

Influenza della radiofrequenza sulla crescita e sulla bioluminescenza di vibrioni marini

V. Nassisi, D. Delle Side, C. Troisio e L. Velardi

Dipartimento di Matematica e Fisica, Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione (LEAS) dell'Università del Salento e INFN sez. di Lecce, Via provinciale Lecce-Arnesano, C.P. 193, 73100 Lecce, Italy

P. Alifano, A. Talà e S. M. Tredici

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Laboratorio di Microbiologia dell'Università del Salento, Via Provinciale Lecce-Monteroni, C.P. 193, 73100 Lecce, Italy

Abstract

In questo lavoro sono utilizzati campi elettromagnetici (radiofrequenze) in strutture guidate per imprimere stress in colonie di batteri del genere *Vibrio* bioluminescenti (ceppo *Vibrio* sp. PS1). Sono state monitorate la crescita e l'attività bioluminescente dei batteri coltivati su substrato solido per sondare l'influenza della radiofrequenza su questi parametri biologici. Nelle condizioni di riferimento (batteri non esposti alla radiofrequenza), la bioluminescenza raggiungeva un massimo circa 8 h dopo la semina dei batteri, in coincidenza con la fine della fase di latenza della curva di crescita, mentre il massimo della densità batterica, dalle stime effettuate, si collocava in un tempo successivo. L'esposizione alla radiofrequenza riduceva il tempo di latenza della crescita, anticipava l'innesco e aumentava l'intensità finale della luminescenza batterica. Anche se le basi biofisiche e il significato fisiologico di tale fenomeno non sono ben chiari, i risultati di questo studio dimostrano che la radiofrequenza interferisce con importanti parametri biologici.

INTRODUZIONE

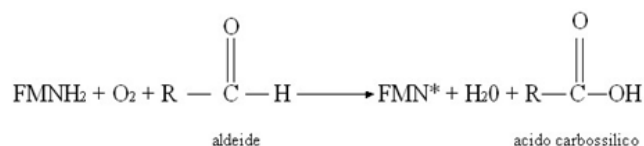
Il comunicare veloce ed efficiente è, da sempre, oggetto d'interesse in vari campi del vivere quotidiano. Negli ultimi decenni la tecnologia ha supportato tale richiesta in modo eccezionale producendo una vasta gamma di dispositivi ad uso della popolazione mondiale. In tal modo il Pianeta risulta quasi interamente coperto da una fitta rete di antenne per garantire la trasmissione dei segnali.

L'interazione delle radiofrequenze (RF) prodotte dai suddetti campi elettromagnetici con organismi viventi rimane, tuttavia, un campo di aperto dibattito e costante ricerca. Lo studio qui descritto si muove nella direzione dell'indagine circa gli effetti che radiofrequenze

con determinate caratteristiche producono su particolari colture batteriche. A tal fine sono stati scelti dei batteri bioluminescenti gram-negativi del genere *Vibrio* (ceppo *Vibrio* sp. PS1); tali batteri hanno la peculiarità di emettere radiazione luminosa, che rappresenta un prezioso indicatore biologico di estrema importanza per studiare i possibili effetti sugli organismi viventi stressati da radiofrequenza.

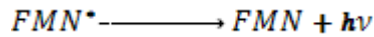
TEORIA

I batteri bioluminescenti sono largamente diffusi negli ambienti marini, dove esistono come plancton o parassiti simbiotici con alcune specie di pesci. La luce prodotta può essere utilizzata dagli stessi per attrarre prede, per comunicare oppure per scappare dai predatori. La bioluminescenza che li caratterizza è provocata da una reazione chimica catalizzata da un particolare enzima chiamato luciferasi. L'emissione di luce avviene tramite ossidazione del flavin mononucleotide (FMNH₂) e di un'aldeide alifatica R (R=radicale), chiamata luciferina (dal greco "portatrice di luce"), ad opera dell'ossigeno molecolare[1]. Per questo motivo, generalmente, il processo si verifica solo in condizioni di aerobiosi. L'equazione chimica di tale reazione può essere scritta come segue:



È evidente come il FMNH₂ si riduca a causa del NADH (Nicotinammide Adenina Dinucleotide), donatore primario di elettroni, spostando i due atomi di idrogeno i quali vanno a formare una molecola d'acqua con uno degli atomi della molecola di ossigeno. L'altro atomo di ossigeno, invece, è inglobato

nell'aldeide luciferina, che, ossidandosi, forma l'acido carbossilico. Il prodotto della reazione è dunque la forma ridotta del flavin mononucleotide nel suo stato eccitato (FMN*). La successiva transizione allo stato fondamentale dell'FMN, provoca l'emissione di energia sotto forma di un fotone di frequenza ν e, quindi, origina la luminescenza secon-



do l'equazione

È stato inoltre dimostrato che la vita media dello stato eccitato dell'FMN e, quindi, l'emissione luminosa dipendono dal tipo di luciferasi batterica, dal numero di atomi di carbonio presenti nell'aldeide e dal pH dell'ambiente in cui avviene la reazione stessa [2].

La luciferasi batterica è caratterizzata da un tipo di regolazione, detta autoinduzione. Durante la crescita, una sostanza detta **autoinduttore** passa liberamente da una cellula batterica all'ambiente e, raggiunta una determinata concentrazione (livello critico), attiva una via di segnalazione che porta all'attivazione trascrizionale dell'operone lux codificante l'enzima luciferasi. La capacità di emettere luce è pertanto correlata alla densità batterica e all'accumulo dell'autoinduttore. Tale meccanismo è noto anche con il termine di **quorum sensing**[3]. Ciò fa sì che le colture di batteri bioluminescenti a bassa densità non siano inizialmente luminose, ma lo diventino solo dopo che la concentrazione raggiunge livelli sufficienti per consentire l'accumulo di autoinduttore necessario a dare inizio al processo. Avviata la reazione, quindi, la luminosità sarà maggiore quanto più alta è la densità batterica della colonia, almeno nella fase iniziale.

L'interesse per questo tipo di batteri nasce proprio dalla suddetta caratteristica: la bioluminescenza facilita il monitoraggio agevolando la caratterizzazione dei campioni e lo studio di specifiche reazioni interne. L'idea cardine del lavoro è di esaminare le reazioni dei microrganismi sottoposti a radiofrequenza, confrontarle con quelle di batteri non irraggiati (di controllo) e osservare le eventuali differenze per capire in che modo il campo elettromagnetico cui sono sottoposti, intervenga negli eventuali cambiamenti.

Crescita batterica

I microrganismi che si riproducono per scissione binaria hanno una crescita che può essere rappresentata mediante un grafico che esprime la relazione tra il logaritmo del numero delle cellule e il tempo di incubazione (Fig. 1)

Il processo di crescita, e quindi anche il grafico che lo rappresenta, può essere diviso in quattro fasi: fase di latenza, fase esponenziale, fase stazionaria e

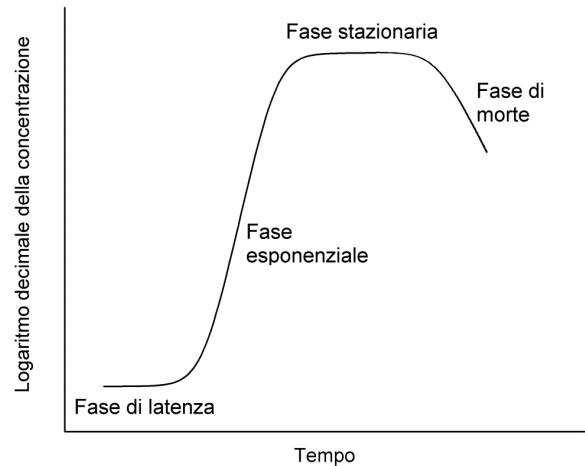


Fig. 1: Curva di crescita batterica in un sistema chiuso.

fase di morte.

Durante la fase di latenza (lag-phase) non si osserva un aumento sostanziale del numero di cellule, poiché la cellula stessa è attivamente impegnata in un processo di adattamento durante il quale le cellule batteriche si modificano per proliferare nell'ambiente di coltura. E' nella fase esponenziale che i microrganismi si dividono alla massima velocità: in condizioni ideali, raddoppiano di numero a intervalli di tempo regolari[4]. Quando la crescita cessa, l'andamento della curva diventa orizzontale e si parla di fase stazionaria. La fase di morte, invece, è indotta dal progressivo esaurimento dei nutrienti e dall'accumulo di metaboliti tossici che si traducono in una diminuzione del numero delle cellule in vita.

Esistono numerosi modelli matematici per descrivere la crescita batterica, tutti forniscono delle informazioni su precisi parametri biologici, ma classicamente sono due i parametri fondamentali per caratterizzare la curva di crescita: il tempo di latenza λ ed il tasso di crescita specifico μ_{max} . L'interpretazione biologica del parametro λ (noto anche come lag-time) e la sua determinazione sono tutt'ora oggetto di studio e dibattito nella comunità scientifica, tuttavia è universalmente accettato il fatto che questo dipenda dalle condizioni ambientali in cui si trovano le cellule batteriche in esame e dalla loro vita precedente all'inoculo.

Storicamente per descrivere l'incremento del logaritmo decimale della densità batterica in funzione del tempo sono stati usati diversi modelli; tra questi, il

modello di Baranyi[5] si è dimostrato tra i più affidabili per determinare con accuratezza i parametri biologici che descrivono tale fenomeno[6,7]. Visto l'elevato numero di parametri da cui dipende (6, nella versione completa), l'applicazione del modello può sembrare piuttosto complessa, tuttavia esistono varie ipotesi semplificative che riducono il numero dei parametri di cui tener conto, agevolando l'analisi senza sacrificarne la validità biologica. In particolare, indicata con $N(t)$ la densità batterica, l'equazione che determina l'evoluzione temporale del suo logaritmo decimale è data, limitatamente alle fasi di latenza e di crescita esponenziale, da

$$y(t) = y_0 + \frac{\mu_{max} \cdot t}{\ln(10)} + \log_{10}[e^{-\mu_{max} t} (1 - e^{-\mu_{max} \lambda}) + e^{-\mu_{max} \lambda}]$$

dove

$$y(t) = \log_{10}(N(t))$$

$$y_0 = \log_{10}(N_0) = \log_{10}(N(0))$$

mentre $\ln(x)$ rappresenta il logaritmo naturale di x . L'utilità del modello consiste nel fatto che, avendo a disposizione i dati circa la crescita batterica di uno o più campioni, si possono determinare in maniera empirica i parametri λ e μ_{max} utilizzando un software per il fit di dati sperimentali che implementi l'equazione (1).

APPARATO SPERIMENTALE

L'esperienza si è svolta all'interno di una camera termo-controllata[8], costituita da un contenitore di materiale isolante dotato di un sistema frigo/riscaldatore necessario per mantenere costante la temperatura al suo interno. Il controllo della temperatura è gestito da una workstation ELIWELL del tipo EWPC 905/T.

L'uso della camera termo-controllata è necessario poiché la luminosità e la crescita batterica sono influenzate dalle variazioni di temperatura ed è quindi molto importante che essa resti costante durante tutte le fasi dell'esperienza (30.0 ± 0.3 °C).

E' stata inoltre realizzata una cella TEM (Transverse ElectroMagnetic), costituita dalla linea di trasmissione illustrata in Fig. 2, per permettere di controllare il campo interagente con i campioni in esame. La cella è stata alimentata con un generatore RF RHODE & SCHWARZ SM 300, la cui frequenza massima è pari a 3GHz e potenza di uscita 20mW. Nella fattispecie, si è applicato un segnale sinusoidale di intensità pari ad 2.2 Vpp e frequenza 900MHz.

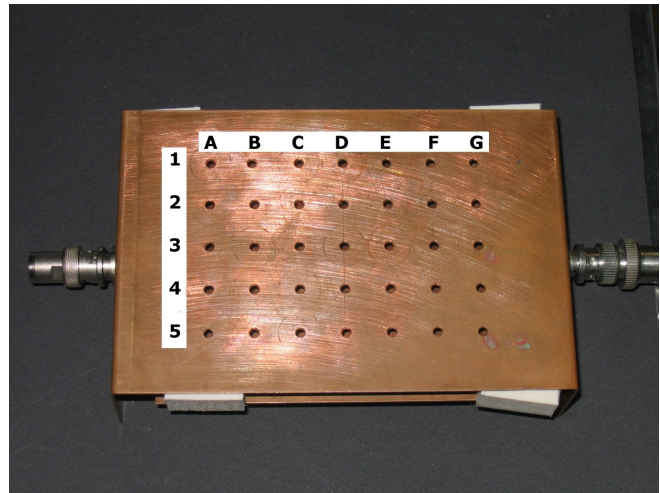


Fig. 2: Linea di trasmissione con fori per la misura del campo elettrico.

L'impedenza caratteristica, e quindi la resistenza d'uscita, è di 50Ω. Al fine di limitare gli effetti di disadattamento e controllare il campo, la linea è stata realizzata con due conduttori piani di lunghezza $l=15$ cm e larghezza $a=10$ cm, separati da 4 supporti in PVC di spessore $h=1.5$ cm. Teoricamente, escludendo l'irraggiamento EM all'esterno, la lunghezza della

$$R_0 = \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \frac{h}{a}}$$

linea non influenza l'impedenza caratteristica R_0 , essendo espressa dalla formula

dove si è indicato con ϵ_0 e μ_0 rispettivamente la permittività elettrica e la permeabilità magnetica. Chiudendo la linea su un carico di 50Ω, il campo al suo interno è misto, ovvero composto da un'onda progressiva ed un'onda stazionaria[9].

Per misurare l'intensità del campo elettrico presente nella cella, è stata realizzata un'antenna specifica, composta da un cilindro forato in alluminio, nel quale è alloggiata una resistenza da 470Ω che ha un estremo saldato sul core interno di un cavo coassiale, mentre l'altro, opportunamente isolato, fuoriesce da uno dei fori del cilindro. La massa del cavo è collegata direttamente al cilindro (Fig. 3a). L'altra estremità del cavo è dotata di un connettore BNC necessario per consentirne il collegamento ad un oscilloscopio veloce (Le Croy WavePro 7100) in grado di apprezzare il segnale captato dall'antenna. La Fig. 3b illustra la foto della sonda costruita. L'impedenza caratteristica del cavo, così come quella dell'oscilloscopio, è pari a 50Ω.

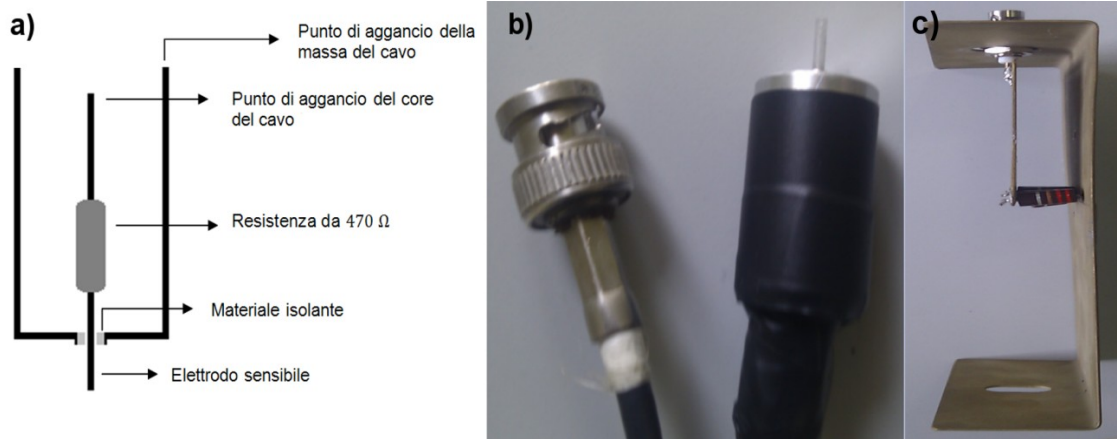


Fig. 3: schematizzazione dell'antenna utilizzata per misurare il campo elettrico nella cella TEM (a), foto dell'antenna e del connettore BNC (b), foto della linea per la taratura (c).

L'utilizzo della resistenza da 470Ω si è reso necessario per diminuire il passaggio di corrente attraverso il circuito di misurazione e per non perturbare il campo. Precedentemente al suo utilizzo, l'antenna è stata tarata attraverso una cella TEM ad-hoc (Fig. 3c), realizzata con dimensioni tali da garantire l'assenza di onde stazionarie al suo interno alla frequenza di 900MHz , usata in questo esperimento. Applicando un segnale sinusoidale dell'ampiezza di 1Vpp , si è registrata un'onda di risposta dall'ampiezza di 4.3mVpp ; pertanto, considerando che i conduttori

della linea di taratura sono alla distanza di 1.5cm , il coefficiente di attenuazione è pari a $1.55 \times 10^4 \text{m}^{-1}$. Per mezzo del coefficiente di attenuazione, si è potuto procedere ad effettuare una mappatura del campo presente nella cella. Inserendo l'antenna nei fori dell'elettrodo mostrato in Fig. 2, la misura ha evidenziato la presenza di un campo di 100V/m sul lato di ingresso della cella, laddove è collegato il generatore RF, ed un campo intenso di 170V/m verso il lato di uscita (Fig. 4).

Distribuzione del campo elettrico nella cella TEM

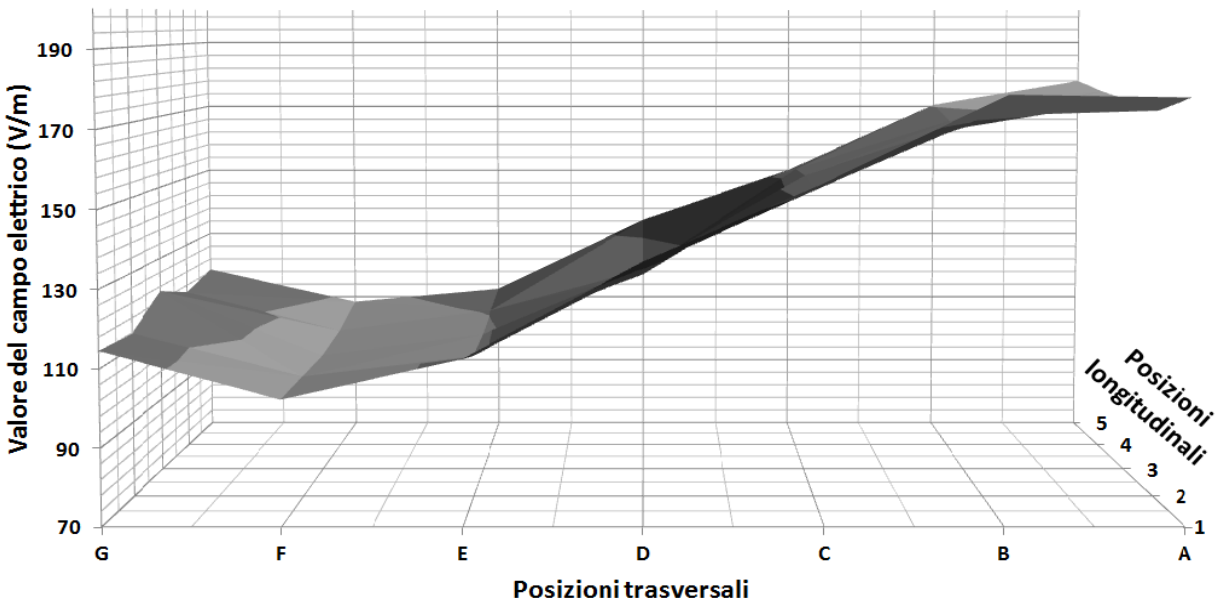


Fig. 4: Mappa indicante la distribuzione del campo elettrico all'interno della cella TEM (a 900MHz).

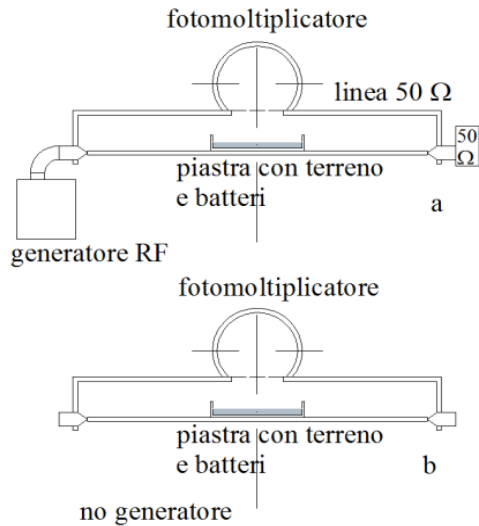


Fig. 5: Disegni di progettazione dell'apparato utilizzato per l'irraggiamento (a) e per la schermatura (b).

MATERIALI E METODI

Metodi

Al centro di due diverse piastre di Marine Agar è inoculata una piccola quantità (10 μ l, circa 10^8 unità formanti colonia [UFC]) dei batteri luminescenti del ceppo *Vibrio* sp. PS1 (Fig. 6). Una delle due piastre è collocata all'interno di una cella TEM e sottoposta a radiofrequenza. L'altra piastra (controllo) è opportunamente schermata per evitare che sia irraggiata, e posta nelle medesime condizioni ambientali di temperatura e umidità. Tutte queste operazioni si svolgono all'interno della camera termo-controllata, mantenuta a temperatura costante di circa 30°C al fine di garan-

tire le migliori condizioni di crescita per i batteri. La rilevazione della radiazione luminosa è avvenuta ogni 10 minuti programmando opportunamente la workstation Pasco 500 interface. Il monitoraggio è durato circa 23h.

In un'altra fase, le piastre sono state usate esclusivamente per monitorare la crescita batterica fino a 27.5h dopo l'inoculo. A tal fine, la colonia cresciuta al centro di diverse piastre è stata raccolta, risospesa in Marine Broth 2216 (BD Difco™) e diluita serialmente. Le diluizioni sono state seminate su Marine Agar per la conta delle UFC per risalire al numero di batteri iniziali.

RISULTATI

Durante l'esperimento sono stati rilevati 7 valori relativi alla densità batterica per i due differenti tipi di campione in esame, ottenendo i dati riportati in Tabella 1. Visto l'andamento dei dati, si è supposto che i primi 4 rappresentino lo stato della densità batterica nelle fasi di latenza e di crescita esponenziale, mentre i rimanenti siano da considerare come rappresentativi della fase di morte e quindi al di fuori degli scopi predittivi del modello di Baranyi. Pertanto, per ogni campione, si sono considerati solo i primi 4 punti al fine di ottenere il tempo di latenza ed il tasso di crescita specifico delle due colonie batteriche. Tali dati sono stati confrontati con il modello di crescita di Baranyi espresso dalla formula (1), attraverso un software per l'analisi di dati sperimentali, ottenendo i risultati presentati in Tabella 2. In Fig. 7 è possibile visualizzare i punti delle misure, insieme con le curve teoriche.

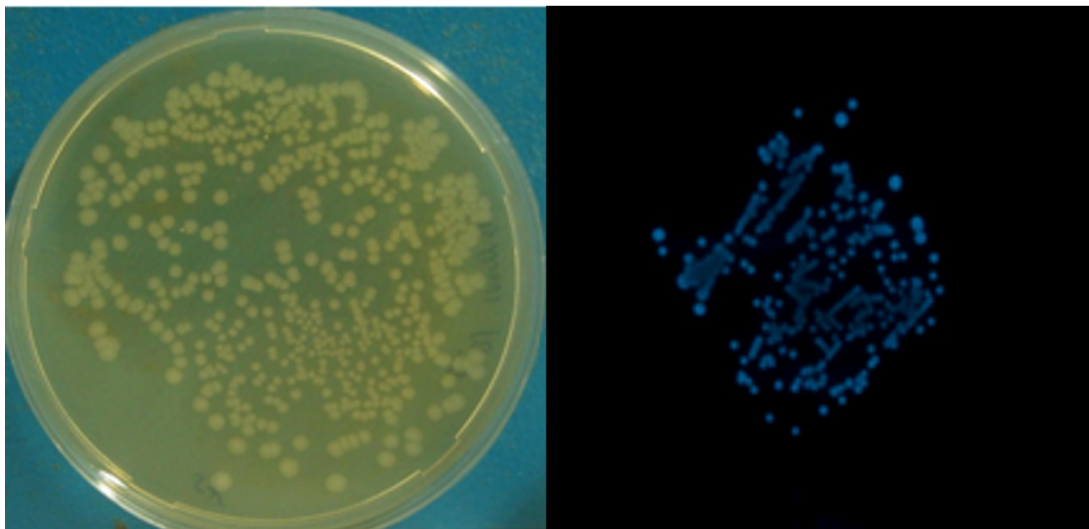


Fig. 6: Piastra inoculata con i batteri bioluminescenti (a sinistra); tipico esempio di emissione luminosa (a destra).

Ore da inizio esperimento	Campione non irraggiato (UFC)	Campione irraggiato (UFC)
3	1.20E+08	1.50E+08
7	1.50E+08	2.00E+08
14	5.50E+09	6.00E+09
16	3.30E+10	1.90E+10
20	3,90E+09	1,90E+09
23.5	7,00E+08	7,00E+08
27.5	7,00E+08	7,00E+08

Tabella 1: misure di densità batterica al variare del tempo.

	Campione non irraggiato	Campione irraggiato
y_0 ($\log_{10}N(0)$)	8.11 ± 0.03	8.15 ± 0.04
Tempo di latenza (λ in h)	9.73 ± 0.47	8.18 ± 0.47
Tasso di crescita (μ_{max})	0.88 ± 0.07	0.63 ± 0.03
Devianza residua (RSS)	0.00205	0.00121

Tabella 2: parametri biologici stimati attraverso il modello di Baranyi semplificato.

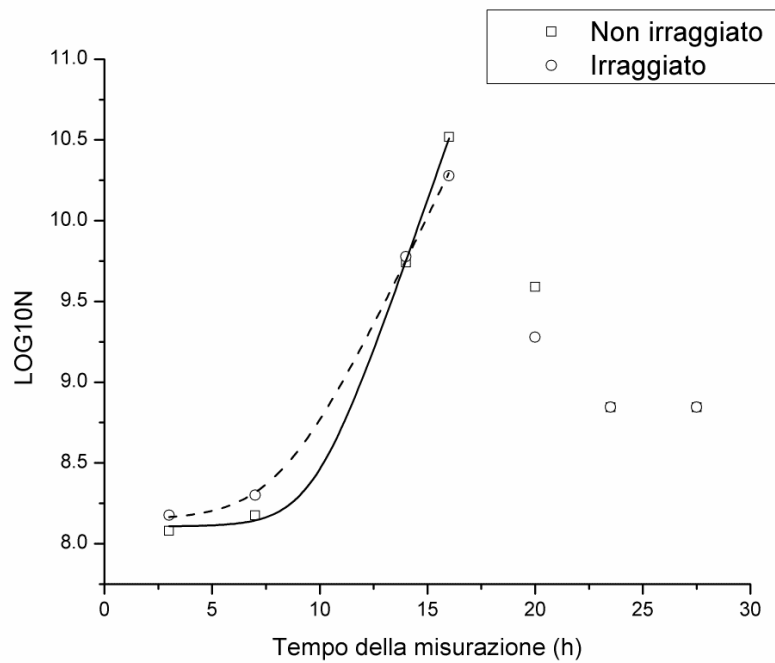


Fig. 7: Logaritmo decimale delle densità batteriche misurate (punti) e rispettive curve teoriche secondo il modello di Baranyi semplificato (per le fasi di latenza e di crescita esponenziale).

L'intensità della radiazione luminosa emessa dai due campioni è illustrata in Fig. 8. È da notare che il campione trattato possiede un'intensità massima pari a 8.47 u.a. Dopo 6.78 h, mentre per il campione non trattato si osserva sempre la presenza di un massimo ma d'intensità più bassa (4.98 u.a.) ed occorrente dopo 8.95h.

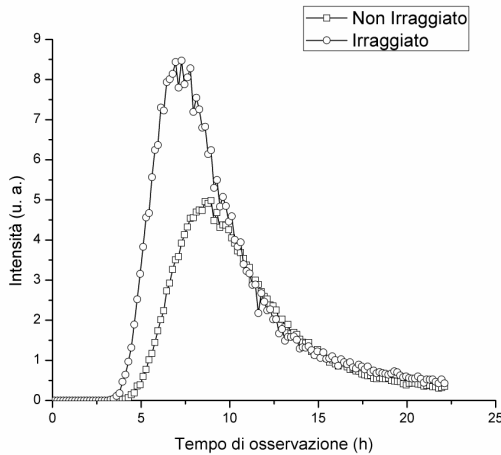


Fig. 8: Andamento temporale della radiazione luminosa emessa dai campioni.

La fase di decrescita dell'emissione luminosa mostra un marcato decadimento esponenziale; considerando le parti di curva che vanno dall'occorrenza del massimo in poi, infatti, il fit con una funzione del tipo $(t) = ae^{-t/\tau}$ ha messo in evidenza un buon adattamento con i punti sperimentali, come mostrato in Tabella 3. In Fig. 9, invece, sono riportati i grafici relativi ai fit. Il fit relativo al campione trattato mostra una devianza residua piuttosto alta e questo è da ascrivere ai primi punti sperimentali che pregiudicano la qualità del risultato finale.

Questi risultati dimostrano che la radiofrequenza interferisce sia con la crescita dei batteri che sull'attività bioluminescente. Inoltre, evidenziano come la crescita e la bioluminescenza siano fenomeni solo parzialmente associati. L'esposizione alla radiofrequenza sembra ridurre lievemente sia il tempo di latenza della curva di crescita che il tasso di crescita.

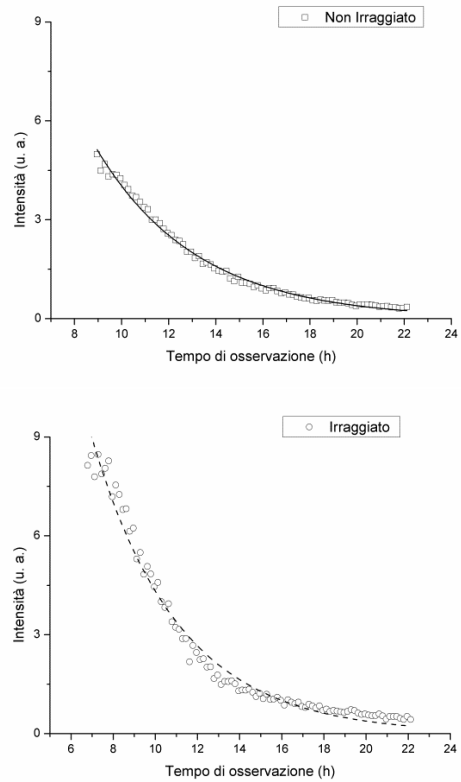


Fig. 9: Decadimento esponenziale dell'intensità luminosa emessa dal campione non irradiato e dal campione irradiato.

Più marcato è l'effetto sul pattern di espressione della bioluminescenza, con un evidente anticipo dell'innesco del fenomeno che raggiunge una maggiore intensità.

Successivamente alla misura dell'intensità luminosa, è stata effettuata anche la misura dello spettro di emissione dei due campioni, dopo 7 h di trattamento. Studi condotti in precedenza[8] hanno mostrato che lo spettro emesso da colonie di *Vibrio harveyi* è composto da due contributi gaussiani, pertanto si è proceduto con un fit multi-picco degli spettri ottenuti. Tale analisi ha evidenziato per entrambi i campioni la presenza di due picchi, uno verso il viola-blu (lunghezza d'onda circa 460 nm) e l'altro verso il blu-verde (circa 490 nm). Nel campione irradiato, tuttavia, è

	Campione non irradiato	Campione irradiato
α	41 ± 1	49 ± 2
τ	4.30 ± 0.05	4.12 ± 0.08
Devianza residua (RSS)	0.9	10.5

Tabella 3: Parametri del decadimento esponenziale dell'intensità luminosa emessa dai due campioni.

evidente una forte predominanza del contributo blu-verde, che è visibilmente più marcato (Fig. 10).

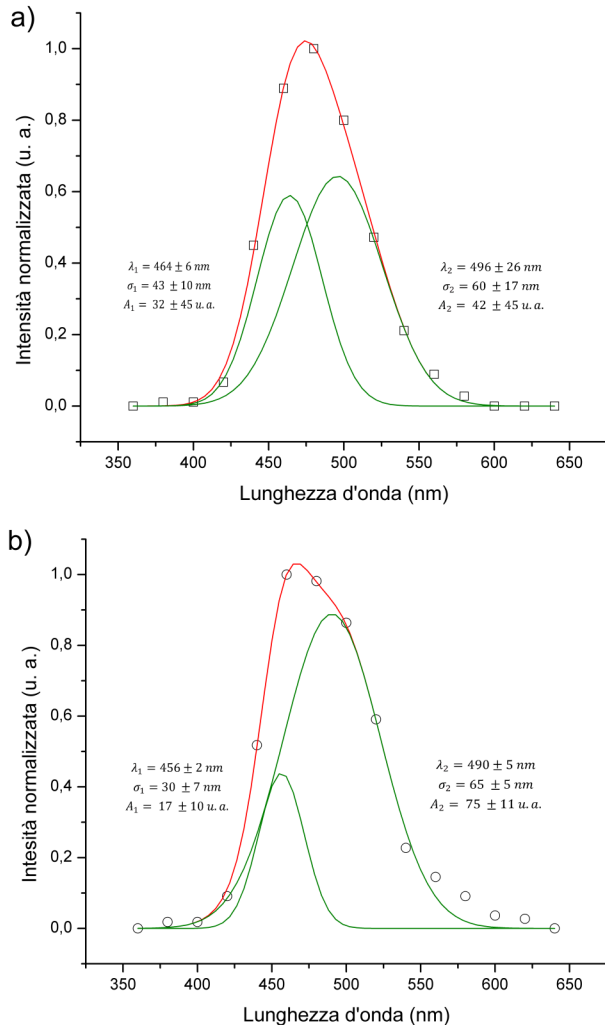


Fig. 10: spettri di emissione dopo 7 h per il campione di controllo (a) e per quello trattato (b).

CONCLUSIONI

L'analisi dimostra come la radiofrequenza abbia un effetto marcato sulle colonie batteriche. I parametri della crescita dei due campioni di batteri (esposti e non esposti) sono, infatti, nettamente differenti. I batteri del campione esposto hanno un tempo di latenza minore rispetto a quello dei batteri del campione non esposto di 1.55 h. Ciò suggerirebbe che la radiofrequenza consenta ai batteri di accelerare il processo di adattamento all'ambiente propedeutico alla crescita esponenziale. Allo stesso tempo, è da segnalare che la stessa colonia batterica ha un tasso di crescita ridotto di circa il 30% rispetto al campione non esposto.

Per ciò che riguarda l'analisi della bioluminescenza, i dati sperimentali mostrano che i batteri della colonia

esposta emettono una radiazione luminosa di intensità maggiore, anticipata rispetto a quella non trattata; quest'ultima evidenza è probabilmente da ascrivere al tempo di latenza più breve che la caratterizza e di cui si è discusso in precedenza.

Dallo studio emerge, inoltre, che la bioluminescenza dei batteri coltivati su substrato solido è soltanto in parte associata alla crescita e alla densità batterica. Per entrambi i campioni, infatti, il picco d'intensità luminosa è raggiunto circa un'ora prima del termine della fase di latenza, quando le colonie sono all'inizio della crescita, per poi scemare in un decadimento esponenziale. Questo comportamento è probabilmente determinato dalla minore disponibilità di ossigeno (necessario per la reazione della luciferasi) nella colonia in crescita esponenziale, o da meccanismi di segnalazione e/o regolazione genica che riducono l'espressione dell'operone lux.

L'andamento degli spettri di emissione, invece, suggerisce che la radiofrequenza possa stimolare il processo di fotoriattivazione dei batteri trattati, che viene stimolato dalla luce visibile, in questo caso centrata a 490 nm.

In conclusione, i risultati preliminari dell'esperimento mostrano un chiaro effetto della radiofrequenza sulla crescita e sulla bioluminescenza batterica. Anche se le basi biofisiche e il significato fisiologico di tale fenomeno non sono ben chiari, lo studio condotto dimostra che la radiofrequenza interferisce con importanti parametri biologici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hastings J. W., Crit. Rev. Biochem. 5 (1978) p. 163-184.
- [2] Tu S. C., Mager H. I., Photochem. Photobiol. 62 (1995) p. 615-624.
- [3] Meighen E. A., FASEB J. 7 (1993) p. 1016-1022.
- [4] Novick A., Annu. Rev. Microbiol. 9 (1955) p. 97-110
- [5] Baranyi J. and Roberts T. A., Int. J. Food Microbiol. 23 (1994) p. 277.
- [6] Baty F. and Delignette-Muller M.-L., Int. J. Food Microbiol. 91 (2004) p. 261.
- [7] Swinnen I. A. M., Bernaerts K., Dens E. J. J., Geeraerd A. H and Van Impe J. F., Int. J. Food Microbiol. 94 (2004) p. 137.
- [8] Alifano P., Nassisi V., Siciliano M. V., Talà A. and Tredici S. M., J. Appl. Phys. 109 (2011) p. 104703.
- [9] Belloni F., Nassisi V., Alifano P., Monaco C. and Talà A., Rev. Sci. Instrum. 76 (2005) p. 054302.