

PIANO NAZIONALE SULLA BIODIVERSITÀ DI INTERESSE AGRICOLO

SINTESI LINEE GUIDA PER LA CONSERVAZIONE E
LA CARATTERIZZAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ
MICROBICA DI INTERESSE PER L'AGRICOLTURA

Il presente lavoro è stato realizzato con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali nell'ambito del programma di attività per l'attuazione del Piano Nazionale per la Biodiversità di interesse agricolo (DM 28672 del 14/12/2009), e con la supervisione del Comitato Permanente per le Risorse Genetiche in Agricoltura.

Il coordinamento scientifico delle Linee guida è di Mario Marino (FAO), il coordinamento tecnico è di Antonella Trisorio (INEA).

Alla stesura delle linee guida hanno collaborato:

Risorse genetiche vegetali per l'alimentazione e l'agricoltura: Pier Giacomo Bianchi (Ente Nazionale delle Sementi Elette), Riccardo Bocci (Libero Professionista), Romana Bravi (Ente Nazionale delle Sementi Elette), Isabella Dalla Ragione (Libero Professionista), Antonio Di Matteo (Università di Napoli), Carlo Fideghelli (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura), Marisa Fontana (Libero Professionista), Mario Macchia (Università di Pisa), Lorenzo Maggioni, (Bioversity International), Valeria Negri (Università di Perugia), Domenico Pignone (Consiglio Nazionale delle Ricerche), Oriana Porfiri (Libero Professionista), Anna Schneider (Consiglio Nazionale delle Ricerche), Francesco Sottile (Università di Palermo), Concetta Vazzana (Università di Firenze)

Risorse genetiche animali per l'alimentazione e l'agricoltura: Riccardo Fortina (Università di Torino), Baldassarre Portolano (Università di Palermo), Alessio Zanon (Libero Professionista);

Risorse genetiche microbiche per l'alimentazione e l'agricoltura: Anna Benedetti (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura), Gian Luigi Cardinali (Università di Perugia)

La segreteria del gruppo di lavoro è stata assicurata da Anna Lapoli e Jessyama Forlini

Ringraziamenti:

Il lavoro ha beneficiato del contributo di esperti di settore, provenienti da Regioni e Province Autonome, da Università, Istituti di ricerca, Associazioni, Enti pubblici e privati, nonché di agricoltori, allevatori e pastori.

Le conclusioni fornite nelle presenti Linee guida sono da ritenersi appropriate al momento della loro predisposizione. Esse potranno essere modificate in funzione di ulteriori conoscenze e/o metodologie acquisite in fasi successive.

La menzione di aziende specifiche o di prodotti, anche se brevettati, non implica che essi siano stati approvati o raccomandati dal GIBA rispetto ad altri di natura simile che non sono stati menzionati.

Le opinioni espresse in questa pubblicazione sono quelle degli Autori e non necessariamente riflettono le opinioni delle istituzioni in cui lavorano.



Presentazione delle linee guida per la conservazione delle risorse genetiche microbiche di interesse agrario.

Il presente documento ha come obiettivo principale quello di fornire linee guida alla conservazione della biodiversità microbica di interesse agrario per i due comparti principali inerenti gli alimenti e la fertilità del suolo. Su decisione del GIBA verte unicamente sui microrganismi utili escludendo tutti gli aspetti fitosanitari e patologici per i quali verranno elaborate linee guida separate.

Si tratta di un documento di rigore scientifico, ma operativo, per consentire agli addetti del settore di predisporre azioni sul territorio volte alla conservazione delle risorse genetiche microbiche. In campo agrario la conservazione delle risorse genetiche microbiche investe aspetti fondamentali come la della fertilità del suolo, senza la quale nulla potrebbe essere coltivato e conservato. La fertilità del suolo rappresenta il nodo centrale per preservare la biodiversità e la vita dell'intero pianeta.

Conservare i microrganismi di rilievo alimentare significa proteggere i prodotti tipici nazionali e tutta la tradizione enogastronomica italiana.

Nel documento si forniscono strumenti operativi gerarchici quali marcatori morfologici o marcatori pratici, fenotipici e molecolari. Si forniscono inoltre protocolli operativi per la conservazione *in situ* ed *in factory*, nonché per il campionamento e la conservazione *ex situ*.

Il documento infine presenta dei casi studio quale esempio applicativo dei protocolli suggeriti.

Il documento consta di sei capitoli: (I) definizione del concetto di specie per il comparto microbico, (II) descrizione dei marcatori morfologici, obiettivi e molecolari, (III) descrizione delle metodologie analitiche da utilizzare nella caratterizzazione e isolamento dei microrganismi, (IV) protocolli di conservazione *in-situ*, *ex-situ*, *on farm*, *in factory*; (V) definizione del rischio di erosione genetica, (VI) note conclusive e raccomandazioni.

Importanza delle risorse genetiche microbiche.

Nel caso dei microrganismi di interesse agrario essi svolgono un ruolo chiave sia nella produzione di cibo (fertilità del suolo, nutrizione delle colture, biocontrollo, biofertilizzazione) che nei riguardi della conservazione delle derrate alimentari (tossine e patogeni), che nella produzione di alimenti trasformati (latte e formaggi, vino, olio, ecc), pertanto la loro presenza e la loro biodiversità è



funzionale al sostentamento degli organismi viventi sulla terra. Nello studio della diversità biologica (biodiversità) le teorie ecologiche sono sempre state sviluppate essenzialmente per gli ecosistemi presenti sulla superficie del suolo, trascurando per lungo tempo tutte quelle forme di vita che sono presenti all'interno di esso, in particolare i microrganismi, che rappresentano una enorme quantità di "vita invisibile" di fondamentale importanza per l'intera vita sulla terra. Infatti la popolazione microbica rappresenta la parte più rilevante della biomassa del suolo, ed è quella che maggiormente influisce sulle sue proprietà biologiche, regolando tutti i processi biochimici che ne determinano le funzioni nutrizionali.

E' difficile definire e soprattutto "misurare" la diversità microbica del suolo poiché a causa di molteplici motivi, basti pensare alla definizione classica di diversità biologica e la sua suddivisione in diversità "ecosistemica, di specie e genetica" attribuita ad animali e piante, essa può essere estesa anche ai microrganismi del suolo, ad eccezione però della definizione di diversità di specie in quanto non applicabile ad organismi che si riproducono per via asessuata come batteri e virus. La diversità microbica è quindi comunemente definita in termini di richness, ovvero il numero degli individui appartenenti a diversi "gruppi" detti taxa, e di evenness cioè alla loro distribuzione all'interno dei taxa stessi.

La composizione delle comunità (cioè l'insieme delle specie microbiche presenti in un dato ambiente) può variare nel tempo in conseguenza dei cambiamenti che si verificano nel microambiente o per azione dei microrganismi che ne fanno parte (o di quelli che vi vengono immessi) e/o a causa di variazioni climatiche, topologiche, biochimiche e antropologiche. Inoltre molti microrganismi possono mantenere la medesima composizione all'interno di una comunità, ma modificare alcuni processi metabolici con conseguenze a livello funzionale ed ecologico. Questa visione comporta anche una correlazione degli individui alla loro funzione, associando lo studio della singola cellula con quelli genomici e proteomici. Ai microrganismi vengono perciò applicate anche le più moderne teorie evoluzionistiche che correlano la variabilità e le capacità adattative che consentono al patrimonio genetico delle singole specie di evolversi progressivamente e quindi sopravvivere ai cambiamenti che possono intervenire nell'ambiente.

Nel caso della biodiversità microbica legata alla produzione di alimenti le osservazioni che sono state riportate sopra per i microrganismi del suolo non sono molto dissimili, fatta eccezione nel fatto che il substrato su cui vengono a svilupparsi le comunità microbiche è in sostanza molto più



semplice del suolo e funge da substrato colturale, anche se, soprattutto nel caso di processi di trasformazioni quali la produzione di formaggi o di vino è possibile incorrere in problematiche simili alla non coltivabilità e coltivabilità dei microrganismi del suolo.

Per gli alimenti lo studio della biodiversità microbica dovrà essere svolto alimento per alimento e non potrà mai essere derivato per categorie di alimenti e questo ovviamente provoca una oggettiva difficoltà legata alla mole di lavoro di caratterizzazione che si dovrà affrontare nell'esame di un determinato prodotto legato ad un determinato territorio.

Concetto di specie

La definizione del concetto di specie è uno degli argomenti più dibattuti di tutta la biologia. Attualmente esistono oltre venti definizioni basate su criteri e concezioni affatto diverse. La scelta di una definizione comporta differenze sostanziali nella suddivisione e catalogazione della biodiversità e impone strumenti analitici e statistici o filogenetici diversi a seconda dei criteri di specie adottata.

Per quanto concerne i microrganismi:

- i. La biodiversità viene definita in base al numero delle specie e quindi la specie è a buon diritto considerata l'unità base della biodiversità.
- ii. I rischi di estinzione sono normalmente associati alle specie e non ai loro componenti, per questo è fondamentale definire correttamente o, perlomeno in maniera condivisa, un concetto di specie che permetta di capire se erosione ed estinzione riguardino raggruppamenti specifici o sub-specifici.
- iii. La definizione di specie implica concetti, quali quello evolutivo, che debbono essere il più possibile coerenti con le attuali conoscenze biologiche e generali.
- iv. Nel caso di microrganismi la definizione di specie è spesso associata ad una tecnica o ad una strategia per l'identificazione. Rapidità, riproducibilità ed economicità di tali procedure sono critiche per rispondere alla duplice necessità di poter identificare accuratamente e, al tempo stesso, di poter effettuare molte identificazioni nei tempi disponibili.



- v. Particolarmente importante per la microbiologia è la possibilità che il concetto di specie e la corrispondente tecnica analitica possano permettere l'identificazione anche di organismi vitali ma non colturabili (VNC). Il fatto che la biodiversità isolata venga stimata fra l'1% ed il 10% fa pensare che la maggior parte della biodiversità sia appunto non coltivabile secondo le attuali procedure di laboratorio. Da qui la necessità che la tecnica di identificazione, coerente con il concetto di specie, sia applicabile anche al DNA di specie i cui ceppi risultino (VNC).

Da quanto sopra elencato risulta chiaro che il **concetto di specie microbica** da impiegare deve essere il frutto di una scelta ponderata e motivata notevolmente condivisa dalla comunità scientifica, facilmente applicabile e comprensibile per gli operatori e il più aderente possibile alle attuali conoscenze biologiche.

Il problema del concetto di specie microbiologica nasce dal fatto che il concetto di specie più diffuso e condiviso è il così detto **concetto biologico di specie** (CBS) che si basa sulla sessualità come unico sistema di riproduzione. Di fatto la stragrande maggioranza dei microrganismi conosciuti non sono in questa condizione per cui si impone la ricerca di un altro concetto di specie, diverso da quello impiegato per animali e piante. La scelta di un particolare criterio sarà presentata con le opportune motivazioni teoriche e pratiche, soprattutto intese a permettere di studiare la biodiversità in maniera rapida, accurata e, possibilmente, svincolabile dalla capacità di coltivare i microrganismi in laboratorio.

Bapteste e Boucher propongono che la tassonomia microbica debba classificare le unità evolutive composite (*composite evolutionary units*): associazioni integrate di elementi replicativi di basso rango tenute coese da meccanismi biologici. Tali unità evolutive sono composite perché composte da geni filogeneticamente diversi. Inoltre, queste unità evolutive operano a diversi livelli di organizzazione. Alcune possono essere parti di organismi, altre rappresentare l'intero organismo, e altre essere costituite da intere comunità microbiche sintrofiche. Le unità evolutive composite non sono specie nel senso comune, poiché gli individui non sono necessariamente organismi, ma geni, gruppi di geni e comunità microbiche



Marcatori

Le linee guida propongono possibili marcatori, utilizzabili per descrivere la biodiversità microbica di interesse ambientale e alimentare. Tali marcatori vengono presentati secondo il criterio “dal più semplice al più complesso” in modo da fornire un quadro completo possibile e tale da permettere analisi sequenziali, via via più articolate, della diversità microbica.

La raccolta di questi marcatori dovrebbe consentire a personale operativo nei vari settori agrario, ambientale ed alimentare di effettuare con sistemi rapidi e semplici una stima preliminare del livello di variabilità e diversità presenti in modo da indirizzare analisi, raccolte di campioni ed operazioni di salvaguardia o di valorizzazione. Nella Figura 1 viene rappresentata una gerarchizzazione di marcatori proposti nelle linee guida per la conservazione delle risorse genetiche microbiche.

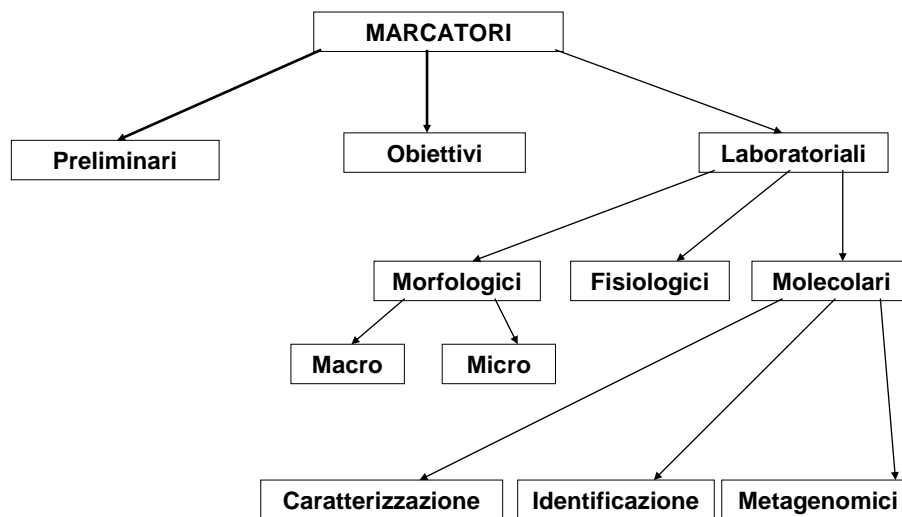


Figura 1: rappresentazione gerarchica dei marcatori utilizzati nella conservazione delle risorse

Per comodità espositiva viene riportata di seguito una classificazione di massima dei marcatori:

- A. **Marcatori preliminari:** sono quelli che consentono di individuare un sito o situazione potenzialmente interessante per la caratterizzazione e successiva conservazione della biodiversità di interesse agrario (es. Prodotto tipico, DOP etc, condizione colturale particolare, rotazioni tradizionali non comuni etc);
- B. **Marcatori obiettivi:** sono tutti quei parametri che consentono di evidenziare uno stato o caratteristiche che leghino un prodotto od un ambiente a dei processi metabolici microbici

essenziali perché si determinino risultati univoci e caratteristici (ad esempio: qualità del prodotto alimentare, fertilità del suolo, prodotto tipico con caratteristiche peculiari, condizione ambientale non comune etc);

C. Marcatori laboratoriali. sono tutti quelli rilevabili solo con accurate analisi in laboratorio e sono a loro volta distinti in:

1) Marcatori macro e micro morfologici (forma dimensione etc della colonia o della cellula). In particolare i Macromorfologici sono quelli che possono dare delle informazioni a livello visibile (es. colonie, patine etc).; mentre i Micromorfologici attengono alla dimensione e forma delle cellule e degli aggregati di cellule osservabili solo al microscopio. Nel caso dei microrganismi del suolo è difficile, se non impossibile fornire dei marcatori morfologici sui microrganismi stessi a livello di campo sia per le dimensioni dei microrganismi stessi che non possono essere visti ad occhio nudo, che per il fatto che è molto difficile il loro isolamento e la loro coltivazione, pertanto a livello di osservazione di pieno campo verranno definiti nel caso del suolo “marcatori morfologici” tutto ciò che può essere osservato ad occhio nudo correlabile alla vita del suolo ed alle funzioni dei microrganismi, ma non si tratterà mai di microrganismi veri e propri.

Conservare la biodiversità a livello del suolo è una pratica che non può prescindere dalle buone pratiche agronomiche e di coltivazione. I microrganismi sono gli artefici principali del ciclo degli elementi nutritivi e della fertilità del suolo pertanto a livello di campo possono essere individuati dei marcatori obiettivi che vanno a correlarsi alle funzioni del suolo ed alla sua fertilità. Sono note pratiche agricole conservative o distruttive nei confronti della fertilità del suolo e della sua biodiversità ed è a questa che ci si deve riferire per una prima analisi di campo alla quale successivamente, se di interesse, dovranno essere affiancate misure di biodiversità. Possono essere considerati marcatori obiettivi a livello del suolo tutte quelle condizioni ambientali particolari che causano una specializzazione della popolazione microbica del suolo dovute a cause naturali endogene. Moltissimi marcatori obiettivi a livello del suolo potranno essere individuati dagli operatori. Tali marcatori potranno essere facilmente identificati nell’analisi della scheda di campagna. Infatti nelle note sarà cura di colui che andrà ad effettuare i campionamenti di annotare qualsiasi elemento possa essere ritenuto interessante.



2) Marcatori fisiologici (assimilazioni, fermentazioni, resistenze a condizioni stressanti etc.);

3) Marcatori Molecolari distinti in **Marcatori** per la **definizione** di specie e **Marcatori** utili alla **caratterizzazione**.

I marcatori molecolari hanno un'importanza determinante nello studio della biodiversità microbiologica. Possono essere distinti in quelli impiegati a livello di identificazione (determinazione di specie), di caratterizzazione (descrizione dei ceppi entro specie) o in meta genomici (analisi di popolazioni di genomi). Anche in questo caso è essenziale definire i marcatori in base ai gruppi microbici e sceglierli (o ordinarli) in base alla loro efficacia.

In Figura 2 viene riportata una schematizzazione.

Classificazione dei marcatori molecolari in base alla loro funzione

I marcatori laboratoriali sono stati descritti in base alla loro funzione, brevemente:

- **marcatori per la identificazione**, per determinare la specie cui associare i ceppi. Questi marcatori si basano sull'individuazione di sequenze specifiche come ad esempio per i microbi eucarioti la sequenza del dominio D1/D2 del gene 26S codificante per l'RNA ribosomale. Nei batteri invece si usa il gene corrispondente all'rDNA 16S.
- **marcatori per la caratterizzazione**, per descrivere i ceppi in dettaglio. Consentono di approfondire le distanze genetiche tra ceppi. Nelle linee guida vengono descritte diverse tecniche analitiche con un breve commento applicativo per ciascuna.
- **marcatori metagenomici**, sono quelli che permettono di descrivere le comunità microbiche, indipendentemente dalla possibilità di far crescere o meno i ceppi in condizioni di laboratorio



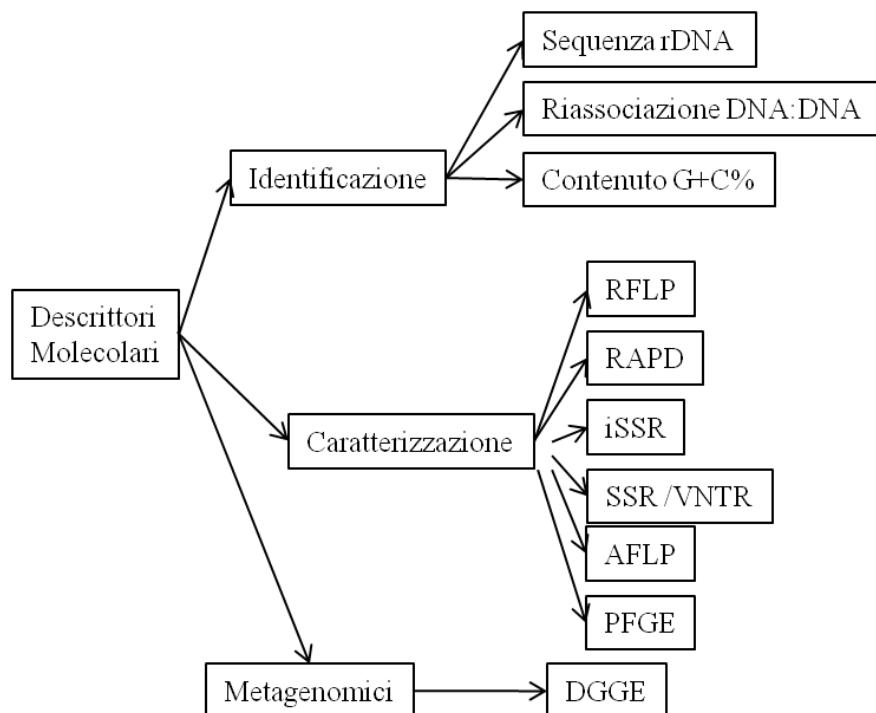


Figura 2 Schematizzazione di marcatori molecolari

Metodologie (Protocolli standard)

Nelle linee guida vengono proposte differenti metodologie, microbiologiche e molecolari, per lo studio della biodiversità microbica nei vari ambiti e a seconda del livello di precisione richiesto. Le metodologie e le scelte comuni a microbiologia ambientale ed alimentare sono state trattate insieme, mentre sono state presentate separatamente le metodologie più specifiche. Questa parte del manuale presuppone la normale capacità tecnico-microbiologica, normalmente fornita dai vari corsi di laurea magistrali in materia biologica, agraria e biotecnologica. Le metodologie ampiamente trattate in appositi manuali e nelle raccolte dei metodi ufficiali non verranno presentate, ma se mai citate quando ritenuto necessario per una miglior comprensione delle metodologie stesse.

Linee guida per la conservazione dei microrganismi

Questa parte è il cuore delle linee guida infatti vengono qui forniti i criteri per le tre strategie fondamentali per la conservazione della biodiversità microbiologica di interesse agroalimentare ed ambientale con un'analisi critica delle motivazioni per adottarle. Particolare cura è stata prestata agli effetti delle varie forme di conservazione sulla struttura genetica dei materiali conservati.

Analisi critica dei sistemi di conservazione microbica

Come qualsiasi altro organismo, anche i microbi possono essere conservati nello stesso posto dove risiedono e da dove verrebbero isolati (*in situ*), oppure in apposite collezioni (*ex situ*). Per i microrganismi ad uso agro-industriale è possibile applicare una forma intermedia che potremmo denominare "*in factory*", simile all' "*on farm*" di piante ed animali.

A ciascun sistema sono associati vantaggi e svantaggi, inoltre le particolari tipologie di microrganismi possono prestarsi o meno ai diversi tipi di conservazione. Di seguito vengono riportate alcune considerazioni sui tre sistemi di conservazione.

Conservazione *ex situ*

La conservazione *ex situ* è stata la prima forma di preservazione della diversità microbica molto tempo prima dei trattati sulla biodiversità e della nascita di una sensibilità in questo senso. Dalla seconda metà del XIX secolo i microbiologi hanno avviato a conservare le colture che ottenevano, cercando di conservarle. Solo dopo il secondo dopoguerra si diffuse la refrigerazione ed anche la liofilizzazione. Il congelamento a bassissime temperature in azoto liquido o a -80°C si resero disponibili solo verso la fine del secolo scorso ed adesso sono considerate fra le più valide e diffuse.

Questa breve storia del mantenimento della coltura è funzionale a due aspetti: capire le diverse tipologie di conservazione e comprendere che le tecnologie connesse sono ancora *in fieri*.

Collezioni

Le collezioni microbiche permettono il mantenimento *ex situ* delle risorse genetiche microbiche (coltivabili) isolate sottoforma di ceppi distinti e possibilmente ben descritti.

Si possono distinguere diversi tipi di collezioni in base alle finalità che si propongono:

- Collezioni tassonomiche. Si tratta di collezioni che raccolgono ceppi di specie e comunque ceppi di varia derivazione, ma comunque identificati a livello di specie in maniera inequivocabile secondo gli standard del momento.
- Collezioni brevettuali. Queste collezioni raccolgono ceppi naturali, ingegnerizzati e soggetti a miglioramento genetico su cui sussistono rivendicazioni brevettuali.



- Collezioni di lavoro. Ogni laboratorio tende a mantenere i ceppi isolati e studiati per tutto il tempo del loro impiego. L'avvento dei sistemi di crioconservazione ha incoraggiato il mantenimento di tali colture anche per tempi più lunghi.
- Collezioni di Servizio. Si tratta di collezioni tassonomiche con disponibilità a fornire servizi di mantenimento, identificazioni, etc..
- Collezioni applicative e settoriali. Si tratta di collezioni per settori specifici (fitopatologico, alimentare, ambientale, etc. e possibilmente finalizzate al mantenimento della biodiversità e alla sua reintroduzione. Tali collezioni debbono minimizzare la selezione indotta dall'isolamento e dal mantenimento in laboratorio e in collezione. Queste collezioni sono particolarmente finalizzate al binomio "conservazione e valorizzazione".

Conservazione "in factory"

La biodiversità microbica agroalimentare si è sviluppata quasi sicuramente nei siti di trasformazione, anche primitivi in cui venivano effettuate le prime rudimentali operazioni per trasformare e conservare le derrate alimentari. Il fatto che molta bibliografia sottolinei la presenza, ma a bassa densità, di *S. cerevisiae* in natura, mentre esso è presente ad alte concentrazioni in ambienti di cantina, è una delle tante evidenze che suggeriscono come lo sviluppo del lievito sia fortemente legato al suo inconsapevole utilizzo nelle trasformazioni dei succhi zuccherini fermentati. In generale, va ricordato che la trasformazione, anche nelle sue forme più semplici, comporta masse di prodotto mantenute in qualche modo isolate dal resto dell'ambiente, in cui si sviluppano alcuni ceppi microbici a densità elevatissime che spesso superano i 10^8 cellule mL^{-1} . A fronte di alcune migliaia di cellule per grammo di substrato negli ambienti naturali, le densità delle fermentazioni alimentari sono quindi di circa 4 o 5 ordini di grandezza superiori. E' proprio questa differenza di concentrazione che sottolinea l'importanza delle strutture di trasformazione nello sviluppo e nel mantenimento della biodiversità. Di fatto la singola struttura produttiva non presenta necessariamente una biodiversità elevatissima a livello di ceppo perché tutta una serie di operazioni hanno portato ad una inconsapevole selezione massale da cui emergevano pochi stipiti. Tali operazioni sono il riutilizzo delle "madi" che hanno dato buoni prodotti (come per molti passiti tradizionali e per gli aceti), il riutilizzo delle "botti buone", ovvero di quelle in cui si produceva il miglior vino, ma anche il lavaggio accuratissimo, la



disinfezione e, in ultima istanza, lo smantellamento delle botti da cui era stato ottenuto un cattivo prodotto.

Il fatto che nei singoli siti di trasformazione ci sia una biodiversità non necessariamente elevatissima, può anche essere dovuto in taluni casi alla limitazione dei mezzi con cui tale biodiversità è stata rilevata e poi caratterizzata. In ogni caso l'aspetto fondamentale da sottolineare è il fatto che nelle zone di produzione tipica la biodiversità è elevata soprattutto considerando i tanti piccoli e diversi impianti di produzione, come le molte cantine che letteralmente tappezzavano le zone vitivinicole o i piccoli caseifici sparsi per monti e colline. La complessa orografia del nostro territorio ha poi favorito lo sviluppo di specificità, magari in valli attigue, con un ovvio incremento della biodiversità.

Da questi aspetti geografici, socio-politici e di coltura locale (compreso il tanto maltrattato "campanilismo") si è originata la biodiversità microbica agroalimentare. Molta di questa biodiversità è restata nei singoli impianti e tutt'ora potrebbe essere mantenuta in essi.

Al momento attuale, mantenere la biodiversità nel proprio impianto significa sostanzialmente applicare tutte le attenzioni per evitare contaminazioni massicce da ceppi contaminanti, senza impedire, però, l'eventuale evoluzione del corredo microbico dell'impianto stesso. Poiché questa evoluzione non è necessariamente positiva dal punto di vista qualitativo, sarà opportuno mettere in atto strategie che possano al contempo salvare la biodiversità, ma anche i produttori che ad essa affidano il proprio lavoro.

Conservazione *in situ* dei microrganismi

Nel caso dei microrganismi del suolo la conservazione *ex situ*, cioè in laboratorio, rappresenta solo una piccolissima parte della realtà ambientale. Infatti come è noto solo l'1% della popolazione microbica del suolo, la popolazione che attivamente contribuisce al mantenimento delle funzioni del suolo e della sua fertilità, è attualmente coltivabile. Questo comporta che solo per l'1% dei principali artefici della vita nel suolo può essere isolata e conservata in collezioni *ex situ*. Ciò non toglie che le tecniche di conservazione descritte non siano utili ed interessanti per conservare e studiare *ex situ* organismi riconosciuti artefici di un determinato processo od azione.

Per la biodiversità correlata alle funzioni del suolo ed alla sua fertilità è importante invece andare ad operare la conservazione *in situ*, come descritto nel capitolo apposito. Inoltre nel caso del



presente lavoro sarà ancora meglio andare ad operare una conservazione di tipo ecosistemico, cioè analizzare e monitorare i microrganismi in relazione alle colture.

Cos'è la conservazione della biodiversità a livello ecosistemico? E' lo studio e la conseguente valutazione della biodiversità microbica associata ad una determinata coltura o specie vegetale. E' noto dalla letteratura che ogni specie vegetale rilascia nel suolo, in funzione anche delle caratteristiche pedoclimatiche ed ambientali, essudati radicali, che selezioneranno una determinata popolazione microbica. Si verranno a creare dei microambienti edafici che costituiranno reti trofiche specifiche associate alla pianta. Questo comporta che soprattutto nel caso delle specie vegetali tipiche o a rischio erosione una conservazione del solo germoplasma vegetale *ex situ*, potrebbe non garantire il desiderato risultato di conservazione.

La diversità microbica è stata ampiamente correlata alla gestione dei suoli, pertanto le comunità batteriche, essendo le più rappresentate, sono state anche le più studiate per prevedere la fertilità dei suoli agrari; meno studiati, invece, sono stati i funghi del suolo, benché essi rappresentino buona parte della massa microbica, siano coinvolti in processi fondamentali come la degradazione dei residui organici ed abbiano un ruolo primario nella 'C assorbimento'. L'ostacolo principale che ha limitato le ricerche in questo settore è sempre stata la scarsa propensione dei microrganismi del suolo a crescere in vitro (coltivabile), rendendo di fatto impossibile studiarli. La possibilità di studiare le comunità microbiche del suolo a partire dagli acidi nucleici, grazie alle nuove tecniche molecolari che permettono una caratterizzazione anche degli organismi non coltivabili superando le difficoltà legate al riconoscimento microbiologico tradizionale, rendono possibile la caratterizzazione tanto dal punto di vista qualitativo che quantitativo delle comunità microbiche. Questo permette di calcolare, con maggiore facilità rispetto al passato, gli indici di diversità microbica dei sistemi agrari con la possibilità di poterli applicare anche per il monitoraggio della biodiversità.

Ottimizzazione dei protocolli di conservazione in collezione (*ex situ*), *in factory* e *in situ*

Ottimizzazione conservazione *ex situ*

La conservazione *ex situ*, o in collezione microbica, presenta i vantaggi e i limiti indicati precedentemente. L'ottimizzazione dei protocolli di conservazione deve considerare i seguenti principi:



1. Limitare al massimo la selezione delle popolazioni complesse in fase di isolamento

Si ottiene impiegando terreni di isolamento il più possibile universali ed evitando l'arricchimento. In caso si sia interessati ad una forma di biodiversità non prevalente nel terreno è opportuno ricorrere a terreni o condizioni selettive. L'uso di terreni di coltura liquidi andrebbe comunque evitato per ridurre la competizione fra colture a diversa fitness nelle particolari condizioni colturali.

2. Limitare i cambiamenti della coltura indotti da un terreno colturale necessariamente diverso dalle condizioni ambientali del substrato da cui il microbo è stato isolato

Si ottiene mantenendo le colture su terreni di isolamento solo per il tempo strettamente necessario alle operazioni di isolamento

3. Anteporre la conservazione alla piena caratterizzazione della coltura

Consiste nel congelare a -80°C le colture subito dopo il secondo re-isolamento, al caso si può congelare addirittura dopo il primo isolamento, procedere al re isolamento ed eventualmente congelare la coltura da secondo isolamento. Certe caratteristiche quali la presenza di capsula o la capacità di scorificare vengono perse in maniera massiccia dopo poche generazioni in terreni da laboratorio.

4. Accertamento della purezza microbiologica della coltura

Si effettua con accurate osservazioni macro e microscopiche. In caso di dubbio si procede ad un nuovo isolamento. D'altra parte non va dimenticato il naturale polimorfismo di molte specie.

5. Mantenimento della coltura in condizioni in grado di minimizzare eventuali mutazioni

Il mantenimento dovrebbe essere effettuato direttamente in azoto liquido o a -80°C , evitando prolungati mantenimenti in coltura.

6. Provvedere ad un'identificazione affidabile

A seconda della tecnica prevalente è opportuno procedere all'identificazione con sistemi inequivocabili, anche se spesso di carattere tipicamente nominalista e tipologico.

7. Effettuare dereplicazioni in grado di limitare la ridondanza delle collezioni.

La dereplicazione è l'operazione che permette di riunire ceppi identici in un unico gruppo. Di solito si mantiene uno o pochissimi isolati per gruppo e si scartano gli altri, considerati copie identiche. Le tecniche di dereplicazioni includono tutti i sistemi di caratterizzazione molecolari descritti nell'obiettivo 2 e le tecniche di fingerprint metabolomico come la FTIR (Fourier Transform InfraRed spectroscopy).



8. Registrazione in un apposito database elettronico con tutte le informazioni raccolte

Per quanto riguarda le informazioni si faccia riferimento alle schede di prelievo trattate in precedenza.

Ottimizzazione della conservazione “*in factory*”

La conservazione delle colture *in factory* consiste nel loro mantenimento nelle condizioni d’uso normale. Due diverse maniere di conservazione possono essere messe in atto: *conservazione dinamica* e *conservazione statica*.

La *conservazione dinamica* è quella che non pone significative restrizioni all’uso delle colture, salvo l’introduzione o la miscelazione con colture di altra provenienza. Questa conservazione potrebbe non mantenere la biodiversità né a livello delle comunità, né a livello delle singole componenti e rispecchia in qualche modo l’andamento evolutivo aperto a inconvenienti di vario tipo (es. contaminazioni da materie prime) come a selezioni interne al microbiota.

La *conservazione statica* è molto restrittiva e cerca di mantenere la coltura in condizioni tali da evitare cambiamenti di qualsiasi natura. Nella conservazione statica devono essere evitate le contaminazioni (soprattutto se massicce) da parte del microbiota delle materie prime, l’introduzione o la miscelazione con altre colture anche se provenienti dalla stessa area, i cambiamenti di tecnologia, la contaminazione ambientale di qualsiasi tipo.

Anche nelle conservazioni tradizionali esistono approcci diversi che in qualche modo richiamano queste due scuole di pensiero. Per esempio, nella conservazione delle paste acide da panificazione sono state tramandate due modalità denominate “alla maniera del contadino” e “alla maniera del fornaio”. Nella prima tutta la pasta acida conservata viene impiegata per formare l’impasto da cui, prima della cottura o prima della formazione delle pagnotte, viene prelevata un’aliquota da conservare. Nella modalità del fornaio solo una parte della pasta acida viene impiegata nella formazione dell’impasto. La parte residua viene mescolata ad acqua e farina e lievitata a parte.

Evidentemente le due forme sono diverse e quella del fornaio permette un mantenimento più accurato della pasta madre oltre alla libertà di integrare l’impasto da panificare con altri ingredienti, magari incompatibili con la pasta madre stessa.

Le attenzioni da dedicare a questa forma di conservazione possono essere delineate nei seguenti principi:

1. Evitare introduzione di microrganismi alloctoni



2. Evitare miscele di inoculo con componenti a forte carica microbica
3. Evitare contaminazioni ambientali (per la conservazione statica)
4. Evitare contaminazioni da materie prime (per la conservazione statica)
5. Evitare cambi tecnologici che possano squilibrare l'inoculo
6. Mantenere diverse aliquote dell'inoculo in collezioni *ex situ*.
7. Controllare periodicamente il mantenimento della qualità dei prodotti trasformati con l'inoculo conservato.
8. Favorire la disseminazione dell'inoculo presso diversi trasformatori, possibilmente entro aree circoscritte.
9. Promozione dei prodotti di qualità: le politiche della qualità dei prodotti agricoli possono avere impatti positivi sulla biodiversità. La tutela dei prodotti "tradizionali" tipici delle regioni italiane è, indirettamente, utile alla conservazione della biodiversità in quanto è associata al sistema ambientale e al patrimonio culturale, artigianale e artistico locale.

Conservazione *in situ*

In Italia la conservazione *in situ* è possibile nelle aree ad agricoltura tradizionale soprattutto se poste all'interno di zone protette, non solo per il regime vincolistico che ne deriva, che è utile a garantire la continuità nell'uso del suolo e una gestione dell'agrosistema in coevoluzione con la biodiversità in esso presente, ma anche perché garantisce un accesso più agevole ai regimi di sostegno alla produzione.

Conservare i microrganismi *in situ*, oppure meglio, sarebbe dire *on farm* può essere praticato congiuntamente alla conservazione del germoplasma vegetale. Là dove verranno condotte azioni conservative di germoplasma vegetale sarà necessario conservare i microrganismi del suolo.

Il protocollo per la conservazione è molto semplice: conservare il suolo e la sua fertilità secondo le seguenti azioni.

Tale analisi dovrà essere condotta secondo un approfondimento "per livelli" gerarchici.

Il livello 1 dovrà considerarsi irrinunciabile e dovrà prevedere la caratterizzazione di base del suolo relativamente alle caratteristiche fisiche-chimiche e biologiche. Di fondamentale importanza sarà la misura dell'indice di fertilità biologica (IBF) secondo la procedura descritta in particolare nelle



linee guida. Il secondo e terzo livello sono consigliabili per distretti ecologici di grande interesse territoriale ed economico, oppure là dove ci siano delle specie a forte erosione genetica.

Il livello 4 dovrà invece essere sempre praticato. Quindi i livelli 0 – 1 – 4 andranno sempre effettuati, mentre i livelli 2 – 3 nei casi di distretto ecologico di grande valore oppure di erosione genetica.

Livello

Azione

0

Analisi matricale

1

Valutazione della IFB Conservazione del suolo *ex situ*

2

Analisi della composizione genetica e funzionale della comunità microbica

3

Sequenziamento e caratterizzazione di singole specie ed eventuale conservazione *ex situ*

4

Monitoraggio spazio-temporale. Il monitoraggio spaziale potrà essere facoltativo, mentre il monitoraggio temporale sarà obbligatorio.

LIVELLO 0

L'agricoltore custode dovrà essere aiutato a compilare la matrice e guidato nella sua interpretazione. Sarà necessario spiegare all'agricoltore quali elementi/caratteri macroscopici (morfologici) osservare nel tempo e come interpretarne i mutamenti. All'agricoltore custode dovrà essere richiesto di contattare i servizi tecnici regionali quando le sue osservazioni lasceranno percepire dei mutamenti non occasionali.

L'agricoltore dovrà annotare eventuali modificazioni di gestione del suolo rispetto al tempo 0 (fertilizzazione, irrigazione, lavorazione, eventuale successione colturale, ecc.) contestualmente si



chiederò all'agricoltore di conservare 1 Kg di terreno essiccato all'aria in bottiglie di vetro scuro e sigillate ed etichettate.

Ogni 5 anni sarà necessario raccogliere e conservare 1 Kg di terreno essiccato all'aria e campionato nel medesimo sito.

Qualora dovessero intervenire pesanti mutamenti nella gestione del suolo o eventi calamitosi sarà necessario raccogliere e conservare 1 Kg di suolo essiccato all'aria, annotando sull'etichetta il perché del nuovo campionamento.

Nel caso di successioni diverse sarà necessario campionare per ogni specie su tutte le specie se queste sono oggetto di conservazione del germoplasma.

LIVELLO 1

L'analisi della fertilità biologica IFB (indice di fertilità biologica) andrà effettuata in laboratorio sul suolo corrispondente alla coltura oggetto di conservazione del germoplasma. Andrà analizzata per ogni specie conservata. Le modalità di campionamento del suolo sono le medesime descritte per la conservazione del suolo *ex situ*. Quest'analisi potrà essere effettuata ogni 5 anni in corrispondenza dell'operazione di conservazione di suolo *ex situ*. Tale analisi sarà necessario ripeterla qualora intervengono pesanti modificazioni nella gestione della coltura. Essa potrebbe fornire importanti informazioni circa l'efficacia di eventuali azioni correttive che interessino la fertilità.

LIVELLO 2

Consiste nella identificazione vera e propria della biodiversità delle comunità microbiche del suolo. Infatti attraverso l'estrazione del DNA dal suolo si è in grado di osservare abbondanza e ricchezza della biodiversità. E' una misura che può essere effettuata unicamente in laboratorio. Dovrebbe essere fatta in tutti i siti in cui si va a conservare germoplasma vegetale, ma ovunque si voglia conoscere la biodiversità microbica dei suoli. Dato il costo di questa analisi, comunque, si consiglia di farla in siti di particolare importanza. Anche in questo caso il livello 4 dovrebbe essere ripetuto nel tempo secondo quanto riportato in allegato.



LIVELLO 3

Ulteriori informazioni sul “chi fa cosa” o “io chi sono” possono derivare solo da questo livello di approfondimento. Si tratta sempre di analisi molecolare da condurre in laboratorio che va a caratterizzare il singolo organismo e la singola comunità. Deve essere mirata a screening che possono emergere dall’analisi di 2 livello. Se in un distretto ecologico dall’analisi molecolare di abbondanza e ricchezza dovesse emergere l’esistenza di bande tipiche associate ad una determinata specie vegetale in quel determinato areale pedoclimatico sarà necessario andare a caratterizzarla perché quella determinata comunità potrebbe essere biunivocamente correlata alla specie vegetale e quindi essere fondamentale per la sua conservazione.

Tutti i campionamenti di suolo per le analisi di 2 e 3 livello dovranno essere effettuati come precedentemente riportato. Se questo microrganismo risulterà coltivabile si potrà isolare e conservare in collezione.

LIVELLO 4

Consiste unicamente nella temporizzazione e nella spazializzazione delle azioni. Saranno le Regioni a stabilire su quanti siti monitorare la biodiversità di suolo.

1 - A questo punto potrebbero organizzarsi campagne di monitoraggio temporale: sempre nello stesso sito con rilievi ogni 5 anni.

2 - Sulla stessa coltura, ma su siti diversi della regione: una tantum, ma qualora si trovassero organismi diversi andrebbe organizzata una nuova campagna di raccolta dati.

3 - Random senza una correlazione con la coltura, ma seguendo ad esempio la maglia di campionamento europeo “LUCAS” entro quadrati di 9 Km x 9 Km.

Definizione di rischio di estinzione e di erosione genetica

In questo capitolo sono stati analizzati i rischi di erosione, estinzione e sostituzione cui può andare incontro la biodiversità microbica di interesse agrario, considerando le specificità proprie dei microbi quali la numerosità, la velocità riproduttiva e l’estrema adattabilità.



- a. **Estinzione:** la scomparsa di intere specie microbiche è molto improbabile, per cui la diversità microbica è difficilmente a rischio
- b. **Sostituzione:** la sostituzione di ceppi con altri della stessa specie o di altre specie è molto probabile e frequente, per cui è a rischio la variabilità microbica e, soprattutto, la specifica variabilità che magari ha valorizzato territori ed alimenti
- c. **Erosione:** la perdita di carica microbica e di biodiversità complessiva è più che probabile, soprattutto là dove non vengano seguite le buone pratiche agricole e di trasformazione. Questo aspetto verrà trattato nei paragrafi successivi, soprattutto in relazione al suolo. Viceversa negli alimenti è probabile sia l'erosione (soprattutto con tecnologie che riducano eccessivamente la carica microbica) e la sostituzione.

Concetto di erosione genetica microbica

Per erosione genetica microbica si intende la perdita di diversità genetica in una determinata area e in un determinato periodo di tempo, associata, al contempo, al concetto di perdita di una funzione.

Il concetto di erosione resta legato al concetto di diversità genetica e diversità funzionale.

In un ecosistema dotato di numerose vie metaboliche ed energetiche come il suolo

l'alterazione di una specie determina un effetto minore sulle altre specie presenti di quanto potrebbe causare la medesima alterazione a carico di una specie di un ecosistema dotato di una scarsa rete energetica.

Sistemi di valutazione del rischio di estinzione, erosione e sostituzione.

Monitorare in genere la biodiversità microbica

Il monitoraggio della biodiversità microbica avviene secondo le tecnologie ampiamente descritte nel capitolo relativo ai metodi condivisi per l'identificazione e la caratterizzazione.

Per sintetizzare al massimo, e richiamare i concetti sopra descritti, è utile ricordare che:

1. La **diversità** attiene al numero di specie di un ambiente, cibo o habitat
2. Le specie sono definite mediante il processo di **identificazione**
3. La **variabilità** attiene ai ceppi, ovvero alle varianti di ciascuna specie, presenti in un dato ambiente alimento o habitat



4. La variabilità viene definita mediante **caratterizzazione**
5. La **biodiversità** è l'integrazione di diversità e variabilità
6. Non tutta la biodiversità è studiabile con metodi microbiologici, ma può essere affrontata anche con strategie molecolari **metagenomiche** ovvero in grado di analizzare tutto il DNA (o RNA) di un ambiente, alimento o habitat.

La valutazione dei rischi di perdita o cambiamento della biodiversità va effettuata quindi a seconda dei casi mediante analisi di identificazione o di caratterizzazione a seconda che si sia più interessati al livello di specie o di ceppo. Tipicamente, in campo ambientale ci si concentra più sulla composizione a livello di specie all'interno di comunità straordinariamente complesse. A livello alimentare, viceversa, prevale il concetto che particolari ceppi imprimano sapori o caratteristiche peculiari ai diversi alimenti, per cui il mantenimento o il miglioramento a livello di ceppo è prevalente sulle considerazioni a livello di specie. Per fare un esempio, non ci sono dubbi che il vino, come definito dalla tradizione, dalla merceologia e dalla legge, sia il prodotto della fermentazione dei mosti d'uva effettuata dal lievito *Saccharomyces cerevisiae* e non da altre specie. Ci sono d'altra parte grandi evidenze che i vari ceppi producano vini diversi a partire dallo stesso mosto d'uva, per cui ogni particolare ceppo ha caratteristiche sue peculiari, che possono essere variamente apprezzate, ma che comunque fanno focalizzare l'interesse sul livello tassonomico della variabilità fra ceppi. Non è escluso che nel prossimo futuro la microbiologia ambientale si apra sempre più alla dimensione delle comunità microbiche, anche trans-dominio come batteri lieviti, nei cibi, che rappresenta la realtà sviluppatasi nella preparazione tradizionale dei cibi e delle bevande trasformate ad opera dei microrganismi.

Monitorare la biodiversità microbica agro-ambientale

Da quanto sino ad ora discusso appare evidente che, sia pure con una certa difficoltà e con un certo margine di approssimazione, è possibile definire la diversità microbica di un suolo e di darne una caratterizzazione temporale in termini di fluttuazioni naturali o patologiche.

La caratterizzazione della diversità microbica di un suolo, e della sua biodiversità in genere, va costruita per livelli di approssimazione utilizzando i marcatori proposti secondo le gerarchie consigliate.



Appropriati metodi di studio biologici del suolo combinati con proprietà fisico-chimiche potrebbero servire come indicatori dei cambiamenti della qualità del suolo e fornire delle prime indicazioni se vi sia stata una alterazione o modificazione del “soil biota”. Tuttavia, Kennedy e Papendiek (1995) evidenziarono che sebbene gli strumenti per caratterizzare il suolo siano numerosi, mancano le strategie per integrare questi strumenti per determinare la qualità del suolo e la sua biodiversità in maniera univoca e incontrovertibile per tutte le situazioni ma che si deve ancora individuare caso per caso gli indicatori utili alla caratterizzazione di una data situazione.

E’ importante che si consideri la standardizzazione di ogni aspetto del metodo, dal campionamento, attraverso lo stoccaggio ed il pre-trattamento dei campioni fino all’attuale procedimento analitico, all’interpretazione e alla presentazione dei risultati.

CONCLUSIONI

Il flow chart presentato nella fig 3 sintetizza tutto il materiale proposto nelle linee guida tenendo conto di quanto segue.

1. La **biodiversità** è costituita dalla diversità e dalla variabilità sia di origine **ambientale** che **alimentare**. Sarebbe opportuno considerare anche altre origini, non strettamente agroalimentari da cui trarre biodiversità impiegabile in campo agrario. Nel settore ambientale *sensu lato* esistono tutta una serie di realtà da considerare, la cui biodiversità è impiegabile in campo agrario. Si consideri per esempio la biodiversità che si sta formando nelle discariche, negli impianti di produzione del metano e nei siti inquinati. Tutta questa microflora può essere impiegata per esempio per la valorizzazione *in situ* delle biomasse di scarto delle produzioni agrarie.
2. Il **Monitoraggio** è stato ampiamente descritto e discussa la modalità di monitoraggio per prevenire o per lo meno per misurare i fenomeni erosivi e sostitutivi. Il monitoraggio ricorre due volte nel flow chart. Il primo (prospettico) dovrebbe essere una ricognizione veloce e poco costosa basata per lo più su parametri (marcatori) preliminari ed obiettivi, con alcuni approfondimento mediante i marcatori laboratoriali. Il Monitoraggio di controllo (nella parte bassa del grafico) è un monitoraggio specifico funzionale al controllo delle situazioni a rischio e al funzionamento delle conservazioni *in situ* e in-factory. Il Monitoraggio si pone quindi come la misura fondamentale per la conservazione della



biodiversità. Esso deve essere quanto più flessibile possibile ed idealmente riducibile ad una sola tecnica.

3. I fattori di rischio della biodiversità possono essere condensati in quattro voci:

- a. Cambiamento produttivo o tecnologico
- b. Importanza intrinseca del cibo o dell'ambiente da conservare
- c. Sostituzione
- d. Erosione

Tutti i fattori sono ipotizzabili sulla base dei marcatori preliminari ed obiettivi. I marcatori laboratoriali (ed in particolare le tecniche metagenomiche come la DGGE). Debbono essere impiegati o come approfondimento nel monitoraggio prospettico o come sistema monofasico nel monitoraggio di conservazione.

4. Conservazione. Le tre modalità *in situ*, *ex situ* ed *in-factory* sono state spiegate e descritte le diverse tecniche conservazione.

5. Le scelte di carattere tecnico e politico sono evidenziate in corsivo entro i due rombi.

La prima scelta riguarda la valutazione se esista almeno un singolo fattore di rischio (rombo in alto). La complessità della scelta sta nella valutazione dei dati di monitoraggio che descrivono la situazione della biodiversità microbica, soprattutto se non esistono (come è adesso) degli standard di valutazione e delle condizioni comparabili. Minore il numero di questi standard, maggiore sarà il peso della discrezionalità e della soggettività della scelta. Premesso che tale discrezionalità non può e non deve essere abolita, soprattutto per la fase politica della scelta, una maggior standardizzazione e normalizzazione dei dati non possono che avere effetti altamente benefici. A questo proposito due sono le misure possibili, una di carattere tecnico-scientifico, l'altra logistico-organizzativo, sottolineando che le due ipotesi dovrebbero essere integrate e non considerate alternative.

a. Soluzione tecnico scientifica. Consiste nel comparare situazioni a diverso livello di rischio con una o pochissime tecniche. Il livello di rischio potrebbe essere espresso come un indice che vari fra 0 e 1 mediante la seguente formula in cui R_n è il rischio normalizzato R_i il rischio riscontrato in una data situazione, R_{max} e R_{min} il rischio massimo e minimo trovati nel corso di questi studi di messa a punto:



$$R_n = (R_i - R_{min}) / (R_{max} - R_{min})$$

- b. Soluzione logistico-organizzativa.** Si tratta di mettere a sistema gli enti preposti ed interessati alla tutela della biodiversità in modo da promuovere monitoraggi standardizzati i cui risultati vengano fatti confluire in un database unico ed organizzato in modo da fornire in tempo reale i valori di R_{min} e R_{max} di ciascuna situazione alimentare ed ambientale.

La scelta sulla sufficienza del monitoraggio (rombo in basso nello schema) è soggetta come la precedente a soggettività e discrezionalità. Chiaramente la scelta deve tener conto della sostenibilità della scelta sapendo che la conservazione *ex situ* è fortemente limitante dal punto di vista del mantenimento delle effettive risorse genetiche microbiche e che è la più costosa, soprattutto in termini energetici. D'altra parte la conservazione in collezione è la scelta privilegiata nel caso di cambio di tecnologia o di forte rischio erosivo o sostitutivo.

Si tratta quindi di considerare i costi complessivi della forma di conservazione e le effettive risorse disponibili. In taluni casi è ipotizzabile che sia difficile anche effettuare conservazioni *in situ* o *in farm*, per questo si raccomanda fortemente di puntare con decisione sullo sviluppo di effettivi sistemi di monitoraggio che permettano di:

- a. Conoscere meglio la struttura della biodiversità microbica nei vari ambiti tipologici, geografici e nel suo divenire temporale
- b. Evitare l'avvio delle procedure di conservazione là dove non siano indispensabili
- c. Favorire le forme meno costose di conservazione (*in situ* o *in farm*), evidenziando il livello di rischio cui è sottoposta la biodiversità microbica nel corso di tali conservazioni
- d. Fungere da strumento di supporto all'isolamento per quantificare la porzione di biodiversità microbica effettivamente isolata e messa in collezione.

Da queste considerazioni si evince che una conservazione sostenibile della biodiversità richiede un approccio diverso da quello seguito fino ad ora con il collezionamento affidato solo alla sensibilità dei singoli, ma spesso fortemente ridondante nei molti casi in cui sia stata ripetutamente isolata la stessa sorgente di biodiversità. La forma proposta è quindi quella di favorire la conoscenza della biodiversità e di preferire le conservazioni che lascino libero corso all'evoluzione della biodiversità negli ambienti naturali o antropizzati interessati all'attività agricola.



Infine, è evidente che le operazioni di scelta richiedono una competenza ed una sensibilità che dovrebbe essere supportata da opportuna informazione e soprattutto favorita da una specifica formazione che veda coinvolti i tanti attori interessati al mantenimento e allo sviluppo della biodiversità microbica.



FLOW CHART DECISIONALE PER LA CONSERVAZIONE SOSTENIBILE DELLA BIODIVERSITA' MICROBICA DI INTERESSE AGROAMBIENTALE E ALIMENTARE

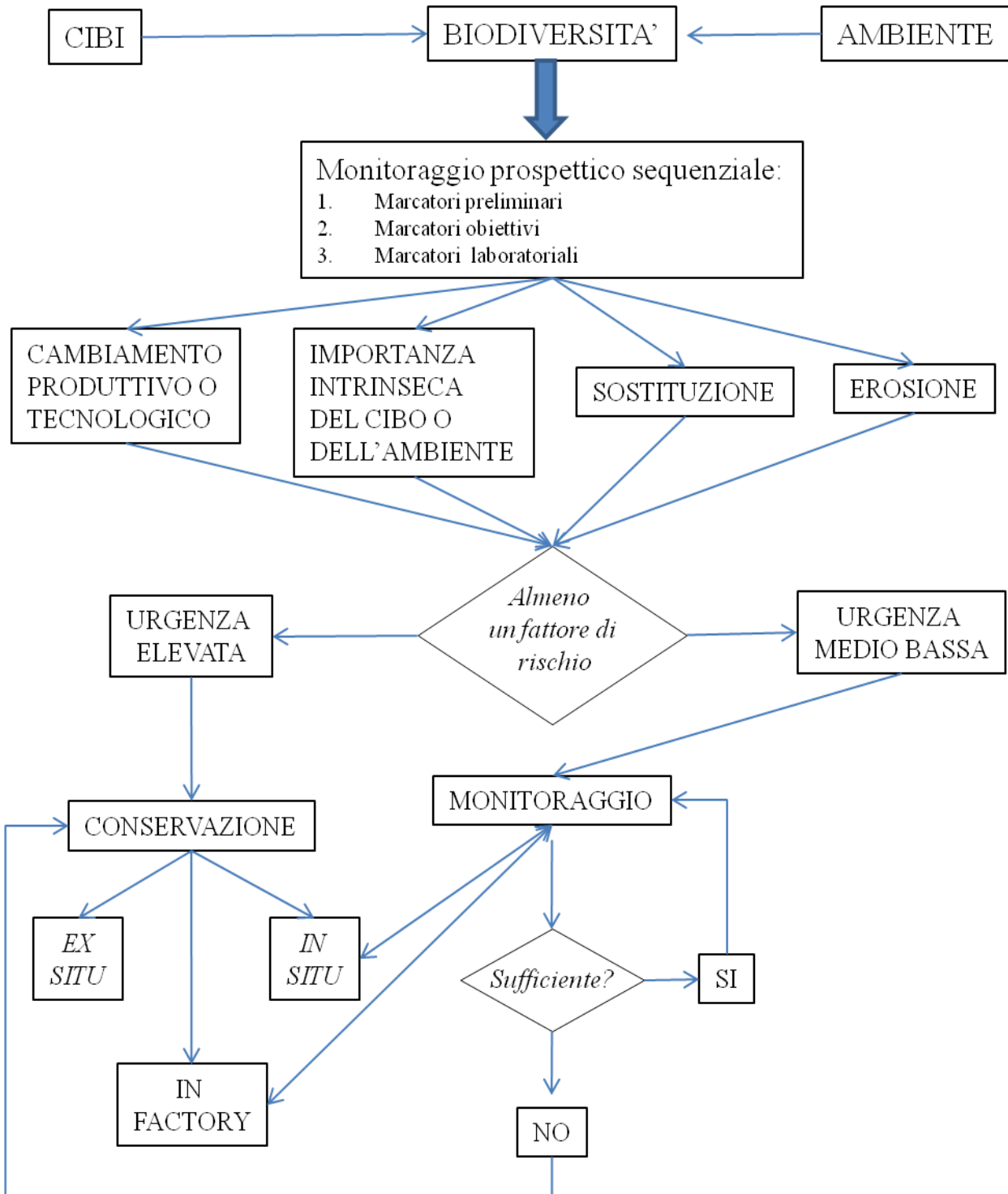


Figura 3 Diagramma di flusso decisionale per la conservazione sostenibile della biodiversità microbica agroambientale ed alimentare.

