

Sviluppo kit FISH e CARD-FISH per l'analisi di biomarker ai fini del biomonitoraggio di campioni ambientali contaminati da solventi clorurati

Obiettivo: L'obiettivo del programma Short Term Mobility 2014 è stato quello di sviluppare un kit commerciale per l'analisi rapida e specifica di campioni ambientali (acqua di falda e suolo) contaminati da composti clorurati nell'ambito di processi di biomonitoraggio. Il programma si è svolto presso Vermicon AG (Munich, Germany).

Attività svolta

Il progetto, mirato alla messa a punto di kit standardizzati per la quantificazione di un biomarker di contaminazione da solventi clorurati, si integra nelle attività di ricerca dell'IRSA per l'ottimizzazione delle procedure di biomonitoraggio mediante l'impiego di tecniche biomolecolari. Poiché in recenti pubblicazioni è stata dimostrata la validità delle tecniche d'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH e CARD-FISH) per quantificare *biomarkers* di contaminazione (1, 2, 3, 5) è emerso un grande interesse per il potenziale sviluppo di un kit standardizzato da integrare nella gamma di saggi rapidi e precisi per il biomonitoraggio a supporto di interventi di MNA (Monitored Natural Attenuation), di protocolli di valutazione dei processi di biostimolazione e più in generale di interventi di biorisanamento. L'attività proposta ha riguardato principalmente la messa a punto e l'ottimizzazione di saggi specifici FISH e CARD-FISH standardizzati, il primo per la quantificazione di microrganismi con elevata attività metabolica, il secondo per la stima anche dei microrganismi inattivi o con bassi livelli di attività metabolica.

I principali obiettivi sono stati dunque:

1. Sviluppo di un kit CARD-FISH per identificare e quantificare marcatori di contaminazione;
2. Sviluppo di un kit FISH per identificare e quantificare marcatori di contaminazione ad elevato livello di attività metabolica.

Nella prima fase della STM2014 particolare attenzione è stata rivolta al disegno sperimentale di un protocollo adattato dalle rispettive procedure standard sia per la FISH che per la CARD-FISH mentre nella seconda fase sono stati eseguiti gli esperimenti per la messa a punto dei saggi con le relative modifiche apportate ai protocolli originari. Gli *steps* dei tradizionali protocolli FISH e CARD-FISH su filtro sono stati valutati ed ottimizzati in base all'impatto di ognuno di essi sulla riuscita finale dell'esperimento. Il campione di biomassa utilizzato per tutti gli esperimenti proveniva da un arricchimento declorante già precedentemente descritto (4) protocollo di partenza utilizzato è quello già descritto in precedenti lavori (1, 2, 5). In particolare, tutte le reazioni che solitamente si effettuano sul filtro su cui è immobilizzata la biomassa del campione di acqua contaminata, vengono eseguiti all'interno di una camera di reazione che consente dunque una più efficace attività degli enzimi e dei lavaggi coinvolti in tutta la durata dell'analisi. Gli *steps* critici per i quali sono state effettuate diverse ottimizzazioni hanno riguardato la scelta della temperatura di ibridazione, il tempo di ibridazione della sonda oligonucleotidica, l'adattamento dei volumi delle soluzioni utilizzate per tutti gli *steps* di reazione e i trattamenti enzimatici al fine di ridurre i tempi di analisi ed adattarli ad un utilizzo semplificato rispetto al protocollo originale. Gli esperimenti con il protocollo tradizionale e il nuovo protocollo ottimizzato per un possibile Kit di analisi, sono stati eseguiti in parallelo. L'utilizzo della camera di reazione nel nuovo protocollo ha dato esito positivo e si è mostrato valido in quanto ha consentito di rilevare un numero maggiore di cellule rispetto al protocollo tradizionale, seppur confrontabile (rispettivamente $2.53E+07$ cells mL⁻¹ and $3.1E+07$ cells mL⁻¹). I segnali di fluorescenza ottenuti sono confrontabili e le concentrazioni

cellulari del *biomarker* quantificato erano confrontabili in entrambi i protocolli ($2.32E+05$ cells mL^{-1} and $2.56E+05$ cells mL^{-1} rispettivamente nel protocollo tradizionale e nel nuovo protocollo per il kit). Inoltre i tempi sperimentali sono stati ridotti in modo da rendere l'utilizzo del kit compatibile con le necessità dei potenziali utilizzatori. In figura 1 si riportano alcune immagini degli esperimenti condotti con il protocollo tradizionale (a) e con il nuovo protocollo adattato per l'allestimento futuro del kit di analisi (b). Ulteriori dettagli per lo sviluppo del kit dovranno essere rifiniti al fine di formulare e sviluppare il prodotto finale. A questo scopo, ulteriori analisi sono in corso d'opera presso IRSA - CNR e presso la Vermicon AG.

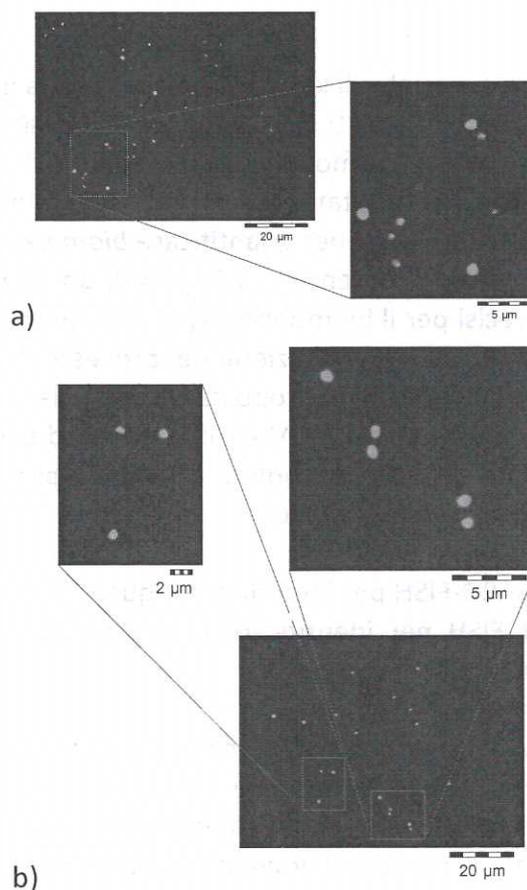


Figura 1. Risultati CARD-FISH ottenuti con l'applicazione del protocollo tradizionale (a) e del protocollo ottimizzato per lo sviluppo di un kit analitico. In blu sono indicate le cellule totali marcate con il colorante DAPI mentre in verde sono evidenziate le cellule ibridate con una sonda oligonucleotidica specifica.

Bibliografia

1. Fazi S, Aulenta F, Majone M, Rossetti S. Improved quantification of "*Dehalococcoides*" species by fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition. *Syst Appl Microbiol.* 2008. 31:62–7.
2. Maturro B, Aulenta F, Majone M, Petrangeli Papini M. 2012. Field distribution and activity of Chlorinated solvents degrading bacteria by combining CARD-FISH and real-time PCR. *New Biotechnol.* 30:23–32.

SHORT TERM MOBILITY 2014 – RELAZIONE FINALE

3. Maturro B, Heavner GL, Richardson RE, Rossetti S. 2013. Quantitative estimation of *Dehalococcoides mccartyi* at laboratory and field scale: comparative study between CARD-FISH and Real Time PCR. *J Microbiol Methods*. 93:127–33.
4. Maturro B, Tandoi V, Rossetti S. 2013b. Different activity levels of *Dehalococcoides mccartyi* revealed by FISH and CARD-FISH under non-steady and pseudo-steady state operating conditions. *New Biotechnol*. 30(6): 756 – 62.
5. Rossetti and Maturro, 2012 S. Rossetti, B. Maturro. Monitoring of dechlorinating bacteria by FISH/CARD-FISH and real time PCR. M. Kastner, al. et (Eds.), *Model soil probing, site assessment and evaluation guidance on technologies*, Sapienza Università Editrice, Rome, pp. 233–244.

Bruna Maturro

