

PIER LUIGI MANACHINI\*

## Le biotecnologie genetico-molecolari a tutela delle tradizioni agro-alimentari

Lettura tenuta il 23 marzo 2006

Una tematica che diversi Microbiologi delle Facoltà di Agraria affrontano, ormai da tempo, è quella riguardante la natura e l'evoluzione dei rapporti che legano tra loro *Tradizioni Agro-Alimentari e Biodiversità Microbica*. Il risultato finale è dato da quell'insieme di peculiari caratteristiche che rendono uno specifico prodotto agro-alimentare tradizionale un qualche cosa di unico.

Tutto questo dipende, sorprendentemente e in gran parte, *dalle espressioni metaboliche e dalle proprietà biotecnologiche delle comunità microbiche naturalmente presenti nelle materie prime e nell'ambiente di lavoro, e dalla evoluzione, quali e quantitativa, che avviene in dette comunità, durante le varie fasi di ottenimento del prodotto finale, al quale conferiscono la riconosciuta tipicità e unicità.*

Per meglio esplicitare questo assunto è necessario illustrarlo con un esempio di ordine applicato. In questa sede si fa riferimento a una recente esperienza riguardante un prodotto del settore lattiero-caseario ottenuto secondo procedure operative tradizionali, artigianali.

### IL CASO DELLA TOMA PIEMONTESE

La Toma è un formaggio della tradizione casearia piemontese, ora prodotto DOP (Denominazione di Origine Protetta), che viene preparato con latte di vacca crudo. Dopo la mungitura si lascia 12 ore circa a 8-10°C, rigorosamente senza aggiunta di colture microbiche d'avvio (starter), quindi durante questo tempo si sviluppano soltanto le popolazioni microbiche naturalmente presen-

\* Facoltà di Agraria, DISTAM, Università degli Studi di Milano

ti nel latte; poi si porta la caldaia a 37-40 °C e si aggiunge il caglio. Dopo 40-60 minuti, si procede a una minuta rottura della cagliata (granuli di 5-10 mm di diametro). Seguono infine la pressatura e l'asciugatura delle forme (24 h a temperatura ambiente) e la stagionatura in grotte o caverne a 6-10°C per 30-40 giorni; l'umidità di questi ultimi ambienti è di norma pari all'85% circa.

È necessario sottolineare che i tempi, le temperature e il pH sono lasciati alla sapienza del singolo casaro, il quale ovviamente non disponeva, né ancor oggi dispone, di alcun strumento per la registrazione e la gestione di molti dei vari parametri operativi.

In conclusione, ciascun processo di produzione tradizionale è gestito dall'esperienza che quello specifico produttore possiede. Il prodotto finale presenterà, nel suo complesso, una variabilità ben nota, che a volte diventa pure una caratteristica discriminante, come ben sa chi opera nel settore artigianale. Ciascun produttore, infatti, ha i propri affezionati clienti che apprezzano i suoi prodotti e questo diretto rapporto tra produttore e consumatore è molto diffuso. Questo è un tipo particolare di rapporto in quanto non solo è caratterizzante, ma è pure premiante ed è presente anche in altri ambiti artigianali, specie in quello enologico.

### *Le popolazioni microbiche della Toma*

Con le nostre ricerche (Fortina et al., 2003) abbiamo rilevato nella Toma piemontese una decisa prevalenza di forme batteriche lattiche coccoidi, pari al 70% circa della popolazione microbica lattica totale. Complessivamente sono stati ottenuti 116 isolati e del DNA di ciascuno sono state studiate alcune caratteristiche genetico-molecolari. Queste caratteristiche forniscono utili informazioni per una rapida e sicura caratterizzazione degli isolati, il che consente di conseguire, in breve tempo, la loro identificazione e di stabilire la loro posizione filogenetica. In poche parole si può rapidamente assegnare ciascuno isolato a una precisa specie di un determinato genere batterico. A questo scopo sono stati considerati:

- i profili di amplificazione della *regione spaziatrice* (RS) dell'operone ribosomiale;
- le *sonde nucleiche* specie specifiche e la loro eventuale disponibilità;
- la *sequenza nucleotidica* di uno specifico segmento del gene che codifica per l'RNA ribosomiale 16S (*16S rDNA*);
- il grado di similarità di sequenze polinucleotidiche, più noto come % di omologia genetica.

Buona parte di queste ricerche utilizzano la PCR (Polymerase Chain Reaction = Reazione a Catena della Polimerasi), una originale procedura, ormai ben nota, che consente di riprodurre in laboratorio il processo di duplicazione del DNA, che avviene naturalmente nella cellula batterica quando si riproduce. La PCR consente di moltiplicare in laboratorio diversi milioni di volte un segmento qualunque o specifico del DNA di un batterio; questo processo viene definito *amplificazione*. Per la geniale intuizione e per gli studi che portarono alla realizzazione della PCR fu assegnato il premio Nobel 1993 allo scienziato americano Kary Mullis (Mullis, 1998).

Con le nostre ricerche si è potuto stabilire che dei 116 isolati:

- \* 78 ( 66% circa) sono ascrivibili al genere *Lactococcus* e in particolare 44 alla specie *L. garvieae*, 24 a *L. lactis* subsp. *lactis* e 10 a *L. lactis* subsp. *cremoris*;
- \* 38 (34% circa) sono stati invece ascritti ai seguenti generi:
  - *Enterococcus* di cui 9 a *E. faecium*, 3 a *E. durans*, 2 a *E. faecalis* e altri 5 a una potenziale specie nuova;
  - *Streptococcus* di cui 8 ascrivibili alle specie *Str. macedonicus* e *Str. thermophilus*, i quali, pur rivestendo un concreto interesse per il settore caseario, a causa della loro ridotta presenza hanno scarsissima importanza biotecnologica, almeno nel nostro caso. I rimanenti 11 isolati sono stati invece assegnati a *Str. suis*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* e *Str. uberis*, specie anticasearie, considerate potenziali patogeni, la cui presenza è riconducibile a scarse condizioni igieniche del processo.

### *Alcune considerazioni*

Questo è un quadro assai interessante in quanto ha permesso di delineare, per la prima volta, i *principali biotipi microbici* della *Toma piemontese*, i quali sono da considerare come importanti corresponsabili della tipicità di questo formaggio tradizionale.

Interessante risulta la prevalenza dei lattococchi; degna di nota è pure la presenza di *L. lactis* subsp. *cremoris*, ormai irreperibile in habitat naturali, in quanto ha eletto come sua abituale dimora il caseificio.

Alcuni studiosi hanno formulato l'ipotesi che alcuni ceppi di *L. lactis* subsp. *lactis* possano comportarsi come dei potenziali patogeni, o "ceppi op-

portunisti”, cioè ceppi che aggrediscono soltanto individui debilitati da altre malattie o sofferenze. È questo un aspetto che deve essere affrontato in profondità. In ogni caso è noto che è possibile che di una specie esistano ceppi differenti in relazione all'ambiente in cui sono di norma presenti, oppure che abbiano proprietà metaboliche, fisiologiche differenti pur frequentando lo stesso habitat.

Emblematica appare poi la concreta presenza di *L. garvieae*, da ciò possiamo dedurre che questo lattococco giochi un importante ruolo nei processi di caratterizzazione del prodotto finito. Sono state tuttavia reperite indicazioni di una sua supposta potenziale patogenicità; un aspetto che deve essere attentamente e correttamente indagato senza dare innesco a interessate, ma immotivate *querelle*, che con la scienza nulla hanno a che vedere.

#### *L. garvieae: un probabile caso di biodiversità intraspecifica*

Dalle nostre ricerche *L. garvieae* è risultata essere la specie lattica predominante nella composizione batterica della Toma. Alcuni ceppi di questa specie sono stati ritenuti essere agenti patogeni per alcune specie di pesci; altri sono stati isolati da bovine affette da mastite, ma sono stati considerati dei ceppi secondari, non responsabili della malattia.

Abbiamo inoltre messo in evidenza che esistono due differenti biotipi di *L. garvieae*, ciascuno presente in un proprio ecosistema (Fortina et al., 2007):

- *biotipo lattiero-caseario*: caratteristiche discriminanti sono risultate la crescita a 45 °C, l'utilizzazione del lattosio, la produzione di coagulo dopo crescita, con acidificazione, in latte;
- *biotipo ittiopatogeno*: spiccatamente proteolitico; possiede quindi una attività enzimatica certamente non desiderata nel settore caseario; in latte inoltre manifesta un basso potere acidificante e l'incapacità di far coagulare il materiale proteico.

Appartiene a questo biotipo anche il ceppo attualmente considerato come *ceppo di riferimento* della specie e comunemente indicato come *ceppo type*.

La presenza dei due biotipi è un fatto alquanto intrigante, che suscita non poco interesse presso i batteriologi per una serie di motivazioni diverse.

Una analoga situazione si riscontra in seno al noto *Escherichia coli*, un abituale e innocuo frequentatore del nostro tratto intestinale. Nel 1991 sono stati però isolati dei ceppi patogeni di *E. coli*, come il tristemente

conosciuto ceppo O 157:H7 e relativi “compagni” verocitotossina produttori, responsabili di gravi enteropatie, che si possono talvolta concludere con la morte del paziente (Manachini et al., 2004). Questi differenti ceppi di *E. coli*, a differenza di quelli di *L. garvieae*, frequentano pure lo stesso habitat.

Questi particolari tipi di rapporti esistono anche tra ceppi di altre specie e anche tra specie tra loro filogeneticamente assai vicine, come nel caso del gruppo-specie *Bacillus cereus*, al quale vengono ascritti anche le note e discusse specie *B. thuringiensis* e *B. anthracis* (Manachini et al., 2004).

Nel loro insieme questi fatti costituiscono un aspetto della biodiversità microbica, che merita una maggiore attenzione e più approfondite indagini, al fine anche di stabilire i limiti delle attuali procedure diagnostiche.

### *Gli enterococchi non identificati*

Gli enterococchi isolati dalla toma, e non identificati nelle prime fasi della ricerca, sono stati sottoposti a uno studio più mirato, dal quale sono emersi i sotto indicati fatti.

I nostri isolati si distinguono da tutte le specie conosciute di *Enterococcus* per:

- il differente profilo di amplificazione della regione spaziatrice;
- i bassi valori di omologia di sequenza del gene codificante per il 16SrRNA;
- il basso valore di % di omologia genetica;
- le differenti caratteristiche fenotipiche.

Sulla base dei risultati ottenuti è stata da noi proposta, e accettata dai competenti organi internazionali, la creazione di una nuova specie di enterococco, alla quale abbiamo assegnato la seguente denominazione: *Enterococcus italicus* sp. nov. (Fortina et al., 2004).

Alcuni ceppi di questa nuova specie sono stati pure depositati presso riconosciute Collezioni Internazionali di Microrganismi, come richiesto dalle norme stabilite dagli organi competenti.

Di *E. italicus* è stata pure preparata una sonda nucleica specie specifica, un validissimo strumento diagnostico per verificare rapidamente se ceppi di nuovo isolamento, oppure non meglio identificati, possono essere ascritti a questa nuova specie.

Per avere una maggiore e più approfondita caratterizzazione della nuova specie è stata inoltre ottenuta la sequenza nucleotidica completa del gene *16S*

*rDNA* che è stata pure comparata con quella del *16S rDNA* di 21 differenti specie di *Enterococcus*. Per lo studio delle sequenze nucleotidiche sono state di notevole aiuto le banche dati. Presso queste strutture sono depositate e reperibili le sequenze nucleotidiche di tutti i geni batterici che sono stati sequenziati.

Questi studi comparativi hanno permesso l'individuazione, nelle regioni V2 e V3, di significative variazioni di sequenza. Le osservazioni fatte hanno poi portato alla *elaborazione di una coppia di primer*, con la quale si è potuto procedere ad amplificare specificatamente una regione interna del *16S rDNA* di circa 323 bp.

### *Toma e "Toma"*

Sono state altresì condotte alcune prove di caseificazione, al fine di verificare il ruolo svolto dalle popolazioni microbiche presenti nel latte crudo nel determinare le caratteristiche del prodotto destinato al consumo. Una stessa partita di latte crudo è stata divisa in due parti: con una di esse è stata seguita la procedura tradizionale, con l'altra la procedura è stata modificata in quanto il latte è stato pastorizzato per escludere soprattutto *L. garvieae*, e inoculato con i consueti ceppi di batteri lattici caseari. In entrambi i casi è stato ottenuto del buon formaggio, però quello ottenuto con il latte pastorizzato non aveva nulla a che vedere con la classica Toma piemontese!

Da queste preliminari prove si evince che la differenza, in particolare quella sensoriale, tra le due produzioni si deve, essenzialmente, alle peculiari attività biotecnologiche della componente microbica presente nel latte crudo; questa differenza viene facilmente percepita anche dal comune consumatore. Gli interventi tecnologici, a differenza di quelli microbici, svolgono un ruolo, come previsto, di relativa incidenza sulle caratteristiche discriminanti che sono peculiari per ciascun prodotto alimentare tradizionale. E questo senza nulla togliere all'importanza all'apporto tecnologico. A voler essere precisi, soltanto con un corretto abbinamento dei saperi delle due discipline si possono ottenere prodotti alimentari, tradizionali e non, validi sotto tutti i punti di vista: nutrizionale, sensoriale, sicurezza d'uso.

Se poniamo poi la nostra attenzione sulla sicurezza d'uso della Toma piemontese classica, con *L. garvieae*, non abbiamo al momento notizie riguardanti casi clinici in cui è implicato il consumo di questo squisito formaggio.

Un evento simile si è verificato anche nel caso della fontina. Per supposti e mai provati motivi di sicurezza d'uso, è stata modificata la composizione delle popolazioni batteriche. L'indiscriminata e indotta riduzione del grado di biodiversità microbica, è da considerarsi come la principale responsabile del fatto che sono venute a mancare proprio quelle comunità microbiche alle cui attività metaboliche si devono le peculiari proprietà che caratterizzano la classica fontina, il più noto dei formaggi della tradizione casearia valdostana (Manachini et al., 2004). Questi sono i motivi che spingono i consumatori più esperti a dire sempre con maggior frequenza: ma questo non è il formaggio di una volta.

Pare che si possa concludere che, nel caso della Toma piemontese, ai ceppi di *L. garvieae* naturalmente presenti non si possa imputare alcunché, se non quello di essere responsabili della “nascita” di questo ottimo e prelibato formaggio.

In ogni caso devono essere approfondite le nostre conoscenze sui citati particolari aspetti che, entro certi limiti, riguardano o potrebbero interessare altri prodotti alimentari tradizionali e non. Al riguardo, un significativo contributo potrà essere fornito dagli strumenti culturali e operativi di cui si avvalgono le biotecnologie molecolari batteriche.

#### ALCUNE PROPOSTE

I risultati delle nostre ricerche confermano quanto da tempo andiamo affermando: *ogni alimento dovrebbe essere identificato e caratterizzato anche in relazione alla propria componente microbiologica* (Manachini e Fortina, 1998; Fortina e Manachini, 2001; Manachini e Isolani, 2004).

Questo parametro qualitativo è di estrema importanza in particolar modo quando si deve procedere alla *identificazione* e alla *tracciabilità* dei molti *alimenti della tradizione italiana*.

Per questi alimenti non è previsto alcun intervento (pastorizzazione, impiego di sostanze estranee, ecc.) teso a modificare, in termini sia quantitativi sia qualitativi, le popolazioni microbiche naturalmente presenti nel corso della procedura di produzione. Va da sé che non è neppure possibile l'impiego di “anonime” colture microbiche starter commerciali.

In sintesi possiamo tradurre tutto ciò con questa lineare “cascata” di uguaglianze:

Caratterizzazione delle popolazioni microbiche  
=  
Caratterizzazione degli alimenti tradizionali  
=  
Qualità Microbiologica degli Alimenti

#### E ORA UNA DOVEROSA DOMANDA

Come siamo giunti ad acquisire questo importante e vasto bagaglio ricco di saperi sui rapporti tra prodotti alimentari tradizionali e interventi metabolici di comunità microbiche naturalmente presenti?

Credo che si possa dare una valida risposta a questo quesito, ma per farlo è necessario partire da lontano. È stata una conquista che ha richiesto anni di studi e di ricerche, un cammino lungo che aveva come fondamenta precedenti acquisiti saperi.

Personalmente ho la fortuna di poter dire: io c'ero.

#### L'EVOLUZIONE DEI SAPERI MICROBIOLOGICI

Nel 1964 inizia la mia affascinante ed intrigante avventura culturale che... continua tuttora.

Su invito del mio mai dimenticato Maestro, il prof. Renato Craveri, intrapresi lo studio del DNA batterico, al fine di meglio conoscere i protagonisti delle nostre ricerche (Craveri et al., 1965). Si era agli albori dello studio del DNA batterico, ma già si intravedevano, si intuivano, le grandi potenzialità che potevano essere offerte ai batteriologi da più approfondite acquisizioni sulle caratteristiche chimico-fisiche e strutturali di questa importante molecola informativa. Le speranze non furono disattese.

Sino agli anni '60 del secolo scorso l'identificazione dei microrganismi, dei batteri in particolare, si conseguiva esclusivamente attraverso la determinazione di convenute caratteristiche fenotipiche. Il lavoro richiedeva un impegno non indifferente di strutture e di uomini e soprattutto di tempo, il che limitava non poco le possibilità e i campi di indagine.

Gli strumenti culturali e operativi di cui i batteriologi potevano disporre a quel tempo non consentivano, se non raramente, di accedere a nuove conoscenze, specie in merito al grado di biodiversità microbica che poteva esistere in habitat agro-alimentare. Tra i microbiologi era, tuttavia, generalizzata

la convinzione che le nostre conoscenze sul grado di biodiversità in ambito microbico fossero, e in parte lo sono ancora, decisamente scarse. Non pochi studiosi infatti, stimavano che si conoscesse allora, e si conosca ora, soltanto il 5%, i più ottimisti il 10%, delle specie microbiche presenti sul nostro pianeta. Il lavoro che ci resta da fare nel prossimo futuro è di dimensioni, attualmente indefinibili, ma sicuramente potrà riservarci non poche sorprese.

Ad aprire nuovi e più ampi orizzonti sulla biodiversità batterica fu il continuo e sempre più articolato bagaglio di conoscenze che si venivano, via via, acquisendo sulla molecola del DNA batterico con il conseguente sviluppo delle biotecnologie genetico-molecolari batteriche e microbiche in generale.

Le nuove procedure di indagine permettono di ridurre, di molto, i tempi di lavoro, elemento da non sottovalutare, e consentono soprattutto di evidenziare un grado maggiore di biodiversità microbica, in ambito agro-alimentare, e un livello di relative conoscenze mai raggiunto prima. I risultati conseguiti con le ricerche prima illustrate confermano questa realtà.

### *Dal passato al presente e ...*

Ritorniamo ora al nostro argomento base. Sino agli anni '60 delle comunità batteriche presenti e attive nei prodotti agro-alimentari poco o nulla si sapeva; in specifico di loro non si conoscevano:

- il *grado di biodiversità*: inteso in termini quanti e qualitativi, soprattutto anche in rapporto all'evolversi nel tempo delle varie comunità batteriche presenti;
- le *espressioni metaboliche*: non sapendo della presenza di altre specie batteriche non sorgeva alcun problema al riguardo; quando invece si ebbe la conoscenza della presenza di specie batteriche minori, esse furono ritenute di scarsa o nulla importanza ai fini di ottenere un prodotto con peculiari caratteristiche; nessuno si era spinto perciò a conoscerne le attività metaboliche, con l'effetto che per molto tempo questo campo di indagini venne trascurato;
- le proprietà *biotecnologiche*: un ceppo batterico deve essere in grado di manifestare le proprie capacità metaboliche, da noi desiderate, nelle condizioni adottate nel corso del processo produttivo.

Questi tre fattori altro non sono che la *manifestazione "fenotipica"* di quello che abbiamo definito essere l'unicità e la tipicità di un prodotto agro-alimentare tradizionale, nonché l'*espressione della specificità* della sua *origine*. Nel loro insieme esse costituiscono un marker di *tracciabilità*. E sono proprio le proce-

ture delle biotecnologie molecolari batteriche che consentono di determinare chiaramente detti fattori.

Le parole chiave per identificare e definire un prodotto agro-alimentare tradizionale sono quindi: *unicità, tipicità, origine, tracciabilità*.

### *... al futuro prossimo*

Le biotecnologie genetico-molecolari potranno, e in parte già possono, contribuire a realizzare delle procedure, rapide e sensibili, atte a stabilire l'origine di prodotti agro-alimentari di dubbia provenienza, per i quali si possono nutrire seri dubbi sul grado di sicurezza d'uso, sia per le tecnologie agrarie adottate (p. es. uso di pesticidi non ammessi o impiegati in dosi e tempi non conformi alle nostre vigenti norme), sia per le procedure di trasformazione, che possono essere condotte senza adeguate attenzioni igienico-sanitarie.

Siamo, quindi, in grado non solo di tutelare i nostri prodotti agro-alimentari tradizionali, ma di tutelare anche la salute del consumatore.

Le biotecnologie molecolari, inoltre, potranno, e in parte già possono, contribuire a realizzare delle procedure, più rapide e più sensibili, idonee a stabilire se un determinato prodotto agro-alimentare contiene OGM o componenti di OGM.

Infine, stante il fatto che le biotecnologie genetico-molecolari sono lo strumento principe che ci consente di conoscere quanto sia grande il grado di biodiversità in ambito microbico, specie in quello batterico, esse possono fungere da forte stimolo perché questa biodiversità sia conservata con la costituzione di idonee strutture.

## EVENTI, RICERCHE E ALTRE PROPOSTE

### *Una necessaria premessa*

L'applicazione delle conoscenze sulla molecola del DNA in ambito batterico, con conseguente nascita delle biotecnologie genetico-molecolari batteriche, si deve soprattutto a Marmur e Doty (Marmur e Doty, 1962) e a Schildkraut, Marmur e Doty (Schildkraut et al., 1961) che misero a punto due procedure relativamente semplici: la prima consente di determinare la *composizione in basi del DNA*, espressa come %GC (G=Guanina, C=Citosina); la seconda riguarda il *grado di omologia genetica* o % di riassociazione o ibridazione

molecolare DNA/DNA o più precisamente il grado di similarità di sequenze polinucleotidiche. Quest'ultima procedura si basa sul fatto che la molecola a doppio filamento del DNA di un batterio può essere dissociata termicamente (a poco più di 90 °C), ma con la riduzione della temperatura (a 70 °C circa) si ritorna alla primitiva struttura (a doppio filamento), spontaneamente: si ha il cosiddetto fenomeno della riassociazione. Questo particolare comportamento "termico" della molecola del DNA costituisce il fondamento anche della già ricordata procedura di amplificazione di segmenti di DNA, facilmente realizzabile mediante la PCR.

Questo insieme di eventi è dovuto alla particolare composizione e alla unicità della struttura della molecola del DNA. Essa è costituita da due filamenti, due lunghe molecole a loro volta costituite e caratterizzate ciascuna da una determinata sequenza di quattro tipi di nucleotidi. I nucleotidi sono costituiti da uno zucchero (desossiribosio), da una molecola di acido fosforico e da una delle quattro basi che li identificano; oltre a G e C abbiamo infatti anche l'Adenina (A) e la Timina (T). La riassociazione dei due singoli filamenti di una molecola di DNA si ha solo attraverso la formazione delle coppie GC (o CG) e AT (o TA), in questo caso si dice che i due filamenti sono complementari. Stante ciò soltanto due filamenti appartenenti alla stessa molecola di DNA possono riassociarsi completamente, al 100%. Tutto ciò sta inoltre a indicare che anche due segmenti di DNA, di differenti e lontani habitat e origini, possono riassociare se hanno una sequenza complementare di nucleotidi.

Ora, stante la ben nota e articolata biodiversità, praticamente osservata in tutte le specie, il grado di riassociazione, nell'ambito di una specie batterica, può variare dal 70 al 100%.

Questa valutazione è possibile in quanto di ogni specie batterica è stato scelto un ceppo type, il cui DNA viene utilizzato nelle necessarie procedure di comparazione. Se abbiamo ad es. un ceppo non ancora identificato il cui DNA presenta valori di riassociazione, con il DNA del ceppo type di una determinata specie, diversi da quelli sopra riportanti, siamo certi che il ceppo in esame non può essere ascritto alla specie del ceppo type scelto. Possiamo tuttavia ipotizzare due differenti situazioni: che il nostro ceppo possa essere ascritto ad altra specie nota, oppure essere il rappresentante di una nuova specie dello stesso genere se i valori di riassociazione non sono troppo distanti dal limite inferiore stabilito (70%), mentre può appartenere a una specie nota o nuova di altri generi noti o nuovi, più o meno distanti filogeneticamente dalla specie e dal genere del ceppo di riferimento impiegato qualora i valori di omologia genetica sono decisamente inferiori, ad es. pari al 16%.

Si deve comunque ricordare che questa procedura consente di determinare soltanto il grado di similarità delle sequenze nucleotidiche e non la vera sequenza nucleotidica; la possibilità di sequenziare segmenti di DNA sarà acquisita soltanto alcuni anni dopo.

Per quanto detto ora possiamo, anche per nostra comodità, distinguere due distinte fasi dell'evoluzione dei saperi e degli strumenti operativi che hanno potenziato, non poco, le nostre capacità di indagine.

### *La prima fase*

Nell'ambito di una serie di ricerche ad ampio raggio nel campo della Microbiologia generale e applicata (settori agro-alimentare, ambientale e industriale) già negli anni '60, come è stato prima segnalato (Craveri et al., 1965), abbiamo iniziato a utilizzare procedure di biotecnologia molecolare microbica per risolvere vari problemi sia scientifici che di ordine pratico.

Ricordo, qui di seguito, soltanto alcune delle ricerche che abbiamo effettuato.

Nel contesto del *Progetto Finalizzato "Ricerca di nuove fonti proteiche e di nuove formulazioni alimentari"*, sottoprogetto "*Proteine da microrganismi*" promosso dal CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche) e che ebbe la durata di un quinquennio, dal 1976 al 1981, siamo stati impegnati a selezionare ceppi di lievito da utilizzare per ottenere, mediante processi di fermentazione, biomasse con elevato tenore proteico da destinare all'alimentazione umana e/o animale. In parallelo sono state condotte anche delle ricerche al fine di stabilire la reale posizione tassonomica e filogenetica dei ceppi di lieviti ritenuti di maggior interesse. Quest'ultimo aspetto si rivelò un'occasione particolare: non solo ci è stata offerta la possibilità di adottare le nuove, già ben collaudate, procedure biotecnologiche, ma anche di adattarle. Gli adattamenti procedurali sono stati necessari in quanto si operava con lieviti che sono degli eucarioti, e quindi con un genoma ben più complesso di quello dei batteri, che sono dei procarioti.

Dei ceppi di lievito, selezionati per il loro elevato contenuto proteico, è stato, infatti, necessario accertare se potessero essere strettamente correlati geneticamente con una specie ritenuta patogena per l'uomo e gli animali. Questo particolare aspetto interessava sia la sicurezza d'uso delle biomasse, sia tutto quanto concerne le problematiche relative alla biodiversità microbica.

In specifico, in accordo con gli scopi della nostra ricerca e in base ai risultati ottenuti, si è voluto approfondire le nostre conoscenze sui rap-

porti filogenetici che potevano esserci tra i selezionati ceppi di *Candida utilis*, con cui sono state ottenute biomasse che presentavano un contenuto proteico elevato di potenziale interesse applicato, e ceppi di *Hansenula jadinii* e *H. petersonii*. Nel genere *Hansenula* vengono ascritte alcune specie di lieviti fenotipicamente simili e caratterizzate dalla capacità di riprodursi non solo vegetativamente, ma pure mediante processi sessuali. Nel genere *Candida* invece sono riunite molte delle specie di lieviti che si riproducono solo per via asessuale. Questi ultimi sono ritenuti le forme "imperfette" di corrispondenti forme perfette. Ad alcuni è stato pure possibile, adottando opportune condizioni di coltura, indurre le forme imperfette a riprodursi mediante processi sessuali, ma questo non è stato a noi possibile.

Nel nostro caso *C. jadini*, secondo le caratteristiche fenotipiche, poteva essere la forma imperfetta di una delle due specie di *Hansenula* prima citate. Questo dubbio doveva essere risolto in quanto, *H. petersonii* è considerata una specie potenzialmente patogena per l'uomo. La stretta correlazione filogenetica tra queste tre specie, a quel tempo era comunemente accettata, ma doveva essere verificata poiché la conferma di questa ipotesi, di fatto, avrebbe potuto impedire ogni possibilità di impiego alimentare delle biomasse prodotte. Il dilemma non poteva che essere risolto utilizzando le procedure e gli strumenti offerti dalle ormai consolidate biotecnologie genetico-molecolari. E così fu.

Dai risultati, da noi ottenuti, è stato possibile stabilire che *C. utilis* e *H. jadinii* sono strettamente correlate filogeneticamente e quindi sono rispettivamente la forma imperfetta e quella perfetta di una sola specie. È stato osservato che, tra i DNA dei diversi ceppi di *C. utilis* e i DNA dei ceppi di *H. jadinii* e i DNA dei ceppi type delle due specie, esistevano alti valori di omologia genetica. Sono stati infatti ottenuti valori di riassociazione molecolare DNA/DNA superiori al 94 %; per contro tra il DNA di *C. utilis* e il DNA di *H. petersonii* il grado di omologia non raggiungeva l'11% (Manachini et al., 1977; Manachini, 1979).

Le biomasse dei ceppi di lieviti da noi studiati, sono state ottenute impiegando substrati di coltura preparati con scarti o residui di produzioni agro-alimentari, previo opportuno trattamento per degradare i polisaccaridi, quando si disponeva di materiali contenenti amido o cellulosa. Tutti i lieviti, infatti, non sono in grado di sintetizzare gli enzimi necessari a scindere, nei loro più semplici componenti, i polisaccaridi complessi, come amido e cellulosa. Questo pre-trattamento non è necessario quando si può disporre dei

melassi, sia di barbabietola che di canna, che altro non sono che dei residui dell'industria saccarifica. Con le attuali biotecnologie genetico-molecolari si possono modificare geneticamente dei ceppi di lieviti, conferendo loro la capacità di utilizzare anche polisaccaridi complessi, come l'amido.

È stato fatto questo inciso poiché, come alcuni ricorderanno, quello era il momento in cui aveva suscitato grande interesse la possibilità di avere la famosa *Bistecca dal Petrolio*. In questo caso si impiegavano altre specie di lieviti, diverse dalle precedenti, in grado di utilizzare, come fonte di carbonio ed energia, miscele di idrocarburi che venivano fornite dalle industrie petrolifere, per le quali questo materiale costituiva uno scarto, più o meno "ingombrante", da eliminare. I possibili svantaggi, specie per la salute umana, furono tanti e tali che il progetto fallì in brevissimo tempo.

Venne così sventato uno dei più pesanti attacchi, forse uno dei primi dei non pochi fatti, che è stato mosso contro la nostra tradizionale e notissima bistecca fiorentina e indirettamente anche contro la chianina.

Per completare il quadro, bisogna ricordare che a quel tempo si faceva un gran parlare, a livello mondiale, di come combattere la fame che debilitava e uccideva milioni di persone ogni anno. La possibilità di disporre di una fonte proteica di basso costo, da destinare alle popolazioni sottoalimentate e malnutrite, parve all'inizio una brillante soluzione del problema fame. Purtroppo questo terribile flagello imperversa tutt'oggi. La soluzione di questo problema è soprattutto di natura politica; la scienza può soltanto suggerire delle possibilità di intervento, cui indirizzare le risorse.

Un possibile contributo alla soluzione di questo tremendo problema, è quello di potenziare le opportunità offerte dalle stesse tradizioni agro-alimentari di quei popoli che devono convivere quotidianamente con lo spettro della fame, con il penoso spettacolo offerto dai sofferenti a causa della malnutrizione e dalla morte dei bambini per stenti. Anche in questo caso le biotecnologie genetico-molecolari batteriche potrebbero svolgere un importante ruolo.

Da quanto sopra detto, possiamo concludere che le biotecnologie genetico-molecolari non solo rappresentano un forte strumento di diagnosi che consente di mettere in evidenza, chiaramente il grado di biodiversità in ambito agro-alimentare, anche in un contesto riguardante la sicurezza d'uso, ma consentono pure di tutelare le "nuove" tradizioni agro-alimentari. Al riguardo ricordiamo che in mangimistica, a quel tempo, era diffuso l'uso della torula, che altro non era che una biomassa di *Candida utilis* ottenuta impiegando come substrato di coltura il melasso. Biomasse di lieviti, ottenute con specie differenti da *C. utilis* e coltivate su substrati non dichiarati, possono essere facilmente riconosciute con le biotecnologie genetico-molecolari.

Successivamente il CNR, per il quinquennio 1984-1988, dette vita al *Progetto Finalizzato IPRA* (Incremento Produttività Risorse Agricole), al quale ho partecipato direttamente come responsabile di una linea di ricerca relativa alla produzione di enzimi microbici. In quest'ambito sono state condotte ricerche per ottenere, per via fermentativa, enzimi per lo più esocellulari e di tipo idrolitico sintetizzati sia da batteri che da eumiceti. Dei grezzi enzimatici, parzialmente purificati, ottenuti dai liquidi di fermentazione sono state determinate le caratteristiche biotecnologiche, in modo da trarre delle indicazioni per quale settore agro-alimentare potevano avere un potenziale interesse di impiego. La selezione dei ceppi è stata condotta, anche con l'ausilio dei principi che fanno da fondamento al fenomeno della biodiversità microbica. Sono state, inoltre, utilizzate le procedure proprie delle biotecnologie genetico-molecolari, allora disponibili, per meglio definire la specie di appartenenza dei ceppi di nuovo isolamento di maggior interesse applicato. I risultati ottenuti sono stati oggetto di diverse considerazioni, comprese quelle relative ai possibili futuri contributi che le biotecnologie genetico-molecolari avrebbero potuto offrire al settore agro-alimentare (Manachini, 1998). A quel tempo le nuove biotecnologie erano nella loro fase esponenziale iniziale.

### *La seconda fase*

Gli studi, sempre più mirati, sulle strutture e le funzioni della cellula batterica hanno portato alla conquista di nuove conoscenze, di notevole importanza anche per lo sviluppo delle nuove procedure di biotecnologia genetico-molecolare.

I batteri posseggono dei sistemi enzimatici particolari che utilizzano per riparare il proprio DNA, quando viene danneggiato da eventi chimico-fisici vari, oppure per neutralizzare, frammentandolo, il DNA esogeno, come quello di origine virale (attacco da parte dei batteriofagi). Si tratta delle *endodesossiribonucleasi di restrizione*, detti più semplicemente *enzimi di restrizione* (ER) e delle *ligasi*. Questi ER operano soltanto sul DNA a doppia elica. Ogni ER, inoltre, agisce in siti ben precisi del DNA, dove si trovano determinate sequenze di nucleotidi, dando luogo a un diverso numero di segmenti di DNA, di differenti dimensioni, in funzione dell'origine, e quindi della sequenza nucleotidica della molecola di DNA in esame. Le ligasi sono enzimi che uniscono due segmenti di DNA. Questi enzimi possono operare anche in vitro, gestiti direttamente dall'uomo. In questo caso è possibile unire due segmenti di DNA, anche di differente origine, cioè provenienti da batteri di specie e generi diversi, da eucarioti e anche da virus.

ER e ligasi sono quindi due strumenti importanti per l'ottenimento di *ricombinanti genetici*. I ricercatori anglofoni di oltre oceano, con quella capacità di sintesi e di immediatezza di espressione che possiedono, hanno denominato questa procedura *cut and tie*, cioè taglia e cuci. Un bell'esempio di quelle che devono essere le prerogative di chi deve divulgare le non sempre facili, anzi spesso pure ostiche, conquiste della scienza.

I batteri, come è noto, posseggono un genoma costituito da un solo cromosoma. Vi sono però diversi ceppi di batteri, anche della stessa specie, che possiedono delle molecole circolari di DNA extracromosomali, autoreplicanti, detti *plasmidi*. Questi plasmidi partecipano ai processi naturali di ricombinazione genetica – capacità dei batteri di acquisire DNA esogeno anche estraneo – noti come trasformazione e coniugazione. Tali processi possono essere conseguiti anche con l'intervento dell'uomo. Si isola un plasmide, si apre con una specifica ER, si mette in presenza di un segmento di DNA che porta un gene di nostro interesse e che è stato separato dal DNA di un altro batterio, utilizzando un ER; quindi, mediante una ligasi, si unisce il segmento di DNA al plasmide: si ottiene così un *plasmide ibrido*. Infine, è poi possibile far acquisire il plasmide ibrido, p. es. per trasformazione, da un altro batterio che verrà così modificato geneticamente. Avremo così ottenuto un *ricombinante*, cioè un batterio che avrà acquisito un nuovo carattere che prima la sua specie non aveva mai posseduto. Questo nuovo batterio è un OGM.

Nei primi anni '90 le procedure di biotecnologia molecolare batterica iniziarono ad affermarsi anche in relazione alla sentita necessità di meglio comprendere quale ruolo e importanza poteva avere, in ambito agro-alimentare, la biodiversità microbica.

Queste tematiche sono state affrontate nell'ambito del *Progetto Finalizzato RAISA* (Ricerche Avanzate per Innovazioni nel Sistema Agricolo), Sub-progetto *Agro-Biotecnologie per la valorizzazione dei prodotti e dei sottoprodotti agricoli*, promosso dal CNR, con durata quinquennale (1991-1995). In questo Progetto ho diretto una specifica Unità Operativa (UO) e sono stato responsabile del coordinamento del lavoro scientifico di un gruppo di ricerca costituito da diverse Unità Operative.

Una prima serie di contributi, che riguardavano i risultati delle ricerche condotte sulle concrete possibilità di impiego delle procedure di *biotecnologia e di biologia molecolare dei batteri lattici* per il miglioramento di alimenti destinati all'uomo o agli animali di allevamento, sono stati presentati nel corso di un Convegno appositamente organizzato (AA. VV., 1993).

Sulla base dei risultati ottenuti ho organizzato, con l'aiuto di alcuni diretti collaboratori, nel 1995, un *Convegno Nazionale dedicato alle Biodiversità Microbiche*, probabilmente il primo in Italia. In questo Convegno sono state discusse diverse problematiche relative agli aspetti tassonomici, biotecnologici e metodologici propri delle biodiversità microbiche (Manachini, 1996).

Sempre nell'ambito del Progetto RAISA, nel 1995, con alcuni microbiologi delle Facoltà di Agraria Italiane, è stata elaborata e avanzata una proposta per la costituzione di una *Collezione Nazionale di Colture Microbiche* con il compito di raccogliere, classificare, conservare e distribuire i ceppi microbici di interesse applicato (Bottazzi et al., 1995). Questo tipo di Istituzione è presente in tutti i paesi più progrediti. Al momento attuale siamo sempre a livello di proposta: è un vero peccato in quanto con gli strumenti culturali e operativi ora disponibili, è probabile che si abbia la possibilità di evidenziare l'esistenza di biodiversità microbiche particolari, in relazione alle peculiarità ambientali proprie dei vari prodotti agro-alimentari tradizionali. In particolare si auspicava la creazione di una sede, oppure di più sedi, dove poter conservare e gestire le differenti biodiversità mostrate dalle popolazioni microbiche messe in evidenza, in particolare, con lo studio delle qualità microbiologiche caratterizzanti i prodotti agro-alimentari delle tradizioni italiane.

Nel 1996, sempre nell'ambito del Progetto RAISA, abbiamo proposto l'istituzione di una

*Carta di Identità dei Microrganismi di interesse agro-alimentare* (Manachini e Isolani, 1996).

Nel 1998, adottando una procedura particolare, la quale prevede l'impiego di una PCR multipla e di specifiche sonde nucleiche, è stato possibile identificare i ceppi di due specie di batteri lattici fenotipicamente indistinguibili, precisamente *Pediococcus pentosaceus* e *P. acidolactici*, e nell'ambito di questa ultima specie distinguere tra i ceppi quelli in grado di sintetizzare la pediocina AcH/PA-1 di potenziale interesse per il settore agro-alimentare (Mora et al., 1998). Questi risultati sono una diretta ricaduta delle conoscenze scientifiche acquisite nel corso delle ricerche effettuate nell'ambito del Progetto CNR-Raisa.

Nel 2001 siamo stati coinvolti nelle ricerche relative a un *Progetto*, promosso dal MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali), per la valorizzazione delle comunità microbiche presenti in ambito lattiero-caseario; in questo contesto abbiamo iniziato le nostre *ricerche sulla Toma Piemontese*. Sempre nell'ambito del Progetto MIPAF abbiamo partecipato attivamente e

concretamente all'obiettivo: costituzione di una *Collezione Nazionale di Microrganismi di Interesse Agrario e Industriale*. La volontà dei ricercatori c'era e c'è tuttora, ci sono pure i ceppi microbici, ma al momento, per quanto è a noi noto, tutto tace.

Nel 2003, sulla base dei risultati conseguiti con l'applicazione delle nuove acquisizioni scientifiche e operative, abbiamo avanzato una nuova proposta: l'istituzione di una *Carta di identità microbiologica dei prodotti agro-alimentari*, la quale dovrebbe assumere la veste di documento ufficiale a garanzia del consumatore sulla origine e tipicità del prodotto agro-alimentare a cui si riferisce (Manachini et al., 2004).

#### CONSIDERAZIONI FINALI

Le biotecnologie genetico-molecolari batteriche, nate poco più di 40 anni fa, utilizzando le peculiari proprietà chimico-fisiche e strutturali e il ruolo funzionale del genoma batterico, hanno quindi consentito di acquisire più approfondite conoscenze sulla complessità della biodiversità microbica che qualifica e identifica ciascun prodotto agro-alimentare ottenuto adottando procedimenti tradizionali.

I risultati, ottenuti con le nostre ultime e più recenti ricerche, hanno permesso di elaborare delle riflessioni sulle importanti opportunità che offrono le biotecnologie genetico-molecolari batteriche. Con il loro ausilio è stato possibile ottenere *parametri oggettivi*, atti a conseguire una corretta e inoppugnabile tutela delle produzioni agro-alimentari tradizionali italiane. Hanno inoltre consentito di evidenziare e sottolineare l'importanza del ruolo svolto dalle popolazioni microbiche minori, non starter, nel determinare le caratteristiche che rendono i prodotti finali tipici e unici e che consentono pure di stabilire l'origine e quindi la tracciabilità dei vari prodotti agro-alimentari reperibili sul mercato.

Tutto questo fa sì che, in ambito batterico, alla caratterizzazione fenotipica o convenzionale, ancor oggi assai valida e direi insostituibile, venga sempre associata la caratterizzazione genetico-molecolare. In questo modo si ha la possibilità di "ristrutturare" il mondo dei batteri in base a un criterio non solo determinativo, ma anche filogenetico. Naturalmente tutto ciò è in continuo *progress*.

I nuovi saperi ci consentono, inoltre, di meglio definire i contorni della specie batterica in un'ottica *polifasica*. Ricordiamo che i batteri sono dei pro-

carioti e come tali non si riproducono mediante un vero e proprio processo sessuale, sicché non era possibile utilizzare la definizione di specie adottata per i viventi superiori, cioè gli eucarioti, comunque anche in quest'ambito il concetto di specie deve essere rivisto, a causa pure dell'ibridismo interspecifico e delle nuove conoscenze sul genoma.

In breve la specie batterica viene oggi intesa, dalla comunità scientifica internazionale come *un insieme di individui che posseggono un complesso di comuni e peculiari caratteristiche sia convenzionali che genetico-molecolari*.

L'attenersi alle norme, che discendono da questa definizione di specie batterica, ha fatto sì che la nostra nuova specie, *Enterococcus italicus*, reperita nella Toma piemontese sia stata riconosciuta internazionalmente. Le caratteristiche discriminanti della nuova specie, descritte analiticamente, sono riportate in bibliografia (Fortina et al., 2004).

In ogni caso l'attuale definizione di specie batterica non risponde a tutte le problematiche di ordine scientifico e diagnostico che abbiamo prima ricordato (ceppi patogeni di *E. coli*, la creazione del gruppo-specie *B. cereus*, il caso della fontina), così come non è stato ancora risolto "l'enigma" dei ceppi batterici considerati delle *genomovar* di una specie. Le *genomovar* sono ceppi batterici che fenotipicamente sono ascrivibili a una determinata specie, mentre, per il basso valore di omologia genetica, sono da ascrivere ad altra specie.

Al riguardo abbiamo fatto una diretta esperienza di questo fenomeno. Di un gruppo di 182 ceppi di batteri sporigeni, aerobi, mesofili, produttori di proteasi esocellulare, isolati da poco meno di un centinaio di campioni di suolo provenienti da diversi paesi dei cinque continenti è stato studiato il grado di biodiversità. Adottando le procedure di identificazione convenzionali tutti gli isolati sono stati ascritti alla specie *Bacillus licheniformis*. Per contro adottando le procedure delle biotecnologie genetico-molecolari è stato evidenziato che un certo numero, una ventina circa, di isolati non potevano essere ascritti alla specie *B. licheniformis* per il basso valore di omologia genetica, bensì a una o due differenti specie nuove.

Stante la discordanza tra caratteristiche fenotipiche e quelle genotipiche si è risolto, momentaneamente il problema creando due nuove *genomovar* nell'ambito della specie *B. licheniformis* (Manachini et al., 1998).

Anche il concetto di specie batterica è quindi in continua evoluzione.

Le biotecnologie genetico-molecolari batteriche hanno altresì consentito di evidenziare la diversa, ampia e più articolata dimensione degli eventi microbiologici che avvengono nei prodotti agro-alimentari tradizionali durante i proces-

si di ottenimento, rispetto a quanto si riteneva prima. Questi eventi sono di una complessità tale che pongono non pochi problemi nella conduzione “cosciente” di uno qualsiasi dei vari processi di trasformazione che vengono adottati per ottenere i numerosi prodotti agro-alimentari della tradizione italiana. La complessità di questi è tale che quella dei più noti processi di fermentazione allestiti per ottenere, da un solo ceppo microbico, soltanto uno specifico metabolita – dall’antibiotico all’amminoacido, dalla vitamina all’acido organico – appare di facile, quasi banale, gestione.

Le nuove biotecnologie hanno pure determinato la nascita di nuove esigenze: occorre disporre di prodotti batterici differenti come plasmidi, enzimi di restrizione, ligasi, segmenti di DNA più o meno specifici, DNA polimerasi.

Hanno anche imposto la progettazione e la realizzazione di nuovi strumenti operativi, come il termociclatore per la PCR e il sequenziatore, indispensabili per poter effettuare le procedure di indagine. Esse sono state messe a punto al fine verificare le possibilità di traduzione, in termini di applicabilità, delle nuove acquisizioni scientifiche e di fornire valide risposte, di natura sperimentale e non solo speculativa, ai nuovi quesiti che via via sorgevano e sorgono.

Tutto questo ha fornito anche quei fondamenti culturali e operativi che hanno consentito di ottenere i tanto discussi OGM.

Stante l’interesse che molti non addetti ai lavori hanno dimostrato di avere per le conquiste delle Scienze, anche per le loro applicazioni in campo agro-alimentare, da tempo un concreto impegno viene dedicato alla ricerca di modelli e procedure per realizzare una efficace *opera di divulgazione*, scientificamente corretta.

In accordo con l’esperienza acquisita, è stato adottato un *approccio olistico*. Abbiamo potuto così svolgere ricerche a tutto campo, a 360 gradi come si suol dire, ovviamente con la collaborazione di altri studiosi. Nell’ottica di un tale approccio metodologico è stato pure possibile trovare quel necessario anello che consente di abbinare la Cultura Scientifica con la Cultura Umanistica.

Gli intenti che abbiamo raggiunto erano e sono quelli di rendere fruibili i “prodotti” delle ricerche al maggior numero possibile di persone, indipendentemente dal loro grado e tipo di cultura. A questo fine è stata riservata una particolare attenzione al linguaggio, che doveva e deve essere di semplice e facile comprensione.

Nella stesura di questo contributo si è cercato, tenuto conto naturalmente del “livello” particolare dei potenziali lettori, di attenerci il più possibile a criteri prima esposti. Anche nella scelta della bibliografia da citare, abbiamo favorito quei lavori che avevano un intento divulgativo.

Infine segnalo che la Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano, dove opero, ha attivato un nuovo Insegnamento, proposto ed elaborato dal sottoscritto con lo scopo di far acquisire agli studenti le conoscenze e le procedure di base riguardanti *l'Evoluzione, la Didattica e la Divulgazione delle Scienze e Tecnologie Agrarie e Alimentari*.

Le biotecnologie genetico-molecolari batteriche non furono quindi, soltanto una semplice acquisizione di nuove e importanti conoscenze scientifiche e la disponibilità di adeguati strumenti operativi e di idonee procedure di indagini, fu soprattutto una importante conquista culturale, una vera *rivoluzione concettuale*.

Questa affermazione è senz'altro vera e condivisibile, ma temo che la biodiversità sia un fenomeno noto all'uomo da lunga pezza. E quest'ultima riflessione mi fanno tornare in mente i versi di un riconosciuto grande poeta latino e, probabilmente, anche del primo vero divulgatore delle Scienze della Natura e delle loro Applicazioni, che fu Tito Lucrezio Caro, vissuto nel primo secolo a.C.

Ecco come Lucrezio descrive, nel suo *De Rerum Natura* (Tito Lucrezio Caro, 1953), la biodiversità per quanto riguarda il complesso mondo animale:

[...] *prendine, specie per specie,  
quale tu vuoi: troverai che hanno pur sempre tra loro  
nella figura una qualche diversità.*  
(libro II: 348-350)

e per l'articolato mondo vegetale osserva che in un campo di grano:

[...] *se uno solo ne prendi di ogni singola stirpe  
vedrai come sono diversi tra di loro d'aspetto [...]*  
(libro II: 373-375)

Il variegato universo dei viventi, cioè la biodiversità della natura, in tutta la sua meravigliosa, potente semplicità, viene illustrata chiaramente con pochi splendidi versi, pensati e vergati più di due mila anni or sono, da un poeta che possedeva non solo eccezionali capacità di osservazione, ma che sapeva pure tradurre e trasmettere ciò che vedeva, utilizzando mezzi di divulgazione di una bellezza senza pari, di forte impatto emotivo, e senza poter ricorrere all'ausilio delle nostre attuali e indispensabili biotecnologie genetico-molecolari.

E *Homo sapiens sapiens*, come ben sappiamo, circa 10.000 anni or sono mise in pratica questi suoi saperi e questo evento così lo descrive, sempre in versi, Lucrezio

[...] *Tentavan poi questa e quella coltura,  
nel dolce lor campicello, e curandola,  
[...] vedevan che tramutavano  
in buoni i frutti selvatici [...]*  
(libro V, 1365-1368)

Ed è proprio vero che con la nascita e lo sviluppo dell'Agricoltura, una delle più grandi conquiste culturali di *Homo*, la biodiversità e la variabilità, che caratterizzano i viventi, offrivano concrete prospettive di un nuovo tipo di vita.

Questi splendidi versi sono la diretta conferma che Lucrezio non è soltanto uno squisito poeta, ma che è pure un valente divulgatore dei fenomeni naturali e soprattutto un deciso sostenitore che solo i saperi scientifici possono razionalmente interpretare gli eventi della Natura.

Possiamo quindi concludere che le nostre attuali biotecnologie genetico-molecolari possono aiutarci a meglio comprendere l'importante ruolo che giocano le biodiversità microbiche, e non, nell'ambito agro-alimentare, anche in relazione ai nostri saperi tradizionali che devono, anche loro, essere tutelati.

#### RIASSUNTO

*Le biotecnologie genetico-molecolari a tutela delle tradizioni agro-alimentari.* Le biotecnologie genetico-molecolari sono un potente strumento per conoscere meglio la biodiversità microbica presente negli alimenti artigianali. Esse si basano soprattutto sulle proprietà chimico-strutturali e funzionali del DNA microbico, con particolare attenzione a: %GC, % DNA/DNA riassociazione, presenza di plasmidi e di enzimi di restrizione, duplicazione e amplificazione del DNA, studio di sonde nucleiche e dell'operone ribosomiale. Le caratteristiche chimico-fisiche, sensoriali, nutrizionali e di sicurezza d'uso, che identificano un alimento tradizionale, sono dovute principalmente alle attività biochimiche di specifiche popolazioni microbiche naturalmente presenti nelle materie prime. In accordo con i risultati delle nostre ricerche abbiamo proposto di redigere una *Carta di identità microbiologica dei prodotti alimentari artigianali* e di costituire una *Collezione Nazionale di Colture Microbiche*. Abbiamo infine presentato alcune considerazioni sulle nostre esperienze di come sia più che necessario organizzare e promuovere una incisiva attività di divulgazione dell'evoluzione dei *Saperi* propri delle Scienze e Tecnologie Agrarie e Alimentari.

## ABSTRACT

*Genetic-molecular biotechnologies to safeguard the traditions in agricultural and food production.* Genetic-molecular biotechnologies are a powerful tool in enhancing our knowledge of the microbiological biodiversity to be found in non-industrial foodstuffs. Above all, they are based on chemical and structural properties and the role of microbial DNA. Particular attention goes to: %GC, % DNA/DNA reassociation, the presence of plasmids and restriction enzymes, the duplication and amplification of DNA, the nucleic probes, and ribosomal operon studies. The chemical, physical, sensorial and nutritional characteristics, as well as safety of use that are associated with a traditional food, are mainly due to the biochemical activities of specific microbiological populations naturally found in the raw material. In accordance with the results of our research we propose preparing a *Microbiological Identity Card of foods produced in a non-industrial fashion* and the establishment of a related *National Collection of Microbiological Cultures*. Finally we have put forward some thoughts arising from our experience on the need to organize and promote effective activities on the development of *knowledge* and awareness of Agricultural and Food related Science and Technology.

## BIBLIOGRAFIA

- AA. VV. (1993): *Biotechnology and molecular biology of lactic acid bacteria for the improvement of foods and feeds quality*. Edited by Coppola S., Manachini P.L., Bottazzi V., Zamorani A., Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Libreria dello Stato, Roma, p. 400.
- BOTTAZZI V., FEDERICI F., LOCCI R., MANACHINI P.L., MARTINI A., PORCEDDU E., RAMBELLI A., VAUGHAN A., ZAMORANI A. (1995): *Proposals for an Italian National Collection of Microbial Cultures*, CNR-RAISA, sottoprogetto 4, Monografia n° 4, CNR, Roma, p. 82.
- CRAVERI R., HILL L., SILVESTRI L., MANACHINI P.L. (1965): *Dexyribonucleic acid base composition among thermophilic actinomycetes: the occurrence of two strains with low GC content*, «Journal General Microbiology», 41, pp. 335-339.
- FORTINA M.G., MANACHINI P.L. (2001): *Qualità e tipicità degli alimenti: biodiversità e ruolo dei microrganismi*, in *Le cucine della memoria – Alimenti e cucina della tradizione verso il nuovo millennio* a cura di Corradini C., Forum Editrice Universitaria Udinese, Udine, pp. 19-39.
- FORTINA M.G., RICCI G., ACQUATI A., ZEPPA G., GANDINI A., MANACHINI P.L. (2003): *Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese*, «Food Microbiology», 20, pp. 397-404.
- FORTINA M.G., RICCI G., FASCHINO R., PICOZZI C., DOLCI P., ZEPPA G., COCOLIN L., MANACHINI P.L. (2007): *Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of Lactococcus garvieae strains from dairy environments*, «Journal of Applied Microbiology», accettato.
- FORTINA M.G., RICCI G., MORA D., MANACHINI P.L. (2004): *Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals Enterococcus italicus sp. nov.* «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology», 54, pp. 1717-1721.

- MANACHINI P.L. (1979): *DNA sequence similarity, cell wall mannans and physiological characteristics in some strains of Candida utilis, Hansenula jadinii and Hansenula petersonii*, «Journal of Microbiology» (Antonie van Leeuwenhoek), 45 (3), pp. 451-463.
- MANACHINI P.L. (1996): *Biodiversità microbiche: "antiche" opportunità emergenti*. in *Atti Convegno Biodiversità microbiche – Aspetti tassonomici, biotecnologici e metodologici*, a cura di Manachini P.L., Fortina M.G. e Parini C., Reggio Emilia dicembre 1995, CNR-RAISA, Roma, pp. 11-13.
- MANACHINI P.L. (1998): *Produzione di enzimi microbici: evoluzione e prospettive*, in *Aggiornamenti sull'impiego di preparazioni enzimatiche nell'industria alimentare*, a cura di Montedoro G.F., Progetto CNR IPRA, Monografia n° 22, CNR-IPRA, Roma, pp. 41-91.
- MANACHINI P.L., CAVAZZONI V., SARRA P.G., BIANCHI E., ADAMI A., BOTTAZZI V., CRAVERI R. (1977): *Omologia genetica e caratteri fisiologici di ceppi del genere Candida di interesse industriale nel contesto di problemi di identificazione*, in *Atti Convegno Speciale sul Genere Candida*, CNR, Pisa, pp. 215-233.
- MANACHINI P.L., FORTINA M.G. (1998): *Sonde nucleiche: un nuovo strumento di indagine per la sicurezza d'uso degli alimenti*, in *Atti del Convegno "La sicurezza microbiologica degli alimenti conservati"*, a cura di D'Aglio G., Stazione Sperimentale per le Industrie delle Conserve Alimentari, Parma, pp. 13-25.
- MANACHINI P.L., FORTINA M.G., LEVATI L., PARINI C. (1998): *Contribution to Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacillus licheniformis and Description of new Genomovars*, «Systematic and Applied Microbiology», 21, pp. 520-529.
- MANACHINI P.L., ISOLANI B. (1996): *Proposal: identity cards for microorganisms in food-stuffs*. «Tecnologie Alimentari», 7 (7), pp. 106-114.
- MANACHINI P.L., ISOLANI B. (2004): *Un contributo per la tracciabilità della tradizione delle Memorie per non parlare soltanto di...microbi*, in *Le cucine della memoria – La tracciabilità della tradizione* a cura di Corradini C., Forum Editrice Universitaria Udinese, Udine, pp. 17-34.
- MANACHINI P.L., RICCI G., ISOLANI B. (2004): *Carta di identità microbiologica dei prodotti alimentari: un elemento delle tradizioni alimentari*, in *Le cucine della memoria – La conservazione della memoria nelle tecnologie alimentari innovative*, a cura di Corradini C., Forum Editrice Universitaria Udinese, Udine, pp. 15-29.
- MARMUR J., DOTY P. (1962): *Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature*, «Journal of Molecular Biology», 3, pp. 109-118.
- MORA D., PARINI C., FORTINA M.G., MANACHINI P.L. (1998): *Discrimination among pediocin AcH/PA-1 producer strain by comparison of pedB and pedD amplified genes and by multiplex PCR assay*, «Systematic and Applied Microbiology», 21, pp. 454-460.
- MULLIS K.B. (1998): *Dancing naked in the mind field*, Pantheon Books, New York. Pubblicato anche in Italia nel 2000 da Baldini Castoldi, Milano con il titolo *Danzando nudo nel campo delle mente*.
- SCHILDKRAUT C.L., MARMUR J., DOTY P. (1961): *The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homology*, «Journal of Molecular Biology», 3, pp. 595-617.
- TITO LUCREZIO CARO (1953): *De rerum natura*, traduzione e note di B. Pinchetti, Rizzoli, Milano.