

## 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>, 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  
Università 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.*

**Daghino S., Vurro E., Ghirlanda M., Martino E., Fubini B., Perotto S. - 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 simbiotici 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> <i>var. vinaceus</i>	Cape Flora, Norvegia	Bergero <i>et al.</i> , 1999
4. <i>Geomyces pannorum</i> <i>var. 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 OH• 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 solubilizzazione del ferro effettuati con i primi 10 ceppi fungini scelti hanno rivelato la capacità di tutti gli isolati selezionati di crescere in pre-

senza 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 solubilizzare 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).

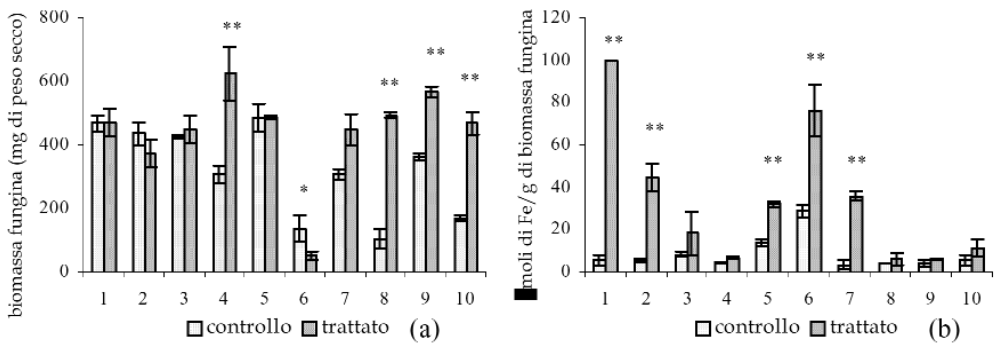


Fig. 1 – a) Crescita fungina misurata come mg di peso secco in assenza (controlli) ed in presenza (trattati) di fibre di crocidolite. Ad eccezione del ceppo *O. griseum*, tutti i funghi analizzati non mostrano una inibizione significativa della crescita in presenza del materiale asbestiforme. Al contrario la crocidolite provoca un incremento significativo della crescita per alcuni dei ceppi studiati. b) Solubilizzazione 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 culturale 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 I.

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. 2 b).

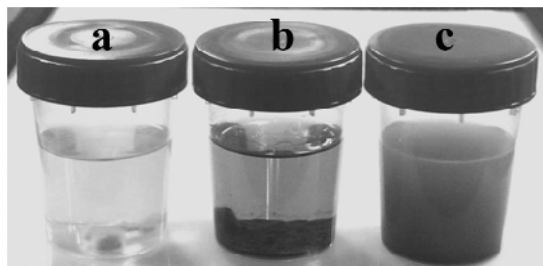


Fig. 2 – Esempio del sistema di coltura utilizzato: (a) campione di controllo cresciuto in assenza di fibre, (b) campione cresciuto nel terreno addizionato di fibre di crocidolite, (c) fibre addizionate al mezzo di coltura in assenza del fungo. Le fibre di amianto (diametro medio 1.5-4 mm) formano una 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). È 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 questo

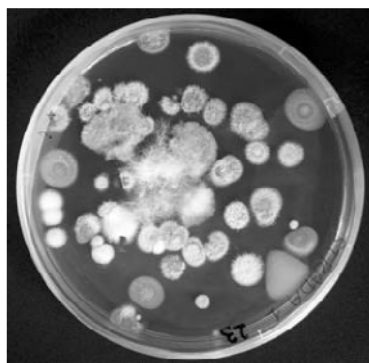


Fig. 3 – Esempio di piastra derivante dagli esperimenti di isolamento della popolazione fungina del suolo serpentinitico della ex cava di Balangero tramite il metodo delle dilution plates. Sono visibili numerose e differenti colonie fungine per le quali si procede poi all'identificazione ed all'isolamento in coltura pura.

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 *V. leptobactrum*, *A. fumigatus*, *P. 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).

La solubilizzazione del ferro 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 solubilizzazione 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 solubilizzare 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.*, in preparazione), 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 solubilizzare 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 *V. leptobactrum*, 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. Psychrooligotrophic 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 chanced 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 hgprt-, gpt+ 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.
- 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 notevolmente 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 *V. leptobactrum*. I ceppi isolati verranno utilizzati per prove di crescita in presenza di asbesto e per studiarne l'eventuale capacità di solubilizzare ioni metallici dalle fibre.

## RÉSUMÉ