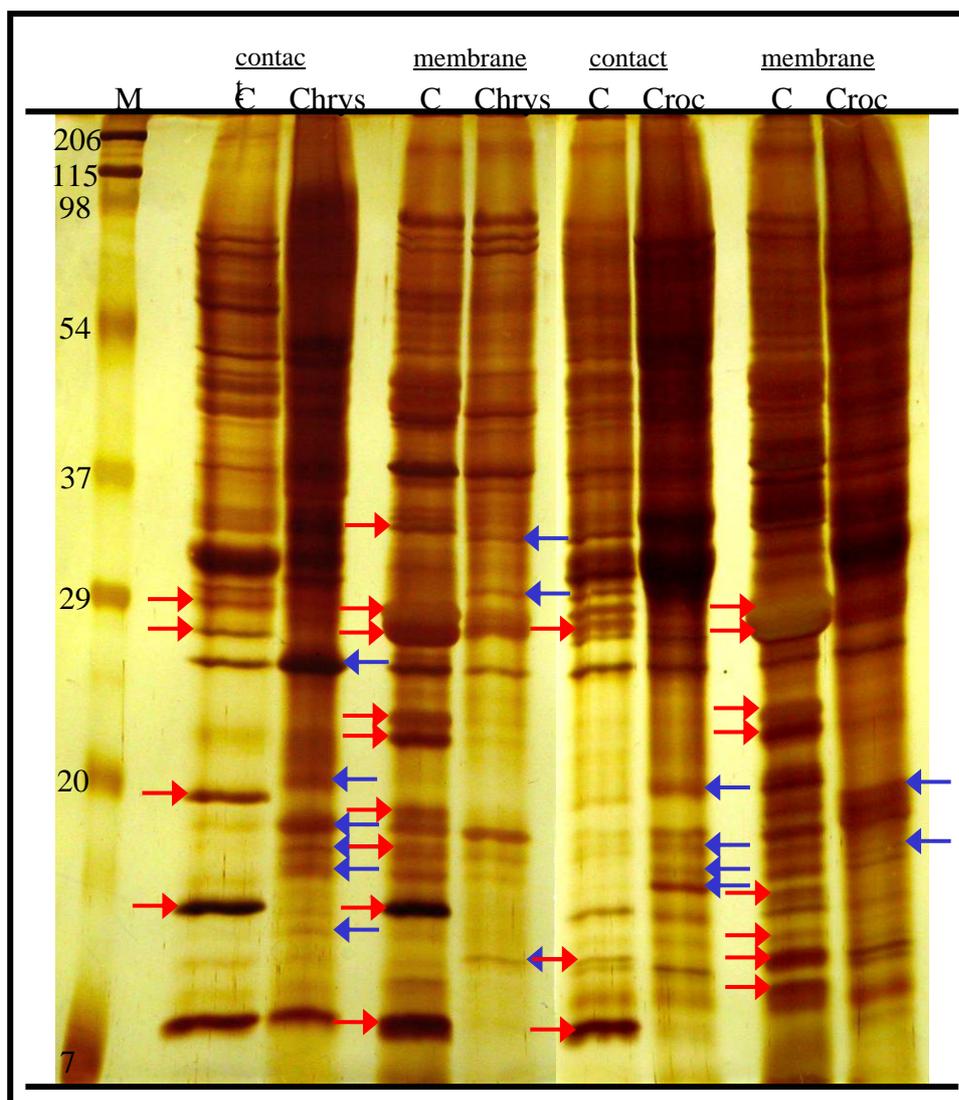
Aliquote del mezzo colturale in cui sono cresciuti i funghi sono state sottoposte ad analisi SDS-PAGE: con questa tecnica le proteine vengono separate sulla base del loro peso

molecolare in un gel di poliacrilammide. E' possibile in questo modo ottenere un'indicazione del contenuto totale di proteine ed evidenziare eventuali differenze qualitative dovute alla presenza di fibre di asbesto nei terreni colturali.

Vengono mostrati (figura 5.4) i profili elettroforetici di *V. leptobactrum* in quanto considerati rappresentativi dell'alterazione riscontrata per tutti i ceppi fungini testati (*F. oysysporum*, *P. lilacinus*, *A. fumigatus* e *Myrothecium sp.*), dovuta alla presenza delle fibre nel mezzo di crescita, sia a diretto contatto che in membrana, consistente in un'inibizione o in un'induzione di alcune bande specifiche.

Vengono confrontati tra loro filtrati colturali di miceli fungini cresciuti in contemporanea, nelle stesse condizioni (25°C 120 rpm) e per lo stesso periodo di tempo. I campioni sono stati quantificati con il metodo di Bradford (v. paragrafo 2.10) e di ognuno sono stati utilizzati 47 µg di proteine totali.

Sono state riscontrate differenze significative confrontando il controllo (C) con i trattati cresciuti secondo entrambe le modalità (miceli a contatto con le fibre o separati da una membrana da dialisi): si nota infatti come alcune bande proteiche molto evidenti nel controllo non siano più rilevabili o siano meno intense nei profili dei trattati (frecce rosse). Viceversa, alcune proteine sono indotte in presenza delle fibre (frecce blu).



**Figura 5.4 - SDS-PAGE di filtrati colturali del ceppo *V. leptobactrum* cresciuto in assenza (C) e in presenza di crisotilo (chrys) e crocidolite (croc), a diretto contatto con la fibra o con la fibra racchiusa in membrana. Le frecce rosse indicano le bande inibite dalla presenza della fibra, mentre le frecce blu quelle indotte. In tutti i casi le maggiori differenze riguardano proteine il cui peso molecolare è compreso tra 15 e 30 KDa. / **SDS-PAGE of proteins from filtered culture media of *V. leptobactrum* grown in the absence (C) or in the presence of chrysotile (chrys) and crocidolite (croc), in direct contact with the fibre or with the fibres kept in a dialysis membrane. Red arrows mark proteins whose expression is inhibited by the fibres, while blue arrow mark induced proteins. The main differences can be seen between 15 and 30 KDa.****

In tutti i casi le maggiori differenze riguardano proteine il cui peso molecolare è compreso tra 15 e 30 KDa. Si osserva in particolare una serie di bande indotte attorno ai 15-20 KDa nei filtrati dei campioni cresciuti a diretto contatto sia con crisotilo 6D che con crocidolite. Inoltre si nota nel primo caso l'inibizione di quattro bande molto intense nel controllo, mentre in presenza di crocidolite si nota l'inibizione di una banda di circa 10 KDa. Per quanto riguarda i campioni cresciuti con la fibra racchiusa in membrana, l'inibizione proteica rispetto ai controlli sembra più marcata dell'induzione, sia nel caso del crisotilo che della crocidolite. Per entrambe

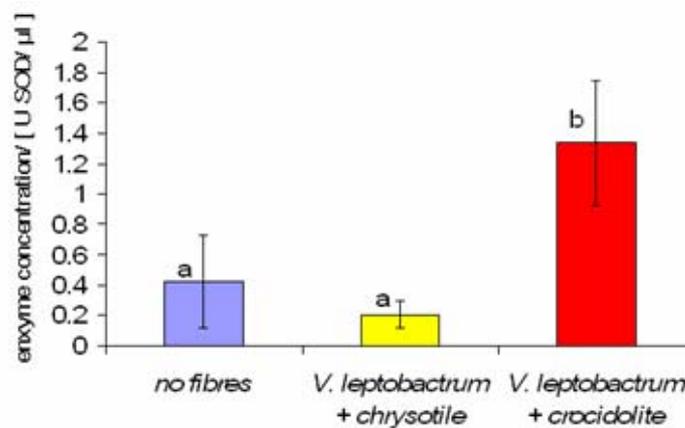
le fibre si osserva l'inibizione parziale o completa di due doppietti a 29 e circa 23 KDa, mentre le proteine inibite a più basso peso molecolare sono differenti.

#### 5.4.2 *V. leptobactrum*: enzimi antiossidanti nel comparto extracellulare.

La risposta cellulare agli stress ossidativi negli eucarioti è mediata da un insieme molto vario e complesso di enzimi e altre proteine.

Allo scopo di ottenere un quadro più dettagliato della risposta del ceppo *V. leptobactrum*, utilizzato nelle prove di solubilizzazione degli asbesti, allo stress eventualmente causato dal minerale, sono stati allestiti diversi esperimenti volti a rivelare l'attività (saggi enzimatici) e l'espressione (western blotting) di alcune proteine di interesse coinvolte nella risposta agli stress ossidativi (v. paragrafo 2.14).

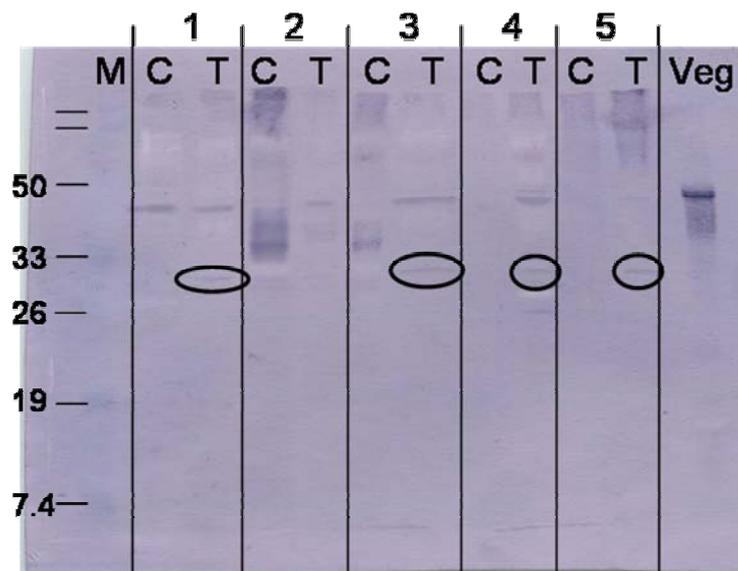
E' stata rivelata l'attività superossido-dismutasica nella frazione proteica extracellulare di *V. leptobactrum*. Tale attività è significativamente più elevata ( $P < 0.05$ ) per i miceli cresciuti in un contatto con fibre di crocidolite, rispetto ai miceli cresciuti a contatto con fibre di crisotilo o in assenza di fibre (figura 5.5).



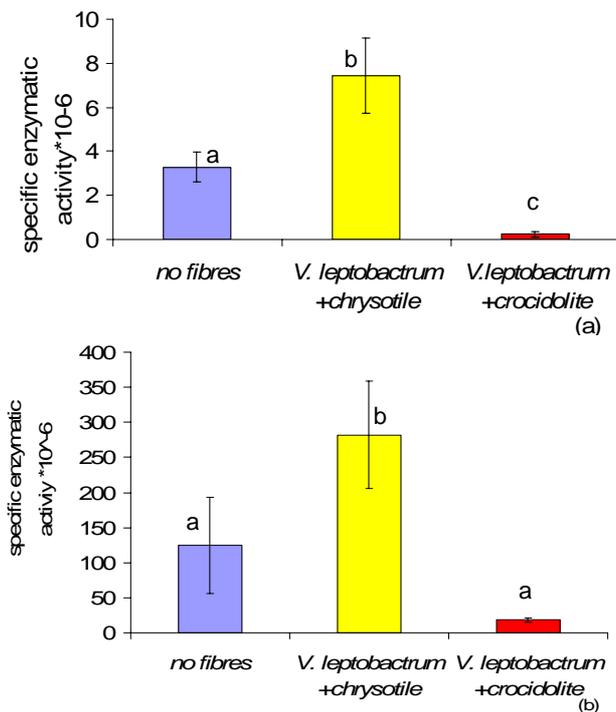
**Figura 5.5 – Concentrazione dell'enzima SOD** nei filtrati colturali di *V. leptobactrum* cresciuto in assenza di fibre, in presenza di crisotilo o di crocidolite. Il saggio utilizzato rivela l'attività dell'enzima, che è poi correlata con la quantità di enzima in soluzione utilizzando una standardizzazione con un enzima purificato. Il risultato è dato dalla media di quattro campioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. Le lettere indicano valori significativamente diversi ( $P < 0.05$ ). / **SOD concentration** in the filtered culture media of *V. leptobactrum* grown in the absence of fibres, in the presence of chrysotile or in the presence of crocidolite. The assay reveals the enzymatic activity, that is correlated with the concentration of enzyme by a standardization with a purified enzyme. The results are the means of four independent replicates  $\pm$  standard deviation. Different letters mark significantly different values ( $P < 0.05$ ).

E' stata quindi condotta un'immunomacatura delle proteine extracellulari di *V. leptobactrum* per verificare se la proteina Mn-SOD fosse espressa nel mezzo di crescita. A tale scopo sono stati utilizzati campioni di proteine extracellulari di alcuni ceppi di *V. leptobactrum*, isolati in diversi suoli serpentinitici (v. tabella 3.2).

L'anticorpo anti-Mn-SOD ha riconosciuto una banda (altezza tra 26 e 33 KDa) nei campioni proteici di miceli cresciuti in presenza di fibre di crisotilo 6D (figura 5.6). Tuttavia tale proteina potrà essere identificata solo tramite sequenziamento.



**Figura 5.6 - Immunomarcatura con l'anticorpo anti-MnSOD** sulle frazioni proteiche ottenute tramite precipitazione dal filtrato culturale di *V. leptobacterium* cresciuto in assenza (C) o in presenza (T) di crisotilo 6D a diretto contatto con il micelio. 1-5=diversi ceppi di *V. leptobacterium*; M=marcatore di peso molecolare; C=controllo; T=trattati; Veg=Mn-SOD purificata di origine vegetale. Gli ovali indicano le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo. / **Immunoblotting with a Mn-SOD antibody** on proteic fractions obtained by precipitation from the filtered culture media of *V. leptobacterium* grown in the absence (C) or in the presence (T) of chrysotile 6D fibres, in direct contact. 1-5=different *V. leptobacterium* strains; M=molecular weight marker, C=control; T=treated; Veg=purified Mn-SOD from vegetal. The circles mark the protein bands recognized by the antibody.



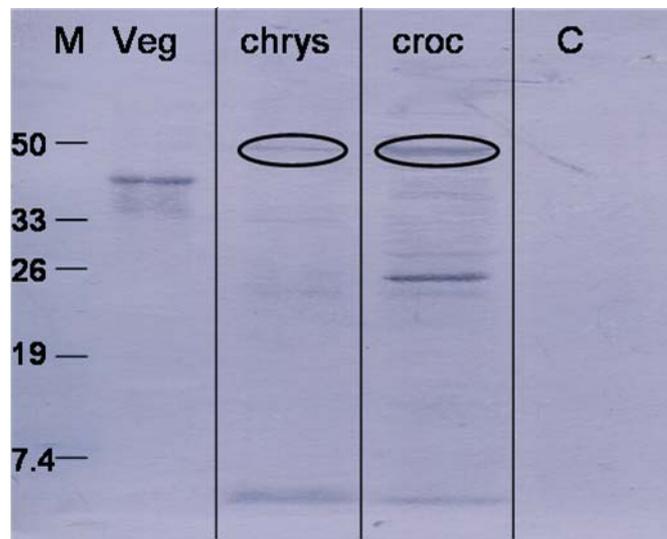
**Figura 5.7 -Saggio di attività dell'enzima catalasi (a) e glutazione perossidasi (b)** in campioni intracellulari di *V. leptobacterium* cresciuto in assenza di fibre o in presenza di crisotilo 6D o crocidolite. Il calcolo dell'attività specifica è riportato al paragrafo 2.16.2. Il crisotilo induce l'attività della catalasi intracellulare, mentre tale attività è inibita dalla crocidolite. I risultati sono la media di quattro ripetizioni indipendenti  $\pm$  deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ( $P < 0.05$ ). / **Enzymatic activity assay of catalase (a) and glutathione peroxidase (b)** in intracellular protein extracts of *V. leptobacterium* grown in the absence of fibres or in the presence of chrysotile 6D or crocidolite. For the formula to calculate specific activity see 2.16.2. Chrysotile induce both CAT and GPx activity, while crocidolite inhibits both enzymes. The results are the means of four independent replicates  $\pm$  standard deviation. Different letters mark significantly different values ( $P < 0.05$ ).

#### 5.4.3 *V. leptobactrum*: enzimi antiossidanti nel comparto intracellulare.

Estratti proteici intracellulari di *V. leptobactrum* sono stati utilizzati per saggiare l'attività di enzimi coinvolti nella risposta agli stress ossidativi quali la catalasi e la glutatione perossidasi. L'attività di tali enzimi, misurata tramite saggi spettrofotometrici, è stata rapportata alla quantità di proteine presenti nei vari campioni (v. paragrafo 2.16.1 e 2.16.2).

I risultati indicano l'induzione dell'attività della catalasi (CAT) nei campioni corrispondenti ai trattati con crisotilo (figura 5.7a), che mostrano una differenza significativa rispetto ai controlli ( $P < 0.05$ ), mentre l'attività enzimatica dei trattati con crocidolite è notevolmente ridotta ( $P < 0.05$ ).

I risultati del saggio di attività della glutatione perossidasi sono simili (figura 5.7b) mostrando un'attività della Gpx indotta nei campioni trattati con crisotilo rispetto ai controlli ( $P < 0.05$ ), ed un'attività enzimatica molto ridotta nei trattati con crocidolite ( $P > 0.05$  rispetto ai controlli). L'attività dei due enzimi ha quindi lo stesso andamento.



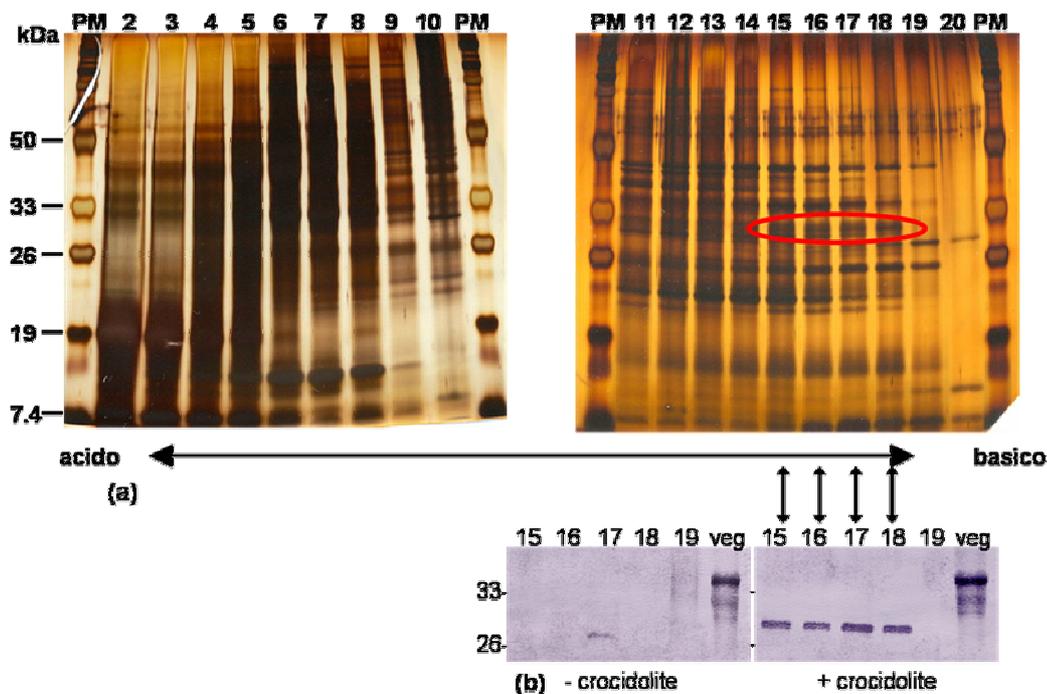
**Figura 5.8 - Immunoblot con l'anticorpo anti-MnSOD** sulle frazioni proteiche intracellulari estratte da micelio di *V. leptobactrum* cresciuto in assenza (C) o in presenza di crisotilo 6D (chrys) o crocidolite (croc) a diretto contatto con il micelio. 1-5=diversi ceppi di *V. leptobactrum*; M=marcatore di peso molecolare; Veg=Mn-SOD purificata di origine vegetale. Gli ovali indicano le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo. / **Immunoblotting with a Mn-SOD antibody** on intracellular proteic fractions obtained from mycelium of *V. leptobactrum* grown in the absence (C) or in the presence of chrysotile 6D (chrys) or crocidolite (croc) fibres, in direct contact. M=molecular weight marker, Veg= purified Mn-SOD from vegetal. The circles mark the protein bands recognized by the antibody.

Tramite un esperimento di immunomarcatura sulle frazioni proteiche intracellulari di *V. leptobactrum* è stato possibile osservare che un anticorpo specifico per la Mn-SOD riconosce una banda solo nei campioni cresciuti in presenza di crisotilo o crocidolite, e non nei campioni di controllo. Tale banda, ha un peso molecolare superiore rispetto a quella isolata nel mezzo extracellulare.

**5.5 Caratterizzazione della risposta fungina allo stress ossidativo:  
*F.oxysporum***



**Figura 5.9 – Saggio di attività superossidodismutasi (SOD) su gel.** L'attività SOD è evidenziata dalle bande incolori su fondo scuro. E' evidente una banda di attività SOD nel campione corrispondente al filtrato culturale di *F. oxysporum* cresciuto in presenza di crocidolite (+), banda non presente invece nel campione di controllo (-). hum= SOD purificata da tessuti umani (Sigma) come controllo positivo/  
**Superoxidedismutase activity assay on native gel.** The SOD id visualized as a clear band on a blue gel. The electrophoresis showed SOD activity in a filtered culture medium of grown in the presence (+), but not in the absence (-), of crocidolite. Hum=purified human SOD (Sigma) as a positive control.



**Figura 5.9 – Elettroforesi e immunomarcatura della frazione proteica extracellulare di *F.oxysporum***  
(a) SDS-PAGE delle frazioni di isoelettrofocalizzazione (IEF) del filtrato culturale di *F. oxysporum* cresciuto a diretto contatto con le fibre di crocidolite. I numeri corrispondono alle frazioni raccolte dopo l'IEF e nelle quali le proteine si sono focalizzate a seconda del loro punto isoelettrico. La frazione 2 corrisponde all'estremo acido dell'intervallo di pH (pI=2) e la frazione 20 corrisponde a quello basico (pI=10.3). La banda evidenziata nelle frazioni 15-18 (PM=26-33 e pI=6.8-7.5) è riconosciuta in maniera specifica dall'anticorpo anti MnSOD in seguito ad immunomarcatura (b), ma non è riconosciuta nel filtrato culturale di *F. oxysporum* cresciuto in assenza di crocidolite.

Veg= Mn-SOD di origine vegetale / **Electrophoresis and immunoblotting of the extracellular protein fraction of *F. oxysporum*.** (a) SDS-PAGE of isoelectrofocusing fractions of the filtered culture medium of *F. oxysporum* grown in direct contact with crocidolite fibres. The numbers correspond to the fractions collected after IEF, in which proteins are separated according to their pI. The fraction 2 is the acid end (pI=2) and the fraction 20 is the basic end (pI=10.3) of the considered range. The protein bands marked with a circle in the fractions 15-18 (PM=26-33, pI=6.8-7.5) are specifically recognized by the Mn-SOD antibody in an immunoblotting assay (b) but it are not recognized in filtered culture medium of *F. oxysporum* grown in the absence of crocidolite.

Un'alterazione dei profili proteici analoga a quella osservata tramite SDS-PAGE nel caso di *V. leptobactrum* è stata osservata anche per *F. oxysporum*. E' stata quindi condotta un'indagine mirata ad evidenziare l'eventuale presenza di proteine di risposta allo stress ossidativo, quali gli enzimi appartenenti alla famiglia delle superossido dismutasi (SOD).

I filtrati colturali di *F. oxysporum* sono stati sottoposti ad un saggio di attività enzimatica direttamente su gel nativo di poliaccrilammide (v. paragrafo 2.15) per rivelare la presenza di una attività SOD extracellulare. La visualizzazione dell'attività SOD deriva dall'inibizione della riduzione dell' NBT da parte del radicale superossido ( $O_2^-$ ) generato tramite una reazione fotochimica. La banda che risulta dall'attività SOD appare incolore su un fondo altrimenti blu a causa dell'NBT ridotto da parte del radicale superossido.

Tale esperimento ha evidenziato una banda di attività superossido-dismutasi soltanto nel campione trattato con crocidolite (figura 5.9). Tale saggio, come il saggio spettrofotometrico condotto su *V. leptobactrum*, rivela una generica attività SOD. Si è quindi proceduto ad una immunomarcatura con anticorpi anti-Mn-SOD.

Il filtrato colturale di *F. oxysporum*, dopo la crescita del fungo in assenza di crocidolite o a contatto con la crocidolite, è stato concentrato in un evaporatore rotante (Rotavapor) e sottoposto ad isoelettrofocalizzazione (IEF), in un intervallo di pH compreso fra 3 e 10. Le frazioni ottenute, numerate da 1 a 20 (la frazione 1 corrisponde all'estremo acido e la 20 all'estremo basico nell'intervallo di pH creato dalle anfoline), sono state analizzate tramite un SDS-PAGE. La figura 5.10a mostra solo il risultato ottenuto per il campione trattato con crocidolite.

E' stato poi effettuato un'immunomarcatura delle frazioni di isoelettrofocalizzazione del filtrato colturale di *F. oxysporum*, cresciuto sia in assenza che in presenza di crocidolite, utilizzando un anticorpo policlonale contro la Mn-SOD. L'anticorpo ha riconosciuto una proteina presente solo nel filtrato corrispondente al campione trattato, nelle frazioni 15-18 del gel, ossia nell'area basica (PM= 26-33; pI=6.8-7.5; figura 5.10b).

E' verosimile che tale risultato sia associato alla presenza di un attività SOD nel mezzo di coltura. Comunque i due risultati si completano a vicenda.

## 5.6 Discussione

### 5.6.1 I mediatori dell'interazione tra funghi e fibre: chelanti del ferro.

L'interazione dei funghi del suolo con i minerali si basa su meccanismi di tipo fisico e di tipo chimico. Questi ultimi, che hanno il peso maggiore nei processi di *bioweathering* mediati da funghi, sono basati sul rilascio di metaboliti, che alterando il pH esterno e/o complessando gli ioni che costituiscono i minerali, ne modificano le caratteristiche (v. introduzione).

Il termine asbesto indica una famiglia di minerali, diversi per struttura e composizione chimica, ma accomunati dal fatto che tutti contengono ioni ferro, in quantità e forme differenti. I funghi hanno sviluppato sistemi specifici di acquisizione del ferro dalla matrice in cui crescono, mediati dal rilascio di molecole chelanti dette siderofori. Negli esperimenti descritti in Martino et al. 2003, si riporta una buona correlazione tra il rilascio di molecole

chelanti in piastra e la capacità di estrarre ioni ferro da fibre di crocidolite da parte di 10 ceppi fungini isolati da substrati vari.

I funghi isolati da suoli serpentinitici hanno mostrato di rilasciare molecole chelanti del ferro in piastra. Le specie testate di *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Verticillium* oltre ad essere state isolate da siti serpentinitici, erano già in precedenza state segnalate su substrati rocciosi o su materiali da costruzione (Burford et al., 2003a,b), così come specie di *Aureobasidium* e *Trichoderma*. Il primo ha mostrato un'attività limitata, mentre *T. harzianum* non ha generato aloni.

L'attività delle specie di *Penicillium* trova riscontro in bibliografia, in quanto si tratta di un genere predominante nel suolo e noto per la produzione di siderofori del tipo idrossamato (Renshaw et al., 2002). La gran parte delle specie di *Aspergillus* producono diversi siderofori del tipo idrossamato. Inoltre essi sono produttori di acidi organici, come il citrato e l'ossalato, che funzionano come siderofori in altri microrganismi (Winkelmann, 1992). Le tre specie di *Verticillium* hanno chiarificato l'area della piastra a diretto contatto con il micelio, senza però mostrare una spiccata attività di rilascio. *V. lecanii* è un fungo entomopatogeno, mentre *V. catenulatum* è un endofita (Gams 1971). *V. leptobactrum* è, come discusso in precedenza, un fungo raro. In questo saggio non ha mostrato una spiccata attività di rilascio di molecole chelanti del ferro, tuttavia è un attivo estrattore di ferro dalle fibre di asbesto. Ulteriori indagini sarebbero necessarie per chiarire se tale effetto sia dovuto principalmente all'elevato sviluppo della biomassa, più che non ad una marcata sintesi di siderofori o acidi organici, oppure se diversi meccanismi di solubilizzazione siano indotti, nel fungo, dall'interazione con le fibre.

Un lavoro precedente aveva attribuito al rilascio di acidi organici in piastra, la solubilizzazione di ossidi di zinco da parte di funghi micorrizici ericoidi, sulla base dell'acidificazione del terreno e della successiva identificazione delle molecole rilasciate (Martino et al., 2003a). Il terreno di crescita delle piastre non risulta acidificato dopo lo sviluppo delle biomasse. Si è rilevata una variabilità in piastra di 0.1 unità di pH, non significativa di una forte acidificazione del mezzo, che suggerisce che le molecole implicate nella complessazione del ferro non siano acidi organici. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che la frazione del mezzo di crescita fungino contenente le molecole chelanti è quella che corrisponde alla frazione di peso molecolare compreso tra 300 e 2000 Da, corrispondente a quello riportato in letteratura per i siderofori (Winkelmann, 1992).

#### 5.6.2 I mediatori dell'interazione tra funghi e fibre: enzimi antiossidanti.

L'estrazione di ferro dalle fibre di asbesto in coltura determina un aumento della concentrazione di ferro in soluzione. Il micelio fungino è quindi esposto alle fibre e ad una aumentata concentrazione di ferro. Tali condizioni ricordano quelle che risultano dalla deposizione di fibre nei tessuti umani in seguito ad inalazione. Le cellule bersaglio vengono a contatto con le fibre, che inducono danni di tipo ossidativo e modificano l'espressione genica (v. introduzione). Per questo motivo si è affrontato lo studio del metabolismo fungino prendendo in considerazione alcuni marcatori di stress ossidativo tipici delle cellule umane, per evidenziare eventuali analogie o, viceversa, differenze.

La perossidazione lipidica è un meccanismo tramite il quale l'asbesto altera la struttura e le funzioni delle membrane cellulari animali e umane; esso sembra essere tra i primi effetti tossici causati dall'asbesto (Gulumian, 1999) e contribuisce all'alterazione della regolazione delle vie di segnalazione intracellulare. I prodotti della perossidazione lipidica sono stati rilevati *in vitro* in cellule epiteliali polmonari incubate con fibre di crocidolite, ma anche nel plasma di lavoratori esposti all'asbesto (Kamp and Weitzman, 1999). Il coinvolgimento di ROS generati dal ferro associato alle fibre è dimostrato dall'osservazione che molecole antiossidanti e chelanti del ferro possono ridurre tale reazione (Ghio et al., 1992; Hardy and Aust, 1995).

I ceppi *F. oxysporum* e *V. leptobactrum* sono stati sottoposti a saggi per valutare fenomeni di perossidazione lipidica nella cellula fungina. La prova sperimentale ha previsto la valutazione della formazione della malonildialdeide (MDA), un prodotto della reazione dei radicali con i lipidi. Questo composto è uno dei più studiati perché è considerato una molecola altamente tossica e un'importante indicatore del danno ossidativo (Del Rio et al., 2005). Alcuni studi effettuati su cellule animali e umane dimostrano, infatti, la possibilità *in vivo* di danni irreversibili a livello dei meccanismi di funzionalità cellulare (Del Rio et al., 2005), la formazione di differenti addotti molecolari (Marnett, 1999) dovuti all'interazione della malonildialdeide con le basi azotate e la produzione di effetti genotossici con possibili conseguenze di induzione del cancro (Niedernhofer et al., 2003). La formazione di MDA è stata riscontrata anche in piante esposte a crisotilo (Trivedi et al., 2004).

I miceli trattati con crocidolite hanno mostrato una produzione di MDA maggiore rispetto ai controlli in entrambi i casi, suggerendo pertanto che l'MDA possa essere considerato un possibile indicatore dello stress ossidativo causato da questo materiale anche per i funghi. Inoltre è stato ripetuto lo stesso saggio dopo l'incubazione di *V. leptobactrum* con crisotilo, il quale induce la formazione di MDA a livelli non significativamente diversi dal controllo. La differenza tra le due fibre potrebbe essere dovuta al minore contenuto in ferro del crisotilo. Entrambi i funghi hanno mostrato la presenza di un danno a livello delle membrane cellulari. I risultati ottenuti con l'utilizzo di cellule fungine sono importanti in quanto dimostrano che la perossidazione dei lipidi di membrana avviene indipendentemente dall'evento di fagocitosi delle fibre, e non necessita di un contatto diretto tra le fibre e la membrana stessa. La membrana cellulare nei funghi è infatti circondata da una parete rigida che non consente fenomeni di endocitosi e che costituisce una barriera fisica che impedisce il contatto. Inoltre, negli esperimenti condotti i miceli crescono separati dalle fibre da una membrana da dialisi. Si può ipotizzare che la reazione di perossidazione lipidica inizi grazie alla produzione di radicali ossidrilici nelle vicinanze della membrana, grazie a reazioni di Fenton catalizzate dal ferro in soluzione, la cui concentrazione è aumentata in seguito all'estrazione dalle fibre. In generale i miceli saranno sottoposti ad uno stress di tipo ossidativo, in virtù della capacità delle fibre di catalizzare la formazione di specie reattive dell'ossigeno (Weitzman and Graceffa, 1984).

Diversi studi precedenti mostrano l'induzione o l'inibizione di proteine specifiche in condizioni di stress. I dati disponibili per i funghi riguardano principalmente lo stress provocato dalla presenza di composti metallici tossici (Vido et al., 2001), ma anche quello dovuto per esempio all'aumento della temperatura. Esistono molti studi riguardanti le risposte intracellulari agli stress, mentre i dati riguardanti le risposte a livello extracellulare sono più scarsi. Un precedente lavoro (Martino et al., 2002) aveva dimostrato il rilascio di proteine specifiche in risposta alla presenza di zinco nel terreno per funghi ericoidi cresciuti in coltura pura. Studi presenti in letteratura (Martino et al., 2003, Daghino et al., 2005) evidenziano come funghi cresciuti in assenza e in presenza di fibre di asbesto mostrino alterazioni nei profili proteici extracellulari.

La scelta di mostrare l'analisi dei profili elettroforetici di *V. leptobactrum* è derivata dal fatto che si tratta di un ceppo particolarmente interessante essendo da un lato una specie rara ed avendo mostrato d'altro lato una cospicua crescita in presenza di fibre nonché un'intensa attività di solubilizzazione di ferro e magnesio dalle fibre stesse. Nello specifico caso mostrato, così come osservato anche per altri funghi (*P. lilacinus*, *Myrothecium sp.*, *A. fumigatus*, *F. oxysporum*), lo studio della variazione dei profili proteici extracellulari in presenza di fibre ha confermato l'induzione di alcune bande specifiche e l'inibizione di altre. È importante notare che per ogni campione è stata fatta correre su gel la stessa quantità di proteine totali, di conseguenza le differenze rilevate tra i diversi campioni possono essere attribuite ad una

alterazione dell'espressione proteica, pur tenendo conto della variabilità dovuta allo sviluppo con il nitrato d'argento che rende questo risultato semi-quantitativo.

Inoltre i campioni cresciuti in presenza di crisotilo ed i rispettivi controlli sono stati ottenuti in esperimenti condotti a distanza di tempo da quelli con crocidolite e dai rispettivi controlli. I profili proteici di tali controlli, che sono quindi ripetizioni a distanza di tempo dello stesso esperimento, presentano alcune bande in comune ma non sono identici: questo denota una certa variabilità anche tra campioni derivanti da uno stesso trattamento e cresciuti nelle stesse condizioni. La modificazione dei profili proteici non sembra essere dovuta a un danno subito dalle membrane cellulari, evidenziato dalla presenza di MDA, e alla conseguente fuoriuscita di componenti intracellulari, in quanto la verifica del rilascio di actina tramite un esperimento di immunoblotting ha indicato l'assenza di questa proteina intracellulare nei filtrati colturali.

La produzione di proteine specifiche suggerisce una diversa regolazione a livello di trascrizione e /o di traduzione in presenza ed in assenza di fibre. Sono in effetti note nei funghi delle proteine che funzionano come sensori della concentrazione di metalli intracellulari, e che possono legarsi a regioni geniche regolatrici (Bird et al., 2000). Inoltre è noto che la stimolazione di *S. cerevisiae* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determina l'induzione di alcune proteine e l'inibizione di altre, non tutte correlate alla risposta allo stress (Godon et al., 1998).

L'induzione o inibizione di proteine può essere interpretata sia come una risposta al contatto fisico delle fibre con il micelio, sia come una risposta all'incremento della concentrazione di ferro nel terreno e allo stress ossidativo che ne consegue, dimostrato dall'ossidazione delle membrane.

Tra gli enzimi coinvolti nelle risposte agli stress ossidativi vi è la famiglia delle superossido dismutasi, che svolgono un ruolo di protezione dalla tossicità causata dai radicali O<sub>2</sub><sup>-</sup> catalizzandone la conversione in perossido di idrogeno ed ossigeno, e sono presenti sia nei procarioti che negli eucarioti (Scandalios, 1993). Sono state identificate tre classi di SOD, a seconda del metallo presente nel sito attivo: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD e Mn-SOD. La Mn-SOD è ampiamente presente in procarioti ed eucarioti, e in questi ultimi è per lo più mitocondriale. Sono state identificate anche Mn-SOD membranarie nelle piante (Scandalios, 1993) e SOD extracellulari (chiamate EC-SOD) per *S. cerevisiae*, *N. crassa*, e negli spazi extracellulari dei tessuti polmonari umani (Roderick et al., 2004). La quantità di SOD non è fissa, ma varia in risposta alle molteplici condizioni ambientali e metaboliche (Scandalios, 1993). Per esempio si ha un'induzione dell'espressione della SOD in funghi miceliari esposti a stress da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Angelova et al., 2004). Studi di Martino et al., (2002) effettuati per il ceppo *O. maius* Zn hanno dimostrato l'induzione di SOD extracellulare in condizioni di stress da metalli pesanti. In quel caso è stato osservato un netto aumento nella produzione di una SOD extracellulari, sia della forma Cu/Zn-SOD che della forma Mn-SOD, in seguito all'esposizione del fungo allo Zn. Tali osservazioni suggeriscono un parallelismo fra il comportamento dei funghi esposti a fibre di crocidolite e quello in risposta a concentrazioni elevate di metalli potenzialmente tossici.

Precedenti lavori avevano evidenziato l'induzione di una Mn-SOD extracellulare in presenza di fibre di crocidolite per funghi del suolo come *Geomyces pannorum* (var. *pannorum*) (Martino et al., 2004). In questo lavoro si è evidenziata la presenza di Mn-SOD nei filtrati colturali di *F. oxysporum* cresciuto in presenza di crocidolite e di *V. leptobactrum* cresciuto in presenza di crisotilo 6D. Anche a livello intracellulare è stata osservata l'induzione di una Mn-SOD in *V. leptobactrum* sviluppatosi in presenza sia di crisotilo che di crocidolite. Lo stesso anticorpo ha riconosciuto nei compartimenti intra- ed extracellulari di *V. leptobactrum*, proteine dal peso molecolare diverso, suggerendo che esistano diverse isoforme, come già visto nelle piante (Scandalios, 1993). Tuttavia il riconoscimento di alcune bande proteiche da parte dell'anticorpo

non è sufficiente per assicurare l'identità di tali proteine, che potrà essere accertata tramite sequenziamento o spettrometria di massa.

Parallelamente all'aumento dell'espressione di tale enzima, si è riscontrato un aumento delle attività SOD nel comparto extracellulare sia di *F. oxysporum* che di *V. leptobactrum* cresciuti in presenza di crocidolite. Il crisotilo, pur causando un aumento dell'espressione della proteina, non ne induce significativamente l'attività. I dati di espressione non possono tuttavia essere direttamente confrontati con quelli di attività, in quanto questi ultimi non sono specifici per la Mn-SOD, ma sommano le attività di tutte le SOD eventualmente presenti nei comparti extracellulari (es. CuZn-SOD, Martino et al., 2002). L'aumento dell'espressione della Mn-SOD è comunque verosimilmente correlato con l'aumento dell'attività SOD generica. La se pur ridotta induzione dell'attività SOD da parte del crisotilo sarebbe sufficiente a rivelare la presenza di Mn-SOD tramite immunomarcatura, non rilevabile a livelli basali (nel fungo non trattato con crisotilo). Quindi tale induzione dipenderebbe da un' aumentata sintesi della proteina stessa. La maggiore attività SOD indotta dalla crocidolite rispetto al crisotilo è forse dovuta al fatto che tale fibra contiene maggiori quantità di ferro, e quindi il micelio è sottoposto ad un maggiore stress, messo in evidenza anche dalla formazione di MDA.

La Mn-SOD svolge un ruolo importante nella risposta cellulare di difesa nei confronti dell'amianto. Crocidolite e crisotilo inducono i livelli di mRNA della MnSOD in modo simile in cellule mesoteliali pleuriche umane *in vitro*. Cellule di tipo diverso, in particolare i fibroblasti polmonari umani, non danno la stessa risposta. E' noto dalla letteratura che la Mn-SOD è altamente espressa in cellule di mesotelioma polmonare umano rispetto a cellule mesoteliali pleuriche sane. Tale espressione conferisce a tali cellule una particolare resistenza ad ossidanti endogeni ed esogeni (Kinnula, 1999). Alcuni esperimenti hanno inoltre dimostrato che il trasferimento del gene che codifica per la Mn-SOD in linee cellulari epiteliali della trachea di criceto riduce la citotossicità delle fibre di amianto (Mossman et al., 1996).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'induzione o la trasfezione della Mn-SOD senza la contemporanea induzione di altri enzimi antiossidanti, quali le catalasi e le glutazione perossidasi, fornisce una protezione minima o nulla dagli stress ossidativi o può persino essere dannosa, causando un aumento della concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nelle cellule, con conseguente danno e apoptosi. Sembra quindi che l'equilibrio tra i diversi enzimi antiossidanti sia più importante dell'attività dei singoli enzimi (Kinnula, 1999). Le catalasi catalizzano la dismutazione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno, mentre le perossidasi eliminano l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secondo un meccanismo chiamato "via di Halliwell-Asada". Catalasi e perossidasi sono, infatti, enzimi presenti in molti organismi eucarioti. In particolare le catalasi esistono in varie forme (Guan and Scandalios, 1996) in organismi vegetali e funghi, mentre la glutazione perossidasi (GPX), si trova in tutti gli organismi (Mittler, 2002). La catalasi è indotta dal perossido di idrogeno nei funghi filamentosi (Angelova et al., 2004).

E' stata evidenziata un'attività elevata della glutazione perossidasi in piante come *Euphorbia esula*, in cui questo enzima gioca un importante ruolo nei meccanismi di difesa antiossidanti attuati dalla pianta stessa in condizioni di stress abiotici. L'esposizione di piante a fibre di crisotilo determina effetti citotossici, nonché la l'induzione di catalasi e superossidodismutasi (Trivedi et al., 2004).

Le prove sperimentali eseguite su *V. leptobactrum* suggeriscono un'elevata attività di entrambi gli enzimi a livello intracellulare, nel caso dei campioni trattati con crisotilo. Viceversa si riscontra un decremento dell'attività di questi stessi enzimi in presenza di crocidolite. Tali dati non sono necessariamente in contrasto con quelli relativi all'attività SOD rilevata negli stessi campioni, in quanto si tratta di comparti cellulari differenti. Per chiarire tale risposta sarà necessario studiare l'espressione della SOD nel comparto intracellulare del fungo, i cui prodotti di reazione sono substrati per le catalasi e le glutazione perossidasi. L'elevata attività di tali

enzimi in presenza di crisotilo, potrebbe essere significativa di un meccanismo di adattamento del fungo, isolato da un substrato roccioso serpentinitico, al minerale. Analogamente, funghi isolati da suoli contaminati da metalli, sono più resistenti ai metalli stessi rispetto ad altri funghi, esibendo inoltre una tolleranza “metallo-specifica” (Picarella S., tesi di laurea 2004).

Al contrario l'inibizione della catalasi e della glutatione perossidasi in seguito a trattamento con crocidolite è analogo a quanto avviene nelle cellule epiteliali polmonari umane. Infatti l'esposizione di tali cellule a crocidolite determina l'inibizione delle difese antiossidanti, dovuta al blocco della via dei pentoso fosfati e alla diminuzione del *pool* intracellulare di glutatione ridotto, che è anche il substrato della glutatione perossidasi (Riganti et al., 2002). Ciò avviene tuttavia anche in seguito ad esposizione a crisotilo rhodesiano (Gazzano et al., 2005). Facendo di nuovo un paragone con le meglio conosciute risposte cellulari, si può sottolineare che l'induzione di CuZnSOD, catalasi e glutatione perossidasi da parte di fibre di asbesto in sistemi cellulari non va sempre in parallelo con quella della MnSOD ed è in generale meno intensa (Kinnula et al., 1995). Gli studi di Carter et al., (2004) rivelano alti livelli di attività di catalasi e perossidasi in cellule umane e in particolare nei macrofagi alveolari, in risposta a stress ossidativi causati da esposizione ad asbesto. Si riscontra quindi una notevole variabilità di risposte anche tra tipi cellulari diversi dello stesso organismo, sebbene le vie di detossificazione delle specie ossidanti coinvolte siano le stesse.

I dati raccolti rispetto alla risposta metabolica fungina allo stress ossidativo generato dalle fibre di asbesto, sebbene non forniscano un quadro completo, indicano il coinvolgimento degli stessi sistemi antiossidanti coinvolti nelle cellule animali, pur con alcune differenze.

Questi dati suggeriscono un parallelismo tra cellula eucariota umana e cellula fungina, per ciò che concerne l'induzione di meccanismi di difesa in risposta a condizioni di stress cellulare provocati dalle fibre di amianto, nonché un'ipotetica funzione dell'organismo fungino come organismo modello per approfondire lo studio degli effetti tossici causati dall'amianto alla cellula eucariota. Il modello fungino avrebbe il vantaggio di poter studiare gli effetti delle fibre mantenendole separate dalle cellule, ossia eliminando le variabili dovute ai danni meccanici e alla fagocitosi, e privilegiando i meccanismi chimici correlati con la presenza e la biodisponibilità del ferro sulle fibre.



## Capitolo 6

### Conclusioni e prospettive

#### Résumé

Un des principaux problèmes posés par les fibres d'amiante dans le sol est la révalorisation (*remediation*) des sites, car les contaminants ne sont ni dégradés ni éliminés.

Les expériences présentées dans cette thèse montrent la capacité des champignons à interagir avec les fibres d'amiantes et à les modifier après seulement 20 jours. Il serait intéressant d'analyser l'altération de l'état redox et de l'état de coordination du fer car il s'agit de facteurs déterminants pour la réactivité du fer.

Nous avons montré que les fibres ainsi modifiées causent moins de dommages à l'ADN *in vitro*, toutefois nous n'avons pas trouvé de correspondance directe entre les analyses sur l'ADN *in vitro* et *in vivo*. D'autres expériences suggèrent que l'extraction du fer des fibres pourrait se prolonger jusqu'à ce qu'il reste du fer à disposition, ainsi modifiant ultérieurement les fibres.

Les modifications *in vitro* et l'activité *bioweathering* des champignons dans le sol, permet de spéculer sur leur possible efficacité sur l'amiante minéral dans le sol, même s'il n'a pas été réalisé d'essais en champs. Ces expériences permettraient d'étudier la capacité des champignons, déjà testée *in vitro*, d'interagir dans la nature avec le minéral dans un système non stéril, affecté par les facteurs climatiques et par la présence d'autres micro-organismes.

L'identification et l'isolement de champignons provenant de sites ophiolites contribuent à la caractérisation écologique de ces sites importants. Cela permet aussi d'identifier des souches fongiques résistantes aux métaux, ce qui est intéressant pour le développement de stratégies de *bioremediation*.

Les réponses métaboliques des champignons au stress oxydant généré par les fibres semblent utiliser des mécanismes moléculaires similaires aux cellules des mammifères. Cela permet de proposer les champignons comme organismes modèles pour les études et la comparaison des effets des différentes fibres. Par exemple, les champignons n'ont pas de phagocytose ce qui permettrait d'étudier différenciellement les mécanismes de stress liés à la forme des fibres et aux stress due à la réactivité et mobilisation du fer. Enfin, les champignons, de part les caractéristiques de leurs génomes, sont aussi des modèles plus simples que les cellules des mammifères pour étudier les altérations induites par l'exposition à l'amiante.

Questo lavoro di tesi è inserito in un più ampio progetto di studio attraverso il quale si vogliono affrontare i molteplici aspetti del problema ambientale derivanti dalla presenza di amianto nei suoli.

Uno di questi aspetti è la bonifica, resa complessa dalla tipologia del contaminante che, essendo un minerale, non è degradabile ma non è neanche rimuovibile.

Gli esperimenti condotti hanno dimostrato la capacità dei funghi del suolo di interagire e modificare fibre di amianto. Dopo soli 20 giorni di incubazione con i funghi, la reattività chimica delle fibre è modificata. Tale modificazione è legata all'estrazione di ferro dalle fibre, e sarà interessante studiare non solo la diminuzione quantitativa del ferro nel minerale, ma anche come il ferro di superficie venga modificato dal punto di vista della coordinazione e dello stato di ossidazione, due fattori che ne determinano la reattività.

A seguito di tali alterazioni, le fibre di asbesto esposte all'azione fungina causano al DNA *in vitro* un danno notevolmente ridotto. Tale risultato non trova corrispondenza negli effetti delle fibre a livello cellulare, ma trattandosi di un sistema estremamente più complesso, potrebbero intervenire fenomeni di regolazione nelle vie di risposta e/o di riparazione del DNA *in vivo*. Inoltre, gli esperimenti condotti suggeriscono che l'estrazione di ioni delle fibre ad opera del fungo, e quindi la loro modificazione, potrebbe essere protratta nel tempo, probabilmente fino all'estrazione di tutti gli ioni biodisponibili, portando forse all'ulteriore inattivazione delle fibre.

Negli esperimenti fino ad ora condotti la struttura delle fibre non sembra essere modificata dal processo di estrazione, anche se un processo di vera disgregazione non si può escludere sul lungo periodo. I funghi contribuiscono infatti al *bioweathering* dei minerali in natura, e quindi è verosimile che essi possano agire analogamente sugli asbesti nelle rocce. Processi di questo genere richiedono però molto tempo e sono difficili da monitorare.

La modificazione delle fibre *in vitro* e le attività di *bioweathering* dei funghi, lasciano intravedere una possibile efficacia anche sugli asbesti nel suolo, sebbene non siano ancora state fatte prove in campo. Tali prove dovrebbero servire a verificare l'efficacia dei funghi già testati *in vitro*, anche in relazione all'influenza dell'ambiente esterno, per esempio le interazioni con gli altri microrganismi del suolo, ma anche fattori quali umidità, temperatura e disponibilità di nutrienti. Si tratta quindi di una prospettiva non immediata, ma, alla luce dello sviluppo delle tecnologie per la *bioremediation*, possibile. Più immediato potrebbe essere l'allestimento di prove di estrazione di ioni dalle fibre in un sistema pilota tipo "microcosmo", in cui i funghi siano fatti crescere in sabbia o terriccio, in condizioni non sterili, sebbene in un sistema chiuso e controllabile.

Le molecole chelanti che mediano l'attività fungina non sono ancora state identificate, così come non si conoscono i relativi meccanismi di regolazione. Lo studio di questo aspetto potrebbe fornire dati utili a chiarire i meccanismi di interazione con i minerali, nonché eventuali meccanismi di resistenza/tolleranza dei funghi all'ambiente ossidante generato dalle fibre di amianto. Inoltre, i chelanti prodotti dai funghi, che sembrano essere molto efficienti, potrebbero essere purificati e utilizzati come tali, in qualsiasi processo che richieda l'estrazione di ioni da una matrice (per esempio: bonifica *ex-situ* di suoli o di materiali contenenti metalli).

Le risposte fungine allo stress ossidativo generato dalle fibre sono mediate dagli stessi sistemi enzimatici coinvolti nelle risposte cellulari di mammifero. Ciò suggerisce, con le adeguate distinzioni dovute alle differenze tra gli organismi, il possibile utilizzo del modello fungino per lo studio degli effetti indotti dalle diverse fibre. Per esempio, essendo il fungo privo di attività di fagocitosi, tale modello potrebbe permettere di distinguere tra gli effetti dello stress meccanico dovuto alla forma delle fibre e quelli dello stress chimico dovuto alla reattività e alla mobilizzazione del ferro. Inoltre il fungo potrebbe essere un modello più semplice delle cellule di mammifero per lo studio delle alterazioni geniche indotte dall'asbesto. Infatti il genoma di molti funghi è già stato completamente sequenziato, e per molti modelli esistono sistemi efficaci di trasformazione che permettono lo studio della funzione di specifici geni. Inoltre il genoma fungino è generalmente aploide, una situazione che facilita grandemente lo studio di mutazioni genetiche.

Infine, gli isolamenti di funghi da suoli serpentinitici contribuiscono alla descrizione delle caratteristiche di tali ambienti, considerati particolarmente interessanti dal punto di vista ecologico. Il ritrovamento di *V. leptobactrum* costituisce una novità, anche perché all'abbondanza nei suoli corrisponde una elevata capacità di interazione con i minerali nonché l'espressione di reazioni di difesa che potrebbero essere sintomo della tolleranza sviluppata al substrato di crescita.

## Capitolo 7

### Bibliografia

- Adachi S., Yoshida S., Kawamura K., Takahashi M., Uchida H., Odagiri Y. and Takemoto K. (1994), Induction of oxidative DNA damage and mesothelioma by crocidolite, with special reference to the presence of iron inside and outside of asbestos fiber. *Carcinogenesis*, **15**(4), 753-758.
- Adjimani J.P. and Emery T. (1987) Iron uptake in *Mycelia sterilia* EP-76. *Journal of Bacteriology*, **169**, 3664–3668.
- Adriano D.C., Bollag J.M., Frankenberger W.T. and Simes R.C. (1999). *Bioremediation of contaminated soil*. Agronomy Monograph 37, American Society of Agronomy, Crop Science of America, Soil Science Society of America.
- Agathos S.N. (2005) *Bioaugmentation as a strategy for in situ bioremediation*. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School “Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites”. Soil Remediation Series, **5**, 293-300.
- Albrecht C., Borm P.J. and Unfried K. (2004) Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutation Research*, **553**, 23-35.
- Albrecht-Gary A.M. & Crumbliss A. L. (1998) Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. In Sigel A. & Sigel H. ed. *Metal Ions in Biological Systems – Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants and Animals*, 239–327. Marcel Dekker, New York.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. (1997) “BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”. *Nucleic Acid Research*, **25**, 3389-3402.
- Anderson J.V. and Davis D.G. (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum*, **120**, 421-433.
- Angelova M.B., Pashova S.B., Spasova B.K., Vassilev S.V. and Slokoska L.S. (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research*, **109**, 150-158.
- Antibus R.K., Bower D. Dighton. (1997) Root surface phosphatase activities and uptake of P-32-labelled inositol phosphate in field-collected gray birch and red maple roots. *Mycorrhiza*, **7**, 39-46.
- Ariño X., Ortega-Calvo J.J., Gomez-Bolea A. and Saiz-Jimenez C. (1995) Lichen colonization of the Roman pavement at Baelo Claudia (Cadiz, Spain): biodeterioration vs. bioprotection. *Science of Total Environment*, **167**, 353-363.
- Arnott H.J. (1995). Calcium oxalate in fungi. In: Khan S.R. ed. *Calcium Oxalate in Biological Systems*, 73-111. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Ascaso C. and Galvan J. (1976) Studies on the pedogenetic action of lichen acids. *Pedobiologia*, **16**, 321-331.
- Atlas R.M. and Bartha R. (1998) *Microbial Ecology*. Benjamin Cummings ed. Redwood City, California, USA.
- Atlas R.M., "Microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective", *Microbiological Review*, **45**, 1981.
- Aust A.E. e Eveleigh J.F. (1999) Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM*, **222**, 246-252.
- Aust A.E. e Lund L.G. (1991) Iron mobilization from crocidolite results in enhanced iron-catalyzed oxygen consumption and hydroxyl radical generation in the presence of cysteine. In: Brown R.C., Hoskins J.A. e Johnson N.F. eds. *Mechanism in fibre carcinogenesis*. NATO ASI Series Plenum press, New York.
- Baker A.J.M., Proctor J. and Reeves R.D. (1992) *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. Intercept, Andover Hampshire, 509 pp.
- Baker K.H. (1994) Bioremediation of surface and subsurface soils. *Bioremediation*. Mc Graw-Hill, Inc. New York.
- Banfield J.P. and Nealson K.H., editors (1998) *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals. Reviews in Mineralogy*, **35**. Mineralogical Society of America, Washington D.C.
- Banfield J.P., Barker W.W., Welch S.A. and Tauton A. (1999) Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**, 3404-3411.
- Baris Y.I., Artvinli M. and Sahin A. (1979) Environmental mesothelioma in Turkey. *Annales of New York Academical Science*, **330**, 91–116.
- Barker W.W. and Banfield J.F. (1996) Biologically versus inorganically mediated weathering reactions: relationships between minerals and extracellular microbial polymers in lithobiotic communities. *Chemical Geology*, **132**, 55-69

- Barker W.W., Welch S.A. and Banfield J.F. (1997). Biogeochemical weathering of silicate minerals. In: J.F. Banfield, K.H. Nealson, editors. *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals. Reviews in Mineralogy*, **35**, p 391-428. Mineralogical Society of America. Washington DC, USA.
- Bartsch H. and Jagadeesan N. (2004) Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention* **28**, 385-391.
- Beauchamp C.O. and Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**, 276-287.
- Bell A.A., Wheeler M.H. (1986) Biosynthesis and function of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, **24**, 411-451.
- Belluso E., Ferraris G., Alberico A. (1997) *Amianto, la componente ambientale: dove, quali e come sono gli amianti nelle Alpi occidentali? da L'amianto: dall'ambiente di lavoro all'ambiente di vita. Nuovi indicatori per futuri effetti*. A cura di C. Minoia, G. Scansetti, G. Piolatto, A. Massola. Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia. I Documenti 12.
- Bengston S. editor (1994) *Early Life on Earth*. Columbia University Press, New York.
- Bennet P.C., Hiebert F.K. and Rogers J.R. (2000) Microbial control of mineral-groundwater equilibria: macroscale to microscale. *Hydrogeology Journal*, **8**, 47-62.
- Berger M., de Hazen M., Nejjari A., Fournier J., Guignard J., Pezerat H. and Cadet, J. (1993) Radical oxidation reactions of the purine moiety of 2'-deoxyribonucleosides and DNA by iron-containing minerals. *Carcinogenesis*, **14**, 41-46.
- Bernstein D.M., Chevalier J. and Smith P. (2005) Comparison of Calidria Chrysotile Asbestos to Pure Tremolite: Final Results of the Inhalation Biopersistence and Histopathology Examination Following Short-Term Exposure. *Inhalation Toxicology*, **17**, 427-449.
- Berry G, Newhouse ML, Wagner JC. Mortality from all cancers of asbestos factory workers in east London 1933-80. *Occup Environ Med* 57:782-785, 2000.
- Bidartondo M.I. and Gardes M. (2005). Fungal diversity in molecular terms: profiling, identification, and quantification in the environment. In: J. Dighton, J.F. White and P. Oudemans eds. *The Fungal Community*, 3rd edition, 215-239.
- Bird A., Evans-Galea M.V., Blankman E., Zhao H., Lou H., Winge D.R. and Eide D.J. (2000). Mapping the DNA binding domain of the Zap1 zinc-responsive transcriptional activator. *Journal of biological chemistry*, **275**, 16160-16166.
- Bogomolova E.V., Vlasov D.Yu. and Panina L.K. (1998) On the nature of the microcolonial morphology of epilithic black yeasts *Phaeococcomyces* de Hoog. *Doklady of Russian Academy of Science*, **363**, 707-709.
- Botha J.L., Irwig L.M. and Strebel P.M. (1986) Excess mortality from stomach cancer, lung cancer and asbestosis and/or mesothelioma in crocidolite mining districts in South Africa. *American Journal of Epidemiology*, **123**, 30-40.
- Bowes D.R. and Farrow C.M. (1997) Major and Trace Element Compositions of the UICC Standard Asbestos Samples. *American journal of industrial medicine*, **32**, 592-594.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brock T.D., Madigan M.D., Martinko J.M. and Parker J. (1995) *Microbiologia*, CittàStudiEdizioni, Milan, Italy.
- Brooks R.R. (1987) *Serpentine and its Vegetation*. Croom Helm, London and Sydney.
- Burford E.P., Fomina M. and Gadd G.M. (2003) Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineralogical Magazine*, **67**, 1127-1155.
- Burford E.P., Kierans M. and Gadd G.M. (2003a) Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist*, **17**, 98-107.
- Burgstaller W. and Shinner F. (1993) Leaching of metals with fungi. *Journal of Biotechnology*, **27**, 91-116.
- Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, **424**, 9-21.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D. and Ravanat J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*, **531**, 5-23.
- Calvente V., Benuzzi, D. and de Tosetti, M.I.S. (1999) Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration and Biodegradation* **43**, 167-172.
- Carnevale F. and Chellini E. 1992. *Amianto. Miracoli, virtù, vizi*, Editoriale Tosca, Firenze 1992.
- Carter A.B., Tephly L.A., Venkataraman S., Oberley L.W., Zhang Y., Buettner G.R., Spitz D.R. and Hunninghake G.W. (2004) High Levels of Catalase and Glutathione Peroxidase Activity Dampen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling in Human Alveolar Macrophages. *American Journal of Respiratory and Cellular Molecular Biology*. **31**, 43-53.
- Casarin V., Plassard C., Souche G. and Arvieu J.C. (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie*, **23**, 461-469.
- Chalot M. and Brun A. (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**, 21-44.

- Chao C.C., Aust A.E. (1994) Effect of long term removal of iron from Asbestos by desferrioxamine B on subsequent mobilization by other chelators and induction of DNA single strand breaks. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **308**, 64-69.
- Chao C.C., Park S.H., Aust A.E. (1996) Participation of Nitric Oxide and Iron in the Oxidation of DNA in Asbestos-Treated Human Lung Epithelial Cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, **326**, 152-157.
- Chen J., Blume H.P. and Beyer L. (2000) Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review. *Catena*, **39**, 121-46.
- Churg A. (1994) Deposition and clearance of chrysotile asbestos. *Annales in Occupational Hygiene*, **38**, 625-633.
- Churg A. (1996) The Uptake of Mineral Particles by Pulmonary Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **154**, 1124-1140.
- Churg A., Wright J.L., DePaoli L. e Wiggs B. (1989) Mineralogic correlates of fibrosis in chrysotile miners and millers. *American Reviews in Respiratory Disease*, **139**, 891-896.
- Churg A., Wright J.L., Wiggs B. e DePaoli L. (1990) Mineralogic parameters related to amosite-asbestos induced fibrosis in man. *American Reviews in Respiratory Disease*, **142**, 1331-1336.
- Churg A.M. and Warnock M.L. (1981) Asbestos and others ferrous bodies, their formation and clinical significance. *American Journal of Pathology*, **102**, 447-456.
- Crema G.C., Dal Piaz G.V., Merlo C. and Zanella E. (1971). Note illustrative della carta geologica d'Italia alla scala 1:100000. Fogli 78, 79 e 90 Argentera-Dronero-Demonte. Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato, Direzione Generale delle Miniere. Servizio Geologico D'Italia.
- Daffonchio D. (2005) Molecular tools to track complex microbial population in polluted environments and during reclamation. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School "Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites". *Soil Remediation Series*, **5**, 173-187.
- Daghino S., Martino E., Fenoglio I., Tomatis M., Perotto S. and Fubini B. (2005) Inorganic materials and living organisms: surface modifications and fungal responses to various asbestos forms. *Chemistry, a european journal*, **11**, 5611-5618.
- Davies M.J. (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1703**, 93-109.
- Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis-II: method and application to human serum proteins. *Annals N.Y. of Academy Science*, **121**, 404-427.
- Davis J.M. (1996) Mixed fibrous and non-fibrous dust exposures and interactions between agents in fibre carcinogenesis. In: *Mechanisms of Fibre Carcinogenesis* (Kane AB, Boffetta P, Saracci R, Wilbourn JD, eds). **140**, 127-135. International Agency for Research on Cancer Sci Publ, Lyon.
- Davis J.M.G., Addison J., Bolton R.E., Donaldson K., Jones A.D. and Smith T. (1986) The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and by peritoneal injection. *Journal of Experimental Pathology*, **67**, 415-430.
- Deacon J.W. (2000) *Micologia moderna*. Ed. Calderini Edagricole.
- Decho A.W. (2000) Exopolymer microdomains as a structuring agent for heterogeneity within microbial biofilms. In: Riding R.E and Awramik S.M. eds. *Microbial Sediments*, 9-15, Springer, Berlin.
- Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malonaldehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, **15**, 316-328.
- Demnerova K., Mackova M., Macek T., Lovecka P. (2005) Integrated microbial and plant systems in the rhizosphere bioremediation. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School "Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites". *Soil Remediation Series*, **5**, 161-170.
- Dhungana S. and Crumbliss A.L. (2005) Coordination chemistry and redox processes in siderophore-mediated iron transport. *Geomicrobiology journal*, **22**, 87-98.
- Diels L., Geets J., Van Roy S., Dejonghe W., Gemoets J. and Vanbroekhoven K. (2005) Bioremediation of heavy metal contaminated sites. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School "Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites". *Soil Remediation Series*, **5**, 323-338.
- Domsch K.H., Gams W. and Anderson T.H. (1980) *Compendium of soil fungi*. London, Academic Press.
- Donald A.M. (2003) The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials. *Nature materials*, **2**.
- D'Orsi F., Marconi A. and Renna E. (1995) La Bonifica delle coperture in Amianto-Cemento. BE-MA Editrice.
- Drechsel H., Metzger J., Freund S., Jung G., Boelaert J., Winkelman G. (1991). Rhizoferrin- a novel siderophore from the fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Biology of metals*, **4**, 238-243.
- Dutton M.V. and Evans C.S. (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**, 881-95.
- Easton R.M. (1997) Lichen-rock mineral interactions: an overview. In: McIntosh J.M. and Groat L.A. eds. *Biological-Mineralogical Interactions*. Short Course Series, **21**, 209-239 Mineralogical Association of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- Ehrlich H.L. (1996) *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York.

- Ehrlich H.L. (1996a) How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*, **132**, 5-9.
- Ehrlich H.L. (1998) Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews*, **45**, 45-60.
- Etienne S. (2002) The role of biological weathering in periglacial areas, a study of weathering in south Iceland. *Geomorphology*, **47**, 75-86.
- Evans M.D., Didzaroglu M., Cooke M.S. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, **567**, 1-61.
- Faux S.P., Howden P.J. and Levy L.S. (1994) Iron-dependent formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA and mutagenicity in Salmonella typhirium TA102 induced by crocidolite. *Carcinogenesis*, **15**, 1749-1751.
- Fava G., Pasqualini E. and Sani D. (1999) *Misure di permeabilità elettrosmotica in laboratorio*, XX Convegno nazionale di Geotecnica. Parma.
- Fava G., Ruello M.L. and Sani D. (2002) *Effetto di contaminanti organici sulla permeabilità elettrosmotica di matrici argillose*, VI Convegno Nazionale AIMAT, Modena.
- Favero-Longo S.E., Fubini B. and Piervittori R. (2004) Analisi della componente lichenica rupicola presente sulle serpentiniti asbestifere della ex-miniera di amianto di Balangero e Corio (Valli di Lanzo, Torino). *Notiziario della Società Lichenologica Italiana*, **17**, 69-70.
- Favero-Longo S.E., Turci F., Tomatis M., Castelli D., Bonfante P., Hochella M.F., Piervittori R. and Fubini B. (2005) Chrysotile Asbestos Is Progressively Converted into a Non-Fibrous Amorphous Material by the Chelating Action of Lichen Metabolites. *Journal of Environmental Monitoring* **7**, 764-766.
- Fenoglio I., Prandi L., Tomatis M., Fubini B. (2001) Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica. *Redox Report*, **6**, 235-241.
- Floyd R.A., West M.S., Eneff K.L., Schneider J.E., Wong P.K., Tingey D.T. and Hogsett W.E. (1990) Conditions influencing yield and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA. *Analytical Biochemistry*, **188**, 155-158.
- Fournier J., Guignard J., Nejjari A., Zalma R. and Pezerat H. (1991) Brown R.C., Hoskins J.A., Johnson N.F., eds, In: *Mechanism in Fibre Carcinogenesis*, 407-414, Plenum Press, New York.
- Francis C.A., Obraztsova A.Y. and Tebo B.M. (2000) Dissimilatory Metal Reduction by the Facultative Anaerobe *Pantoea Agglomerans* Sp1. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 543-548.
- Freitas H., Prasad M.N.V., and Pratas J. (2003) Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation—relevance to the management of mine environment. *Chemosphere*, **54**, 1625-1642.
- Friedman E.I. and Ocampo R. (1976) Endolithic blue-green algae in the dry valleys: primary producers in the Antarctic desert ecosystem. *Science*, **193**, 1247-1249.
- Fubini B. (1997) Surface Reactivity in the Pathogenic Response to Particulates. *Environmental Health Perspectives*, **105**, 1013-1020.
- Fubini B. (1997b) Ruolo della chimica di superficie nella patogenicità degli amianti in *L'amianto nell'ambiente di lavoro e nell'ambiente di vita. Nuovi indicatori per futuri effetti*. Minoia C., Scansetti G., Piolatto G. and Massola A. eds., 239-248. Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia.
- Fubini B. (2000a) *Recenti sviluppi della "questione amianti" in Italia*. L'ateneo, **1**, 25-28.
- Fubini B. and Mollo L. (1995) Role of iron in the reactivity of mineral fibers. *Toxicology Letters*, **82/83**, 951-960.
- Fubini B., Bolis V., A. Cavenago and Volante M. (1995a) Physico-chemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses. *Scandinavian Journal of Work Environmen and Health*, **21**, 9-15.
- Fubini B., Mollo L. e Giamello E. (1995b) Free Radical generation at the solid liquid interface in iron containing minerals. *Free Radical Research* **23**, 593-614.
- Fubini B., Otero-Arèan C., (1999) Chemical aspects of the toxicity of inhaled mineral dusts. *Chemical Society Reviews*, **28**, 373-381.
- Fubini B., Struttura e tossicità dei materiali solidi (2000b) cap. 3 In: *Tossicologia molecolare e cellulare* coordinato da Cantelli-Forti G., Galli C.L., Irelia P. and Marinovich M. in *Trattato di Farmacologia e Terapia* Paoletti R., Clementi F., Fumagalli G. and Nicosia S., UTET 2000, 24-40.
- Fubini B., Volante M., Giamello E., Bolis V. (1993) The role of surface chemistry in the pathogenicity of mineral dust and fibres: some open question; in: *Proceedings of the Eight international conference on occupational lung diseases*, **3**, 1180-1185. Hurich J., Leasage M. and David A. eds., ILO, Geneva, Switzerland.
- Gadd G.M. (1993) Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, **124**, 25-60.
- Gadd G.M. (1999) Fungal production of citric acid and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Advances in Microbial Physiology*, **41**, 47-92.
- Gadd G.M. (2000a) Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. In: Lederberg J. ed. *Encyclopedia of Microbiology*, 607-617. Academic Press, New York.
- Gadd G.M. (2000b). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion of Biotechnology*, **11**, 271-279.

- Gadd G.M. (2001a) Metal transformations. In: Gadd G.M. ed. *Fungi in bioremediation*, 359-382. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gadd G.M. (2001b) Accumulation and transformation of metals by microorganisms. In: Rehem H.J., Reed G., Puhler A. and Stadler P. eds. *Biotechnology, a Multi-volume Comprehensive Treatise*, **10**, 225-264. Wiley-VHC GmbH, Weinheim, Germany.
- Gadd G.M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, **122**, 109-119.
- Gadd G.M. and Sayer J.A. (2000) Fungal transformation of metals and metalloids. In: Lovley D.R. ed. *Environmental Microbe-Metal Interactions*, 237-256. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Gadd G.M. and White C. (1989). Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeast. In: Metal-microbe interactions, 19-38. Poole R.K, Gadd G.M. eds. Oxford, IRL Press.
- Gams W. (1971). *Cephalosporium*-artige Hyphomyceten. G. Fisher, Stuttgart.
- Gams W. and Zare R. (2001) A Revision of *Verticillium* Sect. *Prostrata*. III. Generic Classification. *Nova Hedvigia*, **72**, 329-337.
- Gazzano E., Foresti E., Lesci I.G., Tomatis M., Riganti C., Fubini B., Roveri N. and Ghigo D. (2005) Different Cellular Responses Evoked by Natural and Stoichiometric Synthetic Chrysotile Asbestos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**, 356-364.
- Ghio A.J., Thomas P.K., Whorton A.R., Crumbliss A.L., Hatch G.E. and Hoidal J.R. (1992b) Role of surface complexed iron in oxidant generation and lung inflammation induced by silicates. *Lung Cellular and Molecular Physiology*, **7**, L511-L518.
- Ghio A.J., Zhang J., Piantadosi C.A. (1992) Generation of hydroxyl radical by crocidolite asbestos is proportional to surface [Fe<sup>3+</sup>]. *Archives of biochemistry and biophysics*, **298**, 646-650.
- Gilmour P.S., Beswick P.H., Brown D.M., Donaldson K. (1995) Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled ΦX174 RF1 plasmid DNA. *Carcinogenesis*, **16**, 2973-2979.
- Girlanda M., Perotto S., Moenne-Loccoz Y., Bergero R., Lazzari A., Defago G., Bonfante P. and Luppi A.M. (2001) Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative of culturable fungi in the *Cucumber* rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1851-1864.
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perroti M., Boucheriei H., Toledano M.B. and Labarre J. (1998) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 22480-22489.
- Gold J., Amandusson H., Krozer A., Kasemo B., Ericsson T., Zanetti G. and Fubini B. (1997) Chemical characterization and reactivity of iron chelator-treated amphibole asbestos. *Environmental Health Perspectives*, **105**, 1021-1030.
- Gorbushina A.A. and Krumbein W.E. (2000) Subaerial microbial mats and their effects on soil and rock. Riding R.E. and Awramik S.M., eds. In: *Microbial Sediments*, 161-169. Springer, Berlin.
- Goudie A.S. (1996) Organic agency in calcrete development. *Journal of Arid Environments*, **32**, 103-110.
- Governa M., Amati M., Valentino M., Visona I., Fubini B., Botta G.C., Volpe A.R. and Carmignani M. (2000) *In vitro* cleavage by asbestos fibers of the fifth component of human complement through free-radical generation and kallikrein activation. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **59**, 539-552.
- Gruiz K., (2005) Soil testing triad and the interactive ecotoxicity tests for contaminated soil. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School "Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites". *Soil Remediation Series*, **5**, 47-70.
- Gu J.D., Ford T.E., Berke N.S. and Mitchell R. (1998) Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **41**, 101-109.
- Guan L., and Scandalios J.G. (1996) Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. *Journal of Molecular Evolution*, **42**, 570-579.
- Gulumian M. and Kilroe-Smith T.A. (1987) Crocidolite-induced lipid peroxidation in rat lung microsomes. *Environmental Research*, **43**, 267-273.
- Guthrie G.D. (1997) Mineral Properties and Their Contributions to Particle Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, **105**, 1003-1011.
- Haas H. (2003) Molecular Genetics of Fungal Siderophore Biosynthesis and Uptake: The Role of Siderophores in Iron Uptake and Storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **62**, 316-330.
- Hardy J.A., Aust A.E. (1995b) The effect of iron binding on the ability of crocidolite asbestos to catalyze DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis*, **16**, 319-325.
- Hardy J.A., Aust A.E. (1995) Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chemical Reviews*, **95**, 97-118.
- Haselwandter K. (1995) Mycorrhizal fungi: siderophore production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **15**, 287-91.
- Heckman D.S., Geiger D.M., Eisell B.R., Stauffer R.L., Kardos N.L. and Hedges S.B. (2001) Molecular evidence for the early colonisation of land by fungi and plants. *Science*, **293**, 1129-1133.
- Helbock H.J., Beckman K.B. and Ames B.N. (1999) 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in Enzymology*, **300**, 156-166.

- Henderson M.E.K. and Duff R.B. (1963) The release of metallic and silicate ions from minerals, rock and soils by fungal activity. *Journal of soil science*, **14**, 236-246.
- Henrion B., Letacon F., Martin F. (1992) Rapid identification of genetic-variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist*, **122**, 289-298.
- Hesterberg T.W., Ririe D.G., Barrett J.C. and Nettesheim P. (1987) Mechanisms of cytotoxicity of asbestos fibres in rat tracheal epithelial cells in cultures, *Toxicology, In Vitro*, **1**, 59-65.
- Hider R. (1984) Siderophore mediated absorption of iron. *Structure and Bonding*, **58**, 25-87.
- Hochella M.F. (2002) Sustaining Earth: thoughts on the present and the future roles of mineralogy in environmental science. *Mineralogical Magazine*, **66**, 627-652.
- Hoffland E., Giesler R., Jongmans T. and van Breemen N. (2002) Increasing feldspar tunnelling by fungi across a north Sweden podzol chronosequence. *Ecosystems*, **5**, 11-22.
- Hoffland E., Kuyper T.W., Wallander H., Plassard C., Gorbushina A.A., Haselwandter K., Holmström S., Landeweert R., Lundström U.S., Rosling A., Sen R., Smits M.M., van Hees P.A.W., van Breemen N. (2004) The role of fungi in weathering. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **2**, 258-264.
- Horre R. and de Hoog G.S. (1999) Primary cerebral infection by melanized fungi: a review. *Studies in Mycology*, **43**, 176-193.
- Howard R.J., Ferrari M.A., Roach D.H. and Money N.P. (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **88**, 11281-11284.
- Howoritz N.H., Cameron R.E. and Hubbard J.S. (1972) Microbiology of the dry valley of Antarctica: studies in the world's coldest and driest desert have implication for the Mars biological program. *Science*, **176**, 242-245.
- <http://www.arpa.piemonte.it/>  
<http://www.cbs.knaw.nl/nccb/>  
<http://www.frtr.gov/index.htm>
- Hughes M.N. and Poole R.K. (1989). *Metals and Microorganisms*. Chapman and Hall. London.
- IARC (International Agency Research on Cancer) (1987) *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*. Supplement 7. IARC. Lyon. France.
- Jacobs H., Boswell G.P., Ritz K., Davidson F.A. and Gadd G.M. (2002a) Solubilization of calcium phosphate as a consequence of calcium translocation by *Rhizoglyphus solani*. *Mycological Research*, **106**, 1468-1479.
- Jain N. and Sharma D.K. (2004). Biohydrometallurgy for nonsulfidic minerals – A review. *Geomicrobiology Journal*, **21**, 135-144.
- Jaurand M.C. (1997) Mechanism of fiber-induced genotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, **105**, 1073-1084.
- Jaurand, M.C., Gaudichet A., Halpern S. and Bignon J. (1984) *In vitro* biodegradation of chrysotile fibres by alveolar macrophages and mesothelial cells in culture: comparison with a pH effect. *British Journal Industrial Medicine*, **41**, 389-395.
- Javor B., ed. (1989) Yeast and Fungi. In: *Hypersaline Environments: Microbiology and Biochemistry*. 163-175. Springer, Berlin.
- Jones L.D. (1998) Organic acids in the rizosphere – a critical review. *Plant Soil*, **205**, 25-44.
- Jourd'heuil D., Kang D. and Grisham M. (1997) Interaction between superoxide and nitric oxide: implication in DNA damage and mutagenesis. *Frontiers in Bioscience*, **2**, d189-196.
- Kalogerakis N. (2005) Innovative slurry-phase and solid-phase technologies for soil bioremediation. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School "Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites". *Soil Remediation Series*, **5**, 161-170.
- Kamp D.W. and Weitzman S.A. (1999) The molecular basis of asbestos induced lung injury, *Thorax*, **54**, 638-652.
- Kamp D.W., Graceffa P., Pryor W.A., Weitzman S.A. (1992) The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radicals Biology and Medicine*, **12**, 293-315.
- Kim H.N., Morimoto Y., Tsuda T., Ootsuyama Y., Hirohashi M., Hirano T., Tanaka I., Lim Y., Yun I.G. and Kasai H. (2001) Changes in DNA 8-hydroxyguanine levels, 8-hydroxyguanine repair activity, and hOGG1 and hMTH1 mRNA expression in human lung alveolar epithelial cells induced by crocidolite asbestos. *Carcinogenesis*, **22**, 265-269.
- Kinnula V.L. (1999) Oxidant and antioxidant mechanisms of lung disease caused by asbestos fibres *European Respiratory Journal*, **14**, 706-716.
- Kiss T. and Farkas E. (1998) Metal-binding ability of desferrioxamine B. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, **32**, 385-403.
- Kumar R. and Kumar A.W. (1999) Biodeterioration of Stone in Tropical Environments: an Overview. The J. Paul Getty Trust, USA.
- Kurek E., Francis A.J., Bollag J.M. (1991) Immobilization of cadmium by microbial extracellular products. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **20**, 106-111.

- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **222**, 680-685.
- Landeweert R., Hoffland E., Finlay R.D, Kuyper T.W. and van Breemen N. (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 248-254.
- Lapeyrie F., Ranger J., and Varelles D. (1991) Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Canadian Journal of Botany*, **69**, 342-46.
- Lesuisse E., Simon-Casteras M. and Labbe P. (1998) Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology*, **144**: 3455–3462.
- Liu X., Keane M.J., Harrison J.C., Cilento E.V., Ong T. and Wallace W.E. (1998) Phospholipid surfactant adsorption by respirable quartz and *in vitro* expression of cytotoxicity and DNA damage. *Toxicology Letters* **96-97**, 77-84.
- Loibner A.P., Aichberger H., Todorovic D. and Braun R. (2005) Bioventing – an efficient *in situ* technology for remediating the vadose zone. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School “Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites”. *Soil Remediation Series*, **5**, 303-310.
- Lovley D.R. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews, Microbiology*, **1**, 35-44.
- Lovley D.R., Holmes D.E. and Nevin K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology*, **49**, 219-286.
- Lund L.G, Aust A.E. (1990) Iron mobilization from asbestos by chelators and ascorbic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **278**, 60-64.
- Lund L.G. and Aust A.E. (1992) Iron mobilization from crocidolite asbestos greatly enhances crocidolite-dependent formation of DNA single-strand breaks in  $\Phi$  X174 RFI DNA. *Carcinogenesis*, **13**, 637-642.
- Lund L.G., Williams M.G., Dodson R.F. and Aust A.E. (1994) Iron associated with asbestos bodies is responsible for the formation of single-strand breaks in PHI-X174-RFI DNA. *Occupational and environmental medicine*, **51**, 200-204.
- Luo S., Liu X., Tsai S.P. and Wen C.P. (2003) Asbestos related diseases from environmental exposure to crocidolite in Da-yao, China. I. Review of exposure and epidemiological data. *Occupational Environmental Medicine*, **60**, 35-42.
- Machuca A. and Milagres A.M.F. (2003) Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in applied microbiology*, **36**, 177-181.
- Marnett L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, **424**, 83-95.
- Martino E., Cerminara S., Prandi L., Fubini B. and Perotto S. (2004) Physical and biochemical interactions of soil fungi with asbestos fibers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **23**, 938-944.
- Martino E., Franco B., Piccoli G., Stocchi V. and Perotto S., (2002) Influence of zinc ions on protein secretion in a heavy metal tolerant strain of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **231**, 179-185.
- Martino E., Perotto S., Parsons R. and Gadd G.M. (2003a) Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 133-141.
- Martino E., Prandi L., Fenoglio I., Bonfante P., Perotto S. and Fubini B. (2003) Soil fungal hyphae bind and attack asbestos fibers. *Angewandte Chemie. –International Edition*, **42**, 219-222.
- Martra G., Tomatis M., Fenoglio I., Coluccia S., Fubini B. (2003) Ascorbic acid modifies the surface of asbestos: Possible implications in the molecular mechanisms of toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, **16**, 328-335.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410.
- Mollo L., Merlo E., Giamello E., Volante M., Bolis V., Fubini B. (1994) Effect of chelators on the surface properties of asbestos. Davis J.M.G. and Jaurand M.C. eds. In: *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. North Atlantic Treaty Organization Advanced Study Institute Series, **85**, 425-432. Springer-Verlag, Berlin.
- Money N.P. and Howard R.J. (1996) Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetics and Biology*, **20**, 217-227.
- Morley G., Sayer J., Winkilson S., Gharieb M. and Gadd G.M. (1996) Fungal sequestration, solubilization and transformation of toxic metals. Frankland J.C., Magan N. and Gadd G.M., eds. In: *Fungi and Environmental Change*. 235-256. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Mossman B.T. and Churg A. (1998) Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **57**, 1666-1680.
- Mossmann B.T., Surinrut P., Brinton B.T., Marsh J.P., Heitz N.H., Lindau-Shepard B., Shaffer J.B. (1996) Transfection of a manganese-containing superoxide dismutase gene into hamster tracheal epithelial cells ameliorates asbestos-mediated cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, **21**, 125-131.

- Murao S., Gemmell M.A., Callahan M.F., Anderson N.L. and Huberman E. (1983) Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Research*, **43**, 4989-96.
- Neilands J.B. (1995) Siderophores :structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 26723–26726.
- Nejjari A., Fournier J., Pezerat H. and Leanderson P. (1993) Mineral fibres: correlation between the oxidizing surface activity and the DNA base hydroxylation. *British Journal of Industrial Medicine*, **50**, 501-504.
- Nicholson W.J., Perkel G. and Seliko V.I.J. (1982) Occupational exposure to asbestos: population at risk and projected mortality:1980–2030. *American Journal of Industrial Medicine*, **3**, 259–311.
- Niedernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E. and Marnett L.J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 31426- 31433.
- Ollikainen T., Puhakka A., Kahlos K., Linnainmaa K. and Kinnula V.L. (2000) Modulation of Cell and DNA Damage by Poly(Adp)Ribose Polymerase in Lung Cells Exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Asbestos Fibres. *Mutation Research*, **470**, 77-84.
- Pal A., Dutta S., Mukherjee P.K., Paul A.K. (2005a) Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. *Journal of Basic Microbiology*, **45**, 207-218.
- Pal A., Ghosh S. and Paul A.K. (2005b) Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. *Bioresources Technology*. Published on line, Jul 12.
- Park S.H. and Aust A.E. (1998) Regulation of Nitric Oxide Synthase Induction by Iron and Glutathione in Asbestos-Treated Human Lung Epithelial Cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, **360**, 47–52.
- Pezerat H., Zalma R., Guignard J., Jaurand M.C. (1989) Production of oxygen radicals by the reduction of oxygen arising from the surface activity of mineral fibres. *LARC Scientific Publications*, **90**, 100-11.
- Picarella S. (2004) Caratterizzazione molecolare e funzionale di funghi micorrizici ericoidi isolati da un'area serpentinitica, Tesi di Laurea.
- Piervittori R. and Siniscalco C. eds. (2004) Biodiversità vegetale in ambienti ofiolitici. Atti Workshop, suppl. Revue Valdôtaine d'Histoire Naturelle. Eds. Société de la flore Valdotaïne, **58**, 4-6.
- Pitt J.I. (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press London.
- Plattner H.J. and Dickmann H. (1994) Enzymology of siderophore biosynthesis. In: Winkelmann G. and Winge D.R. eds. *Metal Ions in Fungi* 99–116. Marcel Dekker, New York.
- Poser I., Rahman Q., Lohani M., Yadav S., Becker H.H., Weiss D.G., Schiffmann D. and Dopp E. (2004) Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. *Mutation Research*, **559**, 19-27.
- Pouget J.P., Douki T., Richard M.J., Cadet J. (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiations as measured by HPLC/GC-MS, HPLC-EC and comet assay. *Chemical Research in Toxicology*, **13**, 541-549.
- Prabhu V., Biolchini P.F. and Boyer G.L. (1996) Detection and identification of ferricrocin produced by ectendomycorrhizal fungi in the genus *Wilcoxina*. *Biomaterials*, **9**, 229–234.
- Prandi L. (2002) Reactivity and speciation of metals at the surface of solid xenobiotics. Tesi di dottorato. Università degli studi di Torino.
- Progetto di Massima (1993) Risanamento ambientale della miniera “S. Vittore” nei comuni di Balangero e Corio. Regione Piemonte.
- Puhakka A., Ollikainen T., Soini Y., Kahlos K., Säily M., Koistinen P., Pääkkö P., Linnainmaa K. and Kinnula V.L. (2002) Modulation of DNA single-strand breaks by intracellular glutathione in human lung cells exposed to asbestos fibers *Mutation Research*, **514**, 7-17.
- Putnis A. (2002) Mineral replacement reactions: from macroscopic observation to microscopic mechanisms. *Mineralogical Magazine*, **66**, 689-708.
- Ravanat J.L., Douki T., Duez P., Gremaud E., Herbert K., Hofer T., Lasserre L., Saint-Pierre C., Favier A. and Cadet J. (2002) Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis*, **23**, 1911-1918.
- Rawlings D.E., Dew D., and du Plessis C. (2003) Biomineralization of metal-containing and concentrates. *Trends in Biotechnology*, **21**, 38-44.
- Redman R.S., Litvintseva A., Sheehan K.B., Henson J.M. and Rodriguez R. (1999) Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5193-5197.
- Reeves R.H. (1997) Phylogenetic analysis and implications for subsurface microbiology. In: Amy P.S., Haldeman D.L. eds. *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*. 165–183, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Renaut R.W. and Jones B. (2000) Microbial precipitates around continental hot springs. In: Riding R.E. and Awramik S.M. eds. *Microbial Sediments*, 187-195. Springer, Berlin.

- Renshaw J.C., Robson G.D., Trinci A.P.J., Wiebe M.G., Livens F.R., Collison D. and Taylor R.J. (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research*, **106**, 1123–1142.
- Riganti C., Aldieri E., Bergandi L., Fenoglio I., Costamagna C., Fubini B., Bosia A. and Ghigo D. (2002) Crocidolite Asbestos Inhibits Pentose Phosphate Oxidative Pathway and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Human Lung Epithelial Cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 938-949.
- Riganti C., Aldieri E., Bergandi L., Tomatis M., Fenoglio I., Costamagna C., Fubini B., Bosia A. and Ghigo D. (2003) Long and short fiber amosite asbestos alters at a different extent the redox metabolism in human lung epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **193**, 106-115.
- Rikkinen J. and Poinar G.O. (2001) Fossilised fungal mycelium from Tertiary Dominican amber. *Mycological Research*, **105**, 890-896.
- Roderick J.T., Fattman C.L., Watkins S.C. and Oury T.D. (2004) Redistribution of pulmonary EC-SOD after exposure to asbestos. *Journal of Applied Physiology*, **97**, 2006–2013.
- Rogers A. and Nevill M. (1995) Occupational and environmental mesothelioma due to crocidolite mining activities in Wittenoom, Western Australia. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health*, **21**, 259–64.
- Sacchi G.A., Nocito F.F., Crema B. and Lancilli C. (2005) Plant potential in the field remediation of inorganic and organic pollutants. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School “Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites”. *Soil Remediation Series*, **5**, 147-157.
- Sašek V. (2005) Role of fungi in the remediation of contaminated soil: problems and solutions. In: F. Fava and P. Canepa eds. European Summer School “Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites”. *Soil Remediation Series*, **5**, 47-70.
- Scandalios J.G. (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, **101**, 7-12.
- Scheule R.K. and Holian A. (1989) IgG specifically enhances chrysotile asbestos-stimulated superoxide anion production by the alveolar macrophage. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **1**, 313-318
- Schwyn B. and Neilands J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, **160**, 47-56.
- Shriver D. F. and Atkins P. W. (1999) *Inorganic Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Shukla A., Flanders T., Lounsbury K.M., Mossman B.T. (2004) The  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase and Glutathione Regulate Asbestos-induced Expression of Activator Protein-1 Family Members and Activity. *Cancer Research*, **64**, 7780–7786.
- Shukla A., Ramos-Nino M. and Mossman B.T. (2003) Cell signaling and transcription factor activation by asbestos in lung injury and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**, 1198–1209.
- Singh N.P., Tice R.R., Stephens R.E. and Schneider E.L. (1991) A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research*, **252**, 289-296.
- Skoog D.A, West D.M. (1976) *Fundamentals of Analytical Chemistry*, New York. Holt, Reinhart, and Winston. 786 p.
- Smith S.E. and Read D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd edn), Academic Press.
- Sollas W.J. (1880) *On the action of a lichen on a limestone*. Report, British association for the Advancement of Science, 586 pp.
- Stanton M.F., Layard M., Tegeris A., Miller E., May M., Morgan E. e Smith A. (1981) Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous minerals. *Journal of the National Cancer Institute*, **67**, 965-975.
- Sterflinger K and Krumbein W.E. (1997). Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiology Journal*, **14**, 219–231.
- Sterflinger K. (2000) Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal*, **17**, 97-124.
- Stone A.T. (1997) Reactions of extracellular organic ligands with dissolved metal ions and mineral surface. In: Banfield J.F. and Nealson K.H. eds. *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*, 309-341. Mineralogical Society of America, Washington D.C.
- Takeuchi T. and Morimoto K. (1994) Crocidolite asbestos increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in cellular DNA of a human promyelocytic leukemia cell line, HL60. *Carcinogenesis*, **15**, 635-639.
- Takeuchi T., Nakajima M and Motimoto K. (1999) A human cell system for detecting asbestos cytogenotoxicity *in vitro*. *Mutation Research*, **438**, 63-70.
- Tomatis M., Prandi L., Bodoardo S. and Fubini B. (2002) Loss of Surface Reactivity Upon Heating Amphibole Asbestos. *Langmuir*, **18**, 4345-4350.
- Tournay J.C., Baillif P., Jaurand M.C., Bignon J. and Magne L. (1987) Etude comparative de l'adsorption d'acide déoxyribonucléique sur le chrysotile et le chrysotile phosphorylé (chrysophosphate), *Canadian Journal of Chemistry*, **65**, 508-511.
- Trivedi A.K., Ahmad I., Musthapa M.S., Ansari F.A. and Rahman Q. (2004) Environmental contamination of chrysotile asbestos and its toxic effects on growth and physiological and biochemical parameters of *Lemna gibba*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**, 281-9.

- Turver C.J., Brown R.C. (1987) The role of catalytic iron in asbestos induced lipid peroxidation and DNA-strand breakage in C3H10T1/2 cells. *British Journal of Cancer*, **56**, 133-136.
- U.S. EPA, Draft engineering bulletin: *in situ* vitrification, 1990.
- U.S. EPA, Engineering Bulletin: thermal desorption treatment EPA/540/2-91/008. 1991.
- U.S. EPA, Innovative treatment technologies: overview and guide to information sources, EPA/540/9-91/002, 2000.
- U.S. EPA, Soil Vapor Extraction: Air Permeability Testing and Estimated Methods. EPA/600/9-91/002. 2002.
- Upadhyay D. and Kamp D.W. (2003) Asbestos-induced pulmonary toxicity: role of DNA damage and apoptosis. *Experimental Biology and Medicine*, **228**, 650-659.
- Vala A.K., Vaidya S.Y. and Dube H.C. (2000) Siderophore production by facultative marine fungi. *Indian journal of marine sciences*, **29**, 339-340.
- van Breemen N., Finlay R., Lundsrom U., Jongmans A.G., Giesler R. and Olsson M. (2000) Mycorrhizal weatherin: A true case of mineral plant nutrition? *Biogeochemistry*, **49**, 53-67.
- van der Helm D. and Winkelmann G. (1994) Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. In Winkelmann G. and Winge D.R. ed. *Metal Ions in Fungi*, 39-98. Marcel Dekker, New York.
- Varga C., Horváth G. and Timbrell V. (1996) *In vivo* studies on genotoxicity and cogenotoxicity of ingested UICC anthophyllite asbestos. *Cancer Letters*. **105**, 181-185.
- Vaughan D.J., Patrick R.A.D and Wogelius R.A. (2002) Minerals Metals and Molecules: ore and environmental mineralogy in the new millennium. *Mineralogical Magazine*, **66**, 653-676.
- Verrecchia E.P. (2000) Fungi and Sediments. In: Riding R.E. and Awramik S.M. eds. *Microbial sediments*, 69-75. Springer, Berlin.
- Vido K., Spector D., Lagniel G., Lopez S., Toledano M.B. and Labarre J. (2001) A proteome Analysis of the Cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 9469-8474.
- Warheit D.B., Hartsky M.A. and Frame S.R. (1996) Pulmonary effects in rats inhaling size-separated chrysotile asbestos fibres or p-aramid fibrils: differences in cellular proliferative responses. *Toxicology Letters*. **88**, 287-292.
- Watanabe K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. **12**, 237-241.
- Watteau F. and Berthelin J. (1994) Mineral dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *European Journal of Soil Biology*, **30**, 1-9.
- Watts H.J., Very A.A., Perera T.H.S., Davies J.M. and Gow N.A.R. (1998) Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology*, **144**, 689-695.
- Weinberg E.D. (1999) Iron loading and disease surveillance. *Emerging Infectious Diseases*, **5**, 346-352.
- Weissenhorn I., Leyval C. and Berthelin J. (1993) Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) from heavy metal polluted soils. *Plant Soil*, **157**, 247-256.
- Weitzman S. A., Graceffa P. (1984). Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **228**, 267-274.
- Weitzman S.A. and Weitberg A.B. (1985) Asbestos-catalysed lipid peroxidation and its inhibition by desferroxamine. *Biochemical Journal*, **225**, 259-262.
- Welch K.D., Zane Davis T., Van Eden M.E. e Aust S.D. (2002) Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free radical biology and medicine*, **32**, 577-583.
- Welch S.A., Barker W.W and Banfield J.F. (1999) Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**, 1405-1419.
- Werner A.J., Hochella M.F., Guthrie G.D., Hardy J.A., Aust A.E., Rimstidt J.D. (1995) Asbestiform riebeckite (crocidolite) dissolution in the presence of Fe chelators: implications for mineral-induced disease. *American Mineralogist*, **80**, 1093-1103.
- White I.D., Mottershead D.N. and Harrison S.J. (1992) *Environmental Systems: An introductory Text*. Chapman & Hall, London, UK.
- WHO/EURO Technical Committee for Monitoring and Evaluating Airborne MMMF (1985) Reference Methods for Measuring Airborne Man-made Mineral Fibres (MMMMF), Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe.
- Winkelmann G. (1990) Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. *Biotechnology Advances*, **8**, 207-231.
- Winkelmann G. (1992) Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. *Mycological Research*, **96**, 529-534.
- Winkelmann G. (2002) Microbial siderophores-mediated transport. *Biometals*, Third International Biometals Symposium. 691-696.

Winkelmann G. and Huschka H. (1987) Molecular recognition and transport of siderophores in fungi. In Winkelmann G., van der Helm D. and Neilands J.B. eds. *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*, 317–336. VCH, Weinheim.

Wiseman H. and Halliwell B. (1996) Damage to DNA by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Role in Inflammatory Disease and Progression to Cancer. *Biochemical Journal*, **313**, 17-29.

Xu A., Wu L.J., Santella R.M and Hei T.K. (1999) Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells. *Cancer research*, **59**, 5922-5926.

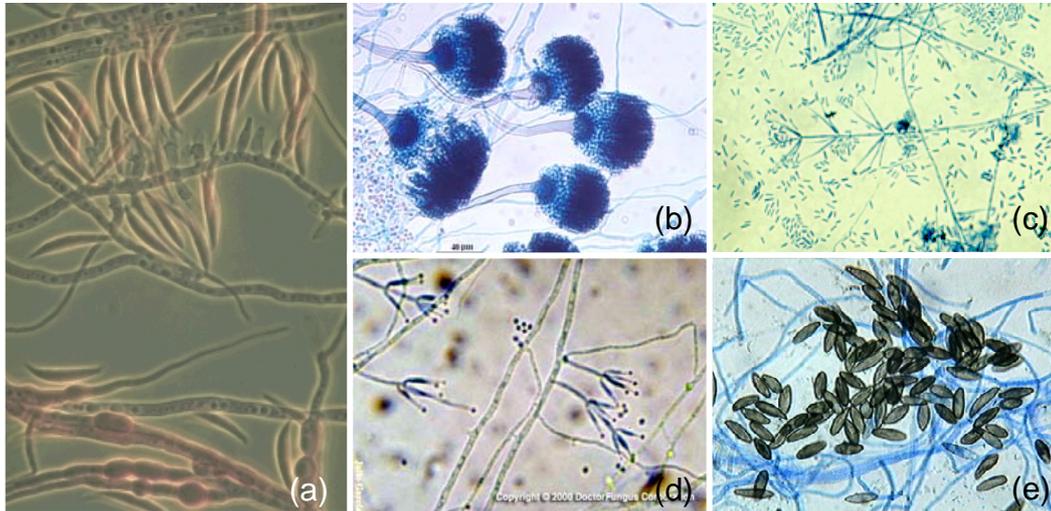


## Appendici al testo



# Appendice 1

## Descrizione dei ceppi fungini caratterizzati in questo studio



**Figura appendice 1.1** - Immagini al microscopio ottico di (a) *Fusarium sp.*, (b) *Aspergillus fumigatus*, (c) *Verticillium sp.*, (d) *Paecilomyces sp.*, (e) *Myrothecium sp.* – Optical microscope images of (a) *Fusarium sp.*, (b) *Aspergillus fumigatus*, (c) *Verticillium sp.*, (d) *Paecilomyces sp.*, (e) *Myrothecium sp.*

### ***Fusarium oxysporum***

*F. oxysporum* ha una distribuzione ubiquitaria ed è attivo nella decomposizione di substrati vegetali contenenti cellulosa; è presente in un'ampissima gamma di suoli dai quali può essere facilmente isolato con le più comuni tecniche. E' un saprofito, ma è anche patogeno di alcune piante. E' noto per la sua capacità di colonizzare suoli alcalini, ma è tuttavia in grado di proliferare in un intervallo di pH molto ampio. Utilizza svariate fonti di carbonio fra le quali acido lattico e succinico, glicerolo, mannitolo, cellobiosio, amido, maltosio e saccarosio. E' in grado di solubilizzare il fosfato di calcio e di ridurre lo ione ferrico. E' un forte produttore di siderofori (Domsch et al., 1980).

### ***Aspergillus fumigatus***

Questo genere è caratterizzato da una crescita piuttosto rapida: le colonie raggiungono i 7 cm di diametro in 10 giorni alla temperatura di 24-26° C su terreno Czapek Agar, con una crescita ampia e sottile, di colore verde-bluastro, con teste conidiofore esattamente colonnari. I conidiofori pigmentati presentano vescicole clavate e si innalzano da una cellula basale ben differenziata e dalla parete ispessita. *A. fumigatus* è un fungo termotollerante con una distribuzione ubiquitaria. Presenta una buona crescita in un intervallo di temperatura molto ampio, tuttavia l'incubazione a 40°C dei substrati da cui viene prelevato ne facilita l'isolamento. *A. fumigatus* si può trovare spesso come contaminante nelle colture preparate per l'isolamento degli altri funghi termofili. Analisi effettuate sulle spore fungine aerodisperse effettuate in

alcuni Paesi (India, Gran Bretagna e Francia) ha rivelato la presenza molto abbondante di numerose specie di *Aspergillus*. *A. fumigatus* in genere non è predominante nel suolo rispetto alla componente fungina totale.

Il pH di crescita ottimale è compreso tra 5 e 8.5. Si può isolare dal suolo dallo strato compreso fra 0 e 45 cm di profondità. Mostra una abilità saprofitica competitiva. La germinazione dei conidi è inibita dalla torba (Domsch *et al.*, 1980).

### ***Verticillium leptobactrum***

*Verticillium* è un genere di Hyphomycetes con ife vegetative ialine e colonie con un moderato tasso di crescita.

Dalla ricerca bibliografica risulta che la specie *V. leptobactrum* è piuttosto rara: essa è stata infatti finora isolata sporadicamente da substrati vari (prevalentemente esoscheletro di insetti ed altri funghi), e per questo motivo non esistono in letteratura dati riguardanti le sue caratteristiche fisiologiche. *Verticillium* comprende numerose specie saprofitiche e alcune specie patogene per le piante.

### ***Paecilomyces lilacinus***

*P. lilacinus* è un fungo del suolo. Questa specie presenta un'ampia diffusione, ma sembra essere più frequente in regioni calde. E' stato isolato da suoli non coltivati, suoli di conifere e foreste decidue ed anche da suoli coltivati.

Si tratta inoltre di una specie rinvenuta con alta frequenza in suoli trattati con fungicidi può crescere in un intervallo di temperatura molto ampio (8-38°C) indipendentemente dal sito di origine. Il pH di crescita ottimale è 6.5, ma tollera un intervallo di pH compreso fra 2 e 10. E' stata osservata una sporulazione ottimale in terreni contenenti NaCl 1%. Presenta una forte attività proteolitica e cheratinolitica (Domsch *et al.*, 1980).

### ***Myrothecium sp.***

Questo genere è caratterizzato dalla formazione di cospicui sporodochi (osservabili sia nel materiale vegetale colonizzato che in coltura) cupolati, ustolati, formati da conidiofori densamente compattati che emergono da uno stroma più o meno sviluppato e portano una massa di conidi sottili, di colore dal verde al nero.

Le specie di *Myrothecium*, in particolar modo *M. verrucaria* e *M. inundatum*, sono specie saprofite e presentano attività cellulolitica. Tali specie sono note anche come produttrici di antibiotici e tossine. La specie *M. roridum* è un fungo patogeno di alcune piante, nelle quali causa la formazione di macchie sui lembi fogliari.

Negli esperimenti di laboratorio si possono utilizzare come terreni di coltura PDA (Potato Dextrose Agar), OA (Oat Agar) o CMA (Corn Meal Agar). Queste tre specie presentano sporodochi cupolati o pustolati, senza setti, con fialidi al di sotto di 20 µm di lunghezza e conidi generalmente al di sotto di 10 µm (Domsch *et al.*, 1980).

		<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>A.</i> <i>fumigatus</i>	<i>V.</i> <i>leptobactrum</i>	<i>P. lilacinus</i>	<i>Myrothecium</i> <i>sp.</i>
Crocidolite UICC	Biomass production	++	n.e.	+++	++	n.e.
	Mycelia pigmentation	++	n.e.	+++	++	n.e.
	Culture medium pigmentation	++	n.e.	+	++	n.e.
	Iron extraction	++	n.e.	+++	++	n.e.
	Magnesium extraction	n.r.	n.e.	n.r	n.r	n.e.
Chrysotile 6D	Biomass production	++	-	+++	++	+
	Mycelia pigmentation	++	+	+++	++	-
	Culture medium pigmentation	++	-	+	++	-
	Iron extraction	++	-	+++	++	-
	Magnesium extraction	++	n.e.	+++	++	n.e.

**Tabella appendice 1.2** – Rappresentazione schematica delle principali caratteristiche dell'interazione funghi/fibre *in vitro*. / Schematic representation of the main characteristics of the fungi/fibres interaction *in vitro*.



**Figura appendice 1.3** – Colture in liquido di *V. leptobactrum* (a sinistra), *V. leptobactrum* a contatto con fibre di crisotilo 6D (centro) e *V. leptobactrum* a contatto con fibre di crocidolite (destra). Si nota l'alterazione della pigmentazione del micelio, soprattutto in presenza di crisotilo. / Liquid cultures of *V. leptobactrum* (left), *V. leptobactrum* in contact with chrysotile 6D (centre) and *V. leptobactrum* in contact with crocidolite fibres (right). The pigmentation of mycelia is altered by the presence of the fibres, especially by chrysotile.



## Appendice 2



## Diversità tassonomica e funzionale della comunità fungina di un suolo serpentinitico ricco di asbesto

STEFANIA DAGHINO<sup>1,2,3</sup>, EMANUELA VURRO<sup>2</sup>, MAURA TOMATIS<sup>2,3</sup>,  
MARIANGELA GIRLANDA<sup>1</sup>, ELENA MARTINO<sup>1,3</sup>, BICE FUBINI<sup>2,3</sup>, SILVIA PEROTTO<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Biologia Vegetale e Centro di Eccellenza CEBIOVEM  
Università degli Studi di Torino  
Viale Mattioli 25  
I - 10125 Torino*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Chimica IFM  
Università di Torino  
Via Pietro Giuria 9  
I - 10125 Torino*

<sup>3</sup> *Centro Interdipartimentale "G. Scansetti"  
per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi  
Università di Torino  
Via Pietro Giuria 9  
I - 10125 Torino*

S. Daghino, E. Vurro, M. Tomatis, M. Girlanda, E. Martino, B. Fubini, S. Perotto - **Diversità tassonomica e funzionale della comunità fungina di un suolo serpentinitico ricco di asbesto.** *Rev. Valdôtaine Hist. Nat.*, **58**: 21-30, 2004.

Iron, a structural component of most asbestos, is thought to play a crucial role in asbestos toxicity. Surface iron promotes the generation of free radicals, with consequent DNA and lipid damage. In some cases, chemical removal of iron from asbestos fibres has indeed reduced several cellular responses to asbestos. Since iron represents an essential element, many soil microorganisms have developed mechanisms to scavenge this element from poorly soluble forms. Fungi in particular produce strong iron chelators and might represent interesting tools for the bioremediation of asbestos contaminated soils. In order to better understand the interactions between fungi and asbestos we have investigated: I) the ability of some soil fungi to grow on asbestos and to produce iron-chelators capable of extracting iron from crocidolite (blue asbestos); II) the range of fungi growing on serpentinites. The fungal responses following exposure to asbestos fibres have been also investigated with morphological and biochemical approaches. Many of the species/isolates investigated could remove significant amounts of iron from crocidolite fibres, *Fusarium oxysporum* being the most effective. In liquid cultures, the fibres were visibly cleared from the suspension because they were tightly bound to the fungal hyphae. Isolation and identification of fungi from serpentine rocks indicates the occurrence of both common and rare species.

Key words: Soil fungi, asbestos, bioremediation, siderophores, iron.

### INTRODUZIONE

I microrganismi del suolo, quali funghi e batteri, sono in grado di interagire con i metalli modificandone la forma chimica e la solubilità (Gadd, 2000). Queste interazioni sono ampiamente documentate in letteratura e sono alla base di numerosi studi atti a comprendere l'attuabilità di progetti di biorisanamento di siti inquinati da metalli pesanti (Watanabe, 2001). Un tipo molto particolare di inquinamento è quello associato alla presenza di uno specifico litotipo: le rocce serpentinitiche. Si tratta di rocce appartenenti alla famiglia delle ofioliti o pietre verdi. I minerali prevalenti nelle serpentiniti sono anfiboli

(ossia silicati idrati di Ca, Mg, Fe, Al) e serpentini (che sono silicati del Mg derivati dall'idratazione dell'olivina). Esempi di alcuni anfiboli sono amosite, crocidolite e tremolite, mentre il crisotilo è un serpentino. Entrambi cristallizzano in fibre rigide o incurvate, lunghe e sottili e sono indicati con il nome generico di asbesti. La forma fibrosa e la struttura cristallina conferiscono agli asbesti qualità tecnologiche per le quali sono stati ampiamente estratti ed utilizzati. Studi epidemiologici hanno però messo in luce le patologie causate dagli asbesti, che, qualora inalati, possono provocare l'insorgere di forme tumorali. Nonostante il divieto di estrazione e commercializzazione risalga al '92, permangono tuttora molte fonti di dispersione delle fibre di asbesto nell'ambiente, sia di origine naturale (ad esempio gli affioramenti di rocce serpentinitiche) che di origine antropica. I meccanismi alla base della tossicità degli asbesti non sono ancora stati del tutto chiariti. Una delle cause individuate è la *forma fibrosa*, che può determinare uno stress meccanico a carico delle cellule bersaglio. Inoltre le caratteristiche strutturali di questi silicati ne determinano la bassa solubilità e quindi l'elevata *biopersistenza* nei tessuti, fattore che influisce sulla tossicità dei particolati.

Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato che il trattamento delle fibre di asbesto con chelanti è efficace nel sottrarre ferro dalla struttura di superficie, e se prolungato, anche dagli strati subsuperficiali. E' anche noto dalla letteratura che la rimozione di ioni magnesio con acido ossalico contribuisce alla disgregazione delle fibre (Fubini, 1997). La solubilizzazione del ferro è particolarmente importante perché questo ione metallico, catalizzando reazioni chimiche quali la formazione di radicali organici e dell'ossigeno all'interfaccia tra fibra ed ambiente esterno, contribuisce a determinarne la *reattività di superficie*, che costituisce una terza concausa della tossicità degli asbesti (Park & Aust 1998). Il trattamento con chelanti risulta inibire la reattività di superficie delle fibre (Hardy & Aust, 1995) riducendo la produzione di radicali provocata dalle fibre stesse e, parallelamente, i danni ai lipidi e al DNA *in vitro* (Aust & Lund, 1990).

La presenza di minerali asbestiformi in forma non compatta, principalmente a causa dell'intervento umano, ad esempio in aree soggette ad attività estrattiva, costituisce quindi un importante fattore di rischio per la salute. In questi casi l'asbesto non può essere rimosso, e attualmente non esistono sistemi di inattivazione *in situ*.

Alcuni studi hanno dimostrato che i funghi hanno sviluppato dei meccanismi specifici di solubilizzazione ed assorbimento del ferro (Haselwandter, 1995), mediati da molecole chelanti di vario genere, che potrebbero essere sfruttati proprio allo scopo di mobilizzare questo ione dalla superficie delle fibre di asbesto. Il trattamento dei minerali asbestiformi *in situ* potrebbe pertanto prevedere l'utilizzo di funghi del suolo che siano anche forti produttori di composti chelanti. I funghi destano inoltre un particolare interesse per l'attuazione di processi di biodecontaminazione, grazie alle loro forti capacità invasive e all'ampio spettro di condizioni ambientali in cui possono crescere.

Scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare le interazioni *in vitro* fra funghi del suolo e minerali asbestiformi dal punto di vista morfologico, chimico e biochimico, al fine di studiare l'attuabilità di un processo di *biorisanamento*. La selezione dei ceppi di interesse si basa in primo luogo sulla loro capacità di crescere in presenza di questo particolare substrato minerale. Sono state pertanto seguite due diverse strategie. La prima prevede l'analisi della crescita su asbesto di funghi con funzioni note (es. oligotrofia, tolleranza a metalli pesanti, produzione di siderofori). Una seconda strategia prevede la selezione di

ceppi fungini nell'ambito della popolazione endogena e quindi già adattata alle caratteristiche del sito contaminato, sia sulla base delle loro capacità estrattive nei confronti dell'inquinante sia considerando il vantaggio competitivo rispetto ad altri microrganismi. Parte del lavoro ha quindi riguardato un primo campionamento del suolo di una cava di amianto (Balangero, TO), sito tipicamente serpentinitico con fibre di crisotilo contaminato da balangeroite e possibile obiettivo di un eventuale progetto di biorisanamento.

## MATERIALI E METODI

### *Campioni di fibre asbestiformi.*

Negli esperimenti condotti al fine di misurare la crescita fungina in presenza di asbesto e l'eventuale estrazione del ferro dalle fibre, sono state utilizzate fibre di crocidolite UICC (Union International Contre le Cancer) e di crisotilo proveniente dalla ex-cava di Balangero (TO).

### *Isolati fungini con caratteristiche note*

Al fine di individuare ceppi fungini adatti all'interazione con l'asbesto è stata compiuta una selezione preliminare utilizzando i 10 ceppi fungini riportati in Tab. 1. Le specie oggetto di tale analisi preliminare sono state: *Fusarium oxysporum*, *Mortierella hyalina*, un micelio sterile, due varietà di *Geomyces pannorum*, *Oidiodendron griseum* e quattro ceppi di *O. maius*. Queste specie sono state scelte in quanto rappresentano diverse strategie trofiche, e sono in grado di crescere facilmente in coltura pura. Sono tutti funghi saprotrofi del suolo, ma alcuni di essi sono simbionti facoltativi in grado di instaurare associazioni micorriziche con le piante appartenenti alla famiglia delle *Ericaceae*. I ceppi utilizzati di *F. oxysporum* e *O. griseum* sono noti per le loro capacità di sintetizzare siderofori.

Specie fungina	Origine	Referenza
1. <i>Fusarium oxysporum</i>	Grugliasco (TO), Italia	Girlanda <i>et al.</i> , 2001
2. <i>Mortierella hyalina</i>	Kane Island, Norvegia	Bergero <i>et al.</i> , 1999
3. <i>Geomyces pannorum</i> var. <i>vinaceus</i>	Cape Flora, Norvegia	Bergero <i>et al.</i> , 1999
4. <i>Geomyces pannorum</i> var. <i>pannorum</i>	Cape Flora, Norvegia	Bergero <i>et al.</i> , 1999
5. micelio sterile MUT 840	Angrogna (TO), Italia	Varese & Luppi, 1997
6. <i>Oidiodendron griseum</i>	Palanfrè (CN), Italia	Varese, 1991
7. <i>Oidiodendron maius</i> E	S. Francesco al Campo (TO), Italia	Perotto <i>et al.</i> , 1996
8. <i>Oidiodendron maius</i> A	Polonia	Martino <i>et al.</i> , 2000
9. <i>Oidiodendron maius</i> Zn	Foresta di Niepolomice, Polonia	Martino <i>et al.</i> , 2000
10. <i>Oidiodendron maius</i> Cd	Foresta di Niepolomice, Polonia	Martino <i>et al.</i> , 2000

Tabella 1 – Isolati fungini analizzati in questo studio.

### *Isolamento di ceppi fungini da rocce serpentinitiche: tecnica delle soil dilution plates*

Il campionamento ha riguardato siti localizzati in punti diversi della cava di Balangero (TO) in un'area di circa 2 Km<sup>2</sup>. Ogni campione di suolo è stato pesato e risospeso in acqua distillata. Le rocce serpentinitiche raccolte sono state lavate con 250 ml di acqua distillata. 1 ml di ogni sospensione è stato miscelato al terreno di coltura (malto 2%, agar 1.8%) addizionato con antibiotici (cloramfenicolo 0.05 g/l e streptomina 30 ppm). Le piastre sono state mantenute a temperatura ambiente. A seguito dello sviluppo delle colonie fungine, sono state contate le CFU e sono stati identificati i ceppi prevalenti.

### *Crescita in presenza di fibre*

Per valutare la crescita dei funghi in presenza di crocidolite e crisotilo sono state allestite colture addizionate di fibre. Per ogni coltura sono stati utilizzati 80 ml di terreno Czapek addizionato di glucosio 2% (p/v). Un litro di terreno contiene: NaNO<sub>3</sub> 3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.31 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 20 mM MES (2-[N-Morpholino] ethane sulphonic acid), pH 5.5. A questo terreno di coltura sono stati aggiunti 8.7 ml di una sospensione 2.3% di fibre (corrispondente a 200 mg di fibra) sia direttamente che all'interno di membrane da dialisi (BDH, Poole, U.K.). Dopo l'inoculo dei funghi, le colture sono state posizionate su un piano basculante (120 rpm) alla temperatura costante di 25°C.

### *Determinazione spettrofotometrica del ferro nel terreno di coltura.*

Dopo aver separato per filtrazione il micelio dal terreno di coltura, è stata utilizzata un'aliquota del filtrato, per determinare la quantità di ferro in essa presente. A questo scopo è stato utilizzato il metodo della ferrozina (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid, Sigma), un chelante specifico per il Fe(II), secondo il protocollo indicato da Lund & Aust (1990). Le letture sono state effettuate con uno spettrofotometro KONTRON Instrument UVIKON 930.

### *Studio della reattività delle fibre: il metodo dello spin-trapping*

Le fibre racchiuse all'interno di membrane da dialisi ed incubate con *F. oxysporum*, sono state separate dal micelio, lavate con H<sub>2</sub>O distillata, portate a secco in stufa a 55°C e poi testate tramite spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR) con il metodo dello *spin-trapping* che permette di rivelare la formazione di radicali ossidrilici in ambiente acquoso, in presenza di tampone fosfato pH=7.4 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La formazione di HO• viene seguita registrando gli spettri dell'addotto DMPO-OH• a 10 e 30 minuti. I reattivi utilizzati sono: 30 mg di solido, 0.5 ml di tampone fosfato 0.5M, 0.5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.196M, 0.250 ml di DMPO 0.15M.

## RISULTATI

### *Crescita in presenza di asbesto e solubilizzazione del ferro dalle fibre di crocidolite*

Gli esperimenti di crescita e di estrazione del ferro effettuati con i primi 10 ceppi fungini scelti hanno rivelato la capacità di tutti gli isolati selezionati di crescere in presenza

di minerali asbestiformi. La valutazione della biomassa fungina (misurata come peso secco dei miceli al termine di un periodo di crescita di 20 gg) ha rivelato che tutti i funghi utilizzati sono in grado di crescere in presenza di fibre di crocidolite, sia quando queste vengono mantenute a contatto diretto con il micelio, sia quando vengono separate tramite una membrana da dialisi. Un generale decremento è stato tuttavia osservato per i campioni cresciuti a contatto diretto con le fibre (dato non mostrato), mentre un incremento significativo della biomassa è stato registrato per alcuni ceppi se cresciuti in presenza di fibre racchiuse in una membrana di dialisi (Fig. 1a). Il 50% dei ceppi utilizzati è risultato in grado di rimuovere una quantità significativa di ferro dalle fibre di crocidolite. Particolarmente attivo si è dimostrato il ceppo *F. oxysporum*, ed in misura minore anche il micelio sterile MUT 840 ed i ceppi *M. hyalina* e *G. pannorum* var. *pannorum* (Fig. 1b).

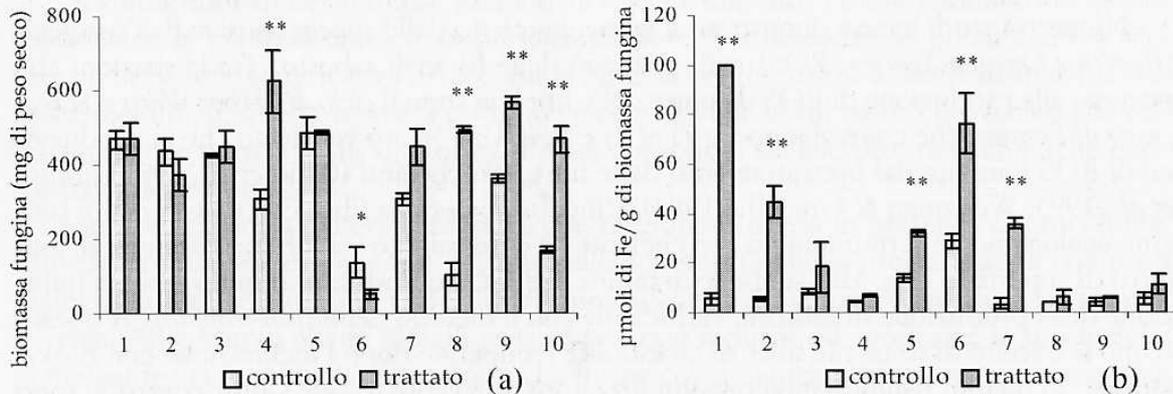


Fig. 1 – a) Crescita fungina misurata come mg di peso secco in assenza (controlli) ed in presenza (trattati) di fibre di crocidolite. Ad eccezione del ceppo *O. griseum*, tutti i funghi analizzati non mostrano una inibizione significativa della crescita in presenza del materiale asbestiforme. Al contrario la crocidolite provoca un incremento significativo della crescita per alcuni dei ceppi studiati. b) Estrazione del ferro dalle fibre di crocidolite. Il ferro è stato estratto dalle fibre con una diversa efficienza dai vari ceppi. Il grafico mostra la quantità di ferro misurata nel mezzo colturale dei funghi cresciuti in assenza (controlli) o in presenza di fibre (trattati). I dati rappresentati derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti  $\pm$  la deviazione standard. Gli asterischi indicano differenze significative fra controlli e trattati ( $p < 0.05$ ) (\*\*incremento della crescita/solubilizzazione del campione trattato rispetto al controllo, \*diminuzione della crescita/solubilizzazione del campione trattato rispetto al controllo). I numeri dei ceppi corrispondono a quelli riportati nella tabella 1.

A livello macromorfologico sono state rilevate differenze significative fra i campioni fungini cresciuti in assenza o in presenza delle fibre. La presenza delle fibre causa, in alcuni casi, un'alterazione della pigmentazione del micelio e del liquido di coltura. Particolarmente significativi sono i dati ottenuti per il ceppo *F. oxysporum* e per le due varietà di *G. pannorum* (Fig. 2). In assenza del fungo inoltre le fibre rimangono in sospensione nel liquido di coltura (Fig 2c), che appare torbido. La crescita del fungo nel terreno addizionato di fibre rende invece il mezzo completamente trasparente (Fig. 2b).

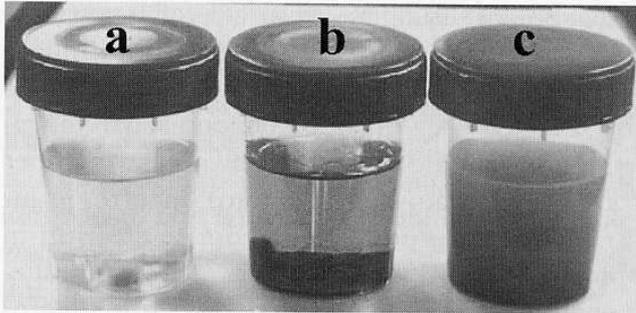


Fig. 2 – Esempio del sistema di coltura utilizzato: (a) campione di controllo cresciuto in assenza di fibre, (b) campione cresciuto nel terreno addizionato di fibre di crocidolite, (c) fibre addizionate al mezzo di coltura in assenza del fungo. Le fibre di amianto (diametro medio 1.5-4 mm) formano una sospensione torbida quando sono disperse nel mezzo colturale (c). Quando i funghi crescono in que-

sto mezzo addizionato di fibre (b), essi rimuovono le fibre dalla sospensione causando una netta chiarificazione del mezzo di coltura. Questo fenomeno è stato osservato per tutti i funghi studiati.

#### *Influenza dell'incubazione con il ceppo *F. oxysporum* sul rilascio di radicali da fibre di crocidolite.*

Numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) nella tossicità delle fibre di asbesto. Tra le reazioni che portano alla produzione di ROS da parte delle fibre, vi sono il *ciclo di Haber-Weiss* e la *reazione di Fenton*, che coinvolgono ioni Fe(II) e Fe(III). E' stato verificato che la produzione di ROS è inibita dal pretrattamento delle fibre con chelanti (Ghio *et al.*, 1992; Fubini *et al.*, 1995; Weitzman & Graceffa, 1984). L'incubazione delle fibre con diversi ceppi fungini, analogamente al trattamento con chelanti, ha determinato la mobilizzazione degli ioni ferro di superficie (Fig. 1b), sebbene in minor misura, e quindi si può ipotizzare un'inibizione della produzione di radicali, verificabile con il metodo dello *spin-trapping*. A questo scopo si è scelto di testare le fibre di crocidolite recuperate dopo l'incubazione con *F. oxysporum*, in quanto risultato miglior solubilizzatore tra i ceppi testati. Come controllo sono state utilizzate fibre incubate per lo stesso periodo di tempo in terreno Czapek-glucosio, in assenza del fungo.

Il rilascio di radicali ossidrilici risulta inibito dopo l'incubazione con il fungo, mentre è attivo per le fibre di controllo (dati non mostrati).

#### *Isolamento da suolo serpentinitico*

I primi risultati hanno dimostrato che funghi del suolo di varia origine sono in grado di solubilizzare il ferro dalle fibre di asbesto e che questa attività si accompagna, nel caso di *F. oxysporum*, ad una riduzione della reattività delle fibre stesse. Ci siamo quindi chiesti se un suolo ricco di asbesto potesse ospitare funghi attivi su questo stesso substrato. Abbiamo scelto l'area della cava di Balangero, sito tipicamente serpentinitico della Val di Lanzo, per procedere all'isolamento e all'identificazione di nuovi ceppi fungini allo scopo di indagare la biodiversità fungina in que-

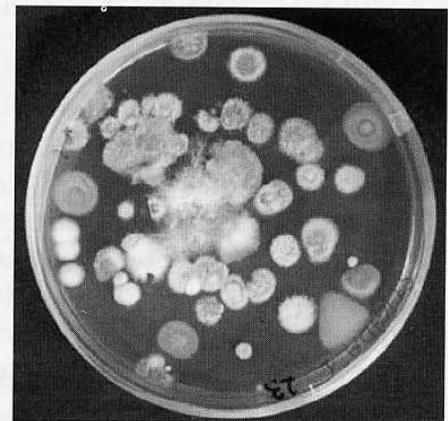


Fig. 3 – Esempio di piastra derivante dagli esperimenti di isolamento della popolazione fungina del suolo serpentinitico della ex cava di Balangero tramite il metodo delle dilution plates. Sono visibili numerose e differenti colonie fungine per le quali si procede poi all'identificazione ed all'isolamento in coltura pura.

sto suolo e in seguito compiere prove di crescita in presenza di asbesto e studiare gli effetti dell'interazione fungo/fibre dal punto di vista del metabolismo fungino e dell'alterazione della reattività delle fibre.

Il campionamento ha interessato un'area ampia circa 2 Km<sup>2</sup>, con il prelievo di 34 campioni di detrito ossia di frammenti di rocce serpentinitiche. Con la tecnica delle *dilution plates* sono state isolate 888 CFU, riconducibili a circa 60 specie diverse (Fig. 3).

Nonostante il lavoro di identificazione sia ancora in corso sono risultati dominanti in termini sia di abbondanza che di frequenza le specie *Verticillium* sp., *A. fumigatus*, *Paecilomyces lilacinus* ed i generi *Mortierella*, *Myrothecium* e *Penicillium*.

## DISCUSSIONE

La valutazione delle biomasse fungine ha rivelato che tutti i funghi utilizzati in questo studio sono in grado di crescere in presenza di fibre di crocidolite. In pochi casi si è rilevata un'inibizione significativa della crescita fungina in presenza di asbesto: in analogia con i sistemi animali, questa tossicità potrebbe essere dovuta ad un danno provocato alle cellule fungine e correlato sia alla forma fibrosa del solido, sia alle proprietà chimiche delle superfici delle fibre.

Sono state comunque evidenziate alcune reazioni di difesa in presenza di crocidolite, come la produzione di pigmenti. E' noto dalla letteratura che la produzione di composti pigmentati rappresenta una risposta dei microrganismi a svariate condizioni ambientali avverse. Ad esempio alcuni metalli pesanti possono indurre od accelerare la produzione di melanine nei funghi ed è dimostrato che forme cellulari melanizzate, come per esempio le clamidospore, mostrano maggiore impermeabilità e tolleranza ai metalli pesanti rispetto alle cellule ialine (Gadd, 1993).

L'estrazione del ferro dalle fibre osservata in misura variabile per tutti i ceppi testati è dovuta verosimilmente alla produzione di composti chelanti. E' noto dalla letteratura che i funghi sono in grado di interagire con i metalli modificandone la forma chimica e la solubilità (Gadd, 1993; 2000). I funghi hanno la capacità di produrre composti organici che modificano la mobilità dei metalli e la loro biodisponibilità (Gadd & White, 1989). Saggi allestiti per verificare la produzione di chelanti quali siderofori e acidi organici hanno dimostrato, per tutti i funghi testati, la capacità di sintetizzare questi composti. E' stata osservata, inoltre, una buona correlazione tra la produzione di siderofori e acidi organici, e la capacità di solubilizzare il ferro dalle fibre (Martino *et al.*, 2003). Il coinvolgimento di questi composti nella mobilizzazione del ferro dalle fibre di asbesto resta comunque da verificare, così come resta da indagare l'esatta natura dei chelanti coinvolti.

E' da sottolineare che esperimenti di citotossicità hanno dimostrato che pretrattamenti di fibre di crocidolite con desferrioxamina B, un chelante del ferro, riducono gli effetti nocivi sulle colture cellulari. Risultano inibite la generazione di radicali liberi (Lund & Aust, 1991), la perossidazione dei lipidi di membrana (Weitzman & Weitberg, 1985) e i danni al DNA (Chao *et al.*, 1996).

Dai dati esposti e dall'evidente potenzialità dei funghi utilizzati in questo lavoro di rimuovere ioni ferro dalle fibre di crocidolite, si potrebbe ipotizzare un'effettiva riduzione della tossicità delle fibre incubate in presenza dei funghi. Per verificare tale ipotesi sarà necessario utilizzare saggi biologici in grado di evidenziare eventuali variazioni nella cito-

tossicità delle fibre in seguito alla loro incubazione in presenza di micelio fungino. Di particolare importanza a questo proposito è il dato riguardante l'inibizione del rilascio di radicali ossidrilici dopo l'incubazione delle fibre con il ceppo fungino *F. oxysporum*. Ulteriori esperimenti consentiranno di studiare l'eventuale decremento della tossicità di tali fibre e di confrontare l'efficacia dei chelanti fungini con quelli finora testati in laboratorio. I dati ottenuti suggeriscono che i chelanti fungini, per esempio nel caso di *F. oxysporum*, estraggono ferro in misura equivalente alla metà di quello estratto dalla desferrioxamina (Prandi *et al.*, 2002), uno dei più forti chelanti utilizzati nella ricerca sull'amianto.

Sicuramente l'osservazione più significativa che riguarda l'interazione tra funghi e fibre di amianto, in una prospettiva di biorisanamento, è la capacità di questi di estrarre il ferro strettamente associato alla fibra, probabile corresponsabile della patologia indotta da questo materiale insieme alla forma fisica delle fibre stesse. Un'altra osservazione interessante è la capacità da parte di alcuni funghi testati di interagire fisicamente con le fibre di crocidolite mediante meccanismi di adesione che portano il fungo ad intrappolare il materiale fibroso nell'intreccio miceliare.

Gli attuali progetti di bonifica dei siti contaminati da amianto prevedono interventi unicamente di tipo chimico-fisico. L'utilizzo di microrganismi come alternativa a, o in sinergia con, un approccio di questo tipo è ancora ipotetico e rappresenterebbe un intervento di tipo nuovo. D'altro lato, l'isolamento di un ampio spettro di funghi del suolo dal detrito della cava di Balangero permetterà la caratterizzazione funzionale di nuovi ceppi derivanti proprio da un sito serpentinitico nonché lo studio della loro interazione con le fibre di asbesto ricavate dalla cava stessa. Fra i primi isolati identificati, risulta di particolare interesse il ceppo *Verticillium* sp., specie rara segnalata sporadicamente da substrati vari (prevalentemente insetti e altri funghi), che invece è risultata la più abbondante e frequente nella cava di Balangero. Una associazione di questa specie con materiale asbestiforme rimane ancora da verificare. Inoltre, trattandosi di una specie rara, non esistono dati in letteratura circa le sue caratteristiche fisiologiche. Al contrario *P. lilacinus*, anch'esso molto abbondante nel detrito raccolto nella cava di Balangero, è un fungo ubiquitario e ben caratterizzato: dati di letteratura dimostrano che è in grado di produrre acidi organici di vario tipo e che altre specie dello stesso genere sono forti produttori di siderofori.

## RINGRAZIAMENTI

La ricerca descritta in questo articolo e la borsa di Dottorato di Stefania Daghino sono finanziati dalla Regione Piemonte, Assessorato Ambiente, nell'ambito del progetto "Amianto e minerali asbestiformi nell'arco alpino: identificazione e mappatura, valutazione del rischio, inattivazione e/o confinamento".

## BIBLIOGRAFIA

- Aust A. E., Lund L. G., 1990. The role of iron in asbestos-catalyzed damage to lipids and DNA. In: Hamilton G., Reddy C. C. (eds.). *Biological Oxidation Systems*. Academic Press, Orlando, Florida, USA, vol. 2: p. 597-605.
- Bergero R., Girlanda M., Varese G. C., Intili D., Luppi A. M., 1999. Psychotrophic fungi from Arctic soils of Franz Joseph Land. *Polar biol.*, 21: 361-368.
- Chao C. C., Park S. H., Aust A. E., 1996. Participation of nitric oxide and iron in the oxidation of DNA in asbestos-treated human lung epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 326: 152-157.

- Fubini B., 1997. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ. Health Perspect.*, 105: 1013-1018.
- Fubini B., Mollo L., Giamello E., 1995. Free radical generation at the solid/liquid interface in iron containing minerals. *Free Radical. Res.*, 23: 593-614.
- Gadd G. M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.*, 124: 25-60.
- Gadd G. M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opinion Biotech.*, 11: 271-279.
- Gadd G. M., White C., 1989. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeast. In: Poole R. K., Gadd G. M. (eds.). *Metal-microbe interactions*. Eds. Oxford, IRL Press: p. 19-38.
- Ghio A. J., Zhang J., Piantadosi C. A., 1992. Generation of hydroxyl radical by crocidolite asbestos is proportional to surface [Fe<sup>3+</sup>]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298: 646-50.
- Girlanda M., Perotto S., Moenne-Loccoz Y., Bergero R., Lazzari A., Defago G., Bonfante P., Luppi A. M., 2001. Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative of culturable fungi in the *Cucumber* rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1851-1864.
- Hardy J. A., Aust A. E., 1995. Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chem. Rev.*, 118: 95-97.
- Haselwandter K., 1995. Mycorrhizal fungi: siderophore production. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15: 287-291.
- Lund L. G., Aust A. E., 1991. Mobilization of iron from crocidolite asbestos by certain chelators results in enhanced crocidolite-dependent oxygen consumption. *Arch. Biochem. Biophys.*, 287: 91-96.
- Lund L. G., Aust A. E., 1990. Iron mobilization from asbestos by chelators and ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 278: 60-64.
- Martino E., Prandi L., Fenoglio I., Bonfante P., Perotto S., Fubini B., 2003. Soil fungal hyphae bind and attack asbestos fibers. *Angew. Chem. -Int. Edit.*, 42: 219-222.
- Martino E., Turnau K., Girlanda M., Bonfante P., Perotto S., 2000. Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of heavy metals. *Mycol. Res.*, 104: 338-344.
- Park S. H., Aust A. E., 1998. Participation of iron and nitric oxide in the mutagenicity of asbestos in hgp<sup>+</sup>, gpt<sup>+</sup> Chinese hamster V79 cells. *Cancer Res.*, 58: 1144-1148.
- Perotto S., Actis-Perino E., Perugini J., Bonfante P., 1996. Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots. *Mol. Ecol.*, 5: 123-131.
- Prandi L., Tomatis M., Penazzi N., Fubini B., 2002. Iron cycling mechanisms and related modifications at the asbestos surface. *Ann. occup. Hyg.*, 46 (1): 140-143.
- Varese G. C., 1991. Funghi rizoplanici di *Fagus sylvatica* L. Tesi di Laurea. Università di Torino, Torino, Italy.
- Varese G. C., Luppi-Mosca A. M., 1997. Microfunghi from ectomycorrhizae of *Fagus sylvatica* with *Xenocomus subtomentosus*, *Cortinarius violaceus* and *Russula aeruginea*. *Allionia*, 35: 165-170.
- Watanabe K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 12: 237-241.
- Weitzman S. A., Graceffa P., 1984. Asbestos catalyzes hydroxyl and superoxide radical generation from hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228: 267-274.
- Weitzman S. A., Weitberg A. B., 1985. Asbestos-catalysed lipid peroxidation and its inhibition by desferrioxamine. *Biochem. J.*, 225: 259-262.

#### RIASSUNTO

A seguito del riconoscimento della tossicità dell'asbesto e dell'imposizione legislativa di attività di risanamento, il rischio legato all'esposizione occupazionale si sta riducendo, ma l'asbesto resta un problema ambientale. Diverse aree montane, dalle Alpi Occidentali alla Sierra Nevada negli USA, sono ricche di asbesto e minerali asbestiformi, e molti siti industriali di lavorazione dell'asbesto, ormai dismessi, sono abbondantemente contaminati da fibre. La decontaminazione delle fibre di asbesto disperse nel suolo o nelle acque, richiede ovviamente un approccio diverso da quello proposto per l'amianto utilizzato in edilizia. Le fibre non possono infatti essere rimosse, ma devono essere inattivate *in situ*, senza danni per l'ambiente. Di conseguenza è necessario individuare nuove strategie di risanamento, da utilizzare nel rispetto dell'ambiente e in vaste aree territoriali, allo scopo di modificare le proprietà chimico-fisiche che determinano la patogenicità delle fibre. L'esposizione a fibre di asbesto inalabili può causare una forma di pneumoconiosi, detta asbestosi, e forme tumorali quali carcinoma polmonare e mesotelioma della pleura. Si pensa che uno dei fattori che determinano la tossicità dell'asbesto sia il ferro, in quanto promotore del rilascio di radicali liberi coinvolti nel danno ossidativo causato a carico di lipidi, proteine e DNA.

Alcuni esperimenti hanno dimostrato che la rimozione del ferro dalle fibre di asbesto può ridurre notevol-

mente il potenziale citotossico delle fibre stesse. Quindi se il ferro potesse essere estratto continuamente dalle fibre disperse nel suolo attraverso un processo "naturale", la modificazione occorsa alla superficie delle fibre potrebbe portare ad una riduzione della loro cancerogenicità o anche ad una completa inattivazione.

Siccome il ferro rappresenta un elemento essenziale per i microrganismi del suolo, essi hanno sviluppato specifici meccanismi di solubilizzazione ed assorbimento di questo elemento presente in forma poco solubile nel suolo. Di conseguenza si può ipotizzare di utilizzare ceppi/specie selezionate di funghi del suolo come agenti di biorisanamento di fibre di asbesto attraverso un progressivo e continuato depauperamento di ferro.

E' stata quindi testata la capacità di diversi ceppi fungini di crescere in presenza di fibre di crocidolite e di estrarre ferro. I risultati hanno dimostrato che tutti i ceppi fungini testati sono in grado di crescere in presenza di fibre di amianto e di solubilizzare, con diversa efficienza, il ferro contenuto nelle fibre stesse. Alcuni funghi rispondono alla presenza delle fibre con la pigmentazione del micelio e del terreno colturale, presumibilmente mediante la secrezione di melanine. Inoltre si è osservato che in coltura liquida le fibre vengono completamente rimosse dal mezzo di coltura, in quanto strettamente intrappolate nel reticolo miceliare.

Allo scopo di individuare funghi del suolo adatti ad attuare un processo di biorisanamento, stiamo isolando ceppi fungini da un suolo serpentinitico (cava di Balangero-TO): i primi ceppi isolati appartengono a generi quali *Aspergillus* (*A. fumigatus*), *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Myrothecium* e *Verticillium* sp. I ceppi isolati verranno utilizzati per prove di crescita in presenza di asbesto e per studiarne l'eventuale capacità di estrarre ioni metallici dalle fibre.

#### RÉSUMÉ

*Diversité taxonomique et fonctionnelle de la communauté fongique d'un sol serpentinite riche en asbeste.*

Des affleurements serpentinitiques sont de puissantes sources de dispersion de fibres d'asbeste dans l'environnement s'ils sont l'objet d'une activité de manutention. La toxicité des fibres d'asbeste dispersées dans l'air et pouvant être inhalées est reconnue, mais il n'existe pas de stratégies d'assainissement applicables à de vastes zones pour modifier les propriétés chimico-physiques qui déterminent la pathogénèse des fibres.

L'enlèvement des ions ferreux des fibres d'asbeste peut réduire notablement le potentiel cytotoxique des fibres.

Les micro-organismes ont développé des stratégies de solubilisation du fer présent dans le sol. On peut donc supposer d'utiliser des espèces souches sélectionnées de champignons du sol qui provoquent un appauvrissement progressif en fer, comme agents de bio-assainissement des fibres d'asbeste.

Pour trouver des champignons ayant cet intérêt nous avons isolé des souches dans un sol serpentinite, parmi lesquelles des espèces appartenant au genre *Aspergillus*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Myrothecium* et *Verticillium* sp.

## Appendice 3



## Inorganic Materials and Living Organisms: Surface Modifications and Fungal Responses to Various Asbestos Forms

Stefania Daghino,<sup>[b]</sup> Elena Martino,<sup>[b]</sup> Ivana Fenoglio,<sup>[a]</sup> Maura Tomatis,<sup>[a]</sup> Silvia Perotto,<sup>[b]</sup> and Bice Fubini\*<sup>[a]</sup>

**Abstract:** In a previous study several strains of soil fungi were reported to remove iron in vitro from crocidolite asbestos, a process that was envisaged as a possible bioremediation route for asbestos-polluted soils. Here, we get some new insight into the chemical basis of the fiber/fungi interaction by comparing the action of the most active fungal strain *Fusarium oxysporum* on three kind of asbestos fibers—chrysotile, amosite, and crocidolite—and on a surface-modified crocidolite. None of the fibers examined significantly inhibited biomass production. Even the smallest fibrils were visibly removed from the supernatant following adhesion to fungal hyphae. *F. oxysporum*, through release of chelators, extracted iron from all fibers; the

higher the amount of iron at the exposed surface, the larger the amount removed, that is, crocidolite > amosite > chrysotile. When considering the fraction of total iron extracted, however, the ranking was chrysotile > crocidolite > amosite > heated crocidolite, because of the different accessibility of the chelators to the metal ions in the crystal structure. Chrysotile was the easiest to deplete of its metal content. Iron removal fully blunted HO<sup>•</sup> radical release from crocidolite and chrysotile but only partially from amosite. The removal, in a long-term experiment, of more iron than is expected to be at the

surface suggests a diffusion of ions from the bulk solid towards the surface depleted of iron by fungal activity. Thus, if the fibers could be treated with a continuous source of chelators, iron extraction would proceed up to a full inactivation of free radical release. The fungal metabolic response of *F. oxysporum* grown in the presence of chrysotile, amosite and crocidolite revealed that new extracellular proteins are induced—including manganese-superoxide dismutase, the typical antioxidant defense—and others are repressed, upon direct contact with the fibers. The protein profile induced by heated crocidolite was different, a result suggesting a key role for the state of the fiber/hyphae interface in protein induction.

**Keywords:** asbestos • bioremediation • fungi • iron • radicals

### Introduction

Asbestos fibers are mobilized from their natural deposits—the rocks to which they are associated—mainly following human activities. Excavation in mines or tunnel constructions through asbestos-containing rocks generates harmful airborne fibrils, which may be deposited in large soil areas.

No current technology is available for the remediation of such sites. Serpentine rocks, naturally rich in chrysotile, or asbestos-contaminated soils are thus a serious environmental issue, recognized by environmental protection agencies (for example, the USA Environmental Protection Agency at the “Asbestos Health Effects Colloquium” (Oakland, CA, 24–27 May 2001) and the “Asbestos mechanism of toxicity workshop”, (Chicago, IL, 12–13 June 2003)).

Asbestos is a commercial term encompassing two groups of magnesium silicates which often crystallize in fibrous form: amphiboles and serpentines. The crystal structure of the amphiboles can be described in terms of a basic structural unit formed by a double-tetrahedral chain (corner-linked SiO<sub>4</sub> tetrahedra) of composition (Si<sub>4</sub>O<sub>11</sub>)<sub>n</sub><sup>6n-</sup>. These silicate double chains share oxygen atoms with alternate layers of edge-sharing MO<sub>6</sub> octahedra, where M stands for a variety of cations: mostly Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, or Fe<sup>3+</sup>. In most common amphiboles—amosite (fibrous grunerite), (Fe<sup>2+</sup>,Mg)<sub>7</sub>-

[a] Dr. I. Fenoglio, Dr. M. Tomatis, Prof. B. Fubini  
University of Torino, Dipartimento di Chimica IFM and  
Centre of Excellence of Nanostructured Interfaces and Surface (NIS)  
via Pietro Giuria 7, 10125 Torino (Italy)  
Fax: (+39)011-670-7855  
E-mail: bice.fubini@unito.it

[b] S. Daghino, Dr. E. Martino, Prof. S. Perotto  
University of Torino, Dipartimento Biologia Vegetale and  
Center of Excellence for Plant and Microbial Biosensing (CEBIO-  
VEM)  
viale Mattioli 25, 10125 Torino (Italy)

$\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ , and crocidolite (fibrous riebeckite),  $\text{Na}_2(\text{Fe}^{3+})_2(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ —iron is a major stoichiometric component. The crystal structure of all the minerals in the serpentine group can be thought of as being formed by a double layer consisting of a tetrahedral (silicate) sheet of composition  $(\text{Si}_4\text{O}_{11})_n^{6n-}$ , in which three of the oxygen atoms in each  $\text{SiO}_4$  tetrahedron are shared by adjacent tetrahedra, and an octahedral (brucite) sheet of composition  $[\text{Mg}_3\text{O}_2(\text{OH})_4]_n^{2+}$  formed by edge-sharing  $\text{MgO}_2(\text{OH})_4$  octahedra ( $\text{Fe}^{2+}$  can substitute for  $\text{Mg}^{2+}$  in this layer because of the similarity in size of the two divalent ions, Table 1). The two sheets are bonded together forming a double layer in

Table 1. Specific surface area and total iron content of asbestos fibers.

	Specific surface area [ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ]	Iron content [w/w %]
chrysotile, $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$	21 <sup>[a]</sup>	1.92 <sup>[b]</sup>
amosite, $(\text{Fe}^{\text{II}}, \text{Mg})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$	5 <sup>[a]</sup>	28.5 <sup>[a]</sup>
crocidolite, $\text{Na}_2\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{Fe}^{\text{II}}, \text{Mg})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$	8 <sup>[a]</sup>	27.3 <sup>[a]</sup>
heated crocidolite, $\text{Na}_2\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{Fe}^{\text{II}}, \text{Mg})_3\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$	5 <sup>[a]</sup>	27.3 <sup>[a]</sup>

[a] See references [9, 27, 53]. [b] See the Experimental Section.

which the apical oxygen atoms of the  $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n^{2n-}$  sheet are shared with the brucite layer.

Chrysotile,  $\text{Mg}_6\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ , the most common serpentine, can contain  $\text{Fe}^{2+}$  ions, replacing  $\text{Mg}^{2+}$  ions, to a large or small extent depending on the geological source.<sup>[1]</sup> Natural chrysotile may contain up to 5% iron. Such fibers are all very poorly soluble in water, but previous work<sup>[1–3]</sup> has shown that treatments in vitro with various chelators may extract iron from the fiber, modify surface properties,<sup>[4, 5]</sup> and even promote, over a long period of time, the disruption of several subsurface layers.<sup>[6]</sup> Iron ions are directly involved in the accepted mechanism of fiber toxicity<sup>[7–10]</sup> because at the fiber/lung interface of the inhaled fiber they constitute active centers where release of free radicals and reactive oxygen species (ROS) takes place.<sup>[5, 11, 12]</sup> These reactions initiate or contribute to the overall pathogenicity.<sup>[13, 14]</sup>

Incubation of the fibers with an aqueous solution of some chelators was reported to inhibit surface reactivity<sup>[15]</sup> and to decrease DNA damage and lipid peroxidation in vitro.<sup>[16–18]</sup> Synthetic chrysotile with no iron in the structure was recently reported not to be cytotoxic toward human epithelial cells in a culture.<sup>[19]</sup> Iron extraction from asbestos fibers may also destabilize the lattice if the extraction proceeds for several layers below the fiber surface. As both the fibrous habit and the chemical reactivity are involved in asbestos pathogenicity, iron removal may be considered as a possible strategy to reduce asbestos-associated toxicity and to inactivate the fibers.

Many microorganisms can modify the chemical status and solubility of metals in the environment,<sup>[20, 21]</sup> and some of these microorganisms are widely employed in the bioremediation of heavy-metal-polluted sites.<sup>[22]</sup> Soil fungi are very

suitable as bioremediation agents since they are ubiquitous organisms and efficient substrate colonizers, they have exceptional degrading capabilities, and they show a good tolerance to extreme environments and polluted conditions. Like all organisms, soil fungi require iron for their own metabolism and have developed mechanisms to scavenge this element from difficult sources through the release of chelating molecules (for example, siderophores and some organic acids).<sup>[23]</sup> A multidisciplinary approach was therefore set up to investigate whether soil fungi could mobilize iron ions from asbestos fibers.

Previous experiments have shown that a variety of fungal strains were able, at least in vitro, to grow in the presence of crocidolite asbestos and to extract iron from the fibers with variable effectiveness.<sup>[24, 25]</sup> Crocidolite, however, is not the most common type of asbestos, being confined mainly to relatively small deposits in South Africa, China, and Australia. The greatest percentage of the asbestos mined and manufactured is chrysotile, the most common fibrous serpentine.<sup>[26]</sup> We have therefore chosen *Fusarium oxysporum*, the most effective iron-extracting fungus,<sup>[24]</sup> and compared its effect on various asbestos forms and on thermally modified crocidolite, in order to understand the role played by the physico-chemical characteristics of the fibers in their potential to be degraded by fungi. In order to recover the asbestos fibers after exposure to the fungal activity, the fibers were separated from the mycelium in some cases by a dialysis membrane. The potential of the recovered fibers to generate free radicals was then compared with that of the original samples. Finally in order to clarify the biological mechanism whereby fungi modify asbestos, the metabolic activities of the fungus in the presence of the various types of asbestos were also investigated, with particular interest in extracellular proteins and/or proteins involved in an oxidative-stress response.

## Results

**Growth and morphological analysis:** In the presence of the fungal mycelium, all asbestos fibers and fibrils were visibly removed from the suspension and tightly bound to the fungal hyphae, so that the supernatant was progressively cleared, in a similar manner to that already reported for crocidolite. Previous ultrastructural studies have shown that the fibrils are, in this case, in intimate contact with the fungus.<sup>[24, 25]</sup>

None of the fibers examined significantly inhibited biomass production of *F. oxysporum* grown in liquid culture (Figure 1), either in direct contact with the fungus or when kept in a separate chamber by a dialysis membrane. The presence of asbestos fibers, however, caused the release of a dark yellow soluble pigment in the culture medium.

**Iron removal:** In the absence of fungi, none of the fiber types released any detectable iron into the medium. Conversely, iron was always detected in the supernatant of

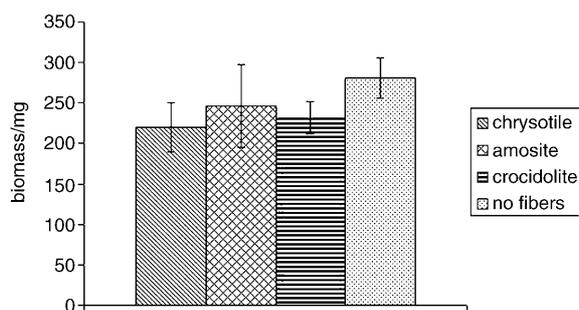


Figure 1. Fungal growth in direct contact with different kinds of fibers, expressed as biomass dry weight (mg) after an in vitro culture of 20 days. The control sample was grown in the absence of any fibers. Data are the mean of three independent experiments  $\pm$  the standard deviation.

fungal cultures grown in the presence of the various kinds of fibers. The iron concentration in the medium was measured after 20 days of incubation and was found to be significantly increased in the presence of the mineral, either in direct contact with the mycelium or when kept in a separate chamber by a dialysis membrane. In an in vitro treatment with chelators<sup>[1]</sup> the amount of iron removed depends on both the surface area of the fibers and their chemical composition, namely the amount of surface iron. As expected, the amount of iron extracted was significantly greater for both amphiboles, crocidolite and amosite, than for chrysotile (Table 2). As previously reported, a thermal treatment of

Table 2. Iron extraction from the asbestos fibers, either kept in direct contact with *F. oxysporum* (A columns) or physically separated by a dialysis membrane (B columns).<sup>[a]</sup>

	Iron released [ $\mu\text{M}$ ]		Iron released per unit surface [ $\text{ions nm}^{-2}$ ]		Iron extracted from the fibers [%]	
	A	B	A	B	A	B
chrysotile	42.6	37.6	0.55	0.49	5.57	4.62
amosite	127.4	84.5	6.9	4.58	1.12	0.74
crocidolite	151.7	129	5.14	4.35	1.39	1.19
heated crocidolite	68.3	56.6	3.7	3.06	0.63	0.52

[a] The concentration of iron measured in the filtered culture medium was normalized by considering either the specific surface area or the total iron content of the fibers.

crocidolite at 800°C in air leads to a 37% reduction of the surface area of the fibers and modifies the coordination status of surface iron ions, which saturate their coordination valencies within the silica framework. The lower number of poorly coordinated iron ions at the surface of the heated sample is consistent with a reduced iron availability.<sup>[27]</sup> As expected, *F. oxysporum* is able to remove from heated crocidolite only about half the amount of iron removed from the original fibers.

To investigate whether iron extraction could proceed over a long period of time of contact between fungus and fibers and whether the accumulation of soluble iron in the medium could affect fungal growth, *F. oxysporum* was culti-

vated with crocidolite (the fiber richest in removable iron) for 56 days in a larger culture system (500 mL of culture medium instead of 80 mL). The fungal biomass, measured as dry weight at the end of the incubation, was similar in the presence of the fibers and in the control samples, thus indicating that there is no growth inhibition even after prolonged exposure. Aliquots of the culture medium were sampled weekly under sterile conditions to monitor the iron concentration. After 20 days the concentration of iron attained the value already measured in the smaller culture system, while after 56 days the iron released was twice as much (Figure 2). The final value attained, 11.45  $\text{ions nm}^{-2}$ , is considerably more than what would be expected to be located at the surface of the fibers.<sup>[6]</sup>

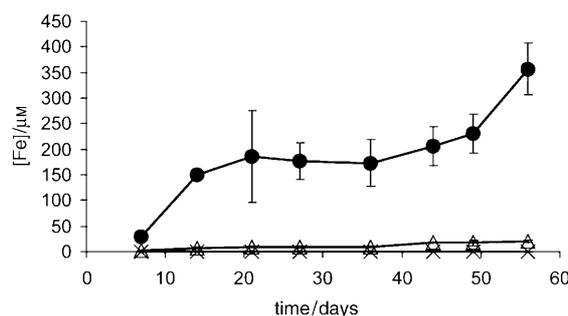


Figure 2. Variation of iron concentration in the supernatant of *F. oxysporum* grown in the presence (●) or absence (Δ) of crocidolite fibers over a period of 56 days. The concentration in the supernatant with the fibers alone (×) under the same conditions is also shown. Data are expressed as  $\mu\text{M}$  concentration of iron in filtered culture media and are the mean of three independent experiments  $\pm$  the standard deviation.

The activity of *F. oxysporum* on crocidolite was also compared with that of the strong siderophore desferrioxamine in order to evaluate the amount of iron available for further extraction (that is, potentially mobilized in the human body by endogenous chelators). Crocidolite fibers, incubated either in the culture medium alone or with *F. oxysporum*, were thus further incubated with desferrioxamine (1 mM) for 37 days. Aliquots of the supernatant were taken at subsequent time periods to measure the iron concentration. Comparison of the kinetics of iron release (Figure 3) showed that the iron removed by desferrioxamine is substantially reduced following contact with the fungus but is not fully suppressed. The difference between the two curves is an indirect measure of the extent of iron extracted during fungal growth in the experimental conditions adopted.

**HO<sup>•</sup> radical generation from the fibers:** The EPR spectra of the 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) hydroxyl radical (DMPO/OH<sup>•</sup>), obtained from aqueous suspensions of the fibers incubated in the culture medium alone and of fibers incubated for 20 days with *F. oxysporum*, are shown in Figure 4. All the fibers incubated in the culture medium alone generated substantial HO<sup>•</sup> radicals (Figure 4, A) a and B) a), as previously reported.<sup>[5,11]</sup> Conversely, treatment with

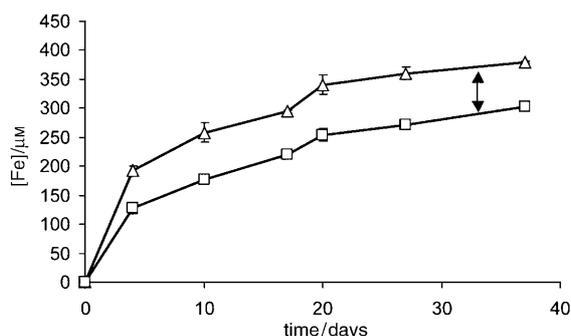


Figure 3. Iron extraction by desferrioxamine from untreated crocidolite fibers ( $\Delta$ ) and from fibers preincubated with *F. oxysporum* ( $\square$ ). The difference between the curves is due to the previous iron extraction by the fungus. Data are expressed as  $\mu\text{M}$  concentration of iron in supernatants and are the mean of three independent experiments  $\pm$  the standard deviation.

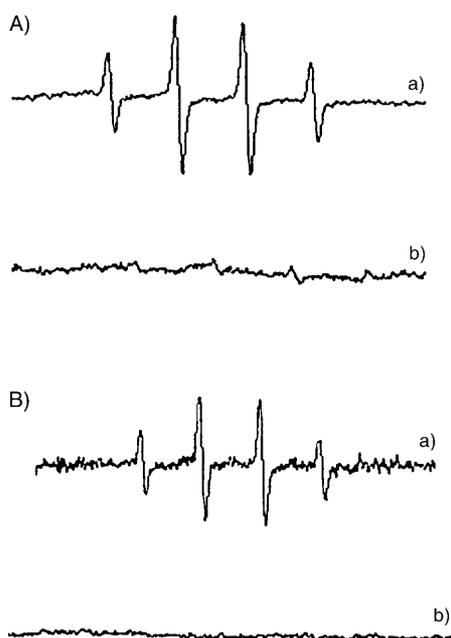


Figure 4. EPR spectra of the  $[\text{DMPO-OH}]^{\cdot}$  adduct of crocidolite (A) and of chrysotile (B). The spectra indicate free radical release from aqueous suspension of fibers incubated in the culture medium alone (A)a and B)a) or previously incubated with *F. oxysporum* (A)b and B)b).

*F. oxysporum* always inhibited, either partially or completely, radical release from crocidolite and chrysotile (Figure 4, A)b and B)b). The effect of the fungus on amosite and on heated crocidolite was less clear, as it markedly varied from one experiment to another. In one case radical generation from amosite was even enhanced following incubation (data not shown). Such variability often occurs in the presence of iron-removal/deposition equilibria because only a small fraction of isolated iron ions, in a well-defined coordinative and redox state, are catalytic centers for radical generation. During iron removal the number of such sites is bound to vary, occasionally increasing and then declining, on a given patch of fiber surface.

**Modification in fungal protein expression:** The production of extracellular proteins, as quantified by using the Bradford assay, did not show any significant differences in asbestos-treated and control samples (data not shown). However, when separated by sodium dodecylsulfate (SDS) PAGE, the protein profiles revealed substantial differences for fungi grown in the presence and absence of asbestos fibers, with new extracellular proteins being induced and others being repressed following incubation with the fibers (Figure 5).

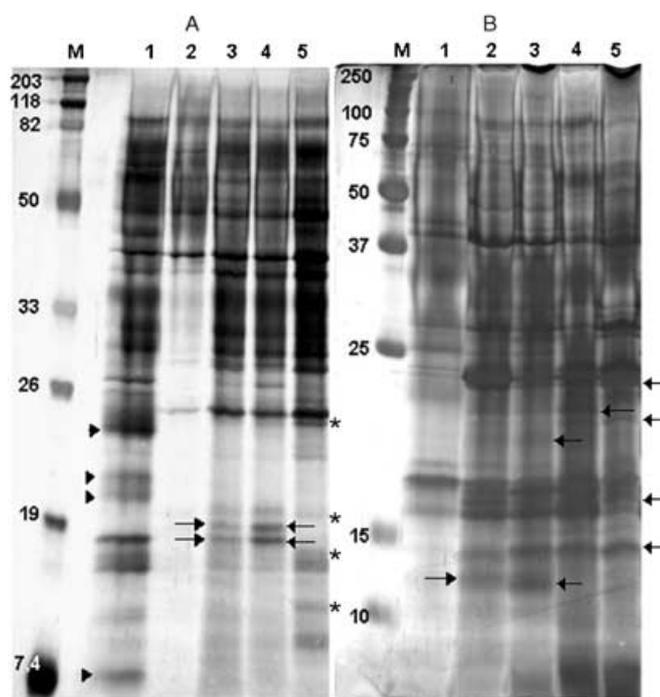


Figure 5. Extracellular protein profiles of *F. oxysporum* grown in Czapek glucose medium in the absence of fibers (lane 1) or in the presence of different kinds of asbestos (lane 2: chrysotile; lane 3: amosite; lane 4: crocidolite; lane 5: heated crocidolite). Mycelia were grown either in direct contact with the fibers (A) or separated from the fibers by a dialysis membrane (B). After SDS PAGE separation of the culture filtrates, proteins were visualized by silver staining. M = molecular weight marker. Arrowheads show proteins inhibited by the presence of the fibers, arrows show proteins induced in the presence of the fibers, and asterisks show proteins expressed after growth in direct contact with heated crocidolite.

The protein patterns of samples grown in direct contact with crocidolite and amosite were very similar, while the sample grown with heated crocidolite showed peculiar protein bands (between 10–28 KDa). The sample grown in direct contact with chrysotile shows a lower intensity of protein bands than the other samples, probably due to minor protein precipitation, since the amount of proteins measured by the Bradford assay in the culture medium before precipitation is comparable to the other samples (data not shown). Conversely, the extracellular protein patterns observed after incubation with fibers kept in a dialysis membrane, and thus not in direct contact with the mycelium, did not show substantial differences among the different types of asbestos,

either natural or thermally modified. However they did reveal several induced bands that were not expressed in the control mycelia.

Isoelectric focusing followed by SDS PAGE and Western blotting with an antibody raised against manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) identified a band at just under 33 KDa in the basic fractions of the culture medium of *F. oxysporum* grown in the presence of crocidolite (Figure 6A). The SOD enzymes are involved in the cell's re-

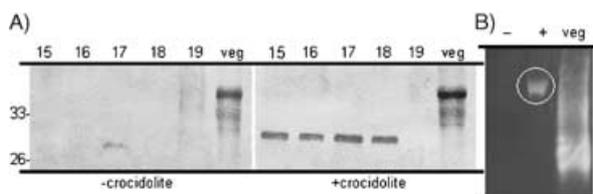


Figure 6. A) Western blot analysis of isoelectric focusing basic fractions (pH 6.5–9) of the culture media of *F. oxysporum* grown in the presence or absence of crocidolite. The Mn-SOD antibody recognized a band at 26–33 KDa only in the sample treated with crocidolite. B) Native gel electrophoresis showed SOD activity in a filtered culture medium of *F. oxysporum* grown in the presence (+), but not in the absence (–), of crocidolite. Veg: purified vegetal SOD (Sigma) as a positive control.

sponse to oxidative stress and catalyze the dismutation of the superoxide  $O_2^{\cdot-}$  radical into water and dioxygen. The presence of SOD activity in the culture medium of *F. oxysporum* grown with crocidolite was also verified by native gel electrophoresis (Figure 6B), according to the method reported by Beauchamp and Fridovich.<sup>[28]</sup>

## Discussion

**Fungal growth:** Several factors are involved in asbestos toxicity to humans, including free radical generation and damage to biomolecules. Such reactions do not appear to affect *F. oxysporum*. Its growth was not inhibited by any of the types of asbestos tested, so the fibers seem not to be harmful to fungal microorganisms. This may be due to the physical resistance of the hyphae cell wall or to radical scavenging systems, which are already known for some fungal strains.<sup>[29,30]</sup>

**Fungi driven depletion in iron content of the various asbestos fibers:** The different types of asbestos are all poorly soluble minerals, but organic chelators can extract iron ions from the surface of the fibers and take them into solution. Such a process is regulated by, besides the chemical nature of the chelator, several features of the mineral including fiber micromorphology, surface area, chemical composition, and coordination and oxidation state of iron.<sup>[1,3,6]</sup>

The extent of soil-fungi-mediated iron extraction also depends on the type of asbestos tested. Different asbestos minerals in fact contain a different amount of iron, have different crystalline structures, and consequently have different

surface topology. Table 2 shows the relationship between these factors and the amount of iron removed by *F. oxysporum*. Amosite and crocidolite contain a similar amount of iron, much greater than chrysotile (Table 1). Crocidolite has a larger surface area than amosite, which accounts for the larger amount of iron extracted by the fungus under the same conditions. Heating crocidolite at 800 °C, which does not obviously modify the amount of iron within the fibers, lowers the extent to which iron ions are being removed from the fiber. Heating reduces the extension of the surface area (Table 1) following sintering and yields to a greater engagement of the iron ions with the silica framework. A reduction in the exposed surface as well as in the fraction of poorly coordinated surface ions, which are the first to be removed,<sup>[31]</sup> may account for the reduced mobilization of iron on the heated fibers. As the reduction in iron removal is larger than that expected as a consequence of the lower amount of exposed surface, we assume that the thermal treatment also reduces the accessibility of the chelators to the iron ions.<sup>[27]</sup>

Finally, although chrysotile contains iron only as a non-stoichiometric component, that is, to much lesser extent than the two amphiboles considered, the extraction from this fiber was much greater than expected, both because of the wide surface area exposed and the open serpentine structure, where the brucite layers  $[Mg(OH)_2]$ , in which iron replaces magnesium, are largely accessible.<sup>[14]</sup> If the amount of solubilized iron is expressed as a ratio between the iron extracted and the iron contained in the fiber (Table 2), the ranking is chrysotile > crocidolite > amosite > heated crocidolite.

The question arises of which factors, in an open system such as would occur in nature, would limit the process of iron extraction. The prolonged incubation of crocidolite with *F. oxysporum*, for as long as allowed by the culture-system volume (Figure 2), reveals that iron release may take place over a long period of time (56 days) and would have proceeded further if the fungal growth had not been limited. The shape of the curve shown in Figure 2 suggests a mechanism of iron removal involving three steps. In fact, iron removal proceeds at an approximately constant rate for the first 20 days, maybe involving the surface iron ions that are more readily available to the chelators. Iron concentration in the supernatant then levels off until the 45th day, when it starts to rise again. This suggests that progressive iron removal leads, after several weeks, to a collapse of the structure, observed as a sharp increase in iron concentration. The removal, in this long-term experiment, of more iron than is expected to be at the surface is consistent with a diffusion of ions from the bulk solid towards the surface depleted of iron by fungal activity, in a similar manner to that previously observed in the case of prolonged asbestos incubation with desferrioxamine.<sup>[6]</sup>

The incubation of fibers in a desferrioxamine solution showed a remarkable difference between fibers preincubated in the presence and absence of the fungus. Even when the fungus had already removed some surface iron, how-

ever, desferrioxamine could continue the removal process, a result confirming that if the fibers could be treated with a continuous source of chelators the iron extraction would proceed.

Soil fungi have developed several systems to take into solution and to absorb in the mycelium poorly soluble forms of iron, which is an essential element. Chelator release is one of these iron-interaction strategies, which is likely to mediate iron mobilization from asbestos. Indeed, a previous paper showed the release of specific (siderophores) and aspecific (organic acids) chelators into the culture medium by soil fungi growing with asbestos.<sup>[24]</sup> Taken together all these data suggest that fungal chelators secreted in soils may have an effect similar to desferrioxamine in vitro and may be continuously produced by mycelia growing close to asbestos fibers.

**Modification of the surface reactivity of the fibers after contact with fungi in culture:** The role played by iron in asbestos reactivity and toxicity is well established.<sup>[8,9,19]</sup> Iron chelators reduce free radical release from asbestos,<sup>[5,14]</sup> although no direct correlation may be established between the amount of iron removal and the reactivity at the fiber surface, which depends not only on the amount of surface iron but also on its coordination and oxidation state and on the fiber micromorphology.<sup>[15,27,32,33]</sup>

The incubation with *F. oxysporum*, similarly to the treatment with chelators, causes a decrement in HO<sup>•</sup> release, with some differences among the different asbestos types examined. In the case of crocidolite and chrysotile, iron removal by the fungus fully blunted HO<sup>•</sup> radical activity. With amosite, iron cycling at the surface gave somewhat inconsistent results; however, it was shown that contact with the fungus interfered with HO<sup>•</sup> release. The differences in the HO<sup>•</sup> radical activity for the various asbestos types may be ascribed to variations in the redox and coordination states of surface iron due to the different bulk composition (Fe<sup>III</sup>/Fe<sup>II</sup> in crocidolite, Fe<sup>II</sup> in amosite). In particular, it was reported that amosite has about twice the amount of redox active iron that crocidolite has.<sup>[34]</sup> Crocidolite heated at 800 °C loses its potential to generate HO<sup>•</sup>.<sup>[27,35]</sup> However, following incubation with the fungus, similarly to the results with amosite, this potential was partially restored in some cases and not in others (data not shown). The variability observed with amosite and heated crocidolite, on the one hand, confirms the capability of the fungus to modify the surface status of iron in asbestos and, on the other hand, suggests that, alongside modification, the potential to generate HO<sup>•</sup> may be depressed or enhanced by subtle surface reactions progressively taking place during iron removal.<sup>[31]</sup> We may however expect that in the long term, when almost all iron will be removed, no HO<sup>•</sup> release will take place on what will remain of the original fibers. Radical scavenging has been related with reduction of in vitro DNA damage and lipid peroxidation and, thus, in an overall decrement in the toxic potential of the fibers.<sup>[2,16,17,36,37]</sup>

**Biochemical response of fungi to asbestos fibers: Modification in protein expression:** The modification in protein expression following interaction with asbestos may be a fungal response either to physical contact with the fibers or to a possible oxidative stress caused by the fiber or by mobilized iron. The SEM analysis of mycelia grown in direct contact with the fibers showed the physical integrity of hyphae;<sup>[25]</sup> thus, the extracellular protein pool changes in the presence of fibers are likely to be due to active synthesis. Protein induction or inhibition due to stress is reported in several studies on fungi and other microorganisms,<sup>[38–41]</sup> particularly for metal-induced stress, for example, extracellular protein induction in ericoid fungi grown in the presence of zinc.<sup>[42]</sup>

The samples grown in the presence of chrysotile, amosite, and crocidolite, either in direct contact with the mycelium or kept in a separated chamber, show a similar profile of protein expression which is different from the control samples. However, the direct contact of mycelia with heat-modified crocidolite leads to a peculiar protein profile, not seen when the same fiber is separated from the mycelium by a membrane. This indicates that, in the case of a physical interaction between hyphae and fibers, the fungal metabolic response, here observed as protein expression, depends on the surface characteristics of the fibers, more than on their mere bulk chemical composition. Phenomena of surface recognition by fungi have already been observed.<sup>[43–45]</sup>

The induction of superoxide dismutase activity, identified as coming from Mn-SOD by Western blotting with a specific antibody, was in agreement with that previously obtained with *Geomyces pannorum* var. *pannorum*.<sup>[25]</sup> Superoxide dismutases are oxidative-stress response enzymes: Mn-SOD expression is increased in rat lung epithelial cells after asbestos-fiber inhalation<sup>[46]</sup> and in vitro treatment of human lymphocytes with SOD inhibited cell death due to previous crocidolite incubation.<sup>[47]</sup> In this respect, mammals and fungal cells seem to have developed a homologous reaction in the presence of asbestos fibers.

## Conclusion

Appropriate remediation routes for asbestos fibers dispersed in soil are still lacking. Soil fungi may provide an “environmental friendly” bioremediation approach, by continuously releasing chelators into the soil, close to the fibers, which is one of the strategies they naturally employ to extract metal ions from their substrate.

The development of environment-decontamination strategies requires a profound knowledge of the complexity of the interaction between the variety of asbestos fibers and mycelia. The present study shows, on the one hand, that the same fungus induces different modifications on various asbestos forms and, on the other hand, that the metabolic fungal response is strongly influenced, not only by the crystallo-chemical structure of the fibers but also by their surface state.

None of the fiber types inhibit fungal growth. The three fibers considered are largely depleted in their iron content, with a remarkable decrease in their potential to release free radicals. The amount of iron extracted by the fungus and the consequent variation in fiber reactivity, including the occasional variability of this result, however, depends on the physico-chemical characteristics of the fibers.

The present study shows that, in the very long term, with all forms of asbestos, iron depletion would involve modifications in the crystal and chemical nature of the mineral, with consequent inactivation of the fibers. The time required, however, would be different for the various forms, with chrysotile being more likely to be rapidly modified, due to the larger accessibility of the metal ions to the chelators.

The chemical and biochemical approach followed gives some insight into the peculiar interaction between a living remediation agent and an inorganic contaminant, but many points have still to be investigated before the application of this approach in the field. A crucial step will be to find out whether the fungi are able to modify asbestos fibers dispersed in a complex natural matrix, such as real soil. More knowledge is required on the chemical nature of the chelating molecules involved in iron removal from the fibers and on their strength and affinity for iron and for the other metal ions in the fibers (mainly magnesium). Finally, the fibers submitted to such treatment with soil fungi should be tested for their toxic potential (for example, cytotoxicity, genotoxicity) in cellular systems and validated *in vivo*, to verify whether, as is reasonably expected, toxicity correlates with the chemical modification induced in the fibers by the fungi.

## Experimental Section

**Asbestos fibers:** Two types of amphibole asbestos fibers, crocidolite and amosite from Union International Contre le Cancer (UICC), and a serpentine asbestos, chrysotile UICC A (Rhodesian) were used. In all cases the asbestos fibers were suspended and dispersed in distilled water (1.84 g per 80 mL), prior to addition to the fungal cultures. The chemical formulae and the Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface areas of these different asbestos types are reported in Table 1.

**Thermal treatment of the fibers:** Crocidolite fibers were heated in air at 800°C for 3 h. The fibers were then cooled, suspended, and dispersed in distilled water (1.84 g per 80 mL) with the same procedure as that reported above.

**Fungal isolate:** The soil fungus *Fusarium oxysporum*<sup>[48]</sup> was chosen because of its good growth rate in the presence of crocidolite fibers and its effectiveness in iron extraction as reported in previous experiments.<sup>[24–25]</sup>

**Culture conditions:** Fungi were grown on liquid Czapek mineral medium supplemented with 2% (w/v) glucose (Carlo Erba, Milano, Italy). Czapek medium contained NaNO<sub>3</sub> (3 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.31 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g L<sup>-1</sup>), KCl (0.5 g L<sup>-1</sup>), and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.01 g L<sup>-1</sup>) and was adjusted to pH 5.5 with 2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid (MES, 20 mM). Asbestos fibers were suspended in distilled water and autoclaved. After sterilization, an aliquot of the suspension (8.7 mL), shaken on a vortex to keep it homogeneous, was added to the culture medium (80 mL) and inoculated with the fungus. A larger batch culture system (500 mL of culture medium instead of 80 mL) was also used, but the ratio between the fibers and the volume of the liquid medium was maintained by adding 50 mL of suspension. In order to recover the asbes-

tos fibers after exposure to the fungal activity, the suspension was sometimes separated from the mycelium by a dialysis membrane (cut off 12000–14000 Da) when added to the culture medium. A corresponding area of dialysis membrane was added to all samples, including the control samples that were run in parallel with the fungal mycelium growing in the same medium in the absence of the fibers. The fungal cultures were grown at 25°C with shaking at 120 rpm for up to 20 days. Cultures were then filtered in a Buchner funnel and the mycelium was dried at room temperature and then weighed to obtain the biomass value. For fungal cultures growing in direct contact with the crocidolite fibers, the amount of fibers in the fungal biomass was estimated by running parallel samples containing only the culture medium and the added fibers. These samples (three replicates) were filtered along with the experimental cultures, and the weight of the fibers collected after filtration was subtracted from the biomass obtained for the fungal cultures.

Aliquots of the culture medium were used to measure iron concentration and for SDS PAGE analysis. At least three replicates were used for each set of experimental conditions.

**Spectrophotometric determination of the iron concentration in the supernatant:** The concentration of iron in the culture supernatant after incubation of asbestos fibers with the fungal mycelium was determined spectrophotometrically by measuring the formation of the violet-colored Fe<sup>2+</sup>–3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid (ferrozine, Sigma) complex at 562 nm by using a Uvikon 930 spectrophotometer, according to the method proposed by Lund and Aust.<sup>[1,24]</sup> The sensitivity of this detection method is around 1–2 μM.

**Iron extraction by desferrioxamine:** Untreated crocidolite fibers and a certain amount of crocidolite fibers preincubated with *F. oxysporum* were suspended (1 mg mL<sup>-1</sup>, final volume 200 mL) in 0.15 M NaCl solution (pH 4.5) containing 1 mM desferrioxamine B mesylate at 37°C, and the mixture was continuously shaken in the dark. The pH value was readjusted at regular time intervals throughout the incubation period to prevent alteration in the rates of iron mobilization with NaOH or HCl solutions. Aliquots of 2.50 mL were taken, at regular time intervals, and centrifuged at 5000 rpm to separate the supernatant from the fibers. The concentration was determined by measuring the absorbance of the Fe<sup>3+</sup>–desferrioxamine complex at 428 nm by using a Uvikon 930 UV/Vis spectrophotometer.

**Determination of the total iron in chrysotile:** Since iron is present in chrysotile fibers as a magnesium substitute, various chrysotile samples contain very different amounts of iron. The amount of iron contained in the chrysotile used was determined by measuring the formation of the Fe<sup>2+</sup>–ferrozine and the Fe<sup>3+</sup>–desferrioxamine complexes at 562 and 428 nm, respectively, (with a Uvikon 930 spectrophotometer) after dissolving mineral (100 mg) in 27.5 M hydrofluoric acid (10 mL) and distilled water (50 mL).

**Free radical detection by means of the spin-trapping technique:** The HO• radical generation upon incubation of fibers (30 mg) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.196 M) and phosphate buffer (0.5 M) solution was detected by using the spin-trapping technique with 0.15 M DMPO as the trapping agent, as described in previous papers.<sup>[5]</sup> The radical adducts formed, DMPO/OH•, were monitored by EPR spectroscopy with a PS100.X Adani EPR spectrometer. The number of radicals released is proportional to the intensity of the EPR signal measured by double integration. Kinetics of free radical generation were followed for up to 30 min.

**Protein analysis:** Aliquots of the culture media (200 μL or 16 mL depending on gel size) were analyzed by SDS PAGE to reveal the pattern of secreted proteins. Before loading, proteins were precipitated with 100% trichloroacetic acid (TCA)/0.4% deoxycholic acid (DOC) and acetone according to the protocol of Perotto et al.<sup>[49]</sup> After electrophoresis, performed according to the method of Laemmli<sup>[50]</sup> on 10% and 12.5% acrylamide separating gels, proteins were revealed by silver staining. The concentration of proteins in the culture media was detected by using the Bradford assay.<sup>[51]</sup>

**Western blotting:** After SDS PAGE, proteins were blotted on nitrocellulose paper (Highbond C-super, Amersham) under an electric field by using the MINI TRANS-BLOT Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad). The blot was carried on for 50 min at 100 V. The protein Mn-SOD was

detected by an anti-Mn-SOD antibody (raised in rabbit, EnVirtue) and an anti-rabbit secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase (Sigma).

**Liquid isoelectric focusing (Rotofor):** Culture filtrates were concentrated about 10-fold by using a rotary evaporator system (Rotavapor) and were dialyzed for 24 h against water at 4°C. An aliquot of 50 mL was subjected to liquid-phase preparative isoelectric focusing (IEF) in a BioRad Rotofor system, for 4 h at constant power (12 W), with BioLyte ampholines (BioRad, pH range 3–10 (4% v/v)). The pH value was measured for each Rotofor fraction before protein precipitation, separation by SDS PAGE, and Western blotting.

**Superoxide dismutase activity:** Proteins from filtered liquid culture were separated on 10% polyacrylamide gel in native conditions according to the method of Davis.<sup>[52]</sup> The loading buffer (tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)/saccharose), was added to the samples (1:5 v/v) before electrophoresis. The running conditions were 15 mA in running buffer (Tris/glycine at pH 8.3). The superoxide dismutase (SOD) enzyme activity was revealed directly on the gel, as reported in Beauchamp and Fridovich.<sup>[28]</sup>

**Statistical analysis:** Statistical analysis of data was performed by using the program one-way ANOVA with the Tukey test as a post-hoc test.

## Acknowledgements

The research has been carried out with the financial support of Regione Piemonte, "Direzione regionale 22, Tutela e Risanamento Ambientale—Programmazione—Gestione Rifiuti", in the context of a multidisciplinary project "Asbestos hazard in Western Alps". S.D. is the recipient of a doctoral fellowship and M.T. of a postdoctoral fellowship from Regione Piemonte within the framework of the project. We are also indebted to Dr. L. Prandi for help with part of the experimental work.

- [1] L. G. Lund, A. E. Aust, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278*, 60–64.
- [2] A. E. Aust, L. G. Lund, *Biol. Oxidation Syst.* **1990**, *2*, 597–605.
- [3] J. Werner, M. F. Hochella, G. D. Guthrie, J. A. Hardy, J. D. Rimstidt, *Am. Mineral.* **1995**, *80*, 1093–1103.
- [4] L. Mollo, E. Merlo, E. Giamello, M. Volante, B. Fubini in *Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres*, Vol. 85 (Eds.: J. M. G. Davis, M. C. Jaurand), NATO ASI series, Springer, Heidelberg, **1994**, pp. 425–432.
- [5] B. Fubini, L. Mollo, E. Giamello, *Free Radical Res.* **1995**, *23*, 593–614.
- [6] L. Prandi, M. Tomatis, N. Penazzi, B. Fubini, *Ann. Occup. Hyg.* **2002**, *46*, 140–143.
- [7] A. B. Kane in *Mechanisms of Fibre Carcinogenesis*, Vol. 140 (Eds.: A. B. Kane, P. Boffetta, R. Saracci, J. D. Wilburn), International Agency for Research on Cancer (IARC) Scientific Publication, Lyon, **1996**, p. 11.
- [8] D. W. Kamp, S. A. Weitzman, *Thorax* **1999**, *54*, 638–652.
- [9] J. A. Hardy, A. E. Aust, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 97–118.
- [10] A. Shukla, M. Gulumian, T. K. Hei, D. Kamp, Q. Rahman, B. T. Mossman, *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34*, 1117–1129.
- [11] S. A. Weitzman, P. Graceffa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *228*, 373–376.
- [12] R. Zalma, L. Bonneau, J. Guignard, H. Pezerat, M. Jaurand, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2338–2341.
- [13] B. Fubini, *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105*, 1013–1018.
- [14] B. Fubini, C. Otero Arean, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 373–381.
- [15] J. Gold, H. Amandusson, A. Krozer, B. Kasemo, T. Ericsson, G. Zanetti, B. Fubini, *Environ. Health Perspect.* **1997**, *105*, 1021–1030.
- [16] C. C. Chao, A. E. Aust, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *308*, 64–69.
- [17] S. A. Weitzman, A. B. Weitzberg, *Biochem. J.* **1985**, *225*, 259–262.
- [18] I. Poser, Q. Rahman, M. Lohani, S. Yadav, H. H. Becker, D. G. Weiss, D. Schifflmann, E. Dopp, *Mutat. Res.* **2004**, *559*, 19–27.
- [19] E. Gazzano, E. Foresti, I. G. Lesci, M. Tomatis, C. Riganti, B. Fubini, N. Roveri, D. Ghigo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, in press.
- [20] G. M. Gadd, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 271–279.
- [21] S. Hadlington, *Chem. World* **2004**, *1*(5), 34–39.
- [22] K. Watanabe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 237–241.
- [23] G. M. Gadd, *Adv. Microb. Physiol.* **1999**, *41*, 47–92.
- [24] E. Martino, L. Prandi, I. Fenoglio, P. Bonfante, S. Perotto, B. Fubini, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 229–232; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 219–222.
- [25] E. Martino, S. Cerminara, L. Prandi, B. Fubini, S. Perotto, *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 938–944.
- [26] B. T. Mossman, J. Bignon, M. Corn, A. Seaton, J. B. L. Gee, *Science* **1990**, *247*, 294–301.
- [27] M. Tomatis, L. Prandi, S. Bodoardo, B. Fubini, *Langmuir* **2002**, *18*, 4345–4350.
- [28] C. O. Beauchamp, I. Fridovich, *Anal. Biochem.* **1971**, *44*, 276–287.
- [29] L. Liu, R. P. Tewari, P. R. Williamson, *Infect. Immun.* **1999**, *1*, 6034–6039.
- [30] V. Chaturvedi, B. Wong, S. L. Newman, *J. Immunol.* **1996**, *156*, 3836–3840.
- [31] G. Martra, M. Tomatis, I. Fenoglio, S. Coluccia, B. Fubini, *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 328–335.
- [32] I. Fenoglio, L. Prandi, M. Tomatis, B. Fubini, *Redox Rep.* **2001**, *6*, 235–241.
- [33] B. Fubini, L. Mollo, *Toxicol. Lett.* **1995**, *82–83*, 951–960.
- [34] Z. Shen, V. D. Parker, A. E. Aust, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 307–311.
- [35] C. Otero Arean, F. Barcelo, I. Fenoglio, B. Fubini, F. X. Llabres i Xamena, M. Tomatis, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 211–216.
- [36] L. G. Lund, A. E. Aust, *Carcinogenesis* **1992**, *13*, 637–642.
- [37] A. Xu, H. N. Zhou, D. Z. L. Yu, T. K. Hei, *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 1003–1008.
- [38] C. S. Cobbet, *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 825–832.
- [39] D. H. Hammer, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 913–951.
- [40] K. Vido, D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M. B. Toledano, J. Labarre, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8469–8474.
- [41] H. Esvan, J. Minet, C. Laclie, M. Cormier, *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *55*, 151–155.
- [42] E. Martino, B. Franco, G. Piccoli, V. Stocchi, S. Perotto, *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, *231*, 179–185.
- [43] J. Z. Xiao, T. Watanabe, S. Sekido, W. B. Choi, T. Kamakura, I. Yamaguchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *1*, 1225–1229.
- [44] N. D. Read, L. J. Kellock, T. J. Collins, A. M. Gundlach, *Planta* **1997**, *202*, 163–170.
- [45] T. C. Jelitto, H. A. Page, N. D. Read, *Planta* **1994**, *194*, 471–477.
- [46] J. A. Holley, Y. M. Janssen, B. T. Mossman, D. J. Taatjes, *Am. J. Pathol.* **1992**, *141*, 475–485.
- [47] A. Ueki, *Ind. Health* **2001**, *39*, 84–93.
- [48] M. Girlanda, S. Perotto, Y. Moenne-Loccoz, R. Bergero, A. Lazzari, G. Defago, P. Bonfante, A. M. Luppi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1851–1864.
- [49] S. Perotto, V. Cometti, J. D. Coisson, I. Perugini, P. Bonfante in *Myrcorrhizae Manual Book* (Ed.: A. Varma), Springer Verlag, Heidelberg, **1998**, pp. 187–215.
- [50] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *222*, 680–685.
- [51] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [52] B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121*, 404–427.
- [53] C. H. Gorski, L. E. Stettler, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **1974**, *35*, 345–353.

Received: January 14, 2005  
Published online: July 15, 2005

*...hai almeno fatto finta di sfogliare la tesi prima di cercare il tuo nome qui???*  
*Ho incrociato un sacco di belle persone in questi anni, non posso citarle tutte!*

*Un grazie speciale va a...*

*Elena, perché di sicuro si trova più a suo agio su questa pagina che sulla prima!*

*A Simona per il confronto continuo, i momenti belli e quelli di "over thinking"*

*A Emanuela, Florinda e Erik..che mi hanno sopportato in questi anni*

*A Claude per il concreto aiuto nell'affrontare "la Francia", a Marta per le barzellette (raccontate e vissute!), a Marco (che per fortuna non sa mai cosa penso) e agli altri del lab.*

*A Elena, Mara, Federico, Francesco, Johnny l'altro Francesco e tutto il terzo piano, che sono gli unici che mi fanno piangere dal ridere*

*A Chiara Sergio e Elisa, con cui ho condiviso sprazzi della (loro) disponibilità*

*A tous ceux qui j'ai connu au LAN, mais surtout à mes copains de bureau, Caroline et JF.*

*Alle mie preziosissime amiche...MarioSaverioPatrizioeiNani, ossia...Elena, Clara, Doriana, Paola(&Massi)*

*Ad Ale...per la condivisione di 6 mesi di Francia, e di tutto il resto*

*A Erica...che mi incoraggia sempre a seguire i miei sogni*

*Ai miei e a Luca, che conoscono il peggio e il meglio di me, e nonostante ciò mi vogliono bene.*

*Grazie!!!!*