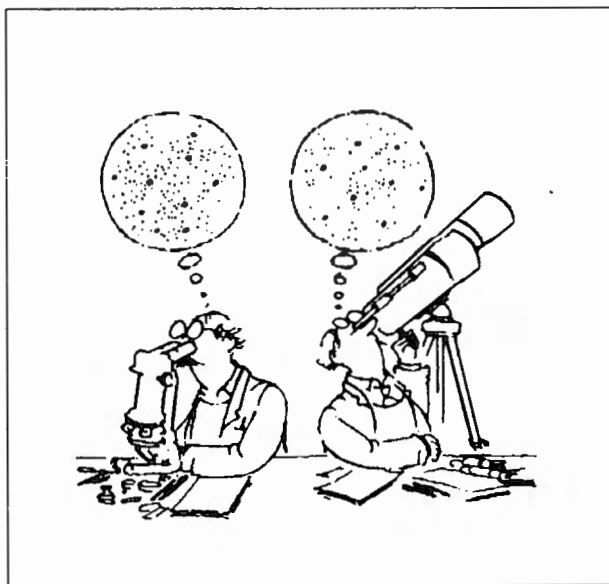


L'INTERVISTA



AGRICOLTURA E AMBIENTE: RIFLESSIONI SULLA DIFFUSIONE DI MICRORGANISMI INGEGNERIZZATI

Intervista al professor PIERLUIGI MANACHINI^(*)

di Rossella Azzoni



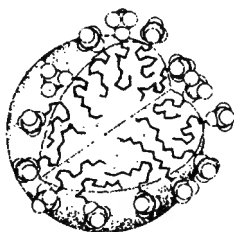
E' convinzione generale che la maggior parte dei rischi umani e ambientali legati all'uso dei pesticidi sia ancora ignota. Nel contempo, però, sembrano crescere anche le perplessità relative ad alcuni metodi di lotta biologica, soprattutto quelli che utilizzano organismi modificati geneticamente. Pensa che rappresenti un reale rischio per l'uomo la diffusione di microrganismi ingegnerizzati ?

Innanzitutto va chiarito cosa si intende per microrganismo geneticamente modificato. Per convenienza, ogni specie microbica è rappresentata da un ceppo di riferimento detto anche ceppo "type". Tutti i ceppi simili a quello "type" ma che presentano alcune differenti caratteristiche fenotipiche quale espressione di variazioni a livello genetico sono dei ceppi modificati geneticamente. Ciò può accadere attraverso mutazioni spontanee e/o indotte, processi di ricombinazione naturale, manipolazioni da parte dell'uomo che opera direttamente in modo mirato sul patrimonio genetico.

Vi sono quindi ceppi geneticamente modifi-

^(*) ordinario di Microbiologia ed Immunologia - Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche - Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano.

cati naturalmente, altri "prodotti" dall'uomo attraverso mutagenesi indotta oppure intervenendo con le tecniche del DNA ricombinante. Non va dimenticato, però, che gli interventi umani in un determinato ambiente possono creare artificiali condizioni di selezione che, in ultima analisi, risultano favorire lo sviluppo e la diffusione di un ceppo microbico, modificato e non, rispetto ad altri.



Intende dire che la diffusione e lo sviluppo massivo di un microrganismo in un determinato habitat comporta essenzialmente gli stessi rischi, indipendentemente dal fatto che il ceppo predominante sia il risultato di eventi che hanno

provocato variazioni a livello di patrimonio genetico o sia una forma non modificata, prima non presente oppure presente in entità insignificanti?

Rifletta sul fatto che l'equilibrio di un habitat è di tipo dinamico e che è in stretta correlazione con vari fattori, sia biotici che abiotici. Un campo coltivato, un orto, un frutteto, un prato polifita poliennale, una risaia, una marcita, un pascolo curato, rispetto a una prateria, un bosco, una palude naturali, sono degli habitat profondamente modificati sia in termini fisico-chimici che biologici.

L'intervento antropico ha determinato una profonda opera selettiva e benchè non vi sia stata una volontaria diffusione, si è instaurato e si è sviluppato -in un certo senso massivo- un tipo di microflora rispetto ad un'altra popolazione microbica. Certamente l'impatto è stato per lo più diluito nel tempo, e nel tempo le molte e profonde variazioni che ha subito l'ambiente sono state in molti casi accettate; in molti altri casi si sono risolte in vere e proprie catastrofi ecologiche i cui prodromi si possono far risalire anche a migliaia di anni or sono. Le stesse rotazioni agrarie sono da considerare come interventi antropici che modificano pesantemente i rapporti tra i vari componenti della microflora del suolo.

Sempre a livello di microflora, seppur con variazioni quanti-qualitative assai differenti, si hanno modifiche con la monocultura, le colture intensive, le colture estensive. E' noto che talune tecniche agronomiche possono anche favorire l'instaurarsi e lo sviluppo di microflora fitopatogena.

Così l'addomesticamento del bestiame e lo sviluppo delle tecniche zootecniche e di selezione hanno profondamente modificato il quadro della fauna e della flora originali con prevedibili conseguenze anche sulla microflora. E' sufficiente -praticamente- il passaggio dall'allevamento brado a quello stabulato, alla produzione e all'impiego del letame. L'abbinamento delle colture agrarie con l'allevamento e la presenza di eventuali industrie trasformatrici sono altri motivi di modifica dell'ambiente e quindi della microflora.

Vi sono stati e vi sono tutt'oggi, quindi, interventi indiretti dell'uomo sull'ambiente che provocano profonde modifiche relativamente ai rapporti quanti e qualitativi tra i vari componenti biotici, microflora compresa; e queste modifiche si possono anche manifestare in tempi brevi in funzione dell'entità della "pressione modificatrice" dell'intervento. Sono casi indotti sia lo sviluppo e la diffusione di ceppi geneticamente modificati anche se non direttamente dall'uomo sia quello di ceppi diversi ma non necessariamente modificati geneticamente.



L'immissione, la diffusione, lo sviluppo di un microrganismo manipolato geneticamente al fine di favorire o difendere una produzione agraria quali rischi può portare ?

Certamente potrebbe determinare una rapida e profonda differenziazione soprattutto dei rapporti tra i diversi soggetti della componente biologica. Possiamo tuttavia ipotizzare

modifiche della stessa "entità" di quelle che si realizzano quando una coltura che da tempo insiste sullo stesso terreno viene sostituita da un'altra coltura: basti pensare ad un prato permanente, ad una marcita sostituiti dalla coltura di una leguminosa o di un cereale, o all'impianto di un frutteto con le conseguenti variazioni tecniche di coltivazione (lavori, concimazione, trattamenti, natura delle acque di irrigazione, ecc.)

Per evitare "catastrofi" ecologiche è necessario che il ceppo modificato da diffondere non sia fitopatogeno, non produca sostanze tossiche che possano contaminare i prodotti, non alteri l'equilibrio biologico del sistema favorendo lo sviluppo di forme dannose, pericolose sotto tutti i più disparati aspetti, anche quello igienico-sanitario.

Giova ricordare che nell'attività agricola la diffusione di ceppi modificati (per lotta biologica, fissazione dell'azoto atmosferico, prevenzione danni da gelate tardive, ecc.) avviene in ambienti ampi, aperti, difficilmente controllabili.



Quindi, di fronte al prepotente diffondersi delle tecniche che consentono di manipolare con una certa facilità il patrimonio genetico degli esseri viventi, occorre reagire con cautela.

Abbandonate le spinte puramente emotive, si deve riflettere sul fatto che -da quanto in precedenza detto- appaiono giustificati i timori che l'immissione massiva di un certo microrganismo in un determinato ambiente possa alterare profondamente e violentemente gli equilibri, seppur dinamici, che si sono stabiliti tra i vari componenti, biotici e abiotici, di quel determinato ambiente con una ipotizzabile eventuale compromissione definitiva dell'esistenza di quel complesso di effetti positivi che era stato raggiunto.

E soprattutto è giustificato il paventare

l'insorgere egemone di alcune forme di vita a detrimento di altre e lo stabilirsi di nuovi equilibri ed il manifestarsi di eventi che potrebbero risultare di grave danno sia per l'ambiente sia per lo "stato di salute", in senso lato, di tutti i suoi componenti biotici, uomo compreso.

Ed il timore è ancor più giustificato quando vi è il fortissimo sospetto che l'immissione massiva di una nuova forma microbica possa provocare rapide, violente, dannose modifiche all'ambiente. E' quindi di estrema importanza considerare il fattore "velocità" del manifestarsi delle variazioni.

Ovviamente le ipotesi di danno vanno verificate e si deve fare tutto quanto è possibile per prevederne l'evoluzione. Inoltre, sebbene attualmente si possa operare in modo mirato, non è possibile escludere a priori l'eventualità che vengano trasferite con l'informazione genetica utile anche caratteristiche genetiche cui corrispondono manifestazioni fenotipiche dannose.



Quali procedure dovrebbero essere seguite per valutare il rischio connesso con la diffusione volontaria di un microrganismo in un determinato ambiente?

Alcuni elementi sono indispensabili per poter acquisire il maggior numero possibile di informazioni suscettibili di essere utilizzate per formulare un parere valido, accettabile scientificamente. Le mie considerazioni si riferiscono alla diffusione di microrganismi ricombinati, benchè siano valide in parte anche per i ceppi mutati.

Si tratta di definire le principali caratteristiche possedute dai ceppi parentali e dal ceppo ricombinante al fine di disporre di adeguati parametri di valutazione. Particolare attenzione deve essere dedicata al ceppo ricevente

in quanto da esso deriverà il ceppo ricombinante.

Del ceppo ricevente e del ceppo donatore occorre conoscere il nome scientifico ed altre denominazioni; l'inquadramento tassonomico, l'indicazione del ceppo e la collezione di deposito, l'origine (nuovo isolamento, luogo dell'isolamento, collezione, se è un mutante, ecc.), la distribuzione ambientale e l'habitat naturale.

Del ceppo ricevente occorre inoltre conoscere le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e chimico strutturali di base (composizione parete cellulare, % GC, grado di riassociazione molecolare DNA/DNA, ecc.); la possibilità di sviluppare forme e strutture di resistenza (per es. endospore, sclerozi, ecc.); la presenza di plasmidi e loro eventuali funzioni caratterizzanti; la sensibilità ai fagi; la produzione di tossine, patogenicità per animali e per uomo, fitopatogenicità; la resistenza ad antibiotici di uso terapeutico umano o veterinario; la resistenza ad antiparassitari, insetticidi, ecc.; la presenza e stabilità delle caratteristiche fenotipiche e genetiche, in particolare di quelle che possono fungere da marcatori; la possibilità di esprimere processi naturali di ricombinazione genetica (coniugazione, trasformazione, trasduzione); la persistenza, lo sviluppo e la diffusione nell'ambiente naturale valutati anche attraverso la determinazione della velocità di crescita, e i processi riproduttivi manifestati. Per le forme eucariotiche è opportuno valutare l'incidenza ed il rapporto tra processo sessuale di riproduzione e quello di tipo vegetativo; la presenza e la consistenza del ceppo selvaggio nell'ambiente dove verrà diffuso il ceppo modificato; i rapporti del ceppo ricevente con la microflora e gli altri esseri viventi esistenti nell'ambiente di diffusione anche in funzione delle possibilità di scambio per via naturale di materiale genetico (ad es. è stato osservato che *E. coli* può ricombinare con una quarantina di organismi filogeneticamente affini); il ruolo svolto nell'ambiente (per es. degradazione di macromolecole, attacco di

molecole organiche di sintesi di difficile degradazione anche in rapporto alle esigenze per l'ossigeno); i possibili meccanismi di diffusione naturale e non (acqua, vento, vettori biologici: insetti, animali, uomo, ecc.); le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dell'ambiente di diffusione nonché destinazione produttiva ed insediamenti umani nella zona.

Per il ceppo geneticamente modificato valgono, in generale, le considerazioni fatte per il ceppo ricevente con particolare riguardo alle procedure di isolamento e alle caratteristiche di riconoscimento, alla stabilità delle caratteristiche introdotte o modificate, alla possibilità di processi di ricombinazione in natura, alla diffusione e sopravvivenza nell'ambiente in cui viene distribuito in rapporto alle pratiche agronomiche, alle variazioni stagionali, alla presenza di sostanze tossiche ed anche in relazione ai rapporti specie di tipo competitivo con altre forme viventi; al ruolo svolto nell'ambiente, all'interazione con il diretto partner bersaglio vivente, specie nel caso di lotta biologica.

Una delle procedure del DNA ricombinante si basa su processi di fusione tra protoplasti dei ceppi parentali: in questo caso le indagini prima elencate dovranno essere approfondite per entrambi i due ceppi che vengono impiegati per l'ottenimento del ricombinante per fusione.



In considerazione della diffusione in ambienti ampi e difficilmente controllabili, quali informazioni preliminari vanno assunte ?

Evidentemente in relazione alla natura del ceppo modificato ed allo scopo del suo rilascio dovranno essere attentamente valutati la posizione geografica, le dimensioni, le caratteristiche pedologiche, geologiche, climatiche, produttive, antropiche dell'area; in particolare devono essere considerate le caratteristiche

degli ecosistemi naturali e di quelli produttori limitrofi dove potrebbe diffondersi il microrganismo modificato, con particolare cura alla individuazione dei possibili rapporti con la flora e/o la fauna, uomo compreso.

Andranno valutati gli elementi (pioggia, vento, ecc.) e gli agenti (insetti, uccelli, ecc.) che possono fungere da vettori, da agenti di diffusione oltre l'habitat stabilità e le analogie e le differenze tra l'habitat dei ceppi coinvolti, specie per quello ricevente, e l'habitat dove sarà rilasciato il ceppo ricombinato.

Prima di procedere alla diffusione occorrerà stabilire quali sono gli eventuali interventi preparatori (aratura, diserbo, semina, ecc.) da eseguire prima delle operazioni vere e proprie di rilascio; descrivere le metodiche di diffusione e l'eventualità di dover operare successivi interventi (programmazione degli interventi) di rilascio del ceppo modificato, il tutto accompagnato dalla presentazione delle eventuali norme da seguire a salvaguardia della salute degli operatori; precisare la natura delle operazioni legate alle attività produttive e non che saranno effettuate dopo il rilascio.

Ovviamente, dovranno essere previsti controlli periodici per verificare che il ceppo modificato non stia diffondendosi anche all'esterno delle zone di rilascio; che non provochi indesiderate modifiche all'assetto instauratosi fra i diversi componenti biotici presenti nel sito prima e dopo il rilascio; che il ceppo diffuso non presenti uno sviluppo carente o contrastato e che non siano richiesti ulteriori interventi di diffusione.

E' necessario pure verificare che le caratteristiche genetiche introdotte non siano state trasmesse ad altri organismi presenti nello stesso ambiente.

Bisogna prevedere programmi di intervento per limitare un inatteso e marcato sviluppo e diffusione del ceppo modificato prevedendo anche procedure per l'eliminazione di eventuali vettori responsabili di incontrollate diffusioni.



Come si prefigura il rapporto rischi/benefici ?

Evidentemente è questo uno dei punti cardine del problema. Vi può essere un vantaggio immediato, mentre i pericoli di danni futuri sono meno facilmente individuabili con sicurezza. Si tenga comunque presente che si tratta sempre di organismi che possono subire "naturalmente" modifiche genetiche sicché nel tempo potrebbero essere annullati i vantaggi ottenuti. Da un organismo patogeno controllato mediante strumenti biologici può prendere "origine" ed avere il sopravvento un ceppo resistente, per cui si deve prospettare che prima o poi si dovrà cambiare o modificare la nostra "arma".



Mi pare di poter concludere che non è affatto facile valutare quali rischi si possono correre con la diffusione massiva di microrganismi modificati geneticamente, ma che è più che necessario affrontare il problema.

Non possiamo permetterci di giungere impreparati di fronte ad un eventuale profondo mutare di equilibri instaurati da tempo, specie nei riflessi della componente biotica, con conseguenze che potrebbero essere se non catastrofiche almeno pesanti e di difficile controllo. L'imperativo è quindi: operare con cautela e programmare continui controlli per non dover intervenire quando potrebbe essere troppo tardi.

In diversi stati, sia europei che extraeuropei, esistono normative riguardanti l'impiego con-

trollato di microrganismi patogeni e di microrganismi a DNA ricombinato e la deliberata diffusione di microrganismi nell'ambiente. La salvaguardia della salute umana e la tutela dell'ambiente sono stati i due principali punti di riferimento dei legislatori.

Attualmente in Italia non sono disponibili precise indicazioni per un impiego controllato delle procedure più avanzate del settore biotecnologico, così come non esiste una specifica normativa relativa alla diffusione deliberata di microrganismi modificati nell'ambiente. In Italia esistono, però, diversi regolamenti concernenti la difesa della salute degli operatori contro i rischi dovuti all'esposizione ad agenti biologici.

Sulle specifiche problematiche, anche in Italia qualcosa si sta muovendo ed è possibile di-

sporre di diversi suggerimenti che rappresentano un possibile nucleo guida, già alquanto elaborato, dal quale evincere più precise indicazioni. Si può, ad esempio, fare riferimento alle proposte suggerite dall'Istituto Superiore di Sanità sull'uso e la manipolazione di organismi patogeni e di organismi a DNA ricombinato. Dal Ministero della Sanità si può ottenere uno schema guida relativo ai dati ed alle informazioni che si devono acquisire e considerare per la valutazione del potenziale rischio sanitario, legato pure alle possibilità di inquinamento dell'ambiente a seguito di diffusione deliberata di microrganismi modificati geneticamente.

Di queste problematiche dovrebbe essere anche investito il Ministero dell'Agricoltura e Foreste.

SEGNALAZIONI BIBLIOGRAFICHE

Chakrabarty A.M., - Genetic engineering and problems of environmental pollution.

In "Biotechnology" (Rehm H.J., Reed G. eds.), *VCH*, Weinheim - New York, vol. 8, pag. 515, 1986.

Stewart G.J., Carlson C.A., 1986 - The biology of natural transformation.

Ann. Rev. microbiol. **40**: 211.

Stotzky G., Babich H., 1986 - Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments.

Adv. Appl. Microbiol., **31**: 93.

Brock T.S. - The study of microorganisms in situ: progress and problems.

In "Ecology of microbial communities" (Fletcher M., Gray T.R.G., Jones J.G. eds.), Symp. n. 41 Soc. Gen. Microbiol., *Cambridge University Press*, Cambridge, pag. 1, 1987.

Sayler G.S., Harris C., Pettigrew C., Pacia D., Breen A., Sirotkin K.M., 1987 - Evaluating the maintenance and effects of genetically engineered microorganisms.

Develop. Industr. Microbiol., **27**: 135.

Bottazzi V., 1988 - Prospettive e rischi per l'industria,

l'agricoltura e l'ambiente dello sviluppo della biologia molecolare applicata ai microrganismi.

L'industria del latte, **24** (1): 97.

Sussman M., Collins C.H., Skinner F.A., Stewart-Tull D.E. (eds.): The release of genetically-engineered microorganisms.

Academic Press, New York, 1988.

Ogram A.V., Sayler G.S., 1988 - The use of gene probes in the rapid analysis of natural microbial communities.

J. Industr. Microbiol., **3**: 281.

Lindow S.E., Panopoulos N.J., McFarland B.L., 1989 - Genetic engineering of bacteria from managed and natural habitats.

Science, **244**: 1300.

Foy J.J. - Organismal safeguards.

In "Biotechnology" (Rehm H.J., Reed G. eds.), *VCH*, Weinheim - New York, vol. 7b, pag. 461, 1989

Kramer P., Frommer W. - Legislation and regulation in biotechnology in european countries.

In "Biotechnology" (Rehm H.J., Reed G. eds.), *VCH*, Weinheim - New York, vol. 7b, pag. 499, 1989