

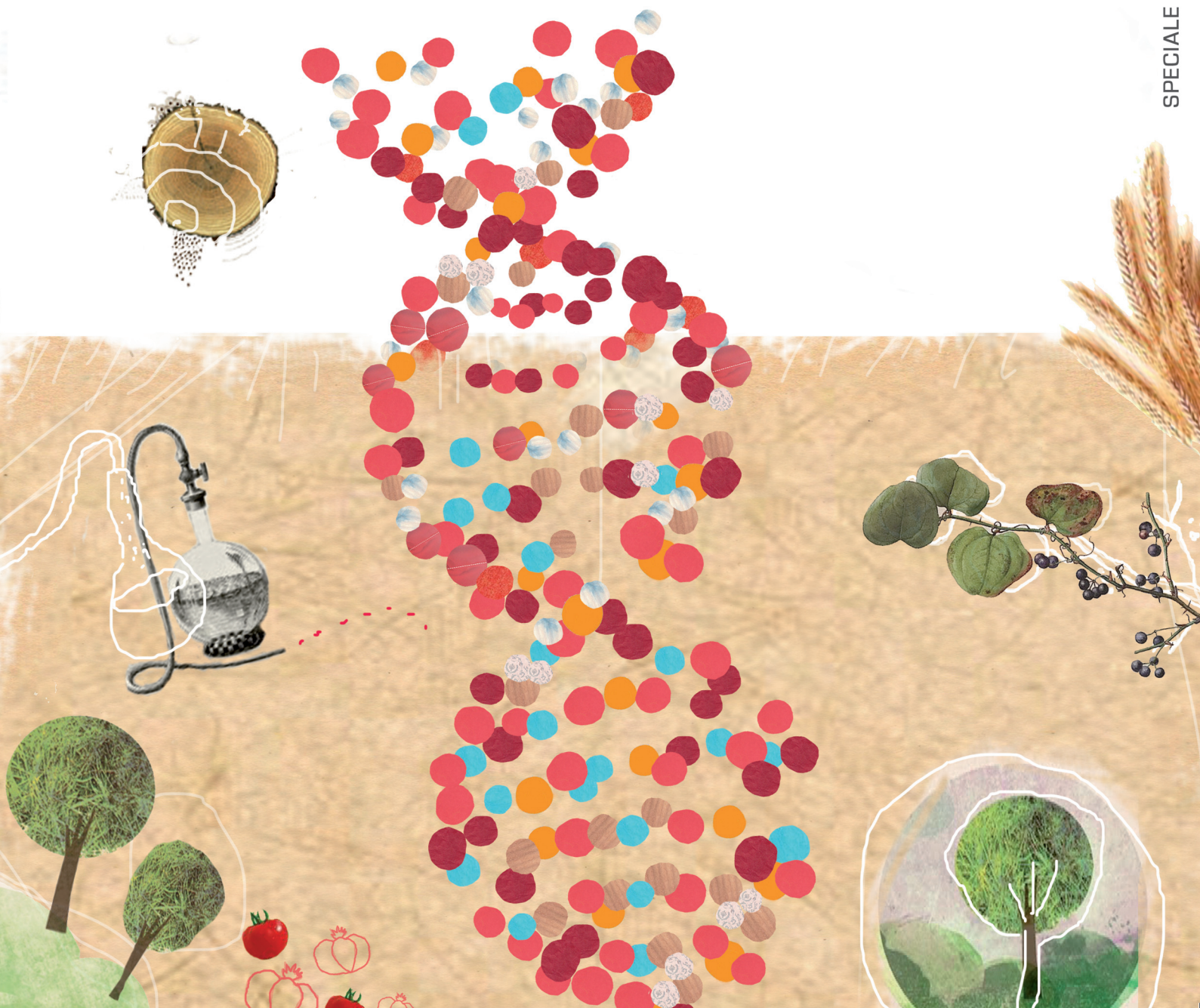


bimestrale dell'ENEA
anno 59

Speciale

BIOTECNOLOGIE PER LO SVILUPPO SOSTENIBILE

SPECIALE I - 2013



Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile

A cura di Massimo Iannetta

Direttore Responsabile

Vincenzo Ferrara

Comitato di Direzione

Pietro Agostini, Vincenzo Artale, Giacobbe Braccio, Marco Casagni, Gian Piero Celata, Carlo Cremisini, Pierino De Felice, Roberta Delfanti, Francesco Di Mario, Roberta Fantoni, Elena Fantuzzi, Massimo Forni, Massimo Frezzotti, Massimo Iannetta, Carlo Manna, Carmela Marino, Paride Meloni, Silvio Migliori, Roberto Morabito, Aldo Pizzuto, Vincenzo Porpiglia, Rino Romani, Sergio Sangiorgi, Massimo Sepielli, Leander Tapfer, Ezio Terzini, Francesco Troiani, Marco Vittori Antisari, Gabriele Zanini

Comitato tecnico-scientifico

Osvaldo Aronica, Paola Batistoni, Ilaria Bertini, Paolo Clemente, Paolo Di Lazzaro, Andrea Fidanza, Stefano Giammartini, Rossella Giorgi, Giorgio Graditi, Massimo Maffucci, Laura Maria Padovani, Paolo Ruti, Emilio Santoro

Direttore editoriale

Diana Savelli

Coordinamento editoriale*Dei fascicoli:* Giuliano Ghisu*Di questo Speciale:* Paola Molinas**Comitato editoriale**

Valerio Abbadessa, Flavia Amato, Daniela Bertuzzi, Paola Carrabba, Paola Cicchetti, Antonino Dattola, Barbara Di Giovanni, Laura Di Pietro, Michele Mazzeo, Laura Migliorini, Paola Molinas, Rita Pascucci, Caterina Vinci

Edizione web

Antonella Andreini, Daniela Bertuzzi, Concetta Manto

Promozione

Paola Crocianielli

Traduzioni

Carla Costigliola

Progetto grafico

Paola Carabotta, Bruno Giovannetti

Per informazioni e contatti: infoeai@enea.it**Pre-stampa**FGE Srl - Fabiano Gruppo Editoriale
Regione San Giovanni, 40 - 14053 Canelli (AT)**Stampa**Varigrafica Alto Lazio
Via Cassia, km 36,300 (Zona industriale) - 01036 Nepi (VT)**Registrazione**Tribunale Civile di Roma - Numero 148 del 19 aprile
2010 del Registro Stampa**Pubblicità**FGE Srl - Fabiano Gruppo Editoriale
Regione San Giovanni, 40 - 14053 Canelli (AT)
Tel. 0141 1768908 - Fax 0141 1768900
e-mail: info@fgeditore.it

Finito di stampare nel mese di aprile 2013



Prodotto realizzato impiegando carta Symbol Freelifelife certificata FSC

1 Lo Speciale
*di Massimo Iannetta***Sp Speciale 3**
**Aspetti inerenti energia,
ambiente e salute****3 Biotecnologie per la bioenergia**
*Vito Pignatelli***13 Riscriviamo la chimica in chiave
green**
*Alessandra Frattini***18 Biotecnologie ambientali per la
valorizzazione integrata di residui
organici dell'industria agro-alimentare
(biowaste biorefinery) a sostegno
della zero waste strategy**
*Alberto Scoma, Lorenzo Bertin, Fabio Fava***25 Biotecnologie per l'ambiente**
*Flavia Tasso, Chiara Alisi, Alessia Fiore, Paola
Marconi, Salvatore Chiavarini, Carla Ubaldi,
Valentina Pinto e Anna Rosa Sprocati***34 Focus - Biosensori per il
monitoraggio ambientale: le
innovazioni introdotte dalle
biotecnologie**
*Livia della Seta, Maria Rita Montereali,
Walter Vastarella***36 Biofarmaci verdi**
*Eugenio Benvenuto***40 Focus - Vaccini del Futuro**
*Selene Baschieri***41 Focus - Dalla virologia vegetale alla
nano medicina**
*Carla Marusic***42 Focus - Anticorpi a basso costo da
sistemi vegetali**
*Marcello Donini***44 Focus - Vaccini verdi contro i tumori
causati dal virus del papilloma
umano (HPV)**
*Rosella Franconi***Sp Speciale 46**
**Aspetti inerenti agricoltura e
agroindustria****46 Introduzione alle problematiche
degli OGM nella cultura italiana**
*Alfonso Pascale***52 Focus - Mais OGM: La Corte di
Giustizia Europea boccia il Ministero
delle Politiche Agrarie**
*Barbara Di Giovanni, Laura Maria Padovani***53 Biotecnologie e sicurezza
alimentare**
*Andrea Sonnino***61 Le microalghe come bio-fabbriche
per composti ad elevato valore
aggiunto**
*Giovanni Giuliano, Olivia De Murtas e Paola
Ferrante***67 Agrobiopolis: una infrastruttura di
ricerca a supporto dello sviluppo
delle biotecnologie e della green
chemistry**
*Roberto Balducchi***74 Il ruolo dell'ICT nelle scienze
omiche high-throughput**
*Giuseppe Aprea, Giulio Gianese, Marco
Pietrella, Vittorio Rosato, Valentina Spedaletti***83 Focus - Biotecnologie e Metrologia**
Giovanna Zappa



Lo Speciale

Massimo Iannetta

Responsabile dell'Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale



Lo Speciale *Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile* ha l'obiettivo di raccontare cosa le biotecnologie hanno cambiato nel nostro modo di vivere e di illustrare alcune applicazioni che hanno impatti importanti in diversi settori, quali l'energia, l'ambiente, la salute, l'agricoltura e l'alimentazione.

Il contributo delle biotecnologie si estende a quasi tutti gli ambiti dell'attività umana e costituisce un *driver* delle prossime sfide sociali, al centro dell'agenda europea nell'ambito della prossima programmazione Horizon 2020.

Il taglio dello Speciale coniuga la visione tecnico-scientifica dello stato d'avanzamento della conoscenza nel settore con l'aspetto applicativo; secondo un approccio che è tradizionale per l'ENEA, i contributi si focalizzano sugli interessi strategici del Paese e sui potenziali sviluppi industriali nei vari settori, in coerenza con le esigenze di uso sostenibile delle risorse biologiche e degli ecosistemi.

All'interno dello Speciale trova spazio anche un articolo sulla esigenza di integrare la cultura umanistica con quella scientifica (A. Pascale, *Introduzione alle problematiche degli OGM nella cultura italiana*). Le biotecnologie, infatti, sono divenute una espressione tipica del dibattito sullo sviluppo della società moderna, che – nella sua sempre maggiore complessità – deve conciliare e valorizzare gli aspetti della scienza e della tecnologia con i fattori culturali, sociali, ecologici ed economici, cercando di affrontare persino i problemi

posti dalla percezione degli stakeholders, nelle loro differenziazioni istituzionali ed ideologiche, delle diverse componenti della società e dell'opinione pubblica.

Come potenziale *opinion maker*, lo Speciale concorre a rafforzare la visione scientifica integrata delle biotecnologie, con la loro natura articolata, innovativa, trasversale e pervasiva, facendo il punto sulle best practice più interessanti e ricche di prospettive per il futuro, che riguardano obiettivi ambiziosi del genere umano: produrre di più per una popolazione in continuo aumento, con meno risorse, in modo più efficiente e sostenibile per il pianeta, migliorando le condizioni della nostra vita.

L'integrazione delle conoscenze e della sostenibilità delle applicazioni costituisce un patrimonio che accompagna lo sviluppo delle biotecnologie e più in generale delle scienze della vita, costituendo il complemento e la garanzia al progresso scientifico e tecnologico al servizio dell'uomo.

Desidero ringraziare sentitamente tutti i membri del Comitato di Redazione, composto da Roberto Balducchi, Eugenio Benvenuto, Giovanni Giuliano, Laura Maria Padovani, Vittorio Rosato, Luigi Rossi, Andrea Sonnino, con la supervisione di Vincenzo Ferrara. Va dato merito alle loro esclusive competenze e al loro impegno, ingredienti unici per continuare ad esprimere l'eccellenza scientifica e mantenere posizioni di rilievo a livello nazionale ed internazionale.

Biotechnologie: l'impegno storico dell'ENEA

Energia, alimenti, ambiente e salute sono ormai riconosciuti come un insieme inscindibile sul piano economico e sociale, con un ruolo centrale per le sfide della società contemporanea: gestione sostenibile delle risorse naturali, integrazione ed armonizzazione degli sviluppi sociali, nuovi modelli di produzione e consumo, miglioramento della salute pubblica, mitigazione e adattamento ai cambiamenti climatici, sviluppo globale basato sulla *green economy*. Le biotechnologie, che possono essere distinte in industriali, ambientali, farmaceutiche e agroalimentari, sono determinanti per la crescita e la tenuta di questo insieme e ne rappresentano l'elemento unificante. Un insieme che ormai si identifica con la *Bio-economy* e che comporta la piena affermazione dello sviluppo sostenibile.

Non è un caso che l'ENEA presenti questo Speciale, dato il suo impegno in attività di ricerca e di innovazione tecnologica nel settore delle biotechnologie, dell'energia, della salute e del sistema agroalimentare e ambientale fin dagli anni '50, che ha portato a risultati significativi in termini scientifici ed economici.

Risalendo agli albori dell'ENEA, al CNEN, nato a seguito della Conferenza di Ginevra "*Peaceful Uses of Atomic Energy*" del 1955, i primi due laboratori, peraltro attigui, realizzati nel grande Centro di Ricerche della Casaccia, furono quelli di Elettronica e di Genetica vegetale. Ed è così che dalla radiogenetica attraverso la mutagenesi, il miglioramento genetico, la citogenetica e le colture in vitro, necessarie anche per lo sviluppo della radioprotezione e delle applicazioni biomediche delle radiazioni ionizzanti, si è arrivati all'ingegneria genetica e, successivamente, alle attuali *scienze omiche*.

Può essere questa la sede per ricordare alcune tappe importanti, che testimoniano l'ampiezza e la continuità della ricerca biotechnologica svolta nei laboratori dell'ENEA.

Nel 1974 viene registrato il grano duro Creso, varietà a taglia bassa e molto produttiva, di elevata qualità di pastificazione. Essa si diffuse rapidamente. Da allora è stata coltivata largamente in Italia e all'estero, con importanti benefici per gli agricoltori, per l'industria alimentare e per i consumatori, con significative *royalties* per l'ENEA. Ancor oggi, dopo quasi 40 anni, la varietà Creso è coltivata su parte della superficie italiana a grano duro.

Nel 1979 viene registrata la prima varietà italiana di triticale – Mizar – risultante da una serie di interventi biotechnologici: ibridazione intergenerica, colture in vitro, raddoppiamento cromosomico, ingegneria cromosomica. Proclamata pianta ecologica per l'elevata resistenza alle fitopatie e per la competitività con le erbe infestanti (non necessita di diserbo), viene coltivata in Italia per prodotti alimentari speciali (meno ricchi di amido) e per uso zootecnico.

Nel 1993, su **Nature 366**, 469-472, viene pubblicato l'articolo "*Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack*" che rappresenta non solo per l'ENEA, ma in ambito internazionale, una pietra miliare nella storia dei cosiddetti fito-anticorpi e "vaccini verdi".

Nel 2012, ancora su **Nature 485**, 635-641, viene pubblicato l'articolo "*The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution*", a testimonianza del grande impegno dell'ENEA nel campo delle scienze omiche.

Infine la Bioinformatica (Biotechnologie e ICT) sviluppata in ENEA, in tutta la sua importanza ed attualità: oggi – dopo oltre 50 anni – viene spontaneo l'accostamento tra il Laboratorio di Genetica Vegetale e quello di Elettronica del vecchio CNEN, a simboleggiare uno sviluppo transdisciplinare ed integrato della conoscenza scientifica.

Biotecnologie per la bioenergia

La produzione, diretta o sotto forma di combustibili solidi, liquidi e gassosi, di energia rinnovabile dalle biomasse prende il nome di “bioenergia” e si realizza per mezzo di processi di diversa natura, dalla combustione diretta alla trasformazione in combustibili prodotti per via termochimica o biologica.

I processi biologici più noti e utilizzati su larga scala sono la digestione anaerobica per la produzione di biogas e la fermentazione alcolica, ma ne esistono molti altri, attualmente oggetto di attività di ricerca, sviluppo tecnologico e dimostrazione, che costituiscono un esempio importante di applicazione industriale delle moderne biotecnologie

■ Vito Pignatelli

La produzione sostenibile dell'energia necessaria per la crescita economica e il miglioramento generale delle condizioni di vita rappresenta una delle maggiori sfide che l'umanità nel suo complesso si troverà a dover affrontare nei prossimi anni, soprattutto in considerazione della necessità di dover far fronte ai cambiamenti climatici in atto e futuri.

In questo quadro, la bioenergia, intesa come quell'insieme ampio e diversificato di tecnologie che consentono di ottenere energia rinnovabile dalle biomasse, può fornire un contributo determinante a soddisfare la futura domanda di energia, considerato che essa costituisce già oggi, a livello mondiale, la più importante fra le fonti energetiche rinnovabili e possiede un significativo potenziale di espansione sia per quel che riguarda la produzione di elettricità e calore, sia – sotto forma di combustibili liquidi o gassosi, noti con il nome di biocarburanti – nel settore dei trasporti.

Per quel che riguarda in particolare il contesto europeo, la diffusa consapevolezza – recepita anche a livello politico e legislativo – dell'importanza della

bioenergia ha portato negli anni ad una situazione particolarmente favorevole alla valorizzazione energetica delle biomasse (legno, residui legnosi, scarti e rifiuti di origine vegetale o animale, ma anche produzioni agricole dedicate) e, conseguentemente, ad un costante incremento del contributo di questa fonte energetica.

Come per tutte le altre fonti energetiche rinnovabili, infatti, lo sviluppo della bioenergia in Europa è stato indubbiamente favorito da un quadro legislativo e normativo che, nella sua costante evoluzione nel corso degli anni, ha portato all'emanazione della Direttiva n. 28 del 2009 sulla promozione delle fonti rinnovabili di energia (nota come Direttiva RED), che evidenzia uno stretto collegamento tra lo sviluppo della produzione di energia da fonti rinnovabili e l'aumento dell'efficienza energetica e, per la prima volta e con un significativo passo in avanti rispetto alla legislazione precedente, stabilisce che, per poter essere considerati ai fini dell'assolvimento dell'obbligo di sostituzione dei combustibili fossili nel settore dei trasporti o del raggiungimento della quota stabilita di uso di energia rinnovabile, biocarburanti e bioliquidi (combustibili liquidi ottenuti dalle biomasse e impiegati per la generazione di energia elettrica e/o calore), devono dimostrare il rispetto di criteri ben definiti e quantificabili di sostenibilità.

■ Vito Pignatelli

ENEA, Unità Tecnica Fonti Rinnovabili

È del tutto evidente che, avendo a che fare con diverse tipologie di biomasse, la produzione di energia e/o combustibili a partire da queste materie prime può essere ottenuta con diverse tecnologie e, in quest'ambito, particolarmente rilevante e, in prospettiva futura, di primaria importanza è il ruolo delle biotecnologie, che costituisce il tema di questo articolo.

A tale proposito, occorre precisare che la bioenergia, rispetto ad altre fonti rinnovabili, presenta alcune differenze e peculiarità, che sono sostanzialmente:

- il fatto di essere una fonte energetica continua e programmabile, per molti versi analoga, nell'uso, ai combustibili fossili e quindi in grado, ad esempio, di immettere elettricità nella rete di trasmissione senza problemi di fluttuazioni temporali o improvvisi arresti della produzione;
- il fatto che, a partire dalle biomasse, è possibile coprire le esigenze di energia in tutte le forme richieste: elettricità, calore per riscaldamento e raffrescamento e biocarburanti;
- il fatto che, a differenza di tutte le altre fonti rinnovabili, la bioenergia non è riconducibile a un insieme di tecnologie, ma deve essere sempre vista come una "filiera": la biomasse devono essere infatti raccolte, o prodotte nel caso di coltivazioni dedicate, trasportate e successivamente convertite in energia e/o combustibili solidi, liquidi e gassosi. Inoltre, dall'utilizzazione delle biomasse a fini energetici derivano sempre residui o sottoprodotti (ceneri di combustione, digestato, glicerolo, residui di distillazione ecc.), il cui recupero e riuso influisce spesso in modo rilevante sulla sostenibilità economica ed ambientale dell'intera filiera produttiva.

Da quest'ultimo punto discende una considerazione importante, soprattutto quando si parla di "sostenibilità" della bioenergia: le biomasse sono una risorsa rinnovabile, ma non inesauribile, per cui devono essere usate in tempi e modi che ne consentano la naturale ricostituzione da parte della fotosintesi clorofilliana. Diventa quindi essenziale evitare ogni forma di spreco (ivi inclusa, per quanto possibile, la sottrazione di terreno agricolo destinato o destinabile alla produzione di alimenti) e utilizzare, ad esempio,

l'intera pianta e non solo una sua frazione o, meglio ancora, convertire in energia e/o combustibili gli scarti, residui e rifiuti che derivano dalla trasformazione dei prodotti dell'agricoltura, dell'allevamento, dell'industria alimentare, del legno ecc.

Considerando le filiere bioenergetiche nel loro complesso – con particolare riferimento a quelle che, come nel caso della produzione dei biocarburanti, utilizzano come materie prime prodotti agricoli come cereali o colture oleaginose – è evidente l'importanza che, nei bilanci energetici e ambientali finali, possono assumere le biotecnologie applicate alle produzioni vegetali per l'incremento delle rese produttive e/o della resistenza agli stress ambientali e agli agenti patogeni, come pure per lo screening e l'individuazione, con tecniche di biologia molecolare, delle specie e varietà più adatte alla coltivazione in determinati ambienti, argomenti per il cui approfondimento si rimanda ad altri articoli di questo Speciale.

Iniziando invece ad affrontare il tema specifico delle tecnologie di conversione – e del ruolo delle biotecnologie in tale contesto – è opportuno ricordare che, al momento attuale, le alternative più valide per l'utilizzazione energetica delle biomasse, tenuto conto del grado di maturità e dell'affidabilità delle relative tecnologie, sono sostanzialmente tre:

- la combustione diretta, con conseguente produzione di calore da utilizzare per il riscaldamento domestico, civile e industriale o per la generazione di vapore (forza motrice o produzione di energia elettrica). Altre tecnologie termochimiche, come la pirogassificazione con produzione di syngas e successiva utilizzazione dello stesso per la generazione di calore e/o elettricità, pur in presenza di alcuni impianti produttivi, sono ancora prevalentemente oggetto di attività di ricerca e sviluppo, in particolare per quel che riguarda impianti di piccola taglia di potenziale interesse di aziende agricole ed agroindustriali;
- la produzione di biogas mediante digestione anaerobica di reflui zootecnici, civili o agroindustriali, colture dedicate e frazione organica dei rifiuti urbani, e la successiva utilizzazione del biogas prodotto per la generazione di calore e/o elettricità o l'impiego come biocarburante;

- la trasformazione in combustibili liquidi, utilizzati per la produzione di energia elettrica (bioliquidi) o nel settore dei trasporti (biocarburanti) di particolari categorie di biomasse coltivate come alcune oleaginose, cereali e colture zuccherine.

Ovviamente, le biotecnologie non hanno nulla a che vedere con i processi termochimici come combustione o gassificazione, ma sono estremamente importanti per quel che riguarda la produzione di biogas e biocarburanti.

Biogas e bioidrogeno

La digestione anaerobica (DA) è un processo biochimico di degradazione della sostanza organica in assenza di ossigeno che dà luogo alla produzione di biogas, costituito essenzialmente da una miscela di metano (55-65%v/v) e CO₂, oltre alla presenza fino al 5%v/v di acqua, acido solfidrico ed ammoniaca. Il processo è realizzato da un consorzio microbico in grado di compiere diverse reazioni degradative della materia organica, più o meno rapide ed efficaci a seconda delle condizioni operative (pH, temperatura, diluizione del substrato, presenza di nutrienti o inibitori ecc.) in cui si svolgono.

Il processo di digestione anaerobica viene sfruttato



FIGURA 1 Impianto per la produzione di biogas da 500 kW in un'azienda agro-zootecnica nei pressi di Sutri (VT), aprile 2011

Fonte: immagine di proprietà dell'autore

per la produzione di energia rinnovabile mediante la conversione in biogas di biomasse residuali (reflui zootecnici, scarti e residui di produzioni agricole ed agroindustriali, fanghi di depurazione, frazione organica dei rifiuti urbani ecc.) e/o derivanti da colture dedicate (insilati di mais, sorgo ecc.). Si tratta di una tecnologia consolidata, con più di 600 impianti in funzione in Italia nel solo comparto agro-zootecnico (figura 1) e diverse migliaia in tutto il mondo.

Sottoponendo il biogas ad un opportuno trattamento di purificazione (*clean-up*) e rimozione della CO₂ (*upgrading*), si ottiene metano praticamente puro, del tutto analogo a quello che costituisce il gas naturale che, per l'origine biologica, prende il nome di "biometano".

Le tecnologie utilizzate per l'*upgrading* del biogas a biometano sono diverse, e ognuna presenta vantaggi e svantaggi che ne favoriscono, o ne sconsigliano, l'utilizzazione a seconda dei casi. Il paese leader a livello europeo nella produzione di biometano è la Germania, che ha pianificato una produzione nazionale di 6 miliardi di Nm³ (6% dei consumi totali di metano) nel 2020 e 10 miliardi di Nm³ nel 2030. In Germania l'immissione in rete del biometano è regolamentata da un'Ordinanza del 2008 (Biogaseinspeiseverordnung) che ne stabilisce la priorità di immissione nella rete nazionale di distribuzione del gas naturale e pone la maggior parte dei costi per gli allacciamenti a carico del gestore della stessa.

I processi di DA e le successive fasi di *clean-up* e *upgrading* del biogas a biometano sono oggetto di crescente attenzione per i vantaggi che il loro impiego potrebbe presentare:

- per una gestione ottimale dei rifiuti, scarti e residui organici di diversa natura e provenienza, in quanto la loro conversione in energia trasforma un costo (lo smaltimento) in un possibile guadagno (la vendita e/o lo sfruttamento diretto dell'energia ricavata);
- come soluzione integrativa ed alternativa per incrementare il reddito derivante dalle attività del settore imprenditoriale agricolo ed agroindustriale, con la possibilità di diversificare, con l'introduzione di nuove colture ad elevata resa di conversione e ridotte esigenze di acqua e fertilizzanti (figura 2),

e aumentare le produzioni agricole consentendo di ampliare le coltivazioni anche in quei terreni che, per scarsa remuneratività e difficoltà di accesso, sono stati marginalizzati o abbandonati, senza depauperarne la capacità produttiva e preservandone il valore agronomico.

Le applicazioni delle biotecnologie per la produzione del biogas riguardano essenzialmente il campo della microbiologia per lo studio di sistemi di DA ottimizzati in termini di resa di biogas, presenza di inquinanti, utilizzo di nuove possibili miscele in co-digestione.

Quest'ultima linea è oggetto di maggiore attenzione, soprattutto dove, come è il caso dell'Italia, non c'è una disponibilità particolarmente elevata di un'unica tipologia di biomassa, ma al contrario è presente un'alta differenziazione locale e stagionale delle biomasse utilizzabili ai fini della digestione anaerobica.

La co-digestione, sebbene richieda una maggior capacità di gestione ed un'approfondita conoscenza del processo anaerobico, favorisce il miglioramento delle rese energetiche specifiche del processo, soprattutto in presenza di substrati velocemente fermentescibili, ottimizza le caratteristiche fisico-chimiche della miscela di alimentazione, permette di raggiungere più facilmente la stabilità del processo rispetto alla digestione semplice di un substrato complesso, di diluire carichi organici eccessivi e picchi di concentrazione di sostanze inibenti e consente la stabilizzazione di residui di lavorazioni agroalimentari (sanse, acque di vegetazione, polpe, buccette, borlande ecc.) prodotte stagionalmente. In ultima analisi, la codigestione di biomasse fermentescibili di diversa natura favorisce la realizzazione di impianti decentralizzati per la produzione di energia, consentendo un buon ritorno economico dell'investimento anche per piccole realtà agro-industriali.

In quest'ottica, alcuni fornitori di tecnologie e impianti per la produzione di biogas hanno recentemente iniziato ad introdurre sul mercato "additivi" costituiti da consorzi di microrganismi appositamente selezionati che, fungendo da veri e propri inoculi per la fermentazione anaerobica, mirano a modificare la composizione della flora microbica presente nel digestore in modo da incrementare la velocità di



FIGURA 2 Coltivazione sperimentale di topinambur - Cicerale (SA), settembre 2011

Fonte: immagine di proprietà dell'autore

conversione e la produzione di metano, o a favorire la degradazione di materiali con un elevato contenuto di cellulosa, come ad esempio i residui di alcune colture erbacee, rendendone conveniente l'impiego.

Allo stato attuale della tecnologia, quando si parla di biogas ci si riferisce, come detto precedentemente, ad una miscela costituita essenzialmente da metano e CO_2 , ma in realtà la degradazione anaerobica della sostanza organica è un processo estremamente complesso, costituito da diverse fasi in successione. In particolare, in uno stadio iniziale del processo – la cosiddetta fase acidogenica/acetogenica – si formano quantitativi non indifferenti di idrogeno che, prendendo successivamente parte ad altre reazioni, viene alla fine convertito praticamente tutto in metano. Un approccio innovativo ai processi di produzione del biogas punta ad arrivare ad una separazione delle diverse fasi della digestione anaerobica, in modo da produrre idrogeno e, successivamente, metano che possono essere recuperati separatamente – ad esempio nella prospettiva di utilizzare l'idrogeno (che, nel caso specifico, viene anche chiamato "bioidrogeno") per la produzione di elettricità con celle a combustibile – o riuniti per formare una miscela di gas combustibili, il cosiddetto idrometano, utilizzabile sia per la produzione di elettricità che come biocarburante.

Su questo tema specifico, presso i laboratori del Centro ENEA della Casaccia vengono condotte attività sperimentali mirate a modificare, in modo più o meno accentuato, le modalità di conduzione del processo di DA (condizioni operative, separazione fra le diverse fasi, composizione della comunità microbica ecc.). I principali argomenti delle attività di ricerca sono il potenziamento della produzione di metano da reflui e sottoprodotti quali liquami di allevamenti bovini, scotta e glicerolo, la separazione delle fasi di idrogenogenesi e metanogenesi per arrivare alla realizzazione di un processo cosiddetto “a doppio stadio”, l'individuazione di pool microbici funzionali alla produzione di idrogeno e naturalmente presenti in alcuni dei substrati considerati, come i liquami.

Parallelamente, sono state svolte indagini molecolari atte ad individuare i migliori pretrattamenti e/o condizioni di reazione per la selezione di pool microbici adatti alla produzione di idrogeno e a definirne la composizione, caratterizzando le comunità microbiche con tecniche di genetica molecolare.

È opportuno sottolineare come la scelta dell'inoculo e del tipo di pretrattamento più idoneo per la selezione dei microrganismi idrogenogenici rappresentano due aspetti correlati, in quanto il fine ultimo, ovvero l'ottenimento di un'adeguata selezione della biomassa idrogeno produttrice, può variare da caso a caso a seconda delle specie presenti nei diversi componenti della miscela avviata a digestione. Esistono infatti più tipi di specie di batteri idrogenogenici, che mostrano elevate rese produttive anche su biomasse più complesse, quali ad esempio la frazione organica dei rifiuti urbani (FORSU), ed ognuna di esse può essere selezionata dalla comunità microbica iniziale con pretrattamenti diversi.

L'elaborazione statistica dei risultati dei test sperimentali ha fornito informazioni utili per poter miscelare i substrati studiati in porzioni diverse, a seconda delle relative disponibilità, e dai risultati emerge che il liquame, un substrato generalmente considerato non idoneo alla produzione di H₂, in codigestione mostra un aumento della resa di produzione tale da far ritenere interessante il passaggio di scala su impianti pilota.

Biocarburanti

Con il termine “biocarburante” si intende un carburante liquido o gassoso utilizzato nei trasporti, ottenuto mediante la trasformazione di biomasse di diversa natura.

Nella scelta tra tutti i biocarburanti definiti tali a livello europeo, in Italia si propende principalmente, attraverso precise disposizioni normative, ad impiegare il biodiesel e il bioetanolo, in genere previa trasformazione in derivati (bio-eteri) come l'ETBE (etere etil-ter butilico) e, in misura minore, il TAEE (etere etil-ter amilico). Nel decreto legislativo n. 28 del 3 marzo 2011, che recepisce la Direttiva europea del 2009 sullo sviluppo delle fonti di energia rinnovabili (la cosiddetta “Direttiva RED”) è inoltre prevista l'emanazione di specifiche misure legislative e normative per favorire la produzione e l'impiego del biometano, ottenuto mediante *upgrading* del biogas, in sostituzione del metano di origine fossile.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei biocarburanti devono soddisfare requisiti rigidamente fissati da normative tecniche europee e nazionali. L'utilizzo dei biocarburanti nel settore dell'autotrazione interessa una vasta gamma di soluzioni praticabili che prevedono la miscelazione con i carburanti fossili, a basse concentrazioni nei motori tradizionali, a medie concentrazioni con lievi modifiche degli stessi, fino ad arrivare all'impiego di biocarburante puro per alcune categorie di veicoli appositamente progettati.

La tabella 1 riporta alcune valutazioni e comparazioni fra i biocarburanti comunemente utilizzati effettuate dalla casa automobilistica tedesca Volkswagen.

Come è noto, il primo carburante utilizzato da Rudolph Diesel per l'alimentazione del motore che ha preso il suo nome, fu olio di arachide, e molte proprietà e caratteristiche chimico-fisiche degli oli vegetali li rendono in effetti adatti – in linea di principio – ad essere impiegati come carburanti in questo tipo di motori, ma la principale controindicazione rispetto al loro uso diretto (che è però presente in alcune particolari situazioni, generalmente limitate all'alimentazione di trattori ed altre macchine agricole) è costituita dall'elevata viscosità.

Le caratteristiche degli oli vegetali possono essere

	Biodiesel	Etanolo	Biometano
Disponibilità potenziale	Percentuale limitata sui consumi totali di gasolio	10-30% dei consumi di benzina, con possibile incremento legato alla produzione industriale da materiali lignocellulosici	Percentuale elevata su un mercato attualmente limitato
Sostenibilità	Questione aperta	Conflitto "food vs fuel"; possibile soluzione etanolo da materiali lignocellulosici	Differenti materie prime utilizzabili, possibile produzione da rifiuti
Valutazioni e problematiche di natura tecnica	Leggermente peggiore del gasolio; compatibilità dei materiali migliore rispetto al gasolio	Leggermente peggiore della benzina; problemi di incompatibilità dei materiali	Leggermente migliore del gas naturale compresso (CNG)
Modalità di impiego nella UE	Miscelazione fino al 7% (in volume); 100-20% in applicazioni di nicchia	Miscelazione fino al 10% in volume; problemi di accettabilità da parte degli utenti	Introdotta da poco; utilizzato al 100% o in miscela con il gas naturale (certificati di immissione al consumo)

TABELLA 1 Fonte: Elaborazione ENEA da IEA Bioenergy - Future Biomass-based Transport Fuels, 2012

notevolmente migliorate sottoponendoli ad un particolare processo che li trasforma in biodiesel, termine che indica un combustibile liquido costituito da una miscela di esteri di acidi grassi (in inglese "FAME" - Fatty Acid Methyl Ester) di origine vegetale o animale, utilizzabile, puro o in miscela con il gasolio, per l'alimentazione di motori a combustione interna a ciclo diesel.

La produzione del biodiesel è un processo industriale in cui un olio vegetale è fatto reagire in eccesso di alcol metilico con una reazione detta "transesterificazione", che si avvale di tecnologie consolidate e si realizza in impianti di diversa taglia (figura 3). La scelta della tecnologia da utilizzare è determinata, a seconda dei casi, dalla valutazione delle capacità produttive desiderate, dalla natura e qualità delle materie prime che si intende utilizzare e dall'entità dell'investimento economico previsto.

La produzione industriale del biodiesel viene effettuata a partire da oli vegetali estratti da semi o frutti oleosi di colture dedicate (colza, soia, girasole, palma da olio ecc.), da oli alimentari esausti rigenerati o, in misura minore, da grassi animali di scarto dei processi di macellazione e lavorazione delle carni.

Il principale sottoprodotto della reazione è il glicerolo (glicerina), in fase acquosa, che deve essere sottoposto ad un adeguato trattamento di purificazione prima di essere rivenduto all'industria chimica, che lo utilizza

direttamente come materia prima in diversi processi (produzione di saponi, cosmetici, prodotti farmaceutici, esplosivi ecc.).

La produzione di biodiesel è un classico processo chimico dove non sembrano esserci spazi per le biotecnologie ma, in prospettiva, gli enormi quantitativi di glicerolo reso disponibile come sottoprodotto dall'industria del biodiesel (a puro titolo di riferimento,



FIGURA 3 Impianto per la produzione di biodiesel della capacità produttiva di 400.000 t/anno della Biopetrol Industries AG, Rotterdam (NL), maggio 2009
Fonte: immagine di proprietà dell'autore

la produzione europea di biodiesel nel 2011, pari a circa 8,8 milioni di tonnellate, corrisponde a poco meno di un milione di t di glicerolo), che hanno determinato una forte diminuzione del prezzo di mercato di questo prodotto, rendono interessante lo sviluppo di nuovi processi, anche di tipo biotecnologico, che ne consentano la conversione in prodotti chimici e/o energetici a più alto valore aggiunto.

Fra le diverse soluzioni proposte, i processi biologici presentano, rispetto alla sintesi catalitica, il vantaggio di non richiedere alte pressioni e/o temperature e, soprattutto, di poter utilizzare glicerolo non raffinato, perché meno sensibili all'eventuale presenza di contaminanti che possono dar luogo invece a fenomeni di inibizione dei catalizzatori. Fra questi, i processi basati sulla digestione anaerobica presentano un particolare interesse, in quanto richiedono un apporto ridotto di nutrienti, inoculi meno frequenti e minori costi di impianto e di gestione rispetto alle fermentazioni aerobiche, e possono portare ad una vasta gamma di prodotti finali.

Il glicerolo grezzo proveniente da impianti di biodiesel è già oggi utilizzato come substrato per la produzione di biogas in codigestione con altre biomasse, ma ben più interessante è il suo possibile impiego in processi fermentativi che, basandosi sulla digestione anaerobica, lo trasformino in intermedi per la sintesi chimica, biocarburanti e/o idrogeno. Infatti, rispetto agli zuccheri normalmente impiegati come substrato di processi fermentativi, il glicerolo presenta il vantaggio di essere in uno stato più "ridotto", cioè di contenere in proporzione meno ossigeno, prestandosi meglio alla trasformazione in prodotti scarsamente ossigenati, quali ad esempio succinato, etanolo, butanolo e 2,3 butandiolo, oltre che alla produzione di idrogeno.

La conversione in una varietà di prodotti chimici ed energetici del glicerolo derivante dalla produzione di biodiesel costituisce un chiaro esempio di cosa si intende per "bioraffineria", vista come un insieme di trasformazioni successive che portano alla valorizzazione completa di una biomassa o di un suo derivato – come è, nel caso specifico, l'olio vegetale – senza produrre praticamente alcun rifiuto.

La maggior parte dei processi biologici utilizzati per ottenere i prodotti precedentemente citati presenta

però lo svantaggio di richiedere l'uso di ceppi microbici puri, in qualche caso anche ingegnerizzati, e questo porta ad un notevole aggravio dei costi dovuto alla necessità di operare in condizioni praticamente asettiche. Diventa quindi di primaria importanza lo sviluppo di processi basati sull'impiego di colture miste, ottenute a partire da consorzi microbici presenti in natura, che consentano di operare in condizioni non sterili.

Presso i laboratori dell'ENEA è stato studiato e sviluppato un processo per la produzione di idrogeno ed etanolo che, partendo da glicerolo grezzo e utilizzando un consorzio microbico opportunamente selezionato, ha mostrato rese di conversione particolarmente elevate (degradazione del substrato > 98%).

Il processo, coperto da brevetto con richiesta di copertura internazionale, è attualmente oggetto di valutazione per una possibile applicazione industriale e le relative analisi tecnico-economiche mostrano che, a differenza di altri processi fermentativi, i costi maggiori non sono dovuti alla fase di recupero e purificazione (*downstream processing*) dei prodotti finali, ma alle dimensioni del reattore, per cui l'obiettivo prioritario delle future attività di *scaling-up* dovrà essere quello di ridurre i tempi e migliorare la cinetica complessiva del processo in modo da ridurre significativamente i volumi dell'impianto.

A differenza del biodiesel, il bioetanolo – che è stato il primo combustibile liquido distribuito pubblicamente per l'alimentazione dei motori a scoppio degli autoveicoli ed è attualmente il biocarburante più utilizzato a livello mondiale – viene ottenuto per fermentazione degli zuccheri contenuti in biomasse vegetali di varia natura (zuccherine, amilacee o – nel caso del cosiddetto "etanolo di seconda generazione" – lignocellulosiche) ed è quindi un chiaro esempio di applicazione delle biotecnologie alla produzione di energia.

Quando la materia prima è una coltura zuccherina (canna da zucchero, barbabietola, sorgo ecc.), si procede con la semplice estrazione degli zuccheri per spremitura e/o diffusione in soluzione acquosa, seguita dalla fermentazione alcolica, mentre i carboidrati complessi come l'amido, l'inulina e la cellulosa richiedono un trattamento preliminare di idrolisi, cioè

di degradazione del polimero ad una soluzione di zuccheri semplici.

Se si ha a che fare con materie prime amilacee (cereali, patate) o ricche di inulina e altri polimeri a base di fruttosio (topinambur, cicoria da inulina), l'idrolisi viene in genere effettuata per mezzo di enzimi (amilasi o inulinasi) che reagiscono con il substrato finemente macinato, portato in soluzione acquosa e riscaldato fino a 90 °C e oltre, mentre l'idrolisi della cellulosa è un processo molto più complesso, non ancora utilizzato su scala industriale (anche se, proprio in Italia, è in fase di avvio il primo impianto pre-commerciale per la produzione di etanolo da biomasse lignocellulosiche, costruito dalla Chemtex Italia S.p.A. del Gruppo Mossi & Ghisolfi, basato su una tecnologia descritta in dettaglio in un altro articolo di questo Speciale).

Le soluzioni di zuccheri semplici (glucosio, fruttosio e saccarosio) provenienti dall'idrolisi sono poi avviate alla fermentazione ad opera di lieviti come il *Saccharomyces cerevisiae* o altri microrganismi, ottenendo alla fine una soluzione di etanolo in acqua ad una concentrazione generalmente compresa fra il 9 e il 14% in volume.

Il processo di produzione del bioetanolo genera, a seconda della materia prima agricola utilizzata, diversi sottoprodotti con valenza economica destinabili alla mangimistica, alla cogenerazione, o riutilizzati all'interno del processo stesso.

A differenza del biodiesel, l'uso dell'etanolo in miscela con la benzina presenta alcuni problemi di compatibilità perché può dare luogo a fenomeni di smiscelazione in presenza di acqua e alla formazione di azeotropi volatili con gli idrocarburi più leggeri (butano), sostanzialmente dovuti alla diversa struttura chimica dei due prodotti.

Per questi motivi, in Europa e nel nostro paese, si tende ad impiegare l'etanolo non miscelandolo direttamente con la benzina, ma sotto forma di derivati (eteri) di cui il più importante è l'ETBE, ottenuto dalla reazione dell'alcol etilico con l'isobutene, un sottoprodotto proveniente dai processi di *cracking* e raffinazione del petrolio o dal gas butano o naturale.

Quando l'alcol impiegato per la sintesi dell'ETBE è bioetanolo (dove il prefisso bio- distingue l'etanolo ottenuto dalla biomassa da quello di origine fossile prodotto per idratazione dell'etilene), si parla più



FIGURA 4 Mezzi di trasporto pubblici alimentati a biometano nella città svedese di Kristianstad, aprile 2008
Fonte: immagine di proprietà dell'autore

propriamente di bio-ETBE. Poiché alla sua sintesi chimica partecipa anche l'isobutene, di origine petrolifera, il bio-ETBE è considerato biocarburante solo per una frazione pari al 47% in peso.

Per quel che riguarda infine il biometano, è opportuno ricordare che questo biocarburante è presente attualmente sul mercato in quantitativi ancora limitati, e copre circa lo 0,5% del consumo totale di biocarburanti a livello europeo.

Fra tutti i paesi che hanno avviato la produzione di biometano, l'unico a privilegiarne decisamente l'impiego come carburante per i trasporti è la Svezia, dove il biometano alimenta camion per la raccolta dei rifiuti, autobus per il trasporto pubblico (figura 4) e auto private, ed è presente una rete di distributori di questo biocarburante.

Biocarburanti di seconda generazione

Con la sola – ma poco rilevante – eccezione del biometano, tutti i biocarburanti attualmente distribuiti su larga scala sono ricavati a partire da colture ben note: oleaginose come colza, soia, girasole e palma da olio o zuccherine come mais, grano, barbabietola e canna da zucchero. Si tratta in tutti i casi di colture largamente diffuse e utilizzate prevalentemente a fini

alimentari, sia nel nostro paese che in altri contesti europei ed extra-europei. In questo caso si usa parlare di biocarburanti di prima generazione, in quanto prodotti da biomasse legate in qualche modo alla filiera alimentare dell'uomo.

L'attuale tendenza ad incorporare percentuali crescenti (ma, tutto sommato, limitate) di questi prodotti in benzina e gasolio va incontro all'esigenza del sistema produttivo agricolo di diversificare le proprie produzioni e di utilizzare grandi estensioni di terreni non più destinabili alla produzione di risorse alimentari. Ovviamente, questa convergenza di interessi è valida solo fino ad un certo punto perché, con l'aumentare della richiesta, si rischia di innescare una pericolosa competizione fra le possibili destinazioni alternative efficacemente sintetizzata dall'espressione "food vs fuel".

Questa preoccupazione è fortemente sentita a livello europeo, al punto che, in sede di revisione e aggiornamento della Direttiva n. 28 del 2009 sulla promozione delle fonti rinnovabili di energia (Direttiva RED), che prevede l'obbligo di coprire nel 2020 il 10% dei consumi energetici nel settore dei trasporti con energie rinnovabili, è attualmente in discussione la proposta di limitare al 5% il contributo dei biocarburanti ottenuti a partire da materie prime a possibile destinazione alimentare, coprendo il restante 5% con elettricità da fonti rinnovabili e biocarburanti cosiddetti "di seconda generazione".

Questa comune denominazione raggruppa in realtà un gran numero di prodotti, ottenibili da diverse materie prime con una varietà di processi a diversi stadi di sviluppo (dal laboratorio all'impianto dimostrativo pre-commerciale), ma nessuno ancora presente sul mercato in quantità significative.

Un elenco non esaustivo di biocarburanti di seconda generazione è riportato nella tabella 2.

Denominatore comune delle filiere dei biocarburanti di seconda generazione è comunque l'uso, come materia prima, di substrati generalmente non utilizzabili a fini alimentari (ad esempio, materiali lignocellulosici e oli non commestibili) o prodotti comunque in aree diverse da quelle tradizionalmente destinate alle produzioni agricole convenzionali, come ad esempio le colture di microalghe.

Le tecnologie utilizzate per la produzione di biocarburanti di seconda generazione sono sia termochimiche (gasificazione, pirolisi, idrogenazione catalitica ecc.), che di natura biologica.

Questa seconda categoria comprende tutti quei processi basati sull'uso di microrganismi (fermentazioni aerobiche e anaerobiche) ed enzimi (idrolisi della cellulosa), che sono tipici esempi di applicazione delle biotecnologie, sia per quel che riguarda le colture microbiche, sia relativamente agli aspetti più propriamente legati alla tecnologia di processo.

Una fra le applicazioni potenzialmente più interessanti delle biotecnologie per la produzione di bioenergia

Tipologia	Biocarburante	Materie prime	Processo produttivo
Bioetanolo	Etanolo da cellulosa	Materiali lignocellulosici	Idrolisi enzimatica e fermentazione
Biocarburanti di sintesi	<ul style="list-style-type: none"> • Fischer-Tropsch diesel; • Biometanolo; • Alcoli superiori (butanolo e altri); • Dimetil etere (DME); • Ossigenati di sintesi (etanolo + MTHF ecc.) 	Materiali lignocellulosici	Gassificazione e sintesi
Biodiesel (ibrido fra I ^a e II ^a generazione)	Hydrodiesel Greendiesel da pirolisi Biolio da microalghe	Oli e grassi vegetali e animali Materiali lignocellulosici Microalghe	Idrogenazione catalitica Pirolisi Coltivazione ed estrazione
Metano	Gas naturale di sintesi (SNG)	Materiali lignocellulosici	Gassificazione e sintesi
Idrogeno	Bioidrogeno	Materiali lignocellulosici Biomasse fermentescibili	Gassificazione e separazione Fermentazione anaerobica

TABELLA 2 Fonte: IEA, Bioenergy Implementing Agreement. From 1st to 2nd Generation Biofuel Technologies, 2008

è, infine, la produzione di biocombustibili liquidi da colture di microalghe, attualmente oggetto di interesse e di numerose attività sperimentali di ricerca, sviluppo e dimostrazione in diverse parti del mondo.

Questi organismi sono infatti in grado di sintetizzare ed accumulare grandi quantità di lipidi, utilizzabili per la produzione di biocarburanti con processi convenzionali (biodiesel) o innovativi, e questa modalità di produzione – i cui prodotti finali vengono spesso indicati come “biocarburanti di terza generazione” – appare particolarmente promettente in quanto le rese ottenibili da un ettaro di superficie messa a coltura con microalghe sono stimate intorno alle 30 tonnellate di olio/anno, valore che è circa di un ordine di grandezza superiore alla migliore resa produttiva delle piante oleaginose terrestri (olio da coltivazioni di palma in ambienti tropicali: 4-5 t/ha/anno).

Rese così elevate non sono però in grado di assicurare di per sé una convenienza economica per l'impresa che decida di avviarne la produzione. Infatti sia le poche esperienze finora realizzate a livello di impianti pilota che gli studi e simulazioni effettuati estrapolando i dati ottenuti in laboratorio fanno ritenere che i costi degli impianti di coltivazione delle microalghe e quelli relativi all'insieme dei processi di *downstream* (recupero della biomassa, estrazione e purificazione della componente lipidica) siano ancora troppo alti, anche a causa delle elevate richieste energetiche del processo.

Inoltre, per ottenere produzioni significative, le estensioni ed i volumi delle colture algali devono raggiungere valori ragguardevoli, dell'ordine minimo di svariati ettari se si parla di coltivazioni in vasche (*open ponds*), e quindi tali da porre, oltre ai problemi di natura tecnologica e di bilanci energetici ed economici, anche una serie di pressioni sull'ambiente ospitante le coltivazioni e su quello circostante.

Per raggiungere, quindi, l'obiettivo di un bilancio economico ed energetico favorevole è necessario agire sia sul versante dell'incremento di produttività, cercando di riprodurre a livello di impianto i risultati ottenuti alla scala di laboratorio, sia sugli aspetti

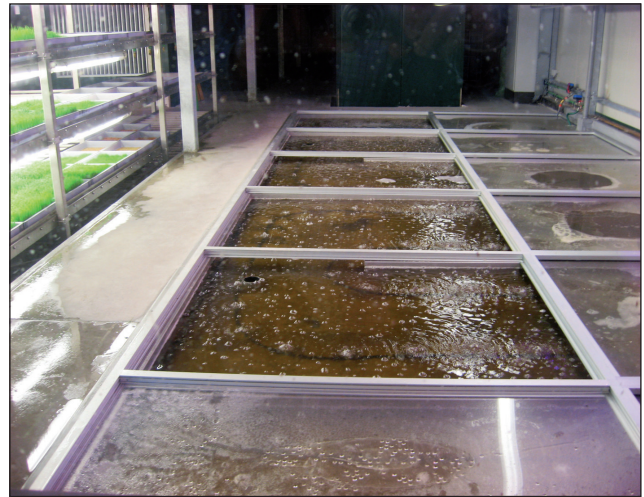


FIGURA 5 Coltivazione sperimentale di microalghe per il trattamento degli effluenti liquidi di un impianto per la produzione di biogas nei pressi di Lendava, Slovenia, ottobre 2011

Fonte: immagine di proprietà dell'autore

più propriamente ingegneristici del processo, per arrivare ad una semplificazione e standardizzazione della componente impiantistica, contenendo significativamente i relativi costi.

Una possibile soluzione intermedia, praticabile nel breve-medio periodo e in grado di ovviare alla mancanza, a livello mondiale, di tecnologie consolidate per la produzione intensiva su larga scala di biomassa microalgale a basso costo potrebbe essere quella di realizzare impianti su piccola/media scala per la produzione di microalghe da destinare alla produzione di biogas, che, oltre a non richiedere alcun processo di frazionamento e recupero di singole componenti della biomassa, presenterebbero il valore aggiunto della depurazione di acque reflue (figura 5) e dell'assorbimento di CO₂, inclusa parte di quella prodotta dai cogeneratori, e consentirebbero di produrre energia in modo più semplice e con minori input energetici e standard qualitativi della biomassa prodotta rispetto a quanto richiesto per la produzione di biodiesel.

Riscriviamo la chimica in chiave *green*

L'utilizzo di materie prime di origine fossile per produrre energia rappresenta, ad oggi, una delle maggiori cause di incremento delle emissioni di gas a effetto serra. L'Europa ha adottato una serie di misure tese a ridurre queste emissioni promuovendo l'utilizzo delle biomasse.

Su queste basi si fonda il nuovo concetto di chimica verde promosso dal Gruppo Mossi & Ghisolfi (M&G), colosso della chimica che ha messo a punto una tecnologia made in Italy per trovare un'alternativa al petrolio che sia sostenibile e in grado di ridurre le emissioni di CO₂. Questa tecnologia, Proesa®, è alla base del primo impianto al mondo per la produzione di biocarburanti di seconda generazione a Crescentino (VC).

Quella di M&G è una vera e propria "rivoluzione verde" per far rinascere uno dei settori strategici dell'industria nazionale recuperando competitività e creando nuovi posti di lavoro

■ Alessandra Frattini

L'utilizzo di materie prime di origine fossile per produrre energia rappresenta, ad oggi, una delle maggiori cause di incremento delle emissioni di gas a effetto serra. Negli ultimi anni l'Europa ha adottato una serie di misure tese a ridurre le emissioni di gas climoalteranti e allo stesso tempo limitative nell'utilizzo di materie prime di origine fossile, promuovendo l'utilizzo di materie prime disponibili sul territorio, quali ad esempio le biomasse. In questo contesto quindi l'agricoltura gioca un ruolo fondamentale ed è oggetto di studi e sperimentazioni al fine di sfruttare la risorsa agricola in un contesto industriale e produttivo, senza alterare gli equilibri ecologici e alimentari. I prodotti agricoli già oggi rappresentano un'alternativa sostenibile ai prodotti di origine petrolchimica, ma

finora l'attenzione è stata posta esclusivamente sul loro potenziale energetico. I nuovi indirizzi della politica europea e le esperienze più innovative ci dicono che un impiego innovativo della biomassa vegetale è destinato a sostenere in chiave ecologica un nuovo paradigma produttivo nel settore chimico industriale. Su queste basi si fonda il nuovo concetto di chimica verde promosso dal Gruppo Mossi & Ghisolfi (M&G), colosso della chimica mondiale, leader nella produzione di PET, che con un investimento di 120 milioni di euro in R&S ha messo a punto una tecnologia completamente *made in Italy* per trovare una valida alternativa al petrolio, competitiva da un punto di vista economico, ambientalmente sostenibile e in grado di ridurre le emissioni di anidride carbonica. Questa tecnologia si chiama Proesa® e permette di produrre bioetanolo di seconda generazione a partire da biomasse non in contrasto con la catena alimentare, reperibili localmente, quali ad esempio paglia di riso, paglia di grano, cippato e altri scarti agricoli.

■ Alessandra Frattini

CHEMTEX Italia SpA (Gruppo Mossi & Ghisolfi), Rivalta Scrivia (AL)

La tecnologia di seconda generazione permette la produzione di bioetanolo da biomassa lignocellulosica, consentendo benefici in termini di riduzione di emissioni di gas ad effetto serra nell'ordine di oltre l'80%.

Ed ecco che dopo quella degli USA, che restano il primo produttore di bioetanolo al mondo (40 miliardi di litri) e del Brasile (25 miliardi), la rinomata "benzina verde" arriva oggi a portare anche la coccarda tricolore con un grande vantaggio rispetto ai due Paesi leader che utilizzano principalmente canna da zucchero e mais: usando esclusivamente colture non destinate a fini alimentari.

La decarbonizzazione è una pagina già scritta nella storia dell'uomo: il caro e vecchio petrolio, comparso sulla scena mondiale nel corso del 900, grazie anche alla diffusione del motore a scoppio, mostra i suoi limiti.

Non ci si può più scordare della esauribilità dei combustibili di origine fossile. Il petrolio non è certo una risorsa rinnovabile: per formarsi ha bisogno di un tempo variabile tra i 10.000 e i 100.000 anni e in natura non è disponibile in quantità illimitata! Cilegina sulla torta: la combustione, su tutto il pianeta, di enormi quantità di petrolio (centrali elettriche, mezzi di

trasporto) è tra le maggiori cause dell'incremento delle percentuali di anidride carbonica e di altri gas nell'atmosfera, con fortissima incidenza sull'effetto serra.

Più del 95% della nostra mobilità dipende da combustibili fossili e per sostituirli occorrono alternative che siano di facile fruizione per il consumatore: ci servono essenzialmente dei sostituti liquidi come oggi lo sono la benzina, il gasolio utilizzato per il trasporto merci e navale e il kerosene utilizzato per il trasporto aereo.

Ulteriore considerazione va fatta per una panoramica internazionale caratterizzata da un forte incremento demografico (aumento della popolazione di circa il 30% entro il 2030) e contemporanea crescita esponenziale dei consumi energetici stessi, che vanno quindi a riflettersi inesorabilmente sull'ambiente.

Da qui ecco iniziata da anni la lotta ai cambiamenti climatici intrapresi dall'Europa attraverso l'adozione di politiche tese a ridurre le emissioni gas-clima alternati e contemporaneamente capaci di limitare l'utilizzo delle materie prime di origine fossile, usando quindi materie prime disponibili sul territorio continentale.

L'iniziativa di M&G si rivolge verso la stessa direzione in cui guarda l'Europa e decide di cogliere la sfida



FIGURA 1 e 2 Attività di laboratorio presso il Centro Ricerche di Rivalta Scrivia (AL)
Fonte: immagine di proprietà del Gruppo Mossi&Ghisolfi

lanciata: l'obiettivo è che nel 2020 il 10% dei carburanti sia da fonte rinnovabile, traguardo decisamente ambizioso considerando che oggi non andiamo oltre il 2,5%, ma alla portata tecnologica, visti i passi avanti fatti negli ultimi anni.

Secondo le stime del Gruppo M&G, basterebbe impiegare una minima percentuale delle biomasse prodotte dai terreni abbandonati perché non idonei alle colture alimentari per poter soddisfare questa richiesta, senza l'aiuto di sussidi che dovrebbero essere invece destinati ad incentivare la ricerca. Parlando appunto di costi, nell'ottica M&G già ora la produzione di bioetanolo è più conveniente della produzione tradizionale della benzina ottenuta con raffinazione del petrolio quando il prezzo del barile supera i 70 USD (oggi siamo ben oltre i 90, e abbiamo nei mesi scorsi toccato massimi vicini ai 150).

Per M&G "sostenibilità" è sinonimo di Proesa®, la tecnologia industriale messa a punto grazie ad un programma di ricerca da 120 milioni di euro, principalmente sviluppato in Italia, che ha dimostrato su scala pilota la fattibilità del processo di conversione. Proesa® è ora la tecnologia per eccellenza per produrre zuccheri da biomasse cellulosiche.

Sono quattro i passaggi fondamentali grazie ai quali è possibile ottenere zuccheri, che poi diventano bioetanolo a partire dalle biomasse.

Pretrattamento

Le biomasse lignocellulosiche (BLC) sono costituite essenzialmente da polisaccaridi: cellulosa, emicellulosa e lignina. Il principale ostacolo che si incontra nell'utilizzo delle BLC è la difficoltà di accesso ai polisaccaridi. Per la produzione di etanolo, cellulosa ed emicellulosa sono la materia prima che deve essere liberata dalla barriera di lignina. Lo scopo del pretrattamento è proprio quello di destrutturare la matrice lignocellulosica, separandola nelle componenti polimeriche principali, rendendole accessibili all'azione degli enzimi prevista nello step successivo. Chemtex ha sviluppato un nuovo metodo di pretrattamento che prevede l'utilizzo di vapor d'acqua saturo e consente di ottenere il rilascio dei polisaccaridi in modo rapido, con basso consumo

energetico e senza l'aggiunta di prodotti chimici (es. acidi). Questo tipo di pretrattamento minimizza la formazione di prodotti di degradazione delle BLC, come ad esempio furfurale o idrossimetilfurfurale (5-HMF), che agiscono come inibitori del processo fermentativo che converte gli zuccheri in etanolo.

Idrolisi enzimatica

L'idrolisi è lo stadio del processo necessario ad ottenere zuccheri semplici dai polisaccaridi, presenti naturalmente nelle BLC e liberati con il passaggio di pretrattamento. La tipologia di idrolisi su cui punta Chemtex è l'idrolisi enzimatica, favorita dalle condizioni del materiale in uscita dal pretrattamento. L'idrolisi è effettuata da un cocktail di enzimi cellulolitici che permettono di ottenere dalla frazione cellulosica zuccheri esosi (a 6 atomi di carbonio) come il glucosio, mentre la frazione composta dall'emicellulosa viene scissa in una miscela di zuccheri pentosi: xylosio e arabinosio sono i componenti più abbondanti. Un cocktail idrolitico efficiente, diversamente da quanto richiesto nei processi di prima generazione, è composto da diversi enzimi che svolgono ognuno un'azione specifica sulle varie componenti delle BLC. Per scindere la cellulosa a zuccheri semplici sono



FIGURA 3 Centro Ricerche di Rivalta Scrivia (AL)

Fonte: immagine di proprietà del Gruppo Mossi&Ghisolfi

necessari almeno tre diversi enzimi: endocellulasi, esocellulasi e β -glucosidasi. Ognuno di questi enzimi taglia il polimero di cellulosa in un punto specifico ed è solo la loro azione concertata che permette di ottenere gli zuccheri monomerici. L'emicellulosa, diversamente dalla cellulosa, è un eteropolimero ramificato e si compone di diversi zuccheri. Per idrolizzarla efficacemente sono necessari non solo gli enzimi responsabili dell'idrolisi dei monomeri di xilosio che ne formano lo scheletro, ma anche altre attività enzimatiche accessorie che scindono i legami tra lo xilosio e gli altri zuccheri presenti.

Fermentazione degli zuccheri a etanolo

Una volta ottenuta la soluzione di zuccheri attraverso il passaggio di idrolisi, si procede alla fermentazione. La conversione degli zuccheri ad etanolo è possibile grazie al comune lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*). Il lievito, prima di essere inoculato nella soluzione di zuccheri, viene propagato fino a raggiungere non solo la concentrazione necessaria per il processo, ma anche lo stato metabolico ottimale ai fini della conversione che deve attuare. Al fine di aumentare le rese, il microrganismo utilizzato nel processo sviluppato da Chemtex consente di convertire tutti gli zuccheri liberati, pentosi ed esosi. Il risultato della fermentazione è una birra ad alta concentrazione di etanolo (fino all'8%).

Distillazione

In quest'ultimo stadio del processo viene trattata la birra derivante dalla precedente fermentazione. In un'apposita colonna, si separa l'etanolo prodotto dal residuo di fermentazione (principalmente costituito da lignina). La corrente di etanolo esce dalla testa della colonna, mentre dalla coda viene recuperata la frazione solida. La lignina, avendo un alto potere calorifico, viene mandata ad una caldaia, per consentire l'auto-sostentamento ed una perfetta integrazione energetica dell'intero processo. La corrente di etanolo è sottoposta ad una fase di deidratazione che permette di ottenere un prodotto puro al 99%.

Tra gli ulteriori vantaggi della tecnologia Proesa®

la minimizzazione della formazione di *by products* e inibitori e l'utilizzo di un impianto in continuo, che costituisce la base per il design su scala industriale.

Nel 2009 infatti è stato messo a punto presso il Centro Ricerche M&G a Rivalta Scrivia (AL) un impianto pilota continuo in cui sono stati testati più di dieci tipi di biomasse e parecchi enzimi e micro-organismi, costituendo quindi la base per la costruzione dell'impianto industriale.

Attualmente è stata avviata nel comune di Crescentino (VC) la realizzazione del Primo Impianto Industriale per la produzione di bioetanolo da biomassa lignocellulosica, con una capacità di produzione di 40.000 tonnellate l'anno. Con questo stabilimento il Gruppo centra il primo traguardo di un più ampio progetto: la costruzione di filiere agroindustriali pienamente sostenibili sia ambientalmente che economicamente e la conseguente realizzazione di impianti commerciali (impianti su linea singola che produrranno 150.000-200.000 t/a di bioetanolo). Questo impianto industriale, primo al mondo per scala e tecnologia, sarà operativo a partire dal 2012. L'investimento è di 120 milioni di euro; l'impianto opererà in filiera locale utilizzando colture dedicate e sarà cardine di un'importante collaborazione tra agricoltura e industria.

Grazie alla capacità di estrarre in maniera efficiente le cellulose, la tecnologia Proesa® permette quindi la produzione di zuccheri a basso costo che, grazie a successive modificazioni chimiche, possono costituire la base per una vera e propria bioraffineria, in grado di produrre un ventaglio di prodotti intermedi chimici, dai *fine chemicals* ai *bulk chemicals*.

Proesa® ha permesso a M&G di essere protagonista negli ultimi mesi di molti annunci, principale tra tutti quello relativo all'alleanza con il fondo di *private equity* americano TPG e con il colosso danese del biotech Novozymes. Beta Renewables, questo è il nome della joint venture, è la società che si sta occupando di commercializzare sul mercato globale la tecnologia Proesa®. Altra importante sinergia è quella con la società brasiliana GraalBio Investimentos S.A, con la quale si ha in progetto la costruzione del primo impianto di produzione di bioetanolo di seconda generazione in Brasile.

M&G si prefigge però un ben più ambizioso obiettivo: la ricerca sul biocarburante è solo un passaggio e apre la strada alla produzione di intermedi chimici da biomasse, creando quindi un'opportunità di crescita sostenibile per il nostro Paese.

Trovare un'alternativa al petrolio per le materie plastiche è un'altra priorità. Priorità che si rispecchia perfettamente nell'intenzione delle principali aziende detentrici di marchi vicini ai consumatori come Pepsi Cola, Coca Cola, P&G, Heinz, Danone e Unilever che hanno pubblicamente dichiarato di incrementare l'uso di prodotti ottenuti da fonti rinnovabili sia nei loro materiali da imballaggio che nei loro prodotti.

E cosa possiamo fare in Italia? Se guardiamo al nostro paese ci accorgiamo che oggi si producono con la petrolchimica circa 8 milioni di tonnellate annue di materiali plastici e prodotti chimici di vario tipo: solventi, ammine, elasticizzanti, emulsionanti, poliesteri, nylon, fenoli, PVC, resine, termoindurenti.

La completa sostituzione dei prodotti petrolchimici con una filiera produttiva che abbia una resa produttiva di 10 ton/a di prodotto richiederebbe l'utilizzazione di 800.000 ettari. Ad oggi l'agricoltura occupa circa 10 milioni di ettari, ma negli ultimi 20 anni in Italia sono stati abbandonati dall'agricoltura circa 1,5 milioni di ettari che potrebbero essere nuovamente valorizzati con colture lignocellulosiche erbacee, realizzabili

anche in terreni marginali e non più produttivi per le colture alimentari.

M&G non si ferma. E non ferma la ricerca. I progetti avviati valutano la possibilità di ottenere prodotti sostitutivi del gasolio e delle gomme e altri intermedi chimici attraverso soluzioni biotecnologiche combinate con catalisi tradizionali.

Insomma, una vera e propria "rivoluzione verde" è ormai alle porte e costituisce un'occasione che il nostro paese non può lasciarsi sfuggire, in quanto farebbe rinascere un settore decisivo dell'industria nazionale recuperando competitività e creando nuovi posti di lavoro. Un vero e proprio toccasana per la chimica europea e quella italiana in particolare, che andrebbe così a recuperare la leadership tecnologica persa negli anni. In questo contesto risulterà essere sempre più determinante il contributo a livello biotecnologico che l'Italia sarà in grado di fornire non solo in termini di idee, ma anche sotto forma di personale addestrato e qualificato.

M&G ha indicato la strada per arrivare ad una chimica verde che sia sostenuta da tecnologie di avanguardia e possa contribuire a ridurre gli impatti ambientali, ma senza incidere sulle tasche dei consumatori, perché attraverso l'innovazione è possibile pensare a prodotti derivati da materie prime rinnovabili (quali le colture lignocellulosiche), che siano competitivi dal punto di vista dei costi con quelli di derivazione petrolifera.

Biotecnologie ambientali per la valorizzazione integrata di residui organici dell'industria agro-alimentare (*biowaste biorefinery*) a sostegno della *zero waste strategy*

La produzione industriale di materiali ed energia è ad oggi basata sul massiccio impiego di risorse fossili non rinnovabili. Lo sfruttamento di dette risorse impatta però negativamente sull'ambiente, essendo causa diretta o indiretta di produzione e rilascio di gas ad effetto serra. Inoltre, la scarsissima biodegradabilità delle plastiche convenzionali sintetizzate per via chimica dal petrolio ne ha comportato l'accumulo in comparti ambientali sia terrestri sia marini, con gravi danni agli ecosistemi interessati. L'impiego di sottoprodotti e/o residui di natura organica quali materie prime alternative alle risorse fossili, può limitare significativamente la domanda di queste ultime e nel contempo consentire la valorizzazione dei rifiuti stessi, aumentando la sostenibilità economica delle attività industriali da cui sono stati prodotti

■ Alberto Scoma, Lorenzo Bertin, Fabio Fava

Introduzione

Il concetto di "Zero Waste" si basa sull'idea di considerare qualsiasi materiale di scarto prodotto da attività antropiche come possibile risorsa per altri processi od utilizzatori. In tal modo, verrebbe meno il concetto di rifiuto, inteso come "qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o l'obbligo di disfarsi", che passerebbe ad essere inteso

come "sottoprodotto", che per normativa si distingue appunto dal rifiuto se utilizzato in successive attività industriali, se in grado di essere impiegato senza altri pre-trattamenti, ed ovviamente se il suo utilizzo come materia prima soddisfa tutti i requisiti di legge relativi alla protezione della salute e dell'ambiente [1]. In tal senso, il riciclaggio rappresenta una pratica dedicata al recupero del rifiuto che contribuisce all'idea di eliminare gli scarti prodotti dall'uomo. La stessa Comunità Europea ha proposto delle linee guida finalizzate alla diminuzione dei rifiuti, suggerendo ai paesi membri sforzi normativi per favorire una minor produzione di materiale di scarto associata ai processi industriali, la raccolta differenziata, il riutilizzo ed il riciclaggio [1]. In definitiva, produrre secondo la

■ Lorenzo Bertin, Fabio Fava, Alberto Scoma

Università di Bologna, Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali (DICAM)

filosofia *zero waste* significa progettare e condurre processi produttivi che minimizzino l'impiego di materie prime e materiali (nell'ottica di conservare risorse naturali), che evitino l'accumulo di rifiuti e che non ne prevedano lo smaltimento in discarica o mediante termovalorizzazione.

Ad oggi, la produzione ed il conseguente smaltimento di rifiuti rappresenta un serio problema a livello globale. Nella sola Comunità Europea allargata a 27 paesi vengono attualmente prodotti circa 3 miliardi di tonnellate di rifiuti all'anno, una larga parte dei quali di natura organica [2]. In particolare, oltre il 10% di tale quota è rappresentata dalla somma di rifiuti di origine animale, vegetale e da fanghi. Le sole attività agricole, forestali e legate alla pesca producono in Europa circa 40 milioni di tonnellate di rifiuti all'anno [2]. Se una tale quantità di scarti di natura organica contribuisce significativamente al problema dello smaltimento dei rifiuti, la loro origine biologica li rende d'altra parte un'interessante potenziale materia prima dalla quale recuperare molecole naturali di interesse industriale o dalla quale ottenere altre molecole ad alto valore aggiunto, biomateriali e/o *biofuels* mediante trasformazione del materiale organico di cui gli scarti sono composti, insieme ad acqua e nutrienti inorganici. Dette trasformazioni possono avvenire mediante applicazione di processi biotecnologici, durante i quali la materia è bioconvertita grazie al metabolismo di specifici organismi viventi, che la utilizzano come fonte di carbonio o di energia. Nello specifico, si parla di bioraffineria quando il residuo organico è sfruttato in filiere industriali che includono processi modulari e seriali basati su approcci principalmente (ma non esclusivamente) biologici, ognuno dei quali in grado di utilizzare come materia prima lo scarto del processo a monte. Le bioraffinerie consentono di sfruttare nella maniera più completa possibile la materia organica di scarto, ottenendo tra l'altro prodotti che possono essere d'interesse per settori industriali differenti, permettendo quindi non solo di diversificare sensibilmente il rischio industriale dovuto alle variazioni di valore di mercato associate ad ogni singolo prodotto, ma guadagnando l'opportunità di impegnare molteplici settori del mercato a partire da una stessa matrice. Le bioraffinerie sono quindi concettualmente

simili alle raffinerie chimiche, ma se ne differenziano per le risorse impiegate. Al termine delle filiere biotecnologiche, tutto ciò che non può ulteriormente essere sfruttato viene tipicamente inviato a processi di digestione anaerobica, dedicati alla mineralizzazione del materiale biologico in assenza di ossigeno, il cui prodotto è 1) un digestato ormai molto povero di materia organica residua, e 2) un biogas ricco in metano. Tutto ciò considerato, le biotecnologie applicate nell'ambito delle bioraffinerie dovrebbero essere considerate uno strumento fondamentale nell'ottica di riciclare materiale di scarto in cicli industriali produttivi, al fine di consentire la valorizzazione di frazioni organiche di interesse, la riduzione dei costi del loro eventuale smaltimento e l'introduzione di nuove molecole di interesse commerciale su diversi settori del mercato.

Bioraffinerie di residui organici dell'industria agro-industriale: possibili approcci e strategie

La materia organica contenuta nei rifiuti delle attività agro-industriali partecipa al ciclo del carbonio dell'ecosfera, intesa come l'insieme delle zone della Terra in cui le condizioni ambientali permettono la formazione e lo sviluppo della vita e comprendente la porzione esterna della litosfera (suolo e parte del sottosuolo), l'idrosfera (le acque marine, lacustri e fluviali) ed i primi strati dell'atmosfera. In tal senso, la CO₂ sviluppata dalla trasformazione biologica o chimico-fisica di detti rifiuti non contribuisce all'incremento di gas serra in atmosfera, in quanto utilizzata come fonte di carbonio da diversi organismi appartenenti a svariati ecosistemi. La materia organica dell'ecosfera è generalmente chiamata biomassa, termine che fa quindi sostanzialmente riferimento a sostanza di origine biologica che non abbia subito processi di fossilizzazione, ovvero direttamente o indirettamente dovuta a sintesi clorofilliana. In particolare, la biomassa ottenuta come scarto di processi industriali è definita residuale, e si distingue dalla biomassa naturale e da quella dedicata in quanto quest'ultime rispettivamente non dovute ad attività antropiche (ad esempio, materiale lignocellulosico raccolto da foreste) e prodotti di definiti processi industriali (ad esempio, coltivazioni).

Le biomasse residuali possono essere di diversa natura, e generalmente si distinguono in prodotti secondari e scarti dell'industria agro-alimentare, materiali e residui di attività agricole e forestali, reflui di origine zootecnica, frazione organica dei rifiuti solidi urbani ed alghe od altre specie vegetali utilizzate per la depurazione di liquami organici. Per quanto riguarda lo scenario europeo, la grande varietà climatica e territoriale del continente è causa di una altissima diversificazione di tipologie di biomasse, da Nord a Sud e da Est ad Ovest. In generale, i reflui agro-industriali rappresentano la quota più significativa del biowaste complessivamente prodotto.

In virtù della grande varietà di biomasse residuali ottenute come rifiuti di attività agro-industriali, le possibilità di valorizzare matrici organiche attraverso approcci biotecnologici sono molteplici. D'altra parte, la composizione di dette matrici è estremamente variabile, in funzione sia dello spazio (a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche e climatiche e del territorio) sia del tempo (la stessa tipologia di biomassa può avere composizione diversa a seconda del periodo dell'anno in cui è prodotta). Di conseguenza, se da un lato è possibile suggerire quali processi biotecnologici possano essere applicati a carico di una definita matrice organica di scarto, è spesso assai difficile prevedere quali valori dei principali parametri processuali consentano di massimizzare la produttività del processo stesso.

In generale, le bioraffinerie possono essere dedicate al recupero di molecole naturali (biomolecole) di interesse industriale (inclusi i principali polimeri biologici, quali ad esempio proteine o polisaccaridi) e/o alla (bio)conversione del materiale organico in altri *chemicals* ad alto valore aggiunto, in biomateriali o *biofuels*. A seconda della tipologia dello scarto, sono però possibili altri processi di valorizzazione. Ad esempio, le coltivazioni di frutta e cereali, che generano elevati volumi di sottoprodotti (per il 20-60% del peso della materia prima processata, [3]) e che sono generalmente impiegate nella produzione di mangimi, hanno trovato recente impiego nell'ambito della produzione di *functional foods*, ovvero alimenti con specifiche benefiche proprietà nutraceutiche. Tali residui sono infatti generalmente ricchi di fibre dietetiche, vitamine, carotenoidi, antiossidanti di origine

naturale, mono-, di- ed oligo-saccaridi. In particolare, questi ultimi agiscono come prebiotici raggiungendo il colon senza aver subito processi digestivi e venendo solo allora fermentati da bifidobatteri o batteri lattici, con effetti benefici per la salute umana [4]. Lo sfruttamento delle componenti sopra indicate per la produzione di *functional foods* può avvenire senza necessità di estrarle come molecole pure, evitando approcci costosi che non consentirebbero l'immissione sul mercato degli stessi prodotti alimentari. A dimostrazione dell'importanza e dell'attualità della tematica sopra descritta, la Comunità Europea e il governo dell'India hanno recentemente finanziato un progetto comune dedicato alla produzione di *functional foods* e nuovi prodotti alimentari a partire da sottoprodotti della produzione di agrumi, mango, melograno e crusca di grano e riso (www.namaste-eu-india.org).

In merito ai processi di separazione ed estrazione di sostanze ad alto valore aggiunto da scarti agro-industriali, i principali approcci sfruttano la loro diversa dimensione (processi con membrane) od affinità con fasi acquose od organiche (processi di estrazione in fase liquida o solida) [5]. In generale, è possibile prevedere diversi pretrattamenti (meccanici, chimico-fisici, di natura enzimatica) in grado di rendere più disponibile al processo estrattivo la sostanza di interesse, e la natura dello scarto influenza sensibilmente sia il primo che il secondo. In particolare, in caso di matrice lignocellulosica, il pretrattamento è fondamentale nell'ottica di separare la lignina dai polisaccaridi (cellulosa ed emicellulosa), che possono essere impiegati in processi fermentativi. A tal fine, sono stati studiati diversi approcci: *steam* o *ammonia fiber explosion*, trattamenti meccanici, microonde, acqua in fase liquida ad alta temperatura e pressione, trattamenti acidi, basici o con solventi ionici, trattamenti biologici che impieghino funghi in grado di degradare la lignina mediante enzimi idrolitici esacellulari [6]. Tuttavia, alcuni ostacoli devono essere ancora superati, tra i quali una insufficiente separazione tra lignina e polisaccaridi, formazione di prodotti in grado di inibire i seguenti processi biologici, alto uso di agenti chimici e di energia [6]. In caso di scarto liquido, il recupero di composti di interesse può avvenire mediante estrazione in fase solida: l'impiego di resine in grado di adsorbire

selettivamente le molecole target, sulla base della loro affinità nei confronti della stessa matrice solida, consente di minimizzare la quantità di solvente impiegato a valle per il processo di desorbimento, rispetto alla quantità da utilizzare in caso di estrazione liquido-liquido [5].

Per quanto concerne la produzione di polimeri e biomateriali, la stessa si basa sulla naturale capacità di microorganismi di produrre e accumulare monomeri e polimeri a partire da risorse di natura organica. In alcuni casi, gli stessi possono avere proprietà meccaniche che li rendono potenziali alternative alle plastiche di origine sintetica (ad esempio, i poliidrossialcanoati). I polimeri naturali sono secreti da batteri (polisaccaridi) o parte della parete cellulare di alcuni microorganismi, quali i lieviti, la cui parete polisaccaridica è formata da mannani, glucani e chitina. Inoltre, polimeri “bio-based” possono essere prodotti dalla polimerizzazione di *building blocks* ottenuti per bioconversione di substrati organici (ad esempio, l'acido polilattico (PLA) è ottenuto per sintesi chimica dall'acido lattico, prodotto della fermentazione dei batteri lattici; il polietilene è sintetizzato dal bioetanolo; il polietilensuccinato dall'acido succinico, ottenuto biologicamente per vie fermentative, e dall'1,4-butandiolo). Tuttavia, al momento, gran parte dei polimeri microbici è prodotta a partire da costosi substrati zuccherini sintetici aventi una composizione definita. Obiettivo delle ricerche attualmente condotte nel settore è quindi la produzione di biopolimeri da rifiuti di natura organica. In virtù dell'elevato contenuto di materiale organico, parte del quale zuccherino, molti di questi potrebbero essere adatti allo scopo: melasso da canna o da barbabietola da zucchero, effluenti dell'industria casearia, acque reflue della produzione di oli, idrolizzati amidacei, cellulose ed emicellulose. I rifiuti dell'industria agro-alimentare possono anche essere valorizzati mediante produzione di esopolisaccaridi (la gomma xantana è l'esopolisaccaride batterico che è attualmente più utilizzato).

Infine, per quanto concerne i *biofuels*, i rifiuti di natura agro-industriale possono essere utilizzati soprattutto per la produzione di bioetanolo, biodiesel, bioidrogeno e biometano. Il bioetanolo è il prodotto della fermentazione alcolica di zuccheri semplici; i processi di prima generazione impiegano substrati puri, mentre il bioetanolo di seconda generazione è prodotto a partire

da matrici lignocellulosiche, per le quali è necessario prevedere i pretrattamenti sopra indicati. Il biodiesel è prodotto dalla transesterificazione di oli vegetali in presenza di metanolo, dalla quale si ottiene una miscela di esteri metilici di acidi grassi (alimentabile in motore Diesel) e glicerolo, sottoprodotto per il quale è a sua volta necessario prevedere processi di valorizzazione che contribuiscano alla sostenibilità economica del processo di produzione del biocarburante. Bioidrogeno e biometano sono ottenuti mediante digestione anaerobica del materiale organico, rispettivamente in condizioni idrolitiche/acidogeniche e metanogeniche. La digestione anaerobica di surplus dell'agro-industria per la produzione di metano è già tecnologia consolidata e largamente impiegata nel contesto nazionale e continentale.

Bioraffinerie di rifiuti organici: il case study delle acque di vegetazione olearie

Le Acque di Vegetazione Olearie (AVO) sono il residuo derivante dalla produzione dell'olio di oliva. Ogni anno, nella breve stagione della molitura delle olive, vengono prodotte nel bacino Mediterraneo decine di milioni di tonnellate di tali acque. I processi di smaltimento condotti nei diversi paesi interessati possono differire ma, in genere, per questo reflu gli approcci di smaltimento sono sostanzialmente lo spandimento controllato su terreno ed il contenimento in vasche per favorire la degradazione naturale della materia organica. Infatti, oltre alla ristretta localizzazione geografica e frazione temporale che interessa la produzione delle AVO, uno dei problemi principali legati alla loro gestione risiede nel loro elevato contenuto organico, nella spiccata acidità e nella presenza rilevante di sostanze polifenoliche, sostanze naturali dall'elevata attività antimicrobica. A causa di tali caratteristiche, un rilascio massivo di AVO in ambiente può comportare la modifica o la distruzione della flora batterica dei terreni sui quali sono rilasciate o l'inquinamento delle falde acquifere, con gravi conseguenze per l'ambiente o per i sistemi di depurazione delle acque civili.

Se da un lato la grande varietà e quantità di composti presenti nelle AVO ne limita seriamente lo smaltimento, dall'altra fa sì che un tale residuo

possa essere considerato come fonte rinnovabile di molecole di interesse commerciale. Ad esempio, le sostanze polifenoliche in esse contenute sono note per le loro capacità antiossidanti ed antiradicaliche. Se recuperate e dosate opportunamente, queste sostanze possono essere nuovamente impiegate in svariati campi commerciali, quali la farmaceutica, la cosmetica, la nutrizione ed il *packaging* [5]. Le AVO sono inoltre ricche di carboidrati, proteine, lipidi, i quali possono essere convertiti tramite processi dedicati in nuove molecole per la produzione di energia, calore, composti chimici, materiali. In tal senso, in accordo col concetto di bioraffineria, è possibile prevedere una serie di approcci sequenziali di natura biotecnologica, ecocompatibili ed ecosostenibili, volti a valorizzare selettivamente diverse famiglie di composti presenti nelle AVO. In generale, una volta definite le principali caratteristiche chimico-fisiche del refluo che si intende valorizzare, il primo processo applicabile, e che ogni bioraffineria dovrebbe prendere in considerazione laddove possibile, è il recupero di molecole di interesse che vi sono naturalmente presenti. Nel caso delle AVO, il processo di recupero dovrebbe riguardare molecole ad alto valore aggiunto quali i polifenoli sopra menzionati. A tal fine, è stata sviluppata una procedura di estrazione liquido-solido (*solid phase extraction*, SPE), utilizzando una resina amberlitica disponibile in commercio (XAD16). Questa resina ha una alta affinità per le sostanze fenoliche ed è in grado di adsorbire con grande efficienza (80% [7]) questa famiglia di composti. Questo processo prevede come materia prima rinnovabile le AVO e come prodotti finali una resina ricca in fenoli ed una AVO defenolizzata. La prima è trattata con etanolo, allo scopo di desorbire i fenoli dalla resina e recuperarli in un solvente ecocompatibile. Mentre la resina esausta può essere rigenerata e riutilizzata senza perdita di efficienza fino ad almeno 10 volte, la soluzione alcolica ricca in fenoli può essere usata tal quale o concentrata tramite tecniche di evaporazione che permettono il recupero del solvente (l'etanolo) puro attraverso distillazione forzata sotto vuoto, tecnica che non danneggia i fenoli in esso contenuti [7]. In questo modo, sia la fase adsorbente (la resina) che la fase desorbente (l'etanolo) possono essere rigenerati, determinando a parità di efficienza un abbattimento

del costo del procedimento durante diversi cicli. In un altro processo, è stato tentato il recupero di singole molecole target, applicando dei polimeri a memoria di forma in grado di rimuovere tali molecole target da una miscela di composti strutturalmente simili (come ad esempio i polifenoli contenuti nelle AVO o nella stessa soluzione alcolica prodotto del processo di SPE), ad alcuni dei quali è possibile associare un valore di mercato assai maggiore). Ad esempio, l'acido gallico è stato recuperato da acque di vegetazione olearie, mostrando una grande specificità sia rispetto ad un analogo strutturale (l'acido pirogallico), sia rispetto a polimeri non sottoposti ad *imprinting*, determinando una efficienza di recupero finale fra l'85 ed il 97% [8]. Se il recupero di sostanze fenoliche pure (come nel caso dell'acido gallico) può avere un immediato interesse in campo medico-farmaceutico in applicazioni molto specifiche, una miscela di sostanze polifenoliche può essere usata nella cosmetica, nella farmaceutica, nella nutraceutica, nella cosmeceutica, nella nutrizione, nella produzione di *functional foods*, nel *packaging*, in campo biomedico ed in tutte quelle applicazioni complesse dove una azione antibatterica o antiossidante ad ampio spettro è comunque preferibile.

Sebbene la rimozione dei fenoli dalle AVO ne faciliti la degradazione microbica, la quantità e varietà dei composti organici in esse presenti dopo questo trattamento è ancora molto alta, e richiede una sua ulteriore attenta gestione prima di poter essere inviata ad un convenzionale trattamento di acque a fanghi attivi. Ad ogni modo, è bene ricordare come quest'ultimo non sia un obiettivo della bioraffineria, in quanto la rimozione o trasformazione delle molecole presenti all'interno del residuo deve avvenire esclusivamente o massimamente durante i processi scelti per la loro valorizzazione. Dunque, nella visione di un'ottima bioraffineria, la riduzione del carico organico senza che la materia organica sia stata sfruttata in processi di valorizzazione non è vista tanto come un vantaggio ai fini della depurazione, quanto come una perdita di efficienza del processo nel suo complesso. La definizione di questo parametro è molto importante ad esempio nell'ambito della digestione anaerobica a cui le AVO defenolizzate possono essere inviate. In questo processo, consorzi misti di microorganismi anaerobi o anaerobi facoltativi

utilizzano la materia organica presente nel residuo per la crescita e/o la produzione di metaboliti secondari. Per quanto riguarda le AVO, la loro ricchezza in carboidrati e zuccheri fermentabili consente il loro impiego come fonte di bioidrogeno in processi di fermentazione al buio. Questi processi vengono condotti in reattori dedicati in modalità di operazione continua, dove un volume di refluo fresco viene alimentato al reattore in concomitanza con un prelievo di refluo trattato di uguale entità in uscita dal reattore. Nei processi operati in continuo, il tempo di contatto della materia organica con la popolazione microbica ne influenza profondamente la composizione. In particolare, quando questi processi sono condotti con tempi di ritenzione idraulica (HRT) dell'ordine del giorno, è favorito lo sviluppo di quelle comunità batteriche responsabili della prima fase della digestione anaerobica, ovvero l'idrolisi, i cui prodotti principali sono i monomeri dei polimeri biologici, ma anche idrogeno ed alcuni acidi grassi volatili (*volatile fatty acids*, VFA). Operando un reattore con tempi di ritenzioni brevi, dunque, il processo condurrà stabilmente solo questa attività metabolica, portando dunque alla produzione di idrogeno costantemente. La produttività in idrogeno osservata in processi a carico di AVO è stata dell'ordine delle decine di mL/L/h. Tali valori, seppure ancora lontani dal permettere un uso

commerciale di questo biogas, sono dello stesso ordine di grandezza di altri processi condotti su mezzi sintetici o con colture pure. A questo riguardo, l'utilizzo di una AVO appena prodotta in frantoio potrebbe aumentare la produttività in bioidrogeno, data la facile degradazione a cui vanno incontro gli zuccheri presenti nel refluo. Allungando il parametro HRT fino a 5-7 giorni, il processo da idrolitico diventa acidogenico. In quest'ultimo, la materia organica viene convertita massivamente a VFA a catena sempre più corta. Tempi di permanenza del refluo ancora più lunghi portano all'acetogenesi (accumulo del solo acido acetico) ed infine alla metanogenesi (produzione di metano), con la quale si compie l'ultima fase della catena trofica e la mineralizzazione della materia organica. Nei processi dedicati alla produzione di VFA, l'insorgere di comunità metanigene all'interno del reattore determina una perdita di efficienza, in quanto al posto della bioconversione della materia organica del residuo da carboidrati, lipidi e proteine in VFA si ottiene il consumo di questi ultimi attraverso la produzione di metano. Parametri operativi quali il pH, la temperatura ed il carico organico sono spesso utilizzati per cercare di limitare l'insorgenza di tali comunità. Quando operata in reattori a letto impaccato, l'acidificazione delle AVO avviene con grande efficienza, e nell'effluente i VFA arrivano a costituire quasi l'80% della materia organica [9].

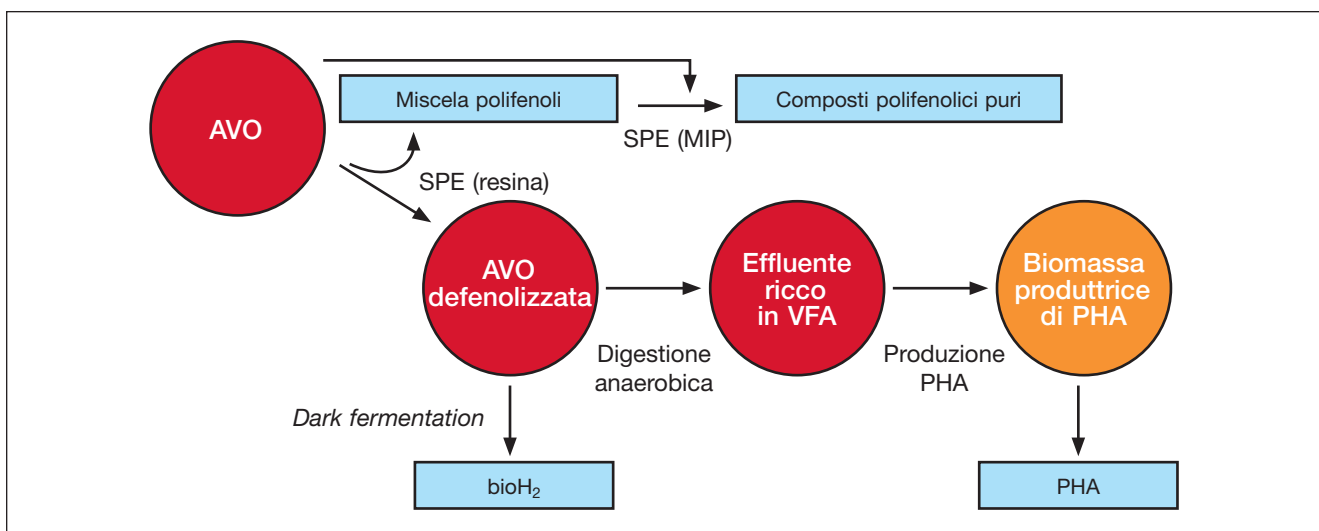


FIGURA 1 Possibile schema di bioraffineria delle acque di vegetazione olearie
Fonte: DICAM

Uno dei campi applicativi di questi composti chimici di origine biologica (gli acidi grassi volatili) è la produzione di biopolimeri quali i poliidrossialcanoati (PHA). Questi metaboliti secondari sono prodotti ed accumulati a livello intracellulare da alcuni batteri aerobi (come *Cupriavidus necator*) con grande efficienza, in condizioni di stress quali carenze in azoto organico e/o ossigeno, arrivando a costituire il 90% in peso della biomassa cellulare. Una delle fonti di carbonio preferite per la produzione di tali polimeri sono i VFA; in particolare, la diversa natura di questi ultimi può influenzare la produzione biologica del polimero, favorendo la sintesi di co-polimeri dalle proprietà meccaniche e chimico-fisiche diverse. In alcuni casi, i PHA presentano delle caratteristiche meccaniche simili a quelle di alcune plastiche ottenute da risorse fossili [10], candidandosi dunque come una promettente loro alternativa. La produzione di PHA può avvenire sia con colture pure (le quali hanno elevate rese in accumulo, ma anche costi di produzione legati alla sterilità del processo e all'utilizzo di mezzi sintetici), che con consorzi misti (meno efficienti nell'accumulo in PHA, ma anche molti più economici a livello operativo e potenzialmente in grado di usare una vastissima gamma di residui organici). Attualmente, l'alimentazione di AVO defenolizzate e fermentate va a sostegno dei processi condotti con consorzi aerobi misti [11]; ad ogni modo, recenti approcci sperimentali stanno cercando di collegare gli scarti organici non sterili con l'utilizzo di colture pure, allo scopo di stabilire

la fattibilità fisiologica del processo (dal punto di vista di accumulo in PHA) ed operativa (mantenimento della coltura batterica principale). L'eventuale successo di questo approccio potrebbe ulteriormente favorire lo sviluppo di queste biotecnologie determinando un abbassamento dei costi produttivi. Uno schema generale delle potenziali bioraffinerie applicabili alle AVO e descritte sopra è riportato nella Figura 1.

Conclusioni

In conclusione, le bioraffinerie a partire da residui dell'agroindustria rappresentano una opportunità nell'ottica di minimizzare la produzione di rifiuti e valorizzare le frazioni a cui altrimenti è associato un costo di smaltimento spesso elevato. I prodotti che possono essere ottenuti processando dette matrici interessano diversi settori industriali e sono sostenibili sia dal punto di vista economico che ecologico. L'introduzione di tali approcci nelle filiere produttive attuali offrirebbe nuove grandi potenzialità di mercato. Ad esempio, in virtù delle loro caratteristiche chimiche, le acque di vegetazione olearia si prestano ad essere valorizzate mediante applicazione di processi integrati dedicati al recupero di antiossidanti naturali ad alto valore aggiunto quali i polifenoli, ottenuti sia come miscele sia come composti puri, alla produzione di *biofuels* quali bioidrogeno e biometano, ed alla produzione di biomateriali quali i poliidrossialcanoati.

- Bibliografia**
- [1] Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. Official Journal of the European Union, L 312, 22.11.2008, p. 3-30.
 - [2] Environmental Data Centre on Waste of the European Commission. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/waste/introduction>
 - [3] AWARENET. *Handbook for the Prevention and Minimisation of Waste and Valorisation of by-products in European Agro-Food Industries* (2004).
 - [4] F. Federici, F. Fava, N. Kalogerakis, D. Mantzavinos (2009). *Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84:895-900.
 - [5] F. Ferri, L. Bertin, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava (2011). *Recovery of low molecular weight phenols through solid-phase extraction*. Chem Eng. J. 166:994-1001.
 - [6] V. Menon, M. Rao (2012). *Trends in bioconversion of lignocellulos: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept*. Progress in Energy and Combustion Science 38(4):522-550.
 - [7] A. Scoma, C. Pintucci, L. Bertin, P. Carozzi, F. Fava (2012). *Increasing the large scale feasibility of a solid phase extraction procedure for the recovery of natural antioxidants from olive mill wastewaters*. Chem. Eng. J. 198-199:103-109.
 - [8] F. Puoci, A. Scoma, G. Cirillo, L. Bertin, F. Fava, N. Picci (2012). *Selective extraction and purification of gallic acid from actual site olive mill wastewaters by means of molecularly imprinted microparticles*. Chem. Eng. J. 198-199:529-535.
 - [9] A. Scoma, L. Bertin, G. Zanolli, S. Fraraccio, F. Fava (2011). *A physicochemical-biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater*. Biores. Technol. 102:10273-10279.
 - [10] M. Beccari, L. Bertin, D. Dionisi, F. Fava, S. Lampis, M. Majone, F. Valentino, G. Vallini, M. Villano. (2009). *Exploiting olive mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84 (17):901-908.
 - [11] F. Valentino, M. Villano, L. Bertin, M. Beccari, M. Majone. (2011). *Olive Oil Wastewater as a Renewable Resource for Production of Polyhydroxyalkanoates*. In: V. Mittal. *Renewable Polymers: Synthesis, Processing, and Technology*. (pp. 175-219). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9780470938775.

Biotecnologie per l'ambiente

Le biotecnologie ambientali hanno un ruolo particolarmente decisivo da svolgere nella realizzazione di uno sviluppo sostenibile duraturo. Alcune esperienze realizzate in ENEA nell'ambito di progetti nazionali ed europei sono rivolte allo sviluppo di approcci innovativi per il monitoraggio a lungo termine dell'impatto ambientale e per il miglioramento delle tecnologie di biorisanamento esistenti. Un'estesa attività di bioprospezione, supportata da tecniche di metagenomica ambientale, è mirata alla cattura e al potenziamento delle capacità di biorisanamento naturalmente presenti nei sistemi ambientali, attraverso la scoperta di nuovi microrganismi, geni funzionali e vie metaboliche, ancora inesplorati

■ Flavia Tasso, Chiara Alisi, Alessia Fiore, Paola Marconi, Salvatore Chiavarini, Carla Ubaldi, Valentina Pinto, Anna Rosa Sprocati

Introduzione

In accordo con le direttive della ricerca Europea in Biotecnologie e in Ambiente, le biotecnologie ambientali includono aspetti di ricerca sia fondamentale, che contribuiscono alla conoscenza dei processi ecologici ed evolutivi, sia orientata verso uno sviluppo tecnologico con esito duplice, economico e ambientale. Di conseguenza, la ricerca biotecnologica ha un ruolo chiave da svolgere nel settore ambientale, ma è importante riconoscere che essa interessa, in misura non trascurabile, anche settori collegati, quali biodiversità, biosicurezza e biotecnologie vegetali. Il dibattito sul rilascio di organismi geneticamente modificati ha catturato per lungo tempo la maggior attenzione, generando una percezione problematica delle biotecnologie, viste come potenziale

minaccia per la biodiversità e oscurando gli approcci e le applicazioni biotecnologiche indiscutibilmente compatibili con l'ambiente.

Similmente, anche il mondo microbico - agente chiave delle biotecnologie ambientali - può essere percepito come una potenziale minaccia, data la cattiva fama generale di cui esso gode, conferitagli dall'interesse, per lungo tempo preminente, per i soli microrganismi patogeni di esseri umani, animali e piante. I microrganismi sono, invece, per la maggior parte innocui, anzi utili, anzi indispensabili. In ogni struttura del corpo umano sono presenti batteri indispensabili e in ogni grammo di suolo, ad esempio, troviamo milioni di microrganismi, senza i quali un suolo non potrebbe essere definito tale, per le funzioni che essi svolgono conferendo vitalità: fissazione dell'azoto, mobilizzazione del fosforo, produzione di molecole di utilità per le piante, come fitormoni, siderofori, auxine, vitamine, per citarne alcune. Il ruolo dei microrganismi è principalmente di rendere possibile il riciclo degli elementi in natura, su scala planetaria, restituendoli ai cicli biogeochimici, attraverso i processi di biodegradazione e, in tal senso, possiamo dire che i microrganismi, soprattutto quelli capaci di degradare e detossificare inquinanti tossici, sono certamente cittadini "più verdi" degli esseri umani, che hanno creato situazioni ambientali critiche e caotiche [1].

■ Chiara Alisi, Salvatore Chiavarini, Paola Marconi, Valentina Pinto, Anna Rosa Sprocati, Flavia Tasso, Carla Ubaldi

ENEA - Unità Tecnica Caratterizzazione, Prevenzione e Risanamento Ambientale

■ Alessia Fiore

ENEA - Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale

Tra Europa e Stati Uniti i siti contaminati documentati si aggirano attorno al milione, tra rifiuti pericolosi e contaminanti industriali, con i costi ambientali, sociali ed economici che ne conseguono. Per l'Europa, il problema è oltretutto intensificato per l'elevata densità di popolazione. Tali considerazioni portano a ritenere che le priorità urgenti per garantire uno sviluppo sostenibile durevole debbano includere l'adozione diffusa di tecnologie produttive pulite (processi e prodotti puliti) e di tecnologie per il ripristino degli ecosistemi (biorisanamento ambientale).

In questo quadro di riferimento le biotecnologie hanno un ruolo particolarmente decisivo da svolgere. Raccogliendo alcuni spunti di riflessione [2], grazie alla maturazione delle biotecnologie, è ora possibile prospettare uno scenario più ottimista di quello che Barry Commoner [3] aveva ritratto nel suo libro *"The closing circle"* sull'incompatibilità della moderna società industriale con la salute ecologica, poiché tra biotecnologia e biodiversità si è stabilito un circuito di flussi sinergici di materiali, servizi e idee. Le biotecnologie ambientali sono un'area della scienza in rapido cambiamento. Al momento, è necessario identificare e verificare le tecnologie-chiave e gli approcci che possano fornire una soluzione alle principali sfide del presente, rappresentate dal cambiamento climatico, dalla diminuzione delle risorse fossili e dalla necessità di migliorare la sostenibilità in agricoltura, nelle attività industriali e domestiche. Per definire lo stato dell'arte e capire come progredire, è utile riferirsi al programma del gruppo di lavoro congiunto US-EU sulle biotecnologie, attivo dal 1990, nato per coordinare gli sforzi transatlantici per promuovere la ricerca sulle biotecnologie e le sue applicazioni orientate al bene della società [4].

Per il periodo 2011-2015 l'obiettivo è arrivare alla comprensione dei processi microbici nei sistemi ambientali d'interesse, promuovendo e sviluppando approcci biotecnologici, che facciano leva sulle ultime tecniche *"omics"* e le integrino con processi informatici. In questo quadro le principali problematiche di biotecnologie ambientali da affrontare e discutere sono le seguenti: a) sviluppo di approcci che portino un avanzamento nella comprensione della funzione dell'ecosistema microbico in risposta al cambiamento del clima; b) nuovi approcci e nuove idee per processi

di biorisanamento e per il monitoraggio a lungo termine dell'impatto ambientale causato dall'inquinamento; c) esplorazione di nuovi approcci informatici per modellare e predire i processi microbici in condizioni ambientali in cambiamento; d) nuovi metodi per valutare la distribuzione spaziale e l'impatto dei processi microbici attraverso scale di osservazione maggiori; e) metagenomica-bioesplorazione ambientale per applicazioni industriali e ambientali (ad esempio ricerca di enzimi estremofili e biocatalizzatori, di nuove specie microbiche e di nuove funzioni metaboliche); f) biotecnologie ambientali applicate al trattamento delle acque reflue, per ridurre la contaminazione delle acque superficiali da parte di inquinanti emergenti e per il recupero di nutrienti e acqua.

Nel presente articolo sono descritte, nelle loro linee generali, alcune attività svolte in ENEA riguardanti le problematiche sopra indicate; per i dettagli scientifici si rimanda alle specifiche pubblicazioni in elenco.

Strategie di risanamento: catturare e mettere a frutto il potenziale di biorisanamento intrinseco dei sistemi ambientali

I processi microbiologici responsabili della trasformazione degli inquinanti (biodegradazione, mobilizzazione, immobilizzazione, detossificazione) rappresentano il motore che guida i fenomeni di attenuazione naturale della contaminazione, cioè la capacità di auto-depurazione degli ecosistemi. Tuttavia l'accumulo di inquinanti altamente tossici in ambiente rende evidente che il flusso dei contaminanti di origine antropica è troppo elevato perché i microrganismi, in condizioni naturali, riescano da soli a smaltirlo. Si rende quindi necessario un aiuto per sfruttare al meglio le loro potenzialità e tradurle in efficaci tecnologie di biorisanamento.

Le vie possibili per attivare e migliorare queste potenzialità naturali comportano un controllo di tipo biogeochimico, che di solito consiste nell'indurre cambiamenti nei parametri fisico-chimici dei sistemi ambientali da trattare (pH, Temperatura, donatori o accettori di elettroni ecc.) o nell'apportare un "aggiustamento di nicchia", mediante adeguati inoculi, che favoriscano la trasformazione degli inquinanti presenti. Un aggiustamento di nicchia

può essere realizzato attraverso diversi approcci e le tecniche principali sono la **biostimolazione** (aggiungere nutrienti per favorire la crescita dei batteri autoctoni) e la **bioaugmentation** (aggiungere batteri competenti, autoctoni o alloctoni, per aumentare le capacità cataboliche rilevanti per il processo di biorisanamento). Entrambe queste tecniche hanno originato controversie all'interno della comunità scientifica, avendo ognuna sostenitori o detrattori. In realtà un'analisi comparativa delle esperienze condotte in diversi studi indica che non esiste una via univoca, poiché il biorisanamento è una tecnologia sito-specifica e come tale richiede studi dettagliati di caratterizzazione del sito e di fattibilità, prima di decidere sul metodo di biorisanamento più adeguato al caso.

I nostri studi ci hanno portato a sviluppare un approccio al biorisanamento, tramite *bioaugmentation*, che ci ha permesso di ottenere risultati positivi riguardo alcune problematiche che costituiscono seri ostacoli all'implementazione del biorisanamento, quali la co-contaminazione (concomitanza di metalli pesanti e inquinanti organici) e la bonifica di siti minerari. La logica alla base della *bioaugmentation* è semplice, tuttavia la tecnica pone diversi problemi di applicazione e ha registrato nel tempo diversi fallimenti [5, 6]. Disparate strategie di *bioaugmentation* sono state proposte da vari autori, a volte anche concettualmente contrastanti. Lo sfruttamento di "super-specie" [7], l'architettura di biofilm microbici [8], lo sfruttamento della chemiotassi batterica [9], l'inoculo di ceppi contenenti elementi genetici mobili [10], la *bioaugmentation* della rizosfera [11] sono alcune delle strategie proposte. Un'analisi critica delle sperimentazioni riportate in letteratura evidenzia la generale mancanza di uno scenario ecologico, sia nell'approccio, sia nell'interpretazione dei risultati, che invece è decisivo per un buon esito dell'applicazione. Il nostro lavoro di ricerca è stato quindi orientato verso un'attenta considerazione degli aspetti ecologici sia in fase di scelta dell'inoculo che di interpretazione degli esiti della sperimentazione. La *bioaugmentation* è, infatti, influenzata da molteplici fattori, quali le caratteristiche fisico-chimiche dei contaminanti, che possono ridurre l'attività microbica; alcuni elementi che limitano il trasferimento di massa (ad esempio la presenza di argilla o il contenuto

di sostanza organica del suolo); fattori di ecologia microbica (flusso energetico, attività microbica spontanea, predatori, competitori, co-substrati, patrimonio genetico dei microrganismi rilevanti, stabilità e attività enzimatica) e metodologia scelta per l'inoculo (selezione dei ceppi, concentrazione e metodi di inoculo, eterogeneità dell'inoculo) [12]. Nel suolo, uno dei principali problemi associati alla *bioaugmentation* è la sopravvivenza dei microrganismi inoculati o la microbiostasi, cioè l'arresto della crescita e della riproduzione microbica, a causa degli stress abiotici e biotici richiamati in precedenza. La strategia di inoculo è un elemento chiave per poter catturare e mettere a frutto il potenziale microbico spontaneo e diventa quindi una sfida che la ricerca si pone per rendere il biorisanamento una tecnologia matura.

Tra le diverse strategie possibili di *bioaugmentation* la nostra ricerca è focalizzata sull'uso di consorzi microbici, che mettano in relazione funzionale la struttura della comunità microbica *in situ* con gli inquinanti presenti. Gli inoculi introdotti, devono essere metabolicamente competenti e in grado di sopravvivere e di catturare il flusso energetico per guidare attivamente l'intera comunità microbica verso i processi biochimici necessari per la bonifica. La procedura da noi individuata per ottenere un inoculo con simili caratteristiche si basa su alcuni criteri razionali: *i*) le popolazioni microbiche, adattate a situazioni di contaminazione cronica, sono il risultato di una pressione selettiva esercitata dai contaminanti stessi e si possono pertanto considerare popolazioni stabili; *ii*) la legge di Pareto dice che, all'interno di una comunità, una minima parte degli organismi consuma la gran parte del flusso di energia, per cui serve individuare questa piccola porzione e incrementarla per dirigere il flusso energetico nella direzione desiderata, nello specifico verso una completa rimozione o detossificazione dei contaminanti presenti nel sistema ambientale bersaglio.

Di conseguenza la nostra ricerca è stata indirizzata sulla identificazione delle popolazioni stabili e metabolicamente competenti presenti nelle comunità microbiche autoctone di matrici contaminate, prevalentemente suoli, ma anche sedimenti, acque superficiali e acque reflue. L'approccio seguito comporta

che, una volta definito il sistema ambientale da trattare, sia eseguita una caratterizzazione bio-geo-chimica, in particolare vengono definiti: la natura della matrice, la natura dei contaminanti, la loro concentrazione e biodisponibilità (disponibilità per i sistemi biologici). La comunità microbica nativa viene caratterizzata attraverso un approccio polifasico, sia a livello metabolico che strutturale. L'analisi del profilo metabolico mediante il sistema Biolog-ECOPlates™ fornisce il *fingerprint* metabolico della comunità (spettro dei substrati che è in grado di utilizzare) e fornisce quindi una misura della diversità funzionale della comunità. L'impiego combinato di tecniche colturali (isolamento della frazione coltivabile, che, come noto, rappresenta una parte molto esigua del totale) e molecolari (cfr. il Focus **Metagenomica ambientale**) produce informazioni complete sulla comunità microbica, sia a livello strutturale sia ecologico e genetico: composizione in specie, indici di diversità, di ricchezza, di *evenness*, di organizzazione funzionale, patrimonio metabolico attivo e inducibile, potenziale genetico. L'insieme di queste informazioni permette di valutare il potenziale di biorisanamento intrinseco alle matrici stesse da trattare. Nel caso in cui il sistema ambientale sia invece privo di microrganismi competenti, quindi si è in assenza di un metabolismo attivo o inducibile verso i contaminanti presenti, è necessario inoculare microrganismi alloctoni, che devono essere scelti sulla base della conoscenza della composizione della comunità nativa, al fine di apportare ceppi compatibili che arricchiscano il patrimonio metabolico della comunità, riducendo al minimo l'impatto sia per gli inoculati che per la comunità nativa [13]. La scelta di procedere con consorzi di batteri, anziché con specie individuali, deriva dall'esigenza di simulare il più possibile i sistemi naturali, dove i microrganismi agiscono in base alle interazioni intra- e inter-specifiche che instaurano, creando complesse reti metaboliche, attraverso le quali arrivano, come intera comunità, alla detossificazione del sistema o alla biodegradazione completa degli inquinanti. Per procedere con la *bioaugmentation* i ceppi così selezionati vengono cresciuti in laboratorio fino alla concentrazione ritenuta necessaria per effettuare un inoculo di quantità adeguate e successivamente vengono inoculati nella matrice da trattare. Seguono le

analisi chimiche ed ecotossicologiche per monitorare il processo e per verificare che non vengano prodotti metaboliti intermedi più tossici dei composti parentali. Visti da questa prospettiva, i siti contaminati diventano fonte di biodiversità microbica specializzata, che rappresenta una particolare storia evolutiva di adattamento a composti non co-evoluti ma introdotti solo recentemente, in epoca industriale, *ex novo* (xenobiotici) o in elevate quantità (metalli, petrolio). Partendo da diverse matrici contaminate abbiamo isolato un elevato numero di ceppi batterici di interesse biotecnologico, *wild type* e non patogeni, che costituiscono la collezione "ENEALilith". In base alle loro caratteristiche, abbiamo quindi sviluppato alcune formule microbiche adatte a specifici problemi, che verranno brevemente descritti nel seguito: trattamento di acque di conseria, biorisanamento di suoli co-contaminati da metalli e idrocarburi, sviluppo di "tool-boxes" per il biorisanamento di siti minerari. In accordo con la convenzione sulla biodiversità, tale biodiversità, al pari dei soffioni di acque profonde, dei deserti e di altri ambienti estremi, costituisce un'essenziale risorsa per il nostro futuro e la sua conservazione *ex situ* è di grande importanza.

Trattamento di reflui conciarci

L'industria conciaria provoca un elevato impatto ambientale a causa dei notevoli quantitativi di effluenti liquidi, solidi e aeriformi prodotti, caratterizzati da elevato contenuto di cromo nei reflui e dei fanghi, elevato livello di COD, presenza di tensioattivi e considerevole salinità negli effluenti. L'ingente consumo di acqua di queste industrie, che utilizzano sia pozzi artesiani sia l'acquedotto pubblico, e la difficoltà di depurare gli effluenti industriali costituiscono i problemi fondamentali dei poli industriali di questo tipo. Le attività svolte (progetto TIDE n.9260, MIUR D.M 593/2000, 2003-2006) riguardano una sperimentazione su impianti pilota, mirata a definire una tecnologia in grado di recuperare la notevole quantità d'acqua utilizzata in questo tipo di lavorazione. Dai fanghi prelevati nelle vasche di decantazione della stessa conseria, è stata isolata e caratterizzata la flora microbica presente, per costituire una formula di ceppi, selezionati per resistenza al Cromo. La formula microbica è stata quindi inoculata a concentrazioni opportune in due impianti pilota che operano con processi diversi:

un impianto a fanghi attivi convenzionale (BIO), l'altro con aggiunta di carbone granulare (BAC). Entrambi gli impianti hanno avuto una *buona performance*, oltre che nella rimozione del Cromo (da 60 a 10-15 mg L⁻¹ in max 70 ore), anche nella completa degradazione degli inquinanti organici presenti (4-cloro-3-metilfenolo, isodecil-polietossilato e paraffine) raggiunta in 40 ore circa e permettendo quindi il riutilizzo dell'acqua effluente. Nell'impianto BAC il carbone attivo ha favorito l'organizzazione della comunità microbica in biofilm, con una più marcata capacità di biodegradazione degli inquinanti e una cinetica di abbattimento del Cromo più rapida (a 15 mg L⁻¹ in 20 ore).

Biorisanamento di suoli co-contaminati da metalli e idrocarburi

La co-contaminazione rappresenta uno dei colli di bottiglia metabolici del biorisanamento, poiché la tossicità dei metalli inibisce le capacità degradative dei microrganismi, a vari livelli. Partendo da un'esplorazione microbiologica di alcune aree contaminate del sito siderurgico ex-ILVA di Bagnoli, che presentavano differenti tipologie e concentrazioni di inquinanti, sono state isolate tre distinte comunità microbiche native, caratterizzate per la composizione in specie e per il profilo metabolico, per la capacità di resistenza ai metalli pesanti e per la capacità di degradare contaminanti organici, principalmente idrocarburi. È stata inoltre studiata la relazione tra i contaminanti presenti, il livello di ecotossicità rilevato e le caratteristiche metaboliche delle popolazioni microbiche native. Il lavoro, condotto nell'ambito del Progetto TIDe, ha permesso di isolare delle popolazioni stabili, adattate alle condizioni di contaminazione cronica e di selezionare, al loro interno, un centinaio di ceppi batterici con capacità di pluri-resistenza ai metalli pesanti e in grado di mantenere attivo il metabolismo biodegradativo verso idrocarburi e derivati, anche alla presenza di metalli pesanti. Da queste popolazioni, evolute per le peculiari condizioni ambientali, rappresentate dalla co-presenza di metalli e inquinanti organici, sono state sviluppate alcune formule microbiche per sperimentazioni di biorisanamento condotte su diverse scale: biometri e microcosmi. Nella sperimentazione condotta in biometri [14] la formula microbica comprendeva ceppi indigeni di

un'area di Bagnoli, appartenenti ai generi *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Delftia*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* ed è stata impiegata come agente di bioaugmentation per studiare la fattibilità di biorisanamento di un suolo co-contaminato da gasolio (1% w/v) e metalli pesanti. In 42 giorni di incubazione a 28 °C gli idrocarburi lineari n-C12-20 sono stati completamente degradati, mentre gli isoprenoidi sono stati ridotti del 60%. I test ecotossicologici seguiti hanno evidenziato una netta riduzione della tossicità, legata al tempo di trattamento. Mediante la tecnica molecolare t-RFLP (*terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) è stata studiata la sopravvivenza della formula microbica impiegata, rilevando sia frammenti corrispondenti a ceppi inoculati di *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Exiguobacterium* e *Delftia* che frammenti non ascrivibili alle specie inoculate, suggerendo che si sia instaurato un equilibrio funzionale tra i microrganismi introdotti e quelli nativi. La ricerca è proseguita con uno *scale up* del sistema sperimentale, realizzato mediante l'impiego di microcosmi terrestri (ASTM 2004 Guidelines E-1197), sistemi indisturbati adatti a riprodurre condizioni sperimentali il più possibile vicini a quelli in campo, in quanto preservano intatta la complessità ecologica del suolo, su scala microbiologica e biochimica. Le informazioni ottenute nei microcosmi sono ritenute

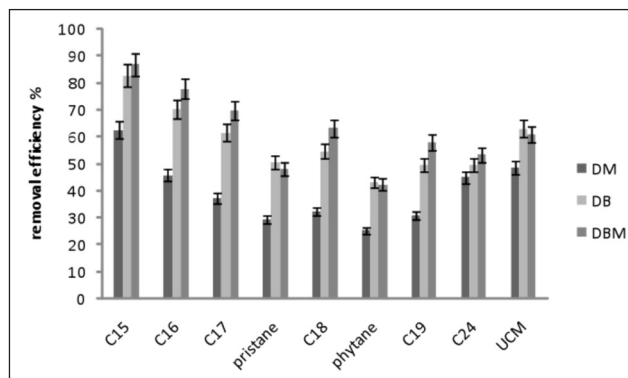


FIGURA 1 Efficienza di rimozione degli idrocarburi del gasolio dal suolo nelle diverse condizioni sperimentali, dopo 105 giorni, misurata mediante GC-massa: DM, diesel e metalli; DB, diesel e formula microbica; DBM diesel, metalli e formula microbica
Fonte: Sprocati et al. [13]

estrapolabili direttamente al campo, a differenza di quelle ottenute in sistemi sperimentali troppo semplificati perché possano essere ritenuti significativi dell'ecosistema target. La formula microbica usata in precedenza è stata potenziata, con l'aggiunta di ceppi produttori di biosurfattanti, sempre isolati dal sito di Bagnoli, allo scopo di aumentare la biodisponibilità degli idrocarburi. Lo studio ha dimostrato che la formula microbica introdotta è in grado di promuovere una degradazione degli idrocarburi prossima al 75% nei primi 15 cm di suolo argilloso, in presenza di metalli pesanti (Zinco 500 mg kg⁻¹ di suolo e Piombo 1000 mg kg⁻¹ di suolo), come mostrato in figura 1. Lo studio della mobilità dei metalli pesanti ha dimostrato

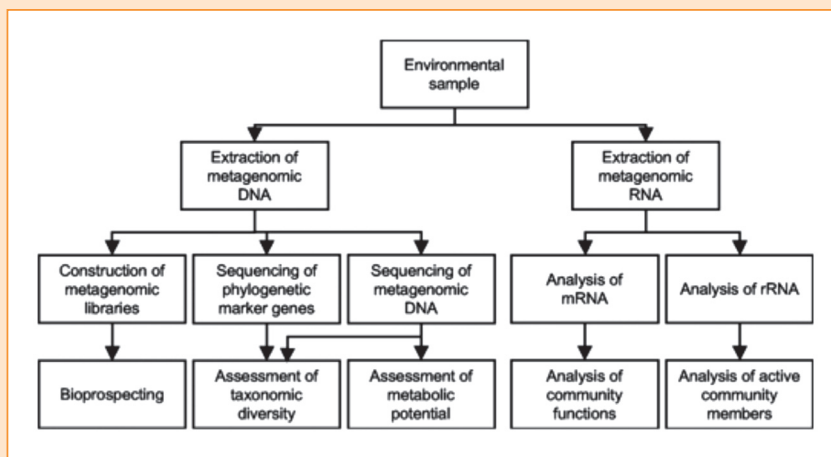
che, al termine dell'esperimento, essi sono presenti in forma quasi completamente biodisponibile. L'analisi del profilo molecolare dell'rDNA 16S delle comunità microbiche, eseguita attraverso la tecnica della DGGE e la successiva applicazione degli indici ecologici [15], ha mostrato che in tutte le condizioni sperimentali testate viene preservata un'alta ricchezza in specie (Indici Rr e 1-D) e non si osservano significativi cambiamenti all'interno della struttura delle comunità, mentre si osserva una specializzazione dove avviene la biodegradazione. Il confronto dei dati ottenuti dalle analisi metaboliche (sistema Biolog) e molecolari (DGGE) mette in luce il ruolo positivo svolto dalla formula sia nell'attivare il processo di biodegradazione

Metagenomica ambientale

Si stima che le cellule microbiche presenti sul pianeta siano nell'ordine di 10³⁰ [16] e il numero di specie nell'ordine di 10⁶-10⁹. È noto che oltre il 99,8% dei microrganismi presenti nei diversi ambienti naturali è incultivabile con le metodiche in uso e quindi inaccessibile per eventuali approcci biotecnologici. L'avvento delle tecniche "metagenomiche" - indipendenti dalla coltivazione - ha permesso di rilevare l'esistenza di specie batteriche finora sconosciute, i cui genomi codificano per un serbatoio di prodotti e funzioni, in gran parte inutilizzato. La metagenomica diventa quindi un potente strumento d'indagine per l'esplorazione dell'ecologia di complesse comunità microbiche e del loro potenziale metabolico, in una grande varietà di ambienti, con una considerevole ricaduta sullo sviluppo delle biotecnologie ambientali e sui settori a esse collegati, in particolare la biodiversità. Gli approcci alle analisi metagenomiche sono essenzialmente due: l'analisi strutturale e l'analisi funzionale che, combinate, producono un enorme impatto sulla conoscenza dell'intera comunità microbica e sulle dinamiche di popolazione [17, 18], sulla scoperta di nuovi geni che esprimono tratti caratteristici, come ad esempio geni di resistenza ad antibiotici, a metalli pesanti [19] o attività enzimatiche specifiche del metabolismo primario o secondario [20] [cfr. diagramma di flusso, [21]]

In tal modo si può valutare il potenziale metabolico dell'intera comunità, anche miratamente ad applicazioni specifiche.

Uno dei lavori pionieri di metagenomica ambientale è stato eseguito analizzando il genoma di un drenaggio acido di miniera in California, uno degli ambienti più estremi al mondo [17]. In questo ambiente la comunità microbica forma un biofilm rosa che galleggia sulla superficie dell'acqua. L'acqua sottostante ha un valore di pH intorno a 1, un'elevata concentrazione di metalli pesanti (Fe, Zn) e assenza di forme di carbonio o azoto assimilabili, tranne la forma gassosa. Attraverso la ricostruzione di interi genomi microbici è stata determinata la struttura della comunità microbica ed è stato ricostruito un modello biogeochimico, individuando le vie metaboliche per il carbonio, per la fissazione dell'azoto e per la produzione di energia e ampliando le conoscenze sulle strategie di sopravvivenza in ambienti estremi. Si può quindi comprendere come la metagenomica, applicata ad ambienti estremi o suoli contaminati, trovi larga applicazione nell'individuazione di quei microrganismi o geni attivi nella degradazione di contaminanti ambientali [22]. Il nostro laboratorio, nell'ambito del progetto "Umbrella", ha applicato tecniche di metagenomica, accanto alle tecniche colturali, allo scopo di esplorare la biodiversità batterica in campioni



che nel guidare l'intera comunità microbica, indigena e inoculata, verso la biodegradazione dei contaminanti.

Biorisanamento di siti minerari

Nell'Unione Europea, la superficie di suoli influenzati da attività minerarie è stata stimata pari allo 0,6%, rispetto a una media mondiale dello 0,2%. La bonifica dei suoli contaminati da metalli pesanti che derivano da attività minerarie rappresenta, quindi, un obiettivo strategico per le politiche europee. Il progetto UMBRELLA (FP7, Grant No. 226870, 2009-2012), cui partecipa la nostra Unità, mira a sviluppare un approccio al biorisanamento, che permetta di stabilire misure migliorative, economicamente efficienti e sostenibili, per la bonifica

di siti contaminati da metalli pesanti, in diverse regioni geografiche e climatiche d'Europa, su larga scala. L'obiettivo generale del progetto è di utilizzare il potenziale offerto dai microrganismi per accelerare le attuali tecniche di fitorisanamento. L'obiettivo viene perseguito con un approccio di ricerca interdisciplinare nei settori della microbiologia, dell'assorbimento di metalli da parte di piante e della (idro)-geochimica, mirato allo studio dell'influenza microbica sui cicli biogeochimici dei metalli e dell'impatto del loro impiego nella protezione del suolo e delle acque. Il progetto si propone di fornire agli utilizzatori finali della tecnologia un insieme di strumenti (microrganismi e piante in associazione, approccio metodologico e

di suolo della ex miniera di Ingurtosu (Sardegna), contaminati da metalli pesanti (Zn e Pb). È stata eseguita un'analisi filogenetica sul rDNA 16S, costruendo due librerie clonali dal DNA totale presente. L'analisi delle sequenze derivate dalle due librerie (174 cloni per gli Archaea e 258 cloni per gli Eubatteri) ha evidenziando una ricchezza di biodiversità inaspettata in una matrice tanto ostile (scarti di miniera), priva di nutrienti, con scarsissima materia organica e con elevatissime concentrazioni di Pb e Zn in forma biodisponibile. In particolare la maggior parte dei cloni individuati per gli Eubatteri, non era stata rilevata neppure a livello di phylum mediante le tecniche colturali (Cianobatteri, Cloroflexi, Gemmatimonadates) (figura 3). Il lavoro procede per attingere in questo serbatoio metabolico inesplorato a funzioni target di interesse per le applicazioni di biorisanamento in corso sul sito (fitorisanamento assistito con batteri), in particolare funzioni di promozione di crescita delle piante e regolazione della mobilità dei metalli. Un obiettivo a più lungo termine è l'individuazione di microorganismi e funzioni metaboliche di interesse in tematiche bio-geo-chimiche aperte, come la completa comprensione del ruolo dei microorganismi nella formazione dei suoli, che rimane un problema ancora irrisolto in biologia.

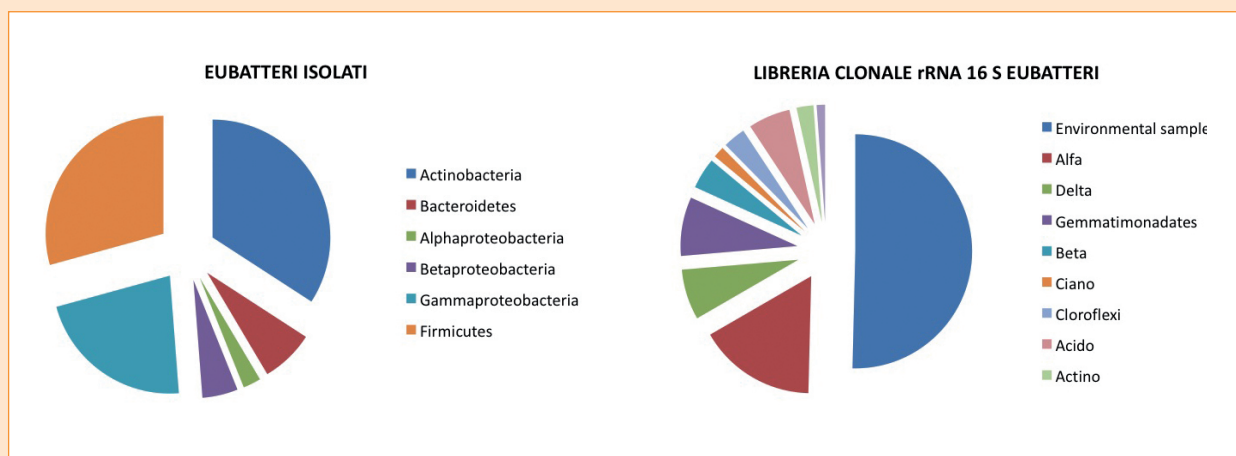


FIGURA 3 Biodiversità microbica (Eubatteri) presente in campioni di suolo della ex-miniera di Ingurtosu, rilevata mediante tecniche colturali classiche (A) e mediante approccio metagenomico (B) (rapporto scientifico progetto UMBRELLA (in attesa di pubblicazione))

Fonte: elaborazione degli autori

modelli previsionali) per azioni di bonifica *in situ*, a basso costo e a basso impatto ambientale. Al progetto partecipano Università, Istituzioni scientifiche, SMEs e Agenzie governative per fornire ai governi linee guida uniformi per la protezione del suolo e dell'acqua, in modo da superare le pratiche separate delle diverse Agenzie, come avviene ora. Il progetto ha preso in esame complessivamente sei siti minerari in diverse zone europee, secondo un unico approccio modellistico, per garantire la futura applicabilità in tutta Europa.

Il contributo delle biotecnologie microbiche al progetto consiste nell'individuazione dei microrganismi autoctoni dei suoli delle sei miniere e la successiva costituzione di un consorzio microbico, per ogni sito, con i 10 ceppi batterici selezionati per le migliori capacità di resistenza ai metalli pesanti e di promozione di crescita delle piante (PGP). I consorzi microbici così definiti entrano a far parte di un "tool-box" specifico per ogni sito, insieme alle specie botaniche selezionate, preferibilmente endemiche, per realizzare interventi di fitorisanamento assistito di metalli pesanti (fitoestrazione o fitoimmobilizzazione). Il sito italiano prescelto è la miniera abbandonata di blenda e galena (Zn e Pb) di Ingurtosu, Sardegna. Nel sito è stato allestito un campo sperimentale (figura 2), dove sono tuttora in corso dei test che impiegano come *tool-box* un'associazione tra una pianta pioniera endemica, *Euphorbia pythiusa*, un consorzio di batteri PGP (UI) e, in alcune condizioni,

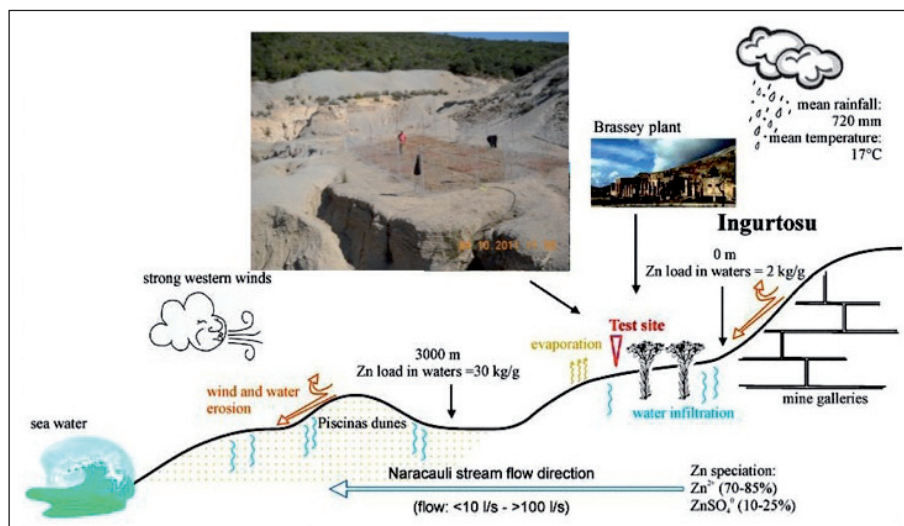
anche micorrize autoctone. È stato inoltre testato l'effetto di un prodotto commerciale (ViroMine™) sul dilavamento dei metalli pesanti dal suolo. L'attività microbica del suolo, i parametri fisiologici delle piante, il contenuto di metalli pesanti nel suolo e nelle piante sono stati monitorati durante la prova, mostrando una certa capacità spontanea di assorbimento di zinco da parte della pianta, un effetto positivo dei batteri sullo stato di salute della pianta e una riduzione della concentrazione dei metalli nel suolo, particolarmente significativa nelle condizioni in cui sono presenti sia batteri che ViroMine. L'elaborazione dei dati sperimentali è in corso e sarà oggetto di pubblicazioni scientifiche coordinate tra i vari partner. Per ogni sito è stato definito un modello di percorsi di scarico e un modello previsionale di dispersione dei metalli. In figura 2 è riportato il modello del sito italiano di Ingurtosu. Informazioni disponibili sul sito web <http://www.umbrella.uni-jena.de/cms/index.php>

Nota conclusiva

Le attività descritte sono orientate a individuare strategie e approcci di biorisanamento che contribuiscano a rendere la tecnologia maggiormente fattibile, stabile e matura. Allo stesso tempo contribuiscono ad allargare le conoscenze fondamentali sulla biodiversità microbica, sui processi metabolici e sulle interazioni tra microrganismi e tra microrganismi e piante, in ecosistemi sottoposti a

FIGURA 2 Percorsi di scarico identificati nel bacino idrografico di Ingurtosu (A), all'interno del quale si trova il sito sperimentale dove è in corso un'applicazione di fitorisanamento assistito con microrganismi (B). Un simile modello è stato definito per ogni sito minerario di UMBRELLA

Fonte: Giovanni De Giudici, rapporto scientifico progetto UMBRELLA (in attesa di pubblicazione)



forte stress ambientale. L'approccio alla *bioaugmentation* proposto, che si avvale di consorzi microbici selezionati secondo criteri di ecologia microbica, è stato applicato con successo in diverse situazioni sperimentali di contaminazione e in diverse matrici, confermando che una selezione razionale dell'inoculo microbico, operata tenendo conto del contesto ecologico in cui si deve agire, può effettivamente contribuire a catturare e mettere a frutto il potenziale di biorisanamento intrinseco dei sistemi ambientali contaminati. Lo sviluppo della metagenomica ambientale ha posto le basi disciplinari e tecniche per amplificare enormemente la capacità di bioprospezione e nei prossimi anni sarà possibile rilevare in modo più realistico questo potenziale metabolico, con la scoperta di nuovi organismi, geni funzionali e vie metaboliche ancora sconosciute. Da tutto questo

trarranno vantaggio sia le tecnologie di biorisanamento, sia le tecniche di monitoraggio ambientale. Soluzioni efficaci per le problematiche di risanamento trattate, quali la co-contaminazione e la bonifica di siti minerari, o per problematiche nuove, come gli inquinanti emergenti, rappresentano obiettivi strategici per l'Europa.

Ringraziamenti

Le attività descritte sono state condotte con il contributo di numerosi ricercatori, citati nelle pubblicazioni. Si ringraziano i partner del consorzio UMBRELLA e in particolare il dottor Giovanni De Giudici, dell'Università di Cagliari, per averci introdotto nel mondo minerario della Sardegna, svelandocene con passione e competenza gli aspetti geologici e storici.

Bibliografia

- [1] J. Ramos (2000), *EC-US taskforce on biotechnology research*, European Communities, ISBN 92-894-0110-9.
- [2] A.T. Bull (1996), "Biotechnology for environmental quality: closing the circles", *Biodiversity and Conservation*, volume 5, pages 1-25.
- [3] B. Commoner (1971), *The closing circle*, Bantam Edition, New York, ISBN 0-553-12921-X
- [4] http://ec.europa.eu/research/biotechnology/eu-us-task-force/index_en.cfm.
- [5] M. Bouchez, D. Blanchet, V. Bardin, F. Haeseler, J.P. Vandecasteele (1999), "Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures", *Biodegradation*, volume 10(6), pages 429-35.
- [6] S.Z. Fu, H.X. Fan, S.J. Liu, Y. Liu, Z.P. Liu (2009), "A bioaugmentation failure caused by phage infection and weak biofilm formation ability", *Journal of Environmental Science*, volume 21, pages 1151-1161.
- [7] A.C. Singer, C.J. van der Gast, I.P. Thompson (2005), "Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation", *Trends in Biotechnology*, volume 23(2), pages 74-77.
- [8] S. Wuertz, S. Okabe, M. Hausner (2004), "Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview", *Water Science and Technology*, volume 49 (11-12), pages 327-336.
- [9] S. Venkata Mohan, T. Kisa, T. Ohkuma, R.A. Kanaly, Y. Shimizu (2006), "Bioremediation technology for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency", *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, volume 5, pages 347-374.
- [10] I.P. Thompson, C.J. van der Gast, Singer A.C. (2005), "Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection", *Environmental Microbiology*, volume 7 (7), pages 909-915.
- [11] T.J. Gentry, C. Rensing, I.L. Pepper (2004), "New approaches for bioaugmentation as a remediation technology", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, volume 34, pages 447-494.
- [12] T.M. Vogel (1996), "Bioaugmentation as a soil bioremediation approach", *Current Opinion in Biotechnology*, volume 7(3), pages 311-316.
- [13] A.R. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, P. Marconi, A. Sciuolo, V. Pinto, S. Chiavarini, C. Ubaldi and C. Cremisini (2012), "Feasibility study for bioremediation of a soil co-contaminated by diesel oil and heavy metals using a tailor-made microbial formula as bioaugmentation agent", *Process Biochemistry*, 47:1649-1655.
- [14] C. Alisi, R. Musella, F. Tasso, C. Ubaldi, S. Manzo, C. Cremisini and A.R. Sprocati (2009), "Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance", *Science of the Total Environment*, volume 407 (8), pages 3024-3032.
- [15] M. Marzorati, L. Wittebolle, N. Boon, D. Daffonchio, W. Verstraete (2008), "How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology", *Environmental Microbiology*, volume 10(6), pages 1571-1581.
- [16] P.J. Turnbaugh and J.I. Gordon (2008), "An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics", *Cell*, volume 134, pages 708-713.
- [17] G.W. Tyson, J. Chapman, P. Hugenholtz, E.E. Allen, R.J. Ram, P.M. Richardson, V.V. Solovyev, E.M. Rubin, D.S. Rokhsar, J.F. Banfield (2004) "Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment", *Nature*, volume 428(6978), pages 37-43.
- [18] J.C. Venter et al. (2004), "Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea", *Science*, volume 304(5667), pages 66-74.
- [19] S. Mirete, C.G. de Figueras, J.E. González-Pastor (2007), "Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage", *Applied and Environmental Microbiology*, volume 73 (19), pages 60001-60011.
- [20] J.R. Marchesi, A.J. Weightman (2003), "Comparing the dehalogenase gene pool in cultivated alpha-halocarboxylic acid-degrading bacteria with the environmental metagenome pool", *Applied Environmental Microbiology*, volume 69(8), pages 4375-4382.
- [21] C. Simon and R. Daniel (2011), "Metagenomic Analyses: Past and Future", *Trends in Applied and Environmental Microbiology*, volume 77, pages 1153-1161.
- [22] E. Yergeau, S. Sanschagrin, D. Beaumier, C. Greer (2012), "Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils", *PLoS One*, volume 7(1).

Biosensori per il monitoraggio ambientale: le innovazioni introdotte dalle biotecnologie

■ Livia Della Seta, Maria Rita Montereali, Walter Vastarella

I biosensori sono dispositivi integrati, in grado di fornire una risposta analitica quantitativa o semi-quantitativa, costituiti da un **elemento biologico** o *biomimico*, che riconosce il composto di interesse dando luogo ad un fenomeno chimico o chimico fisico e da un **trasduttore**, che permette la trasformazione di questo fenomeno in un segnale analogico o digitale. Possono pertanto essere intrinsecamente definiti come “apparati biotecnologici”. La loro classificazione avviene in base alla biomolecola di riconoscimento (biosensori enzimatici, ad anticorpo, a DNA, a cellula intera o tessuto ecc.) o, in alternativa, in base al trasduttore di segnale utilizzato (biosensori elettrochimici, ottici, piezoelettrici, calorimetrici ecc.) [1]. I biosensori offrono ampie potenzialità in campo analitico grazie, in generale, alla specificità della reazione di riconoscimento biorecettore-substrato, ai tempi di

risposta brevi (30''-2 min) ed alla semplicità e portabilità del sistema che può essere utilizzato in matrice reale o con minimo pre-trattamento. Tutte queste caratteristiche li rendono adatti per misure in continuo e direttamente in campo [2]. I biosensori, che hanno avuto prevalenti applicazioni pratiche in campo medico ed alimentare, si offrono principalmente, in campo ambientale, come sistemi analitici complementari alle tecniche classiche per analisi di *screening* e come sistemi di preallarme (*early warning systems*).

I sistemi elettrochimici, in particolare, utilizzano prevalentemente elettrodi stampati in serie con tecniche serigrafiche, a basso costo e grandi quantità: si prestano pertanto alla realizzazione di dispositivi monouso e sono facilmente adattabili ad usi specifici ed in continuo. Nel campo del monitoraggio ambientale sono stati proposti numerosi biosensori ottici o elettrochimici, basati su enzimi semplici (ad es. ossidasi, idrolasi, transferasi) per la determinazione analitica di sostanze inquinanti (in genere composti organici). In alcuni casi la misura è basata

sull'inibizione di un enzima o di una reazione chimica, provocata da uno o più composti aventi questo specifico effetto tossico [3].

Negli ultimi decenni i risultati ottenuti nel campo della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica hanno stimolato la realizzazione di un numero crescente di biosensori basati su una varietà di sistemi biologici sempre più *target-specifici* (enzimi ingegnerizzati, anticorpi monoclonali, proteine, frammenti di DNA, **aptameri**, ma anche batteri, alghe, cellule intere o tessuti cellulari) [4]. Parallelamente, la scoperta di nuovi materiali e l'evolversi di tecniche di fabbricazione basate sull'utilizzo di micro e **nanomateriali** hanno permesso la realizzazione di una nuova classe di biosensori e di sistemi integrati micronizzati in grado di effettuare anche analisi multiparametriche, per applicazioni in campo ambientale, alimentare, farmaceutico e, più in generale, per la sicurezza e la salute dell'uomo e dell'ambiente. Nonostante l'elevata produzione di pubblicazioni scientifiche sui biosensori, il numero di dispositivi

■ Livia Della Seta,
Maria Rita Montereali,
Walter Vastarella
ENEA, Unità Tecnica Caratterizzazione,
Prevenzione e Risanamento Ambientale

commerciali basati su di essi resta ancora limitato e ancora più scarsa la loro diffusione. Il passaggio dalla scala di laboratorio alla produzione di questi dispositivi è spesso rallentato da problemi legati alla stabilità ed alla sintesi dei biorecettori, ai costi e ai tempi di *tayloring* molecolare, alla necessità della presenza di cofattori e ai metodi di immobilizzazione. Queste criticità rendono indispensabile la convergenza fra differenti competenze e tecnologie per ottimizzare i sistemi e migliorare la sensibilità dei metodi.

I limiti di legge oggi richiedono la determinazione, con alta specificità, di concentrazioni sub-nanomolari e quindi l'utilizzo di tecniche analitiche ad elevatissime prestazioni e specificità quali GC/MS ed LC/MS (LC-MS/MS/MS, U-HPLC, time-of-flight (ToF) e Orbitrap-based MS detection). Sulla base di queste considerazioni oggi l'attenzione dei ricercatori è anche, se non soprattutto, concentrata nello studio di biosensori in grado di rivelare classi di inquinanti, piuttosto che il singolo contaminante, sfruttando per la misura analitica gli effetti di tossicità (inibizione enzimatica o effetti genotossici) caratteristici delle differenti classi. Questi sistemi sono ancora più interessanti per l'inserimento nella catena dei test previsti nella metodologia definita "*Effect Directed Analysis*" (EDA) [6], che è oggi ritenuta l'approccio più valido nelle campagne esplorative di monitoraggio ambientale finalizzate all'individuazione degli **emerging**

pollutants. Tale approccio si basa infatti sul frazionamento del campione, sull'uso integrato di test tossicologici a diverso grado di specificità e sulle analisi chimiche; in questo caso, quindi, possono essere utili sistemi bioanalitici in grado di fornire un indice di tossicità specifica o genotossicità/mutagenicità totale [5].

In questa prospettiva, i biosensori a DNA o quelli basati su aptameri mostrano grandi potenzialità. I primi sono stati impiegati per la determinazione di rotture di catena o danni alle basi indotti da specie chimiche tossiche, i secondi possono essere selezionati per legarsi con elevata affinità alla molecola di interesse. Rispetto agli anticorpi, gli aptameri presentano il vantaggio di essere ottenuti impiegando una procedura totalmente *in vitro*: possono essere

manipolati per introdurre modifiche che ne aumentino stabilità, affinità e specificità verso la molecola target e possono essere impiegati anche per il riconoscimento di molecole non immunogeniche. Scienziati di differenti discipline dovranno lavorare in stretta collaborazione per:

- rendere la selezione e replica di aptameri, DNA, RNA più accessibile per costi e tempi;
- migliorare la stabilità e preservare la bioreattività dei biorecettori;
- studiare le proprietà chimico-fisiche e di adesione al fine di rendere più efficaci le tecniche di immobilizzazione e orientamento del biorecettore;
- studiare i limiti tecnologici correlati alla miniaturizzazione e all'automazione del sistema;
- sfruttare le proprietà elettriche e topologiche dei nanomateriali.

Bibliografia

- [1] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson (2001), "*Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*", *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121-131, Elsevier.
- [2] A. Rasooly, K. E. Herold Eds. (2008) *Biosensors and Biodection: Methods and Protocols*, Vol. 2, Humana Press, New York.
- [3] M.T. Giardi, E.V. Piliateska Eds, (2006), *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, Landes Bioscience, Austin, TX.
- [4] I. Palchetti, M. Mascini, (2008), *Analyst*, 133, 846-854, RSC, London.
- [5] R. Renneberg, F. Lisdat, (2008) *Biosensing for the 21st Century*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [6] G.M. Hecker, H. Hollert, (2009), "*Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges*", *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 607-613, Springer-Verlag Berlin.

Biofarmaci verdi

Nella domanda crescente di farmaci di nuova generazione che deve contemplare lo sforzo della riduzione dei costi, i farmaci biotecnologici derivati da piante rappresentano una delle sfide delle biotecnologie avanzate in favore dell'accessibilità alle cure della maggior parte della popolazione mondiale. Le piante trasformate in biofabbriche di molecole di rilevanza farmacologica stanno rispondendo alle osservazioni cliniche con diversi prodotti innovativi che aprono ampi orizzonti per un nuovo uso delle piante, diverso dai metodi convenzionali. Il valore sociale di questo approccio, unito a metodi di biologia molecolare sempre più efficienti ed efficaci, diventa un strumento fondamentale per la diffusione di questa tecnologia

■ Eugenio Benvenuto

È noto da secoli che le piante rappresentano la più importante fabbrica naturale di composti ad azione farmacologica su cui sono ancora fondate le medicine tradizionali di antiche culture come la cinese o l'indiana (ayurvedica).

Con l'avvento delle tecnologie del DNA ricombinante le biotecnologie vegetali mettono in risalto la grande opportunità di utilizzare le piante non solo come sorgente di principi attivi endogeni, ma come un vero e proprio bioreattore per la sintesi di biofarmaci ricombinanti. Diversamente dalle molecole ottenute anche per sintesi chimica, i biofarmaci, che per definizione sono molecole complesse dal peso molecolare compreso tra 5.000 e 150.000 dalton (in alcuni casi anche fino a 500.000), possono essere ottenuti esclusivamente mediante sintesi indotta in sistemi biologici eterologhi mediante intervento genetico. Per una migliore comprensione del tipo di complessità di queste molecole, basti pensare che i farmaci basati sui classici principi attivi non superano mai i 1.000 dalton e, pur riuscendo a coprire una

ampia gamma di patologie, non riescono ad essere attivi in quelle malattie dove non ci sono alternative terapeutiche se non nelle molecole ricombinanti (ad esempio l'insulina nel diabete). In numerose pratiche cliniche non è più possibile fare a meno dei biofarmaci che rappresentano la nuova frontiera della farmacologia, in quanto naturale conseguenza del progresso delle conoscenze in molti ambiti della ricerca biomedica, da quello del cancro a quello delle malattie autoimmuni.

I prodotti biofarmaceutici (o biofarmaci) realizzati con l'ausilio delle biotecnologie hanno un *cost of good* (costo base) piuttosto alto, determinato, di solito, dalle condizioni di sintesi indotta nei vari organismi e dalle condizioni di allevamento e di estrazione della molecola prodotta. Le piante rappresentano perciò un'alternativa economicamente rilevante per la produzione a basso costo di queste molecole perché si parte da luce e semplici nutrienti per l'attivazione della sintesi complessa delle molecole ricombinanti che risultano, in molti casi, in una produzione estremamente competitiva rispetto a sistemi tradizionali basati su colture cellulari.

I primi esempi di sintesi nelle piante come bioreattori per la produzione di biofarmaceutici risalgono alla fine degli anni '80, quando fu dimostrata la possibilità

■ Eugenio Benvenuto

ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo

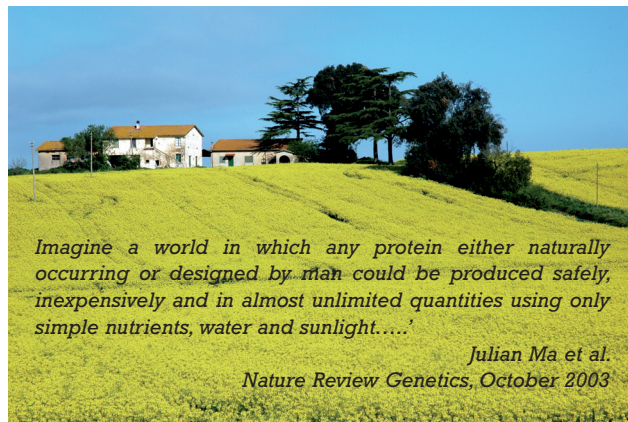
di esprimere anticorpi completi in foglie di tabacco e l'albumina sierica umana prodotta in tabacco e patata. Queste ricerche rappresentano pietre miliari per lo sviluppo dell'area delle biotecnologie verdi, conosciuta come "agricoltura molecolare" o "*molecular farming*". Con questo termine viene genericamente indicata la produzione su larga scala di molecole ricombinanti ad alto valore aggiunto in pianta. Contrariamente a quanto si possa immaginare, la capacità delle cellule vegetali di sintetizzare, elaborare e indirizzare proteine complesse normalmente prodotte in cellule animali, le rende un sistema alternativo efficiente per l'espressione di molecole di rilevanza farmacologica. Diverse specie di piante sono utilizzate per la produzione di proteine biofarmaceutiche che possono essere accumulate nelle foglie e nei frutti (tabacco, pomodoro, erba medica e lattuga ecc.) nei tuberi (patata) o nei semi (riso, frumento, mais, piselli e soia), coprendo un ampio spettro di produzione di biomolecole (da singoli peptidi a strutture complesse come le VLP -*Virus Like Particles*-) per la terapia o la prevenzione di molte patologie.

Gli esempi di piante che mostrano di essere sistemi affidabili e convenienti per la produzione di biomolecole sono molti, pertanto si limiterà la descrizione solo ad alcuni esempi più significativi delle applicazioni di questa area delle biotecnologie.

Vaccini per le pandemie

Esistono diverse malattie che possono dare origine a pandemie con devastanti conseguenze, se solo si pensa alle varie epidemie di peste descritte nella storia, di colera e le pandemie di influenza come "la spagnola", "l'asiatica", quella di "Hong Kong". Nel caso di pandemie influenzali, queste si presentano con una certa regolarità con intervalli di 20-40 anni. A complicare il quadro, c'è sempre la possibilità che ceppi di virus dell'influenza aviaria possano combinarsi con quella umana generando virus patogeni con potenziale di virulenza molto pericoloso per l'uomo. La soluzione immediata è sempre la formulazione di dosi di vaccino in tempi rapidi e con il maggior numero di dosi che vadano a coprire la maggior parte della popolazione a rischio.

Una delle possibili alternative a quella classica della



preparazione di vaccini anti influenzali mediante uova embrionate di pollo è proprio quella della produzione a partire da tonnellate di foglie per la preparazione di milioni di dosi in tempi rapidi. È questo l'obiettivo che è stato realizzato grazie allo sforzo congiunto tra il Pentagono (nel caso specifico dall'Agenzia per Progetti Avanzati di Ricerca di Difesa -DARPA-) e una giovane impresa del settore Biotec, la Medicago Inc., che hanno annunciato quest'anno di aver realizzato la produzione di 10 milioni di dosi di vaccino contro l'influenza di tipo H1N1 in un solo mese. Questo vaccino è sotto forma di "*virus-like particles*", che rappresenta la forma più sicura di induzione di protezione vaccinale in quanto costituita solo da proteine assemblate a formare l'involucro virale in assenza di acido nucleico. Quindi un formulato vaccinale sicuro, in nessun modo in grado di replicarsi autonomamente all'interno dell'organismo trattato. Questa produzione è stata ottenuta mediante una semplice infiltrazione delle foglie con un batterio che funge da vettore per i geni virali necessari all'espressione e quindi all'assemblaggio delle proteine dell'involucro virale che vengono poi prodotte e purificate dai tessuti vegetali. È intuitivo quanto una simile tecnologia possa essere di estesa applicazione, se si considera che i vaccini di origine vegetale potrebbero essere ragionevolmente prodotti su larga scala con numeri che si aggirano intorno a 100 milioni di dosi in un mese, mentre, in questo caso, il processo della produzione attraverso le uova ha dei tempi nemmeno comparabili per arrivare a queste quantità.

Collagene umano per applicazioni in Medicina Rigenerativa

Tra i prodotti biofarmaceutici derivati da pianta, vale la pena di menzionare quello del collagene umano di tipo 1, molecola presente nei tessuti connettivi comprese le cartilagini, che ha un'ampia gamma di applicazioni, dalla medicina rigenerativa alla chirurgia estetica, all'industria alimentare. Finora, la maggior parte delle esigenze di collagene in medicina sono soddisfatte con collagene di origine animale (bovina, suina o equina) con rischi di rigetto e possibilità di contaminazione da patogeni. Il collagene umano ricombinante ottenuto dai vegetali è invece anallergico e non-immunogenico perché prodotto in organismi privi di prioni e/o altri agenti patogeni per l'uomo. In questo specifico caso, il gene di origine umana è stato stabilmente inserito nel genoma delle piante di tabacco che sono riuscite a sintetizzare procollagene stabile, che è il precursore del collagene naturale presente nei tessuti animali. Il processo è brevettato ed industrializzato con la produzione e distribuzione di dispositivi medici a base di collagene ricombinante per applicazioni di medicina rigenerativa, soprattutto in forma di gel ed in forma di tessuto per accelerare il processo di guarigione delle ferite cutanee. Sono anche in preparazione nuovi diversi dispositivi medici conformati a spugna, membrana, fibre, per diverse molteplici applicazioni in questo campo.

Bioterapeutici per malattie rare

Altro esempio di prodotto sul mercato prodotto da piante è la glucocerebrosidasi enzima assente o parzialmente funzionante nella malattia di Gaucher, malattia rara di tipo autosomico recessivo (occorre cioè che entrambi i genitori siano portatori del gene alterato e lo trasmettano al figlio). La funzione della glucocerebrosidasi è quella di trasformare il glucocerebroside, sostanza di degradazione cellulare, in zuccheri (glucosio) e grassi (ceramide) riutilizzabili. Quando questa funzione è carente, il glucocerebroside si accumula nei lisosomi dei macrofagi, che quindi crescono di dimensioni. Queste cellule prendono il nome di cellule di Gaucher e si concentrano soprattutto

nella milza, nel fegato e nel midollo osseo, alterando le normali funzioni di questi organi. Come in molti casi di malattie rare, la spinta per la realizzazione di prodotti terapeutici non è certamente operata dalle grandi case farmaceutiche ed è proprio questo uno dei casi in cui la piccola e media impresa del settore Biotec può ricavare una nicchia di produzione di biofarmaceutici "salva-vita". È il caso della Protalix Biotherapeutics, che ha realizzato la produzione di taliglucerasse alfa, farmaco di origine ricombinante, appena approvato dalla Food and Drug Administration per una somministrazione intravenosa in sostituzione dell'enzima mancante in pazienti con la malattia di Gaucher di tipo 1, la più diffusa, che non presenta disturbi neurologici. Il farmaco è realizzato grazie a una nuova tecnologia produttiva di "molecular farming" basata su cellule di carota, estremamente efficace ed economica.

Ovviamente, come in tutti i sistemi di espressione eterologa, le piante hanno alcuni limiti, per esempio quando i livelli di produzione non sono così soddisfacenti per rappresentare una convenienza economica. Quest'ultima, però, può dipendere anche dalle difficoltà tecniche e dai costi relativi alla purificazione del prodotto. Purificazione che comunque può variare a seconda del farmaco e delle sue modalità di somministrazione. Un aspetto di particolare importanza è quello relativo a modificazioni del prodotto proteico, come la glicosilazione. Infatti, nel caso delle piante, gli zuccheri che vengono addizionati alle proteine espresse potrebbero essere diversi, con effetti sulla perfetta equivalenza delle molecole prodotte e con conseguenze da valutare, caso per caso, sulla effettiva funzionalità ed eventuale immunogenicità del derivato. Negli ultimi anni, enormi sforzi si stanno compiendo per risolvere le maggiori problematiche relative alla sostanziale equivalenza del prodotto derivato da pianta, con risultati davvero molto incoraggianti.

In questo quadro è importante anche considerare che la condizione necessaria per cui un biofarmaceutico derivato da pianta possa rimanere competitivo è che i tempi di sviluppo, di valutazione e iter autorizzativo del un nuovo prodotto, prima della commercializzazione rimangano, nella media, simili a quelli previsti da

altri sistemi di produzione già affermati per la sintesi di alcuni biofarmaci. Circostanza questa non sempre verificata con i prodotti innovativi, specialmente se da sistemi come le piante, considerati non convenzionali, che quindi incontrano non poche difficoltà ad entrare nella filiera delle attività regolatorie in campo tecnologico-farmaceutico.

Questi ed altri esempi qui brevemente illustrati sottolineano la grande risorsa delle piante per usi innovativi come quello della produzione di biofarmaci. Il cammino è solo all'inizio, ma la strada è tracciata verso la 'coltivazione' dell'innata capacità della biofabbrica vegetale per la realizzazione di biofarmaci a costi ridotti, quindi accessibili alla maggior parte della popolazione umana. In gioco ci sono milioni di vite e un mercato ricco e vastissimo.

Bibliografia

- [1] <http://biotecnologie.casaccia.enea.it/home.html>
- [2] Expert Review of Vaccines, vol. 9 no. 8, August 2010 (Special focus issue on Plant- derived vaccines).
- [3] Lico C., Buriani G., Capuano F., Benvenuto E., Baschieri S. "Influenza vaccines: new perspectives from plants". In: Plant-derived Vaccines: Technologies & Applications, Buonaguro L. Ed., Future Medicine, 2011. pp. 104-115.
- [4] *Innovation in Vaccinology from design, through to delivery and testing* (Baschieri Editor) 2012 Springer ISBN 978-94-007-4542-1.
- [5] Capodicasa C., Donini M., Villani M.E., Benvenuto E. (2011). *Rapid and high yield production of immunotherapeutic plant-made antibodies*. Future Medicine, E-Pub DOI10.2217/EBO.11.76.
- [6] De Muyck B., Navarre C., Boutry M. "Production of antibodies in plants: status after twenty years". *Plant Biotechnol J.* 2010; 8(5):529-63.
- [7] Horn ME. "Plant molecular pharming 2012 and beyond". *Plant Cell Rep.* 2012 31(3):437-8.
- [8] Xu J., Dolan M.C., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J. *Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins*. *Biotechnol Adv.* 2012 30(5): 1171-84.
- [9] Paul M., Ma J.K. "Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms". *Biotechnol Appl Biochem.* 2011;58 (1):58-67.

Vaccini del Futuro

■ *Selene Baschieri*

I vaccini sono farmaci che addestrano il sistema immunitario in modo che sia pronto a difenderci nel caso in cui fossimo attaccati da un agente infettivo. Idealmente, quando somministrati, dovrebbero determinare l'attivazione di una risposta immunitaria il più possibile simile a quella indotta dall'infezione da parte del patogeno, conferendo protezione duratura. I vaccini tradizionali contengono l'agente patogeno indebolito ("attenuato") o ucciso ("inattivato"). I vaccini "attenuati" sono estremamente efficaci nell'indurre protezione per tutta la vita, ma possono essere pericolosi poiché può accadere che il microrganismo indebolito riacquisti a pieno la sua vitalità e quindi patogenicità, causando nel soggetto vaccinato la malattia. I vaccini "inattivati" di contro sono molto sicuri, ma per riuscire ad indurre risposte immunitarie rilevabili (quindi efficaci nel proteggere) devono essere somministrati più volte (richiami) in combinazione con sostanze la cui funzione è quella di "svegliare" il sistema immunitario (adiuvanti). Lo stesso discorso è valido per i

vaccini di ultima generazione che sono un'evoluzione dei vaccini inattivati perché contengono solo le parti dell'agente patogeno ("subunità antigeniche") note per essere il bersaglio delle risposte immuni. Buona parte della moderna ricerca sui vaccini, sfruttando i progressi compiuti nel campo dell'immunologia molecolare e dell'ingegneria genetica, mira ad aumentare l'efficacia dei vaccini a subunità mediante l'individuazione di nuove sostanze adiuvanti, prive di effetti collaterali, o la messa a punto di formulazioni dell'antigene che ne aumentino il potenziale immunogenico intrinseco e consentano di rinunciare agli adiuvanti.

Tra le possibili applicazioni delle piante "biofabbrica" nel campo della vaccinologia, ci sono quelle finalizzate alla produzione di subunità antigeniche "potenziate" nella loro intrinseca capacità di stimolare il sistema immunitario, applicazione a cui si dedicano alcuni dei ricercatori del laboratorio di Biotecnologie di ENEA. Una delle tecnologie messe a punto consiste nel costruire e produrre su larga scala nelle piante, loro naturali "ospiti", virus vegetali che espongono sulla loro superficie le subunità antigeniche di interesse. Questi virus chimerici, privi della

capacità di infettare le cellule animali e pertanto sicuri per la salute, si sono dimostrati in grado di stimolare potenti risposte immunitarie anticorpo- e cellulomediatae specifiche per l'antigene veicolato senza la necessità di co-somministrare sostanze adiuvanti. Un altro approccio sviluppato nei nostri laboratori e che sta dimostrandosi efficace consiste nell'utilizzare le cosiddette "Heat shock proteins" (HSP) vegetali come veicolo delle subunità antigeniche ricombinanti prodotte nelle piante. Da un punto di vista generale, le HSP svolgono funzioni essenziali per il corretto funzionamento delle cellule poiché si associano a qualsiasi proteina venga prodotta in una cellula, "aiutandola" ad assumere la sua configurazione funzionale. Nelle cellule delle piante "biofabbrica" di antigeni, le HSP formano complessi anche con gli antigeni. Tali complessi possono essere purificati e, se somministrati, sono in grado di attivare potenti risposte immunitarie senza la necessità di co-somministrare adiuvanti.

In conclusione, i promettenti risultati ottenuti utilizzando le piante per affrontare problemi di tipo immunologico dimostrano che l'approccio multi-disciplinare è la via di sicuro successo per innovare.

■ **Selene Baschieri**

ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo

Dalla virologia vegetale alla nano medicina

■ Carla Marusic

Lo studio dei meccanismi che regolano l'interazione della pianta con i patogeni vegetali ha posto l'accento non solo sulla comprensione e il controllo delle malattie causate da parte di virus in colture agricole, ma ha anche contribuito notevolmente alla fine caratterizzazione strutturale di molti di essi. In particolare, la cristallizzazione di alcuni virus vegetali ha evidenziato che per la maggior parte si tratta di strutture molto semplici e regolari, costituite da una o poche proteine che si auto-assemblano secondo una simmetria elicoidale o icosaedrica per formare un "capside" o involucro esterno che racchiude il materiale genetico. Poiché i capsidi hanno un diametro compreso fra 25 e 100 nanometri, i virus vegetali rientrano nella scala dimensionale delle "nanoparticelle".

Una peculiarità di alcuni virus vegetali risiede nella possibilità di indurre transizioni reversibili della loro struttura, modificando il pH e la concentrazione di ioni bivalenti (quali Ca^{2+} e Mg^{2+}). Ad esempio, eliminando Ca^{2+} e Mg^{2+} e aumentando il pH della soluzione, si provoca un sorta di rigonfiamento noto con il nome di "swelling", che consiste in un aumento del 10% del diametro del capsido, con formazione di pori di 2 nm sul guscio virale. Questa plasticità della

struttura consente l'infusione di molecole estranee attraverso i pori che possono essere successivamente richiusi mediante aggiunta di ioni bivalenti e il ripristino del pH ottimale per la conformazione nativa del virus. Recentemente sono stati pubblicati numerosi studi scientifici che hanno dimostrato la possibilità di utilizzare i capsidi di virus vegetali per produrre nano-contenitori per il trasporto di molecole o principi attivi utili in campo biomedico. Risultati molto incoraggianti sono stati ottenuti per quello che riguarda la produzione di nanoparticelle in grado di trasportare *Gadolinio* che rappresenta, ad oggi, il principale mezzo di contrasto per la risonanza Magnetica ad Immagini (MRI). Un altro importante campo di applicazione riguarda la produzione di nanoparticelle caricate con farmaci anti-tumorali. Particelle di questo tipo devono una volta iniettate all'interno dell'organismo devono raggiungere le cellule bersaglio, penetrare al loro interno e rilasciare il principio attivo in maniera sicura. Anche per questo tipo di applicazione, i capsidi dei virus vegetali si sono rivelati ottimi prototipi. Infatti, sono state prodotte nanoparticelle contenenti doxorubicina (potente chemioterapico) in grado di indurre effetti citotossici in cellule in coltura.

In quest'ambito d'indagine si colloca una delle linee di ricerca del Laboratorio di Biotecnologie ENEA, che sta studiando la possibilità di utilizzare il virus dell'Arricciamento Maculato del Carciofo (*Artichoke Mottled Crinkle*

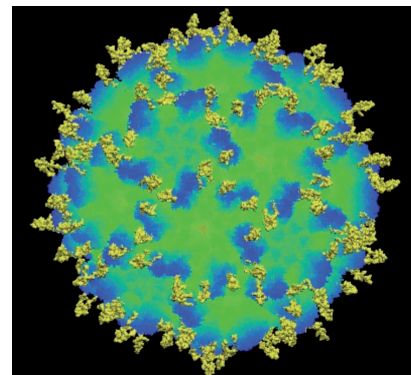


FIGURA 1 Modello "in silico" di un virus vegetale chimerico ottenuto mediante procedure bioinformatiche di *homology modeling*
Fonte: ENEA

Virus, AMCV) per la produzione di nanoparticelle. Poiché l'AMCV non è stato ben caratterizzato da un punto di vista strutturale, si è pensato di ricorrere a metodi di bioinformatica per ottenere un modello matematico "virtuale" di questo virus. Per sviluppare il modello in silico del virus ci siamo avvalsi della collaborazione di colleghi ENEA con competenze in questo settore (Caterina Arcangeli, Unità Tecnica Tecnologie dei Materiali, Laboratorio Metodologie Diagnostiche (UTTMAT-DIAG)). Il modello bioinformatico è risultato di grande utilità sia per gli studi volti alla produzione di componenti vaccinali, utilizzando il capsido del virus AMCV come "carrier" di epitopi immunogenici derivati da virus patogeni umani, che per valutare la stabilità delle eventuali nanoparticelle caricate con piccole molecole estranee.

■ Carla Marusic

ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo

Bibliografia

- [1] C. Arcangeli, P. Circelli, M. Donini, A.A. Aljabali, E. Benvenuto, G.P. Lomonosoff, C. Marusic (2013), "Structure-based design and experimental engineering of a plant virus nanoparticle for the presentation of immunogenic epitopes and as a drug carrier", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, in press.

Anticorpi a basso costo da sistemi vegetali

■ *Marcello Donini*

Gli anticorpi monoclonali (mAb) rappresentano una classe di molecole ampiamente utilizzata in medicina (nella diagnosi e terapia di diverse patologie) per la loro specificità di legame verso l'antigene e per le elevate caratteristiche di stabilità molecolare che li contraddistinguono. Attualmente sono in commercio più di venti anticorpi monoclonali utilizzati nel trattamento di patologie oncologiche, autoimmuni ed infiammatorie. Per avere un'idea dell'importanza che tali molecole ricoprono sul mercato dei farmaci, basti pensare che tra i venti farmaci biotecnologici più venduti negli Stati Uniti otto sono rappresentati da anticorpi. Ad oggi, le colture cellulari animali rappresentano il sistema di elezione per la produzione dei mAb attualmente in commercio, anche se la crescente domanda ed i costi elevati di produzione incoraggiano lo sviluppo di piattaforme di espressione alternative. Tra i sistemi di espressione alternativi, le piante si presentano proprio come bioreattori ideali. Infatti, in maniera inaspettata, le cellule

vegetali hanno un apparato di sintesi che consente di produrre tali molecole in maniera molto efficiente, riducendo notevolmente i costi di produzione, e tutto lascia pensare che probabilmente saranno proprio gli anticorpi ad occupare una grossa fetta di mercato nella commercializzazione dei farmaci biotecnologici prodotti da pianta.

Negli ultimi decenni, anticorpi monoclonali diretti contro diversi tipi di cancro sono stati espressi in modo efficiente in sistemi vegetali. Uno dei primi esempi di produzione di un anticorpo ricombinante anti-cancro è rappresentato da un'immunoglobulina diretta contro il marker tumorale CEA (antigene carcino-embrionario) prodotta in tabacco. Altri esempi sono l'anticorpo TheraCIM specifico per il recettore del fattore di crescita (EGF-R) o un anticorpo per il trattamento del linfoma non-Hodgkin da utilizzare come vaccino 'idiotipico' personalizzato. Tra le applicazioni in terapia umana, gli anticorpi possono anche essere utilizzati per combattere le malattie infettive di origine virale, batterica o fungina, rappresentando una valida alternativa ai farmaci tradizionali. Negli ultimi anni, sono stati presentati diversi esempi di anticorpi prodotti in pianta dotati di un elevato

potenziale neutralizzante contro diversi agenti infettivi. Uno dei primi esempi è l'anticorpo secretorio IgG (Guy's 13) diretto contro una proteina (adesina) del batterio *Streptococcus mutans* agente causale della carie dentale. Tale molecola è stata trasformata da una società biotecnologica statunitense (Planet Biotechnology Inc.) in un prodotto biofarmaceutico dal nome CaroRX™, che ha recentemente ottenuto l'approvazione europea per l'impiego come dispositivo medico nella prevenzione della carie. Risultati promettenti sono stati anche ottenuti con un anticorpo in grado di neutralizzare il virus HIV che è stato prodotto in piante di tabacco. Questo anticorpo, sviluppato nell'ambito di un consorzio di laboratori denominato "Pharmaplanta" (Progetto integrato del 6° Programma Quadro, cui ha partecipato anche ENEA, che aveva lo scopo di creare una filiera di produzione di proteine farmaceutiche in pianta rispettando condizioni di "good manufacturing practices" -GMP-), ha raggiunto la fase di sperimentazione clinica umana. In questa specifica attività il laboratorio Biotecnologie di ENEA (UTBIORAD-FARM) ha recentemente messo a punto una piattaforma tecnologica per l'espressione di due

■ **Marcello Donini**

ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo

anticorpi, uno diretto contro il marker tumorale tenascina-C ed uno ad attività anti-fungina, utilizzando un sistema di espressione di tipo "transiente". Questo sistema permette di ottenere elevati

livelli di anticorpi completi in tempi brevi senza la necessità di utilizzare piante geneticamente modificate. Il ciclo di produzione risulta inoltre confinato in serre a contenimento,

evitando qualsiasi contatto con l'ambiente esterno. I dati ottenuti sono stati da poco pubblicati su importanti riviste del settore delle biotecnologie vegetali.

Bibliografia

- [1] Lombardi R, Donini M, Villani ME, Brunetti P, Fujiyama K, Kajjura H, Paul M, Ma JK, Benvenuto E (2012). "Production of different glycosylation variants of the tumour-targeting mAb H10 in *Nicotiana benthamiana*: influence on expression yield and antibody degradation". *Transgenic Res.* 21:1005-1021.
- [2] Capodicasa C, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Catellani M, Palma AS, Liu Y, Feizi T, Cassone A, Benvenuto E, Torosantucci A (2011) "Plant production of anti- β -glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans". *Plant Biotechnol. J.* 9:776-87.
- [3] Villani ME, Morgun B, Brunetti P, Marusic C, Lombardi R, Pisoni I, Bacci C, Desiderio A, Benvenuto E, Donini M (2009). "Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies". *Plant Biotechnol. J.* 7: 59-72.

Vaccini verdi contro i tumori causati dal virus del papilloma umano (HPV)

■ Rosella Franconi

Il carcinoma della cervice uterina (o cancro del collo dell'utero) è, a livello mondiale, il secondo tumore maligno nella donna, con circa 500.000 nuovi casi per anno e oltre 275.000 decessi, dei quali l'88% nei paesi in via di sviluppo (13% di tutti i tumori femminili). In Italia, dai registri nazionali dei tumori, risultano 3.000 nuovi casi per anno, con circa 1.500 morti/anno. Lo screening delle donne per le lesioni pre-cancerose (Pap test) è un intervento efficace per prevenire il cancro della cervice. Questo tumore è stato il primo ad essere riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come totalmente riconducibile ad un'infezione grazie alle dimostrazioni dei primi anni '80 del virologo tedesco Harald zur Hausen (premio Nobel per la Medicina, 2008). La fondamentale scoperta che l'infezione da virus del papilloma umano (HPV) è la causa del tumore del collo dell'utero (ma anche di altri tumori, per un totale di circa 5% di tutti i tumori) ha aperto la strada a nuovi sistemi

di screening primario (test HPV) e a nuove strategie di prevenzione basate sulla vaccinazione.

Recentemente, sono stati commercializzati due vaccini preventivi (*Gardasil*[®], prodotto in lievito e *Cervarix*[®], prodotto in cellule di insetto) contro i papillomavirus umani oncogeni più frequenti (HPV 16 e 18), capaci di conferire un'efficiente protezione contro le infezioni persistenti da HPV e di conseguenza dai tumori indotti da questi virus. L'azione preventiva di entrambi i vaccini è dovuta alla somministrazione di "particelle virus-simili" (VLP), costituite dall'assemblaggio della proteina L1 del capsido virale e altamente purificate. Gli alti costi (attualmente circa 180 euro per il ciclo di tre dosi) e la necessità della catena del freddo per la conservazione, rendono complicata tale vaccinazione nei paesi in via di sviluppo, dove l'incidenza di carcinoma cervicale è più alta. Vi è perciò la necessità di sviluppare di vaccini preventivi di "seconda generazione", a basso costo, a più ampio spettro, termostabili, somministrabili in singola dose senza siringhe. Allo stesso tempo, è necessario sviluppare nuove strategie terapeutiche (in particolare immunoterapia)

per gli individui con infezioni persistenti che non potrebbero comunque trarre beneficio dai vaccini preventivi. Le oncoproteine E6 ed E7 degli HPV ad alto rischio rappresentano candidati ideali per la realizzazione di questi vaccini terapeutici, poiché sono antigeni 'tumore-specifico'.

Vari vaccini sperimentali basati su queste proteine hanno dato risultati promettenti, dimostrando di controllare o bloccare, anche in sperimentazione clinica, lo sviluppo neoplastico.

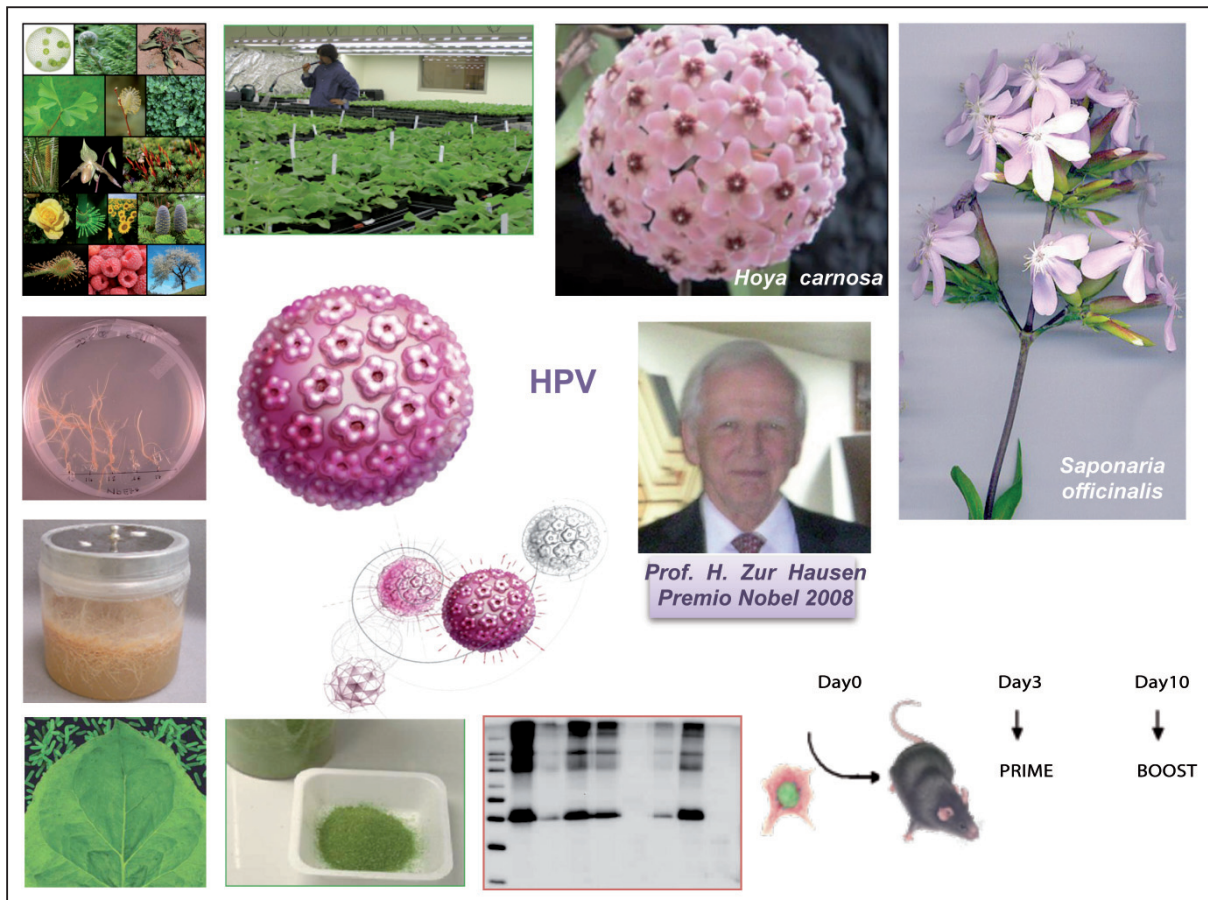
Di conseguenza, centinaia di milioni di donne e uomini già infetti (o che lo saranno nel prossimo futuro) potrebbero trarre beneficio da un intervento terapeutico di questo tipo.

Le piante rappresentano una piattaforma alternativa sia per lo sviluppo di vaccini preventivi che terapeutici anti-HPV. Sarebbe, infatti, strategico produrre in pianta vaccini che rappresentano copie (o biosimilari) di prodotti di successo (perché molto efficaci) ma costosi, come gli attuali vaccini preventivi contro HPV.

Effettivamente, numerosi studi hanno già dimostrato che la proteina L1/VLP può essere prodotta in pianta, in forma biologicamente attiva, sia in maniera transgenica

■ Rosella Franconi

ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo



(tabacco e patata) che transiente. Per quanto riguarda i vaccini terapeutici, la prima dimostrazione della possibilità di usare le piante per la produzione di vaccini terapeutici contro le patologie associate ad HPV risale al 2002 quando, presso i nostri laboratori, in collaborazione con il Laboratorio di Virologia dell'Istituto per i Tumori "Regina Elena" e l'Istituto Superiore di Sanità di Roma, l'oncoproteina E7 di HPV 16 è stata prodotta in piante di tabacco tramite il virus X della patata (PVX).

In seguito a vaccinazione di topi con l'estratto vegetale, è stata ottenuta una risposta immunitaria E7-specifica (mediata sia da anticorpi che da cellule) in grado di inibire lo sviluppo del tumore. Questi studi hanno inoltre suggerito che il "vaccino verde" è dotato di intrinseche proprietà "adiuvanti" (immunostimolanti), proprietà confermate da studi su cellule dendritiche umane (le migliori cellule che presentano l'antigene al sistema immunitario). Successivamente, la proteina E7

è stata espressa ad altissime alte rese (3 mg/g tessuto fresco) e purificata. La vaccinazione di topi con la proteina purificata da pianta ha determinato la regressione di tumori già stabilizzati nel 100% degli animali.

Questi risultati aprono perciò la strada sia alla sperimentazione clinica delle molecole prodotte in pianta, come pure alla ricerca e caratterizzazione di nuovi principi attivi vegetali di natura proteica da usare come immunostimolanti nelle terapie anti-cancro.

Introduzione alle problematiche degli OGM nella cultura italiana

In Italia il dibattito pubblico sugli OGM è pervaso di antimodernismo e sensazionalismo giornalistico. Intorno al blocco della ricerca si è unito un asse politico e sociale che sfrutta questa scelta nella comunicazione del Made in Italy, alimentando una sorta di neonazionalismo autarchico. La dimensione ormai multiculturale della nostra società richiederebbe, invece, una nuova laicità fondata su uno Stato neutrale tra le diverse concezioni. Non basta che la comunità scientifica si autogestisca nel produrre una conoscenza affidabile mediante percorsi collettivi di controllo e approvazione. Ci vorrebbe un'innovazione sociale che parta dagli scienziati e promuova la conoscenza come effettivo diritto di cittadinanza. In tal modo la scienza e il metodo scientifico diventerebbero concretamente un pilastro costitutivo della democrazia

■ Alfonso Pascale

In Italia sono pochi gli intellettuali che esprimono opinioni su problemi complessi valorizzando conoscenze acquisite con metodo scientifico e molteplici strumenti di misura. La maggior parte si limita ad accompagnare le opinioni con espressioni immaginifiche e ricorrendo, con disinvoltura, ai miti del primitivismo e alla retorica dell'apocalisse per risultare gradevoli all'interlocutore. C'è, dunque, un comportamento diversificato da parte degli esponenti della cultura nel contribuire a formare l'opinione dei cittadini. E questo non è irrilevante in un paese che vuole guardare con fiducia al futuro, puntando sull'innovazione.

Un fiero oppositore degli organismi geneticamente modificati (OGM) come Piero Bevilacqua, in una sua recente pubblicazione, così si esprime: "Non era mai

accaduto che un nuovo prodotto venisse immesso nel mercato a dispetto di una controversia scientifica così aspra qual è quella che oggi divide il mondo della ricerca" (Bevilacqua, 2008). Dopo quest'affermazione ci si aspetterebbe un'analisi del dibattito scientifico sugli ogm. Ma niente. L'intento sembra essere solo quello di svuotare di significato i dati scientifici. Anzi, rincarando ulteriormente la dose, lo storico continua: "Non si era mai visto, in tutta la storia secolare delle società industriali, un prodotto di dubbia utilità esporre in maniera tanto gratuita a rischi così elevati e imprevedibili la comunità umana". Una condanna netta da parte di uno studioso di storia dell'agricoltura, che sa perfettamente come da almeno diecimila anni i contadini hanno con sagacia e pazienza selezionato, modificato, ibridato piante e semi che l'infinita biodiversità della natura metteva loro a disposizione. Ciò che raccapriccia lo studioso è il trasferimento di materiale genetico appartenente a un'altra specie. Ma in realtà, la barriera della specie è stata già superata in natura più volte ed esistono svariate specie nuove. Il triticale, per esempio, deriva da incroci tra specie

■ Alfonso Pascale

Scrittore, studioso di sviluppo rurale e welfare locale

diverse. Com'è noto, la differenza rispetto al passato anche recente è che la tecnica adottata ora – quella del DNA ricombinante – consente una maggiore precisione.

La radicalità del rifiuto dipende forse dal fatto che le questioni biotecnologiche esorbitano la mera applicazione alle piante e riguardano l'uomo stesso? Oppure dal fatto che pongono problemi di potere che la politica ha difficoltà a regolare a livello globale con gli attuali strumenti della democrazia? Può darsi. E tuttavia, neanche di questi problemi si discute in profondità. Dopo le Grandi Speranze sembra non esserci altro che la disperazione.

Oltre la specie con speranze ragionevoli

Siamo appena entrati in una nuova rivoluzione tecnologica. E ciò che traspare all'orizzonte è il superamento della separazione tra storia della vita e storia dell'intelligenza. Le basi naturali della nostra esistenza smetteranno presto di essere un presupposto imm modificabile dell'agire umano. La nostra natura, nella sua interezza, diventerà un risultato storicamente determinato della nostra cultura. L'intelligenza umana e quella non biologica presto si alleeranno. E così entreremo nella cosiddetta "Singolarità". E quando sfonderemo tale soglia, saremo oltre la specie, in una dimensione non più "naturale" ma interamente "culturale" dell'umano. A detta dei futurologi, tale condizione aprirebbe prospettive inedite oggi difficili da intravedere.

In una cultura come quella italiana, nutrita di antimodernismo e di sensazionalismo giornalistico, la sola evocazione di siffatte novità suscita una reazione di rigetto. Ma senza peccare di ottimismo tecnologico e senza ricorrere ai grandi racconti fantascientifici, si possono senz'altro nutrire *speranze ragionevoli* entro un futuro incerto e difficile (Rossi, 2008). Tra l'Apocalisse e le Grandi Speranze c'è la giusta misura con cui guardare al domani a condizione, tuttavia, che in Italia si abbandoni la demonizzazione della tecnica applicata alla natura umana e alla natura in generale. La violenza della polemica ha sfiorato addirittura il paradosso. All'oncologo Umberto Veronesi che dichiarava in un articolo su *Repubblica* del 4 novembre

2004 "Se potessi scegliere, preferirei nutrirmi di mais transgenico", Bevilacqua replicava in modo perentorio: "Affermiamo senza difficoltà che, di fronte a un mondo a così alto rischio, la fede incondizionata che anche intellettuali liberi nutrono nei confronti della tecnoscienza rappresenta un aspetto costitutivo della superstizione contemporanea" (Bevilacqua, 2008).

Lo storico è un intellettuale di sinistra; eppure accusa di atteggiamento fideistico e superstizioso quei settori che si battono per la libertà della ricerca scientifica da posizioni positiviste e illuministe. Perché? I termini "fede" e "superstizione" tirati in ballo dallo studioso fanno emergere una novità che non tutti colgono: oggi non solo i diversi punti di vista sono percepiti come credenze o fedi, indipendentemente se queste siano religiose o meno, ma anche i dati scientifici sono assimilati alle credenze. Da una parte della cultura italiana il metodo scientifico non è più riconosciuto ed è considerato superfluo. Gli intellettuali che a esso continuano a ricorrere nella loro attività devono, pertanto, attrezzarsi per farlo valere nella società mediante un'azione pedagogica e un impegno civile di ripensamento della democrazia.

Laicità e innovazione sociale

Che si debba porre mano alla democrazia, ai suoi fondamenti etici e ai modi di produrre decisioni condivise, appare ormai scontato in una società che diventa sempre più multiculturale. Non si tratta solo di una molteplicità d'interessi particolari o di punti di vista limitati, che si possono trascendere in sintesi superiori, ma di un pluralismo che "è parte integrante dell'opera della ragione pratica libera, entro la cornice di libere istituzioni" (Rawls, 1994).

Dinanzi a questa novità, le istituzioni politiche dovrebbero assumere un atteggiamento laico e tollerante. Si tratta di accettare il pluralismo non come *modus vivendi* o come necessità, ma per adesione profonda a un regime di libertà e ai suoi principi. Pertanto, l'idea stessa di laicità, che non riguarda più solo il rapporto tra stato e confessioni religiose, andrebbe rifondata. La nuova laicità presuppone uno Stato neutrale tra le diverse concezioni e indipendente da qualunque dottrina (Mancina, 2009). Ma quando i

dati scientifici devono necessariamente supportare le decisioni, in che modo si potranno difendere da eventuali manipolazioni? Non è semplice rispondere a questa domanda. Si può tentare qui di prospettare un'ipotesi. La nuova laicità dovrebbe presupporre non già il mero riconoscimento di una comunità scientifica che si autogestisce nel produrre una conoscenza affidabile mediante percorsi collettivi di controllo e approvazione, bensì l'“immersione” degli scienziati nella società civile per interagire con l'insieme dei cittadini e contribuire “dal basso” alla formazione dei punti di vista. Si tratta, in sostanza, di produrre un'innovazione sociale che cambia la qualità e l'estensione delle relazioni per fare in modo che la conoscenza si diffonda e diventi effettivo diritto di cittadinanza. A quel punto la scienza e il metodo scientifico possono diventare concretamente un pilastro costitutivo della democrazia.

Di fronte a scenari che prospettano uno sviluppo rapidissimo delle biotecnologie, ci vorrebbe una politica capace di sognare progetti volti ad anticipare la forma civile e naturale che le grandi strutture della tecnoeconomia già cominciano a ridisegnare in solitudine e, dunque, nel pericolo.

Ma prima ancora della politica, avremmo bisogno di una nuova etica, che dovrebbe maturare nella società civile. Di quale etica? A questa domanda un altro storico, Aldo Schiavone, che da tempo riflette su tali questioni, così risponde: “Di un'etica che sappia trovare il divino nell'accrescersi delle facoltà dell'umano e non nella sacralità della natura. Di un'etica della trasformazione e non della conservazione; che accolga le responsabilità e non le respinga; che non rifiuti l'aumento illimitato di potenza, ma ne determini gli obiettivi; che non consideri definitivo nessun assetto biologico o sociale, ma accetti di considerarli tutti come figure del mutamento e della transizione; che cerchi le sue leggi non nella natura, ma nell'intelligenza e nell'amore (Schiavone, 2007)”.

È questo il livello cui il dibattito sulle biotecnologie dovrebbe tendere per favorire percorsi efficaci, benché complessi, al fine di giungere a decisioni condivise. Ma in Italia le istituzioni (e anche i mass media) non garantiscono condizioni d'imparzialità, indipendenza e laicità per un confronto civile tra le

diverse posizioni. E nelle reti sociali non nascono ancora azioni di monitoraggio e correzione (con analisi di dati dettagliati e rigorosi ricorsi alle fonti scientifiche), interdisciplinari e gratuite, a sostegno delle persone che intendono avvalersene nella formazione delle opinioni.

Dall'amaca alla cabala

Quando a metà settembre del 2012, il settimanale *Nouvel Observateur* ha annunciato un articolo scientifico che accusava un mais ogm, resistente al glifosato, e questo stesso erbicida di produrre tumori nei topi, Michele Serra ha dedicato alla notizia una sua Amaca. “Immaginate un enorme estensione di terreno agricolo – ecco il nucleo dello scritto – e che su quel terreno venga sparso un diserbante che uccide tutte le specie tranne una, una semente transgenica progettata per resistere, lei sola, al diserbante. Una specie brevettata, non disponibile in natura, proprietà esclusiva della multinazionale che l'ha creata. Questa sorta di Soluzione Finale è l'agricoltura intensiva resa possibile dagli ogm”.

Dall'amaca su cui è felicemente sdraiato, il giornalista non si occupa dell'esperimento farlocco che associa il consumo di mais ogm all'insorgenza di tumori nei topi – che era l'oggetto della notizia da cui aveva preso spunto per il suo scritto – ma attira l'attenzione dei suoi lettori esclusivamente sull'erbicida, snobbando l'argomento scientifico. Tant'è che la sua nota si chiude così: “Ha senso un sistema di produzione del cibo, e di gestione della terra, che stermina le piante ritenute “inutili” (quasi tutte) e di conseguenza azzerava un habitat che ha impiegato milioni di anni a formarsi e trovare equilibrio? La salute dell'uomo non appare quasi un dettaglio, se è la salute di un pianeta intero a essere sotto attacco?” (*Repubblica*, 21 settembre 2012). A Michele Serra non interessava per niente che, in agricoltura, la lotta alle malerbe fosse da sempre uno dei pilastri della produttività e che l'uso di ogm resistenti agli erbicidi fosse, da qualche tempo, un modo più ecologico rispetto all'uso di più erbicidi, pratica – questa sì! – capace di sconvolgere l'equilibrio della flora infestante e di inquinare di più. La notizia giunta dalla Francia – a prescindere se fosse o no una

bufala – semplicemente gli serviva per annunciare la Soluzione Finale.

Qualche anno prima, Mario Capanna, presidente della *Fondazione dei Diritti Genetici*, durante una puntata di *Uno mattina* aveva sostenuto con molta *nonchalance* di aver visto un ogm particolare, la fragola pesce, ormai nota leggenda metropolitana. E Carlo Petrini, fondatore di *Slow Food*, aveva dichiarato su *L'Espresso* che le piante mal sopportano le modifiche genetiche. Un'affermazione palesemente infondata se si guarda solo al numero delle mutazioni, naturali e artificiali, del frumento.

I casi citati sono soltanto gli ultimi che caratterizzano l'approccio di alcuni personaggi famosi al tema dell'ingegneria genetica in agricoltura: un pretesto per avvalorare credenze, arrivando fino alla manipolazione dei fatti.

Dagli anni Novanta, non poche decisioni politiche sono state prese sulla base di falsificazioni di fatti scientifici. La discussione intorno alla legge sulla procreazione assistita e il successivo referendum vanno visti come un passaggio essenziale nella cultura pubblica italiana. Emersero allora affermazioni molto gravi. Ad esempio, quella che la tesi secondo cui l'embrione è persona non sarebbe nata in seno alla dottrina cattolica, bensì sarebbe una tesi scientifica e una verità naturale. Oppure quella che l'etica sarebbe il luogo di verità assolute, le quali poggerrebbero sul diritto naturale; e, di conseguenza, le questioni etiche trascenderebbero lo spazio della negoziazione politica.

Siamo, insomma, all'etica come giustificazione della menzogna. Volete un altro esempio? Inaugurando la Conferenza sui cambiamenti climatici, tenutasi presso il Palazzo della FAO nel 2007, l'allora ministro dell'Ambiente, Alfonso Pecoraro Scanio, adottò un tono sicuramente apocalittico, prefigurando un'ecatombe imminente, anzi già avvenuta: "Il cambiamento climatico è qui e ora", disse il ministro alla platea preoccupata. "Già ora la temperatura in Italia è aumentata quattro volte di più che nel resto del mondo". Era una bufala. Il ministro ambientalista si esercitava nella cabala.

Come ha scritto Francesca Santolini, "il catastrofismo di Pecoraro non ha certo aiutato a radicare nell'opinione pubblica una maggiore sensibilità ecologica, contribuendo al contrario a diffondere quella che

alcuni osservatori hanno definito la *sindrome del Titanic*" (Santolini, 2010). Se si sta affondando e non ci sono speranze di salvezza né per la nave né per i passeggeri che senso può avere affannarsi? Tanto vale godersi gli ultimi attimi prima del disastro sorseggiando champagne sul ponte e ascoltando l'orchestrina di bordo che suona le sue ultime canzoni. E tal effetto si ha perché i dati scientifici non servono al politico per formarsi quella base di conoscenza a lui indispensabile per prendere delle decisioni. Egli preferisce utilizzare il procedimento inverso, cercando nei dati le "pezze d'appoggio" a sostegno delle proprie tesi.

Un altro caso simile dimostra come la manipolazione dei fatti ha ormai assunto caratteristiche bipartisan. Nell'inverno 2009, alcuni senatori del Pdl hanno proposto nientemeno una delibera perché il corpo legislativo dello Stato si pronunciasse sul grado di pericolosità del riscaldamento globale. La delibera afferma innanzitutto che il fenomeno è in realtà modesto, che la sua causa non è legata all'emissione di anidride carbonica provocata dalle attività umane, e che in ogni caso se la temperatura salisse un po' si starebbe tutti meglio. Pare superfluo ogni commento.

Blocco della ricerca e civismo italico

Tra la fine degli anni Novanta e gli inizi del Duemila, in modo bipartisan fu vietato, con due successivi decreti del Ministero delle Politiche agricole, lo studio degli ogm in campo aperto. Il primo provvedimento fu firmato da Pecoraro per tenere insieme l'ambientalismo nostrano con la sinistra antagonista, e il secondo da Gianni Alemanno, il quale, con l'avversione agli ogm, volle segnalare che il suo approdo al neocomunitarismo conservatore non rigettava le vecchie pulsioni antimoderniste e antitecnocratiche (Alemanno, 2002). Si trattò di una chiusura alla ricerca scientifica che ancora oggi non si riesce a rimuovere. Un caso clamoroso che andrebbe meglio approfondito, rovistando nelle analisi sulle virtù civiche degli italiani.

La ricerca pubblica del nostro paese era, infatti, all'avanguardia nell'affrontare una serie di problemi creati dalla "rivoluzione verde". E molti studiosi

vedevano nelle nuove conoscenze e nei nuovi strumenti tecnologici una seria possibilità per farlo. Ma le istituzioni interrompono queste attività che non vengono più finanziate.

Intanto c'è da chiedersi se tali comportamenti siano un tratto specifico della nostra cultura nazionale. Gilberto Corbellini, storico della medicina, sostiene che in Italia esiste una tradizione sociale e culturale antropologicamente refrattaria all'empirismo e al pragmatismo. E ha prevalso, a ogni livello, un indottrinamento ispirato da un'etica dei principi assoluti per cui le convinzioni e le intenzioni contano di più delle conseguenze nel dar conto di una scelta o di un'azione (Corbellini, 2011).

È difficile non condividere questo giudizio. E a proposito del nesso tra atteggiamento antiscientifico e debole spirito civico, la sociologa Loredana Sciolla ha sviluppato alcune interessanti analisi dei dati empirici raccolti attraverso *surveys* internazionali (Sciolla, 2004). Secondo la studiosa, l'Italia si è sviluppata come gli altri paesi democratici, ma è rimasta a livelli più bassi sul piano dell'informazione, della competenza, della fiducia e soddisfazione per la democrazia. C'è, in particolare, un elemento che ci differenzia dalle altre democrazie occidentali e riguarda "la sfera morale dei valori". Facendo riferimento al modello di Ronald Inglehart, che ha descritto il cambiamento dei valori prevalenti nelle democrazie avanzate, da "materialisti" (collegati a sicurezza economica e fisica) a "postmaterialisti" (basati su autorealizzazione, qualità dei rapporti interpersonali e libertà di parola), Sciolla illustra l'anomalia dell'Italia. Infatti, in tutti i paesi dove sono avvenuti i cambiamenti descritti da Inglehart, l'abbandono dei valori e delle credenze tradizionali non ha voluto dire un'eclisse della morale, ma una transizione verso quel "politeismo dei valori" che promuove il pluralismo e infonde dinamicità alla democrazia. In Italia, questa transizione non è mai avvenuta. L'Italia è precipitata in basso se si considera la laicità, il rispetto delle regole e le virtù civiche.

Autarchia o innovazione?

Intorno al blocco della ricerca sugli ogm si è unito un asse politico e sociale che sfrutta questa scelta nella

comunicazione del *Made in Italy* agroalimentare. Un asse rinchiuso nella tutela di una malintesa italianità, frutto del raggrumarsi di subculture che rispondono impaurite e rabbiose alla globalizzazione e ai nuovi equilibri mondiali, in cui emergono paesi con un tasso di crescita prima inimmaginabile. Un'alleanza che preme sul governo per bloccare l'utilizzo in Italia delle sementi ogm approvate da Bruxelles; che ottiene dal Parlamento leggi sull'etichettatura degli alimenti o sulla percentuale di *alchil esteri* nell'olio d'oliva da usare come armi puntate verso gli organismi europei per tentare di condizionarne le scelte.

Emerge, dunque, una sorta di neonazionalismo autarchico che esclude ogni collaborazione con le agricolture di altri paesi, considerate come nemiche da combattere, e preme ostinatamente sulle istituzioni nazionali perché riguadagnino quella sovranità che un tempo si sarebbe sacrificata volentieri per l'obiettivo di un ideale europeo.

Il tutto nasce da due elementi strettamente connessi. In primo luogo dall'esasperazione dell'idea di tipicità, considerata come strategia unica che permetterebbe di affrontare la globalizzazione eludendo la competizione da costi. E in secondo luogo dalla costruzione di un mito originario basato su un presunto insanabile contrasto tra produzioni tipiche e ogm, negando così in radice l'assunto scientifico su cui i nostri ricercatori di "seconda generazione" avevano avviato le nuove sperimentazioni (Pascale, 2012). E la cosa grave è che si fa passare questa tesi antiscientifica nell'opinione pubblica, mediante programmi promozionali, con un dispendio insensato di risorse pubbliche e in barba a ogni criterio di laicità e indipendenza delle istituzioni. Il teorema costruito sulle coppie tipico/sano e ogm/dannoso, tipico/naturale e ogm/artificiale, tipico/italiano e ogm/straniero, tipico/imprese locali e ogm/multinazionali, è dunque la miope invenzione di chi si è seduto sul ramo che egli stesso sta tagliando.

Sta, infatti, avvenendo qualcosa che ha diversi punti in comune con l'affermazione e il crollo del primato culinario italiano tra Medioevo e Rinascimento, raccontato dallo storico Ruggiero Romano. Nel Trecento la cucina era soltanto una pratica e nel secolo successivo diventa anche un'arte, in parallelo con l'evoluzione dei modelli culturali nell'architettura

e nelle lettere dell'Italia comunale-mercantile. Ma una volta che il modello raggiunge il top, non si creano più piatti nuovi e l'attenzione alla qualità si sposta sul servizio. La tavola diventa pretesto per musica, danze, canto, teatro, giochi, conversazioni. Si vive di rendita, ritenendo di dover confermare quanto già inventato nel passato, senza dover far leva sull'innovazione. Si esasperano fino alla tracotanza i motivi che in origine avevano costituito la forza del nostro modello. Ci si ripiega su se stessi e non si ricercano più nuovi sentieri. Di fatto, si spegne ogni creatività. E così il nostro modello è ripreso fuori d'Italia, assorbito, assimilato, digerito fino a farne qualcosa di diverso che l'Italia del XVII secolo è costretta a importare (Romano, 1994). È quanto accade oggi al modello agroalimentare italiano con l'approccio autarchico e l'identificazione del naturale con il bene e l'artificiale con il male. A questo proposito e non senza una punta di ironia, il filosofo e storico della scienza Paolo Rossi, recentemente scomparso, ha affermato: "Siamo afflitti da una quantità – che a molti pare francamente eccessiva – di riviste e di trasmissioni televisive che spiegano ed esaltano specifiche tradizioni gastronomiche, nonché le pastasciutte, gli arrostiti, i formaggi, i dolci, le frutta, i vini di una località già nota, sempre più spesso di un piccolo e finora poco conosciuto paese che cerca di farsi spazio nel mondo della gastronomia" (Rossi, 2011). E trattando il tema del primitivismo che riemerge nella lotta odierna contro la scienza e la tecnica da parte dei "neonazionalisti autarchici", l'illustre studioso ha ricordato che "tutto ciò che chiamiamo civiltà e cultura ebbe inizio perché i nostri più lontani progenitori scelsero di non adottare il cosiddetto *principio di precauzione*. Se lo avessero adottato saremmo ancora simili alle scimmie delle prime inquadrature di *2001 Odissea nello spazio*". Fortunatamente anche altri intellettuali si stanno schierando contro questa deriva, mostrando passione civile e attenzione fiduciosa alle facoltà dell'ingegno umano. Lo scrittore Antonio Pascale dedica di continuo saggi e interventi su questi temi. L'inviato speciale della RAI, Elio Cadelo, ha pubblicato alcuni libri che spiegano in modo scientifico cosa sono gli ogm (Cadelo, 2012). Il giornalista Luigi Caricato dirige la rivista on line *Teatro Naturale*, aperta al confronto

tra diversi punti di vista. Il chimico Dario Bressanini cura il blog *Scienza in cucina*, svolgendo un'opera di divulgazione scientifica senza pregiudizi. Il ricercatore Roberto Defez cura il blog *Salmone.org*, da cui si possono ottenere informazioni sugli ogm. Sarebbe davvero un delitto se proprio ora che gli scambi non solo economici diventano nel mondo più ampi e ramificati, rinunciassimo alla nostra principale prerogativa: quella di assimilare più culture e ricrearle in modo così originale da farle apparire come se fossero sempre appartenute al nostro DNA. È questo il senso più profondo del "saper fare" che la nostra storia ci consegna. Anziché difenderci dai paesi emergenti con le leggi e i tribunali, faremmo meglio a coltivare gli scambi culturali, la ricerca scientifica, la creatività, il gusto di essere imitati per ricavarne la stimolo a superare noi stessi. Anziché continuare a vivere di rendita, sarebbe ora di attivare la molla dell'innovazione, che oltre ad essere tecnologica, dev'essere un'innovazione sociale, cioè fondata su un nuovo rapporto tra scienza e società civile.

Bibliografia

- [1] Alemanno Gianni, *Intervista sulla destra sociale*, Marsilio, Venezia, 2002.
- [2] Bevilacqua Piero, *Miseria dello sviluppo*, Gius. Laterza & figli, Roma-Bari, 2008.
- [3] Cadelo Elio, *Perché gli ogm*, Palombi Editori, Roma, 2012.
- [4] Corbellini Gilberto, *Scienza, quindi democrazia*, Einaudi, Torino, 2011.
- [5] Mancina Claudia, *La laicità al tempo della bioetica*, Il Mulino, Bologna, 2009.
- [6] Pascale Antonio, *Pane e pace*, Chiarelettere, Milano, 2012.
- [7] Rawls John, *Liberalismo politico*, Edizioni di Comunità, Milano, 1994.
- [8] Romano Ruggiero, *Paese Italia. Venti secoli di identità*, Donzelli, Roma, 1994.
- [9] Rossi Paolo, *Speranze*, Il Mulino, Bologna, 2008.
- [10] Rossi Paolo, *Mangiare*, Il Mulino, Bologna, 2011.
- [11] Santolini Francesca, *Passione verde. La sfida ecologista alla politica*, Marsilio, Venezia, 2010.
- [12] Schiavone Aldo, *Storia e destino*, Einaudi, Torino, 2007.
- [13] Sciolla Loredana, *La sfida dei valori. Rispetto delle regole e rispetto dei diritti in Italia*, Il Mulino, Bologna, 2004.

Mais OGM: la Corte di Giustizia Europea bocchia il Ministero delle Politiche Agrarie

■ Barbara Di Giovanni, Laura Maria Padovani

Il 6 settembre 2012 la sentenza C-36/11 della Corte di Giustizia europea rivoluziona la messa in coltura di organismi geneticamente modificati, autorizzandola anche in Italia. La decisione fa seguito a un contenzioso avviato dalla Pioneer Hi-Bred nei confronti del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (Mipaaf), non avendo ottenuto da quest'ultimo l'autorizzazione a coltivare i suoi ibridi di mais geneticamente modificato appartenente alla varietà M810. Nonostante la coltivazione fosse già iscritta nel Catalogo Comune Europeo, essa veniva comunque negata dal governo italiano poiché mancavano le norme regionali di coesistenza e di salvaguardia delle specie autoctone e dell'ambiente. Pertanto, "nelle more dell'adozione da parte delle regioni di norme idonee a garantire la coesistenza tra colture convenzionali, biologiche e transgeniche" (Paragrafo 2 della sentenza) il "no agli OGM" veniva adottato a livello nazionale.

La sentenza C-36/11, al contrario,

dispone che la messa in coltura di organismi geneticamente modificati – quali le varietà del mais MON 810 – non possa essere assoggettata a una procedura nazionale di autorizzazione quando l'impiego e la commercializzazione di tali varietà siano autorizzati da un regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio (ai sensi dell'articolo 20 del regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio) relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati. Le medesime varietà sono, infatti, state iscritte nel catalogo comune europeo delle varietà delle specie di piante agricole (direttiva 2002/53/CE del Consiglio, del 13 giugno 2002, relativa al catalogo comune delle varietà delle specie di piante agricole, emendata con il regolamento n. 1829/2003). Per di più, l'articolo 26 bis della direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati (che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio, come modificata dalla direttiva 2008/27/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'11 marzo 2008) "non consente a uno Stato membro di opporsi in via generale alla messa in coltura sul suo territorio di tali organismi geneticamente modificati

nelle more dell'adozione di misure di coesistenza dirette a evitare la presenza accidentale di organismi geneticamente modificati in altre colture".

Per le suddette ragioni, la Corte di Giustizia europea, all'articolo 69 della sentenza sancisce che "allo stato attuale del diritto dell'Unione, uno Stato membro non è libero di subordinare a un'autorizzazione nazionale, fondata su considerazioni di tutela della salute o dell'ambiente, la coltivazione di OGM autorizzati in virtù del regolamento n. 1829/2003 ed iscritti nel catalogo comune in applicazione della direttiva 2002/53".

In conclusione, in questa sentenza sono affermati due principi fondamentali. Il primo è che l'Italia non può imporre ai coltivatori italiani di sementi OGM che siano già state autorizzate nell'Unione Europea, di richiedere una nuova autorizzazione a livello nazionale. Il secondo è che l'Italia non può vietare la coltivazione di OGM già autorizzati in Europa, in attesa dell'emanazione di norme di coesistenza la cui introduzione è soltanto facoltativa per gli Stati membri. Il rischio è che, nell'ipotesi in cui uno Stato membro si astenga da qualunque intervento nel settore, si adotti questo espediente per impedire la libera circolazione degli OGM "sine die".

■ **Barbara Di Giovanni,
Laura Maria Padovani**
ENEA, *Unita Tecnica Sviluppo
Sostenibile ed Innovazione
del Sistema Agro-Industriale*

Biotechnologie e sicurezza alimentare

Grazie all'innovazione tecnologica ed organizzativa, l'agricoltura mondiale produce oggi alimenti più che sufficienti a nutrire una popolazione di 7 miliardi di persone. Ciononostante, 870 milioni di persone soffrono la fame. La crescita demografica, il processo di progressiva urbanizzazione della popolazione ed il cambiamento delle diete accresceranno la domanda globale di alimenti, che nel 2050 sarà del 60% più alta rispetto a quella odierna. La sfida che ne deriva è ulteriormente aggravata dal cambio climatico e dalla erosione delle risorse naturali che forniscono la base per la produzione di alimenti. Tra le altre misure necessarie per conseguire in modo sostenibile la sicurezza alimentare, che vengono brevemente discusse, l'articolo esamina l'aumento della produttività agricola ed il ruolo che sta giocando e che dovrà giocare in futuro la innovazione in agricoltura in genere e quello della applicazione delle biotecnologie agricole in particolare

■ *Andrea Sonnino*

Introduzione

Le crisi del prezzo dei prodotti alimentari verificatesi negli ultimi anni hanno riportato alla ribalta la drammaticità dell'insicurezza alimentare e l'urgenza di questo problema globale, cosicché esso ha riottenuto il meritato ordine di priorità nelle agende politiche internazionali, dopo molti anni di oblio o di scarsa attenzione. Se però risulta universalmente condiviso il concetto che dobbiamo assicurare a tutti il diritto all'alimentazione, perdura molta confusione nelle discussioni relative a come si può raggiungere questo obiettivo: il partito produttivistico-tecnologico propugna l'equazione per cui la persistenza di denutrizione può essere risolta accrescendo la produzione di alimenti e pertanto mediante forti iniezioni di tecnologia nei processi produttivi, ivi comprese le biotecnologie; la corrente ambientalista-

solidaristica osserva che l'attuale produzione di alimenti è sufficiente a sfamare l'intera umanità e ritiene quindi che non sia necessaria l'immissione di nuove tecnologie (e men che meno di biotecnologie), ma che bisogna al contrario migliorare la distribuzione del cibo prodotto attraverso interventi di natura politica e sociale e migliorare semmai la sostenibilità delle produzioni agricole.

Questo lavoro si propone di portare chiarezza su questa diatriba, dimostrando come ambedue le tesi siano parzialmente corrette ma, nel contempo, riducano il problema a termini troppo semplicistici e quindi siano, in fin dei conti, ambedue sbagliate. Sarà inoltre discusso il contributo delle biotecnologie al conseguimento della sicurezza alimentare.

La sicurezza alimentare

Definizione e componenti

Il primo elemento di chiarezza che deve essere considerato è la definizione di sicurezza alimentare e del suo contrario, l'insicurezza alimentare. Vi è un largo consenso internazionale nel definire la sicurezza alimentare come l'accesso fisico ed economico

■ **Andrea Sonnino**

Chief, Research and Extension Branch - Food and Agriculture Organization of the UN (FAO)

permanente di tutta la popolazione agli alimenti sani e nutrienti di cui necessita per soddisfare i propri fabbisogni e le proprie preferenze alimentari e per condurre una vita sana ed attiva. La sicurezza alimentare viene riconosciuta pertanto come la risultante di quattro elementi essenziali, che si debbono realizzare contemporaneamente: (i) disponibilità adeguata di alimenti, (ii) accesso al cibo da parte di tutta la popolazione, (iii) stabilità nel tempo della disponibilità e dell'accesso, e (iv) utilizzazione del cibo.

Il primo elemento si riferisce alla disponibilità di alimenti di buona qualità igienico-sanitaria e nutrizionale, sia prodotti localmente che importati. Molti paesi in via di sviluppo hanno ottime capacità di produzione agricola o di importazione di alimenti, per cui la disponibilità di alimenti non è il problema principale per la sicurezza alimentare, se non nei casi di emergenze umanitarie e catastrofi naturali.

La seconda dimensione è relativa all'accesso fisico ed economico agli alimenti necessari per una vita attiva e sana, e comprende il potere di acquisto, cioè che la popolazione abbia la disponibilità economica per comprare gli alimenti di cui abbisogna. In altre parole, se vi è disponibilità di alimenti, ma la gente non ha il denaro per acquistarli, allora si ha insicurezza alimentare. Per molti paesi in via di sviluppo è questa la dimensione più problematica.

La terza dimensione consiste nella utilizzazione degli alimenti, perché si può fare un uso appropriato degli alimenti solo se si è sani, se si ha la possibilità di scegliere gli alimenti più adatti ad ogni età e di adeguata qualità igienico-sanitaria, e se si dispone di accesso all'acqua potabile.

Il quarto elemento riguarda il fatto che tutti dovrebbero avere accesso continuo agli alimenti e non correre il rischio di rimanere vittima di crisi economiche o ambientali improvvise o di fenomeni ciclici come la volatilità dei prezzi delle derrate alimentari. Questa dimensione sta assumendo maggiore importanza a causa della crisi finanziaria e dei problemi causati dal cambio climatico.

Questo approccio contribuisce già notevolmente a chiarire alcuni aspetti della questione esposta nella introduzione a questo scritto. In particolare, la distinzione tra disponibilità di alimenti ed accesso

inizia a spargere luce sul preteso conflitto tra produzione ed equità sociale.

La situazione attuale

Per molti anni i programmi di ricerca agricola hanno perseguito lo sviluppo di tecnologie che permettessero di aumentare la produttività a livello di azienda agricola, mentre il mercato e le politiche pubbliche agivano come promotori di innovazione tecnologica in agricoltura. Questo modello ha permesso di ottenere gli spettacolari progressi verificatisi nei paesi industrializzati nel secondo dopoguerra e nei paesi in via di sviluppo durante la Rivoluzione Verde. In particolare la produzione agricola è cresciuta tra le 2,5 e le 3 volte negli ultimi 50 anni (FAO, 2011a), ed è quindi arrivata oggi a livelli sufficienti a soddisfare il fabbisogno alimentare della popolazione mondiale, nonostante questa sia raddoppiata tra il 1960 ed il 2003 e raggiunga oggi i 7 miliardi di persone (UN Population Division, 2011). La disponibilità pro-capite di alimenti è anzi aumentata del 27% nel medesimo periodo (figura 1).

Nonostante la grande crescita della produzione agricola, che ha portato ad una situazione di generale abbondanza, il sistema alimentare mondiale ha fallito per due grandi aspetti, che richiedono urgente azione: 1. quasi 870 milioni di persone - vale a dire una su otto - hanno sofferto di malnutrizione cronica nel biennio 2010-2012. La maggioranza delle persone che soffrono la fame - circa 852 milioni - vive nei paesi in via di sviluppo, mentre i restanti 16 milioni vivono nei paesi sviluppati. Nel periodo compreso tra il 1990-92 e il 2010-12 il numero totale delle persone che soffrono la fame è diminuito di 132

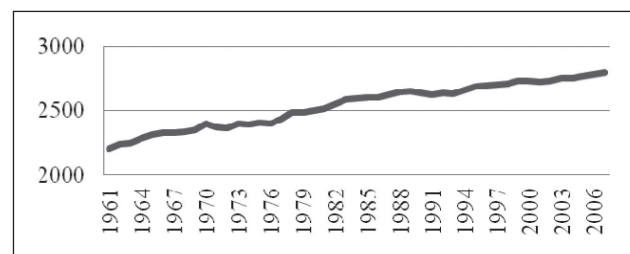


FIGURA 1 Offerta globale di alimenti (kcal/capita/d)
Fonte: FAO

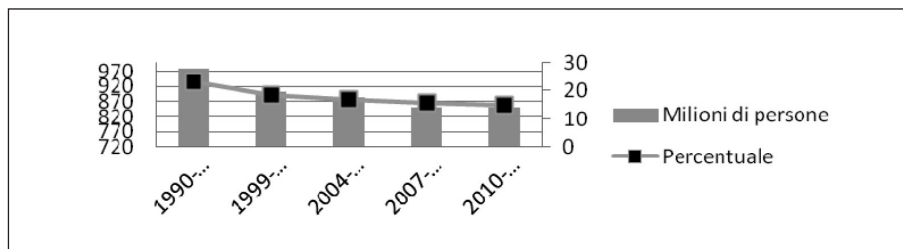


FIGURA 2 Numero e percentuale di persone malnutrite nei paesi in via di sviluppo
Fonte: FAO, WFP and IFAD, 2012

milioni, passando dal 18,6% della popolazione mondiale al 12,5%, e dal 23,2% al 14,9% nei paesi in via di sviluppo (figura 2). Al problema della denutrizione va sommato quello della malnutrizione: più di un miliardo di persone, pur assumendo un numero adeguato di calorie, non consumano sufficienti proteine, vitamine e minerali, con serie conseguenze sulla loro salute fisica e mentale. Per esempio, l'anemia derivata da deficienza di ferro è responsabile del 20% della mortalità materna a livello globale, ritarda la crescita nei bambini e riduce la capacità lavorativa degli adulti. Un secondo esempio è rappresentato dalla deficienza di vitamina A che colpisce 40 milioni di persone, causando cecità e contribuendo ad aumentare la prevalenza di infezioni ed altre malattie.

2. l'aumento della produttività agricola è stato spesso accompagnato dallo sfruttamento eccessivo delle risorse idriche e dei suoli e quindi dal deterioramento delle risorse naturali e dei servizi ecosistemici connessi. Negli ultimi 50 anni l'area coltivata globale si è ampliata solo del 12%, mentre l'area irrigata si è più che raddoppiata nel medesimo periodo (+117%). Gli aumenti di produzione sopra riportati sono quindi stati ottenuti soprattutto mediante miglioramenti della produttività: basti pensare che la superficie di terra coltivata per

persona è gradualmente diminuita da 0,45 a 0,22 ettari (tabella 1). L'intensificazione della produzione agricola ha permesso di limitare la deforestazione, alleggerendo la pressione verso l'espansione della frontiera agricola, ma ha in molti casi compromesso la sostenibilità della produzione agricola. Si calcola infatti che circa il 25% delle terre coltivate ha suoli altamente degradati, cui si deve aggiungere un ulteriore 8% di superficie con suoli moderatamente degradati. Sfortunatamente, le zone con suoli più degradati coincidono con quelle in cui la povertà è più pervasiva. L'agricoltura usa oggi circa l'11% della terra disponibile e il 70% delle risorse idriche mondiali. Anche la rapida erosione delle risorse genetiche vegetali ed animali che costituiscono la base della agricoltura aumenta la vulnerabilità delle coltivazione e degli alimenti a patogeni, parassiti e stress ambientali (Sonnino, 2011).

È quindi corretto affermare che l'attuale produzione di alimenti è sufficiente a sfamare tutta l'umanità, ma iniquamente distribuita, talché interventi di natura sociale e politica sono prioritari, come è giusto invocare provvedimenti per migliorare la sostenibilità della agricoltura.

La sicurezza alimentare in prospettiva

Esaminiamo adesso il problema della sicurezza

	1961	2009	Differenza percentuale 1961-2009
Superficie coltivata (Milioni di Ha)	1368	1527	12%
<i>Di cui:</i>			
• senza irrigazione (Milioni di Ha)	1229	1226	-0,2%
• con irrigazione (Milioni di Ha)	139	301	117%
Superficie coltivata procapite (Ha)	0,45	0,22	-51%

TABELLA 1 Cambiamenti netti di destinazione d'uso della terra e della superficie coltivata per persona (1961-2009)
Fonte: FAO (2011)

alimentare in un'ottica di prospettiva. Secondo le proiezioni dell'ONU, la popolazione mondiale supererà i 9,1 miliardi di persone nel 2050 (FAO, 2009), con quasi tutta la crescita a carico dei paesi in via di sviluppo (figura 3). Continuerà inoltre il processo di urbanizzazione, che ha visto negli ultimi 50 anni 800 milioni di individui abbandonare le aree rurali. Nel 2050 circa il 70% della popolazione mondiale vivrà nelle città, lontano dalle zone di produzione degli alimenti, contro il 50% di oggi. Il miglioramento delle condizioni economiche di vasti strati della popolazione, soprattutto nei paesi emergenti, congiuntamente al processo di urbanizzazione, sta determinando, e sempre più determinerà, cambi significativi delle diete, con diminuzione della quota di cereali e alimenti di base e aumento di ortaggi, frutta, carne, pesce e prodotti lattiero-caseari, tutti alimenti più nutritivi, ma anche più dispendiosi in termini di risorse naturali necessarie per produrli (figura 4). Con una popolazione più numerosa, più urbanizzata e, nel medio termine, più ricca, la sfida sarà quella di soddisfare la domanda globale di

alimenti, che nel 2050 sarà del 60% più alta rispetto a quella odierna (FAO, 2009).

L'aumento di produzione agricola necessario per far fronte all'accresciuta domanda di alimenti e di altri prodotti agricoli deve essere raggiunto in una condizione di erosione delle risorse naturali che sono alla base dell'agricoltura, come ricordato nel capitolo precedente: terra, acqua, fertilità del suolo sono limitati ed il loro uso non può espandersi all'infinito ma, anzi, subisce la competizione crescente da parte di altre utilizzazioni alternative.

La sfida globale di aumentare la produzione di alimenti è esacerbata dal cambio climatico, che ha profonde conseguenze sulla agricoltura, particolarmente vulnerabile ad ogni cambiamento delle condizioni ambientali. Il cambio climatico sta infatti modificando la frequenza e la distribuzione delle precipitazioni e dei fenomeni meteorologici estremi, come i picchi di temperatura, le siccità e le alluvioni. Il cambio climatico sta inoltre alterando la distribuzione geografica delle popolazioni di piante infestanti e di patogeni e parassiti. Gli effetti del

FIGURA 3 Evoluzione della popolazione mondiale totale, della popolazione dei paesi in via di sviluppo e dei paesi industrializzati, della percentuale della popolazione residente in aree rurali
Fonte: FAO

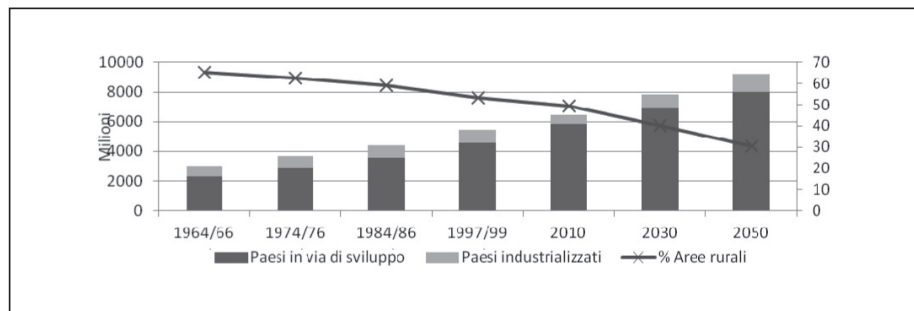
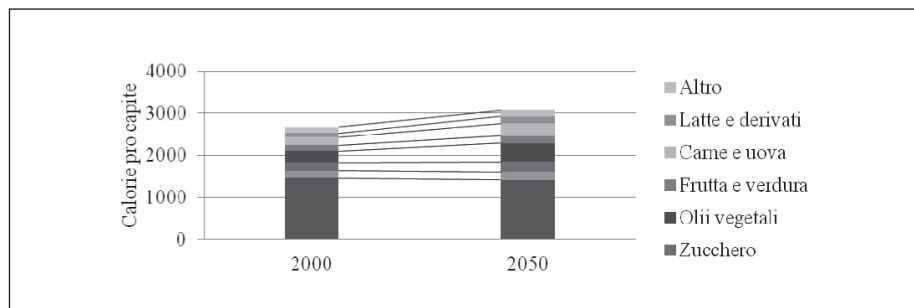


FIGURA 4 Cambiamento della composizione della dieta media (2000 -2050)
Fonte: FAO



cambio climatico sulla agricoltura saranno però, e già sono, sproporzionatamente più gravi nelle aree più vulnerabili e soggette ad insicurezza alimentare (Beddington et al., 2011) e colpiranno soprattutto gli strati più poveri della popolazione, che hanno inferiori capacità di adattamento. Anche un aumento di temperatura di 2 °C, che corrisponde allo scenario più ottimistico, comporterà in Africa e Asia Meridionale una perdita permanente delle entrate annuali delle aziende agricole del 4-5%. In alcune zone del pianeta, specialmente nelle aree a clima temperato, e quindi nei Paesi industrializzati, il cambiamento climatico può portare invece ad un moderato incremento della produzione agricola.

Come conseguire la sicurezza alimentare

L'agricoltura offre la base per vincere la sfida della sicurezza alimentare: 3 miliardi di persone vivono oggi nelle aree rurali (World Bank, 2007), la vasta maggioranza delle quali è direttamente o indirettamente coinvolta in attività di produzione agricola e per la vasta maggioranza delle quali l'agricoltura rappresenta la più importante fonte di sostentamento. Inoltre, 3 persone povere su 4 vivono nelle aree rurali (World Bank, 2007). I paesi in via di sviluppo contano su una base produttiva di 404 milioni di aziende agricole con meno di 2 Ha, che danno lavoro a 1,5 miliardi di persone e la cui produzione alimenta circa 2 miliardi di persone (IAASTD, 2008). A questi piccoli agricoltori bisogna aggiungere tra i 100 e i 200 milioni di pastori (Convention on Biological Diversity, 2010), 410 milioni di persone che vivono dei prodotti delle foreste e 100 milioni di pescatori su piccola scala (Kura, et al., 2004), per tacere degli 800 milioni di persone che vivono in aree urbane, ma sono coinvolti in attività di coltivazione di orti urbani

(World Watch Institute, 2007). Ne consegue che la crescita del settore agricolo nei paesi a basso reddito e marcatamente agricoli, creando occupazione e reddito per i piccoli agricoltori, è due volte più efficace della crescita degli altri settori produttivi per la riduzione della fame e della povertà (World Bank, 2008).

Le politiche di sicurezza alimentare poggiano su 4 aree di azione prioritaria:

(i) aumento degli investimenti in agricoltura

La causa fondamentale della fame è l'insufficienza di investimenti nel settore agricolo nei paesi in via di sviluppo. È dimostrato, infatti, che gli investimenti nel settore agricolo hanno rendimenti in termini di sviluppo da due a quattro volte più alti degli investimenti in altri settori (Juma, 2011). La quota degli interventi di cooperazione allo sviluppo destinati al settore agricolo, forestale e della pesca è diminuita dal 19% nel 1980 al 5% attuale, anche se ha cominciato a risalire negli ultimi anni. La percentuale della spesa pubblica destinata all'agricoltura è scesa dal 1980 al 2002 dal 14,8 all'8,6% in Asia, dall'8,0 al 2,5% in America Latina, e dal 6,4 al 4,5% in Africa (Figura 5).

(ii) ampliamento dell'accesso agli alimenti

Programmi di protezione sociale per assistere i più poveri e vulnerabili e per migliorarne l'accesso agli alimenti sono stati applicati con successo in molti paesi in via di sviluppo, come per esempio in Brasile e in Bangladesh. Questo tipo di interventi hanno efficacia soprattutto per contrastare gli effetti di catastrofi naturali, di crisi economiche o di altri eventi avversi, ma sono ovviamente poco sostenibili nel lungo periodo.

(iii) miglioramento della governance del commercio mondiale

La volatilità dei prezzi degli alimenti costituisce

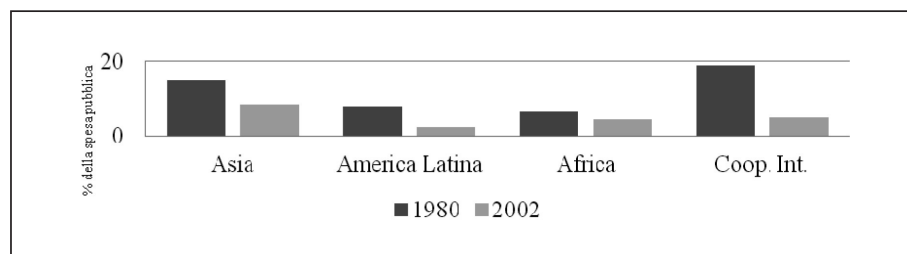


FIGURA 5 Investimenti in agricoltura effettuati dai paesi in via di sviluppo e dai programmi di cooperazione internazionale (confronto 1980-2002)

Fonte: Sonnino (2012)

una preoccupazione importante per i governanti mondiali, come ricordato anche nei recenti vertici del G20, e soprattutto per i paesi a basso reddito che dipendono dalle importazioni alimentari. Interventi per migliorare la trasparenza dei mercati, prevenire le manovre speculative e quindi contenere la volatilità dei prezzi delle derrate agricole sono quindi essenziali per migliorare la componente della stabilità della sicurezza alimentare.

(iv) aumento sostenibile della produttività

L'ultimo pilastro delle politiche di sicurezza alimentare è l'aumento sostenibile della produttività dei piccoli agricoltori, mediante l'applicazione appropriata di tecnologie agronomiche migliorate. L'aumento della produttività è un'azione prioritaria perché può migliorare la sicurezza alimentare nel breve e medio termine in due modi: aumentando le entrate delle piccole aziende agricole, e quindi il potere di acquisto dei piccoli produttori agricoli, e accrescendo la disponibilità di alimenti e riducendone così il prezzo per l'azione esercitata sul lato dell'offerta dall'equazione domanda-offerta. Nel lungo termine la produttività dovrà aumentare per permettere di far fronte all'aumentata domanda ed al deterioramento della base di risorse naturali. La produttività deve comunque essere aumentata in maniera sostenibile, conservando la base delle risorse naturali da cui dipende la produzione attuale di alimenti e quella futura.

Come aumentare la produttività

L'innovazione in agricoltura

La maggior parte dell'aumento della produzione agricola mondiale negli ultimi 50 anni deve essere attribuito ad aumenti di produttività totale dei fattori (figura 6), che comprendono principalmente ricerca e servizi di assistenza tecnica agli agricoltori, e quindi innovazione.

Anche nel futuro l'aumento della produttività e quindi essenzialmente l'innovazione, dovrà coprire più di tre quarti dell'aumento dei nuovi fabbisogni alimentari della popolazione mondiale, se si considera che l'aumento della produzione globale di alimenti potrà essere conseguita solo per il 9% dall'ampliamento della frontiera agricola (figura 7). Nuovi terreni arabili

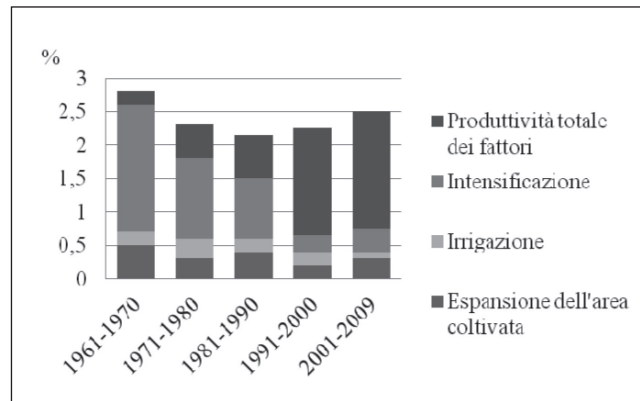


FIGURA 6 Variazione del tasso di crescita della produzione agricola e sua attribuzione
Fonte: Fuglie (2012)

da dedicare all'agricoltura sono infatti scarsamente disponibili e la loro conversione all'agricoltura ha comunque un alto prezzo ambientale (Ruane e Sonnino, 2011).

Inoltre, l'aumento di produttività dovrà essere conseguito senza aumentare e, possibilmente, diminuendo la pressione sulle risorse naturali e sugli ecosistemi. L'aumento di disponibilità di alimenti potrà essere conseguito anche riducendo sostanzialmente le perdite di prodotti agricoli che avvengono dopo la raccolta: un recente studio stima che il 30% dei cereali, il 40-50% delle radici e dei tuberi, il 20% degli oli vegetali ed il 30% del pescato vanno sprecati o comunque perduti durante le fasi di distribuzione e consumo (FAO, 2011c).

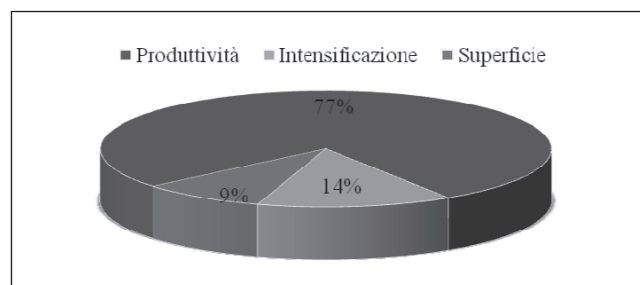


FIGURA 7 Fattori utilizzabili per l'aumento della produzione globale di alimenti (1999-2030)
Fonte: Sonnino (2012)

Il ruolo delle biotecnologie agricole

Giova innanzitutto ricordare che il termine biotecnologie agricole designa una vasta gamma di tecnologie usate in agricoltura e nella industria alimentare, utilizzate per un gran numero di scopi, tra cui il miglioramento delle varietà coltivate e delle popolazioni animali per aumentare la loro produttività o la loro efficienza, la diagnosi di patologie sia animali che vegetali, la produzione di vaccini per uso veterinario, e il miglioramento dei processi fermentativi impiegati nella preparazioni alimentari (Ruane e Sonnino, 2011). Le biotecnologie offrono anche potenti strumenti per la conservazione e la caratterizzazione delle risorse genetiche microbiche, vegetali ed animali (Lidder e Sonnino, 2012).

La forte controversia che spesso accompagna la discussione sull'uso delle biotecnologie agricole è in realtà legata ad una sola applicazione biotecnologica, l'ingegneria genetica, ed ai suoi prodotti, gli organismi geneticamente modificati (OGM), mentre le altre applicazioni sono generalmente ben accettate dal pubblico. Non v'è dubbio che la polemica sugli OGM non ha precedenti per ramificazione e profondità raggiunta, salvo forse l'utilizzazione della energia nucleare. La diatriba sugli OGM dura ormai da anni in forma estremamente polarizzata e non accenna ad assopirsi, oscurando agli occhi del grande pubblico il grande contributo all'aumento sostenibile della produttività agricola dato dalle altre biotecnologie e il loro ancor più grande contributo potenziale (Ruane e Sonnino, 2011).

Gli aumenti della produzione agricola ottenuti fino ad oggi sono stati infatti assicurati in gran parte anche dall'utilizzo di biotecnologie. Il rapporto finale della Conferenza Tecnica Internazionale sulle Biotecnologie Agricole nei Paesi in Via di sviluppo (ABDC-10), tenutasi a Guadalajara (Messico) nel marzo 2010, segnala che: "Le biotecnologie agricole comprendono una vasta gamma di strumenti e metodologie che si stanno applicando in misura crescente alle coltivazioni, agli allevamenti, al settore forestale, alla pesca e all'acquacoltura, nonché all'agroindustria, per aiutare a ridurre la fame e la povertà, contribuire all'adattamento al cambio climatico e conservare la base di risorse naturali tanto nei paesi industrializzati

come in quelli in via di sviluppo", ma rimarca che le biotecnologie agricole non sono state ancora sufficientemente sfruttate dai paesi in via di sviluppo e non ne hanno sufficientemente beneficiato i piccoli produttori agricoli. Il rapporto conclude raccomandando che più attività di ricerca e sviluppo siano dedicate alla soluzione dei problemi dei piccoli produttori agricoli (FAO, 2011d).

Le biotecnologie agricole, che si avvalgono del sorprendente, costante aumento di conoscenze di base biologiche, informatiche e biochimiche, hanno concorso, insieme al miglioramento delle infrastrutture e delle tecniche di conservazione e distribuzione delle derrate alimentari, alla diminuzione delle perdite di post-raccolta. La riduzione degli sprechi sarà anche nel futuro una componente essenziale dell'aumento della disponibilità alimentare, come già ricordato.

Le biotecnologie agricole inoltre sono essenziali per superare le barriere produttive in ambedue le vie suggerite da Philips (2009):

1. aumentando la produttività operativa:
 - a. diminuendo le perdite dovute a fattori negativi, quali patogeni, parassiti ed infestanti (per esempio mediante lo sviluppo di varietà vegetali o popolazioni animali resistenti);
 - b. aumentando l'efficienza d'uso dei fattori limitanti (come acqua e fertilità del suolo);
2. aumentando la produttività intrinseca, la produttività ottenibile cioè in assenza di fattori negativi e con fattori limitanti disponibili a livello ottimale.

Fino ad adesso le applicazioni pratiche delle biotecnologie agricole hanno contribuito essenzialmente ad aumentare la produttività operativa, e le potenzialità di questo approccio permangono tuttora molto alte. L'aumento della produttività intrinseca richiederà forse tempi più lunghi, ma potrà apportare contributi estremamente significativi.

Conclusioni

Le sfide che il mondo deve affrontare per assicurare una alimentazione sufficiente alla propria popolazione, facendo uso di una base di risorse naturali in progressivo deterioramento, e facendo fronte al cambio climatico, sono certamente sfide di portata



enorme. Le soluzioni sono complesse ed abbracciano interventi di natura politica, economica, finanziaria, sociale, legislativa, e tecnologica.

Non esistono quindi misure semplici in grado di risolvere tutti i problemi. Interventi che assicurano una più equa distribuzione del cibo prodotto sono certamente necessari ed urgenti, ma devono essere integrati ad azioni volte ad assicurare aumenti

importanti della produttività agricola, sia per far fronte alla crescita demografica, che per aumentare le entrate e quindi migliorare il livello di vita dei piccoli agricoltori. L'innovazione tecnologica, ivi inclusa la applicazione di biotecnologie agricole, gioca in questo scenario un ruolo essenziale, anche, se non soprattutto, per assicurare la sostenibilità della produzione agricola.

Bibliografia

- [1] Beddington J, Asaduzzaman M, Fernandez A, Clark M, Guillou M, Jahn M, Erda L, Mamo T, Van Bo N, Nobre CA, Scholes R, Sharma R, Wakhungu J. *Achieving food security in the face of climate change: Summary for policy makers from the Commission on Sustainable Agriculture and Climate Change*. CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). Copenhagen, Denmark, 2011. <http://ccafs.cgiar.org/commission/reports#final>
- [2] CGIAR. *A strategy and results framework for the CGIAR*. 2011. http://www.cgiarfund.org/cgiarfund/sites/cgiarfund.org/files/Documents/PDF/srf_feb20_2011.pdf
- [3] CGIAR and GFAR, *The GCARD Road Map: Transforming Agricultural Research for Development (AR4D) Systems for Global Impact*, 2011. http://www.fao.org/docs/eims/upload/290017/The_GCARD_Road_Map_finalized%2020-4-2011.pdf
- [4] FAO. *How to feed the world in 2050*. Food and Agriculture Organization of UN, Rome, Italy, 2009. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- [5] FAO. *The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) - Managing systems at risk*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London, 2011a.
- [6] FAO. *Natural resources*. Food and Agriculture Organization of UN, Rome, 2011b. <http://www.fao.org/docrep/014/am859e/am859e12.pdf>
- [7] FAO. *Global food losses and food waste, extent, causes and prevention*, by Gustafsson J., C. Cederberg, U. Sonneson (Swedish Institute for Food and Biotechnology) and R. van Otterdick and A. Meybeck (FAO). Food and Agriculture Organization of UN, Rome, 2011c.
- [8] FAO, *Biotechnologies for Agricultural Development: Proceedings of the FAO international technical conference on "Agricultural Biotechnologies in Developing Countries: options and opportunities in crops, forestry, livestock, fisheries and agro-industry to face the challenges of food insecurity and climate change" (ABDC-10)*, FAO, Rome, 2011. <http://www.fao.org/docrep/014/i2300e/i2300e00.htm>
- [9] FAO, WFP and IFAD. *The State of Food Insecurity in the World 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition*. Rome, FAO, 2012. <http://www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e.pdf>
- [10] Fuglie K. *Productivity Growth and Technology Capital in the Global Agricultural Economy*. In: Productivity Growth in Agriculture: An International Perspective (Keith O. Fuglie, Sun Ling Wang and V. Eldon Ball, eds.), chapter 16. Oxfordshire, UK: CAB International, 2012.
- [11] IAASTD. *Agriculture at a Crossroads*. Executive Summary of the Synthesis Report of the International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development, Washington, D.C., 2008. [http://www.agassessment.org/reports/IAASTD/EN/Agriculture%20at%20a%20Crossroads_Executive%20Summary%20of%20the%20Synthesis%20Report%20\(English\).pdf](http://www.agassessment.org/reports/IAASTD/EN/Agriculture%20at%20a%20Crossroads_Executive%20Summary%20of%20the%20Synthesis%20Report%20(English).pdf).
- [12] Juma, C. *The new harvest: agricultural innovative in Africa*. Oxford University Press, 2011.
- [13] Kura, Yumiko et al. *Fishing for answers*. Making sense of the global fish crisis, World Resources Institute: Washington D.C., 2004.
- [14] Lidder P. and A. Sonnino. *Biotechnologies for the Management of Genetic Resources for Food and Agriculture*. *Advances in Genetics* vol. 78: 1-168, 2012.
- [15] Philips R.L. *Mobilizing science to break yield barriers*. *Cop Science* 2009, 50, S-99-S108.
- [16] Ruane, J., A. Sonnino. *Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security*. *Journal of Biotechnology* 2011, 156: 356-363.
- [17] Sonnino, A. *La sfida della sicurezza alimentare: sfamare la crescente popolazione mondiale nonostante le minacce ambientali, economiche e sociali*. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione, Journal of Food Science and Nutrition*, anno 41, n. 1: 55-64, 2012.
- [18] Sonnino, A. *Biodiversidad y biotecnologías: el eslabón estratégico*. In: V. Ivone (ed.) *Biodiversidad, Biotecnología y Derecho. Un crisol para la sustentabilidad*, Page 299-320. Aracne editrice, Roma, Italia, 2011.
- [19] UN Population Division. *World population prospects: the 2010 revision*. 2011. <http://www.unpopulation.org>
- [20] World Bank. *World Development Report 2008: Agriculture for Development*. The World Bank, Washington, D.C, 2007.
- [21] World Watch Institute. *State of the World 2007*. Our urban future, World Watch Institute: New York/London, 2007.

Le microalghe come bio-fabbriche per composti ad elevato valore aggiunto

Le microalghe sono organismi fotosintetici unicellulari, che utilizzano la CO₂ ambientale per produrre una vasta gamma di molecole interessanti, dai trigliceridi utilizzabili per la produzione di biodiesel, a molecole con azione nutraceutica, come i carotenoidi o gli acidi grassi omega-3 a catena lunga. Inoltre, esse possono essere ingegnerizzate per produrre farmaci. La loro elevata produttività, la crescita in terreni di coltura sterili, i costi decrescenti di produzione, la domanda crescente per alcune di queste molecole, rendono le microalghe molto interessanti per applicazioni nel campo della chimica fine, della nutraceutica, della produzione di farmaci

■ Giovanni Giuliano, Olivia Demurtas, Paola Ferrante

Le microalghe sono uno dei gruppi più antichi di esseri viventi. La loro fotosintesi è simile a quella delle piante superiori, ma esse sono generalmente più efficienti delle piante nel convertire l'energia solare. Crescendo in mezzi acquosi, esse utilizzano in maniera efficiente l'acqua, la CO₂ ed i nutrienti. Le microalghe possono essere fotoautotrofe, eterotrofe, o mixotrofe. Le microalghe autotrofe utilizzano la radiazione solare per convertire l'H₂O e la CO₂ in O₂ e zuccheri. Esse sono in grado di fissare efficientemente la CO₂ da diverse fonti, tra cui l'atmosfera, i carbonati solubili e i gas di scarico industriali. Circa 1,8 kg di CO₂ vengono fissati per ogni Kg (peso secco) di biomassa microalgale prodotta.

Le microalghe sono state proposte come "feedstock" per biocarburanti di terza generazione (Brennan e Owende, 2010; Mata et al, 2010). Esse presentano infatti una serie di vantaggi rispetto alle piante terrestri: 1)

crescono velocemente e, potenzialmente, tutto l'anno; 2) possono essere coltivate su terreni marginali o desertici; 3) hanno bisogno di molta meno acqua per kg di biomassa prodotta rispetto alle colture terrestri; 4) molti ceppi possono essere coltivati in acque saline o salmastre; 5) sono in grado di sequestrare la CO₂ dai gas di combustione di impianti industriali; 6) alcuni ceppi accumulano grandi quantità (30-40% sul peso secco) di trigliceridi, adatti per la produzione di biodiesel, mentre altri accumulano amido, adatto per la produzione di bioetanolo; 7) non richiedono

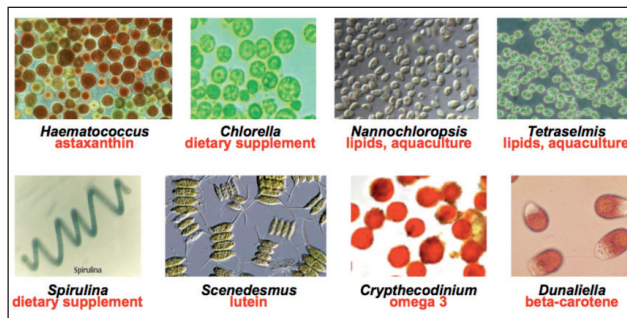


FIGURA 1 Microalghe coltivate commercialmente e loro prodotti
Fonte: ENEA

■ Olivia Demurtas, Paola Ferrante,
Giovanni Giuliano

ENEA, Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del
Sistema Agro-Industriale

Microalgae	Annual production	Producer country	Application and product	Price (€)
<i>Spirulina</i>	3000 tonnes dry weight	China, India, USA, Myanmar, Japan	Human nutrition Animal nutrition Cosmetics Phycobiliproteins	36 kg ⁻¹ 11 mg ⁻¹
<i>Chlorella</i>	2000 tonnes dry weight	Taiwan, Germany, Japan	Human nutrition Cosmetics Aquaculture	36 kg ⁻¹ 50 l ⁻¹
<i>Dunaliella salina</i>	1200 tonnes dry weight	Australia, Israel, USA, Japan	Human nutrition Cosmetics B-carotene	215–2150 kg ⁻¹
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 tonnes dry weight	USA	Human nutrition	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 tonnes dry weight	USA, India, Israel	Aquaculture Astaxanthin	50 l ⁻¹ 7150 kg ⁻¹
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 tonnes DHA oil	USA	DHA oil	43 g ⁻¹
<i>Shizochytrium</i>	10 tonnes DHA oil	USA	DHA oil	43 g ⁻¹

TABELLA 1 Produzione commerciale di microalghe
Fonte: Brennan e Owende, 2010 [1]

l'applicazione di erbicidi o pesticidi; 8) alcuni ceppi possono essere utilizzati per scopi di biorisanamento. Nonostante questi vantaggi e le molte aziende *start-up* sorte nel settore dei biocarburanti da alghe, una filiera commerciale per tale produzione non ha ancora visto la luce. Il principale motivo è il costo, ancora troppo elevato, per la produzione di biomassa algale. Le applicazioni commerciali attuali delle microalghe sono principalmente nei settori degli integratori alimentari, della mangimistica, della cosmetica (figura 1, tabella 1). Nonostante l'ampio utilizzo delle microalghe come "health food", i "claims" sui loro effetti salutistici hanno talvolta una base poco scientifica: ad esempio, l'uso alimentare di *Aphanizomenon* può comportare rischi per la salute, a causa delle tossine presenti in alcune preparazioni (Dittmann e Wiegand, 2006). Per contro, altre specie di microalghe non presentano rischi e sono estremamente promettenti per potenziali applicazioni nei campi della nutrizione umana ed animale e nella produzione di molecole di interesse farmaceutico. Discutiamo qui sotto alcuni potenziali prodotti delle biotecnologie microalgali.

Omega-3

Molte microalghe accumulano elevati livelli di acidi grassi polinsaturi (PUFA) ω -3, come l'acido

eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). I PUFA ω -3 ed ω -6 sono acidi grassi essenziali nella dieta di molti animali, compresi gli esseri umani, i quali non sono in grado di sintetizzarli. Nella figura 2 sono rappresentati alcuni PUFA ω -3 ed ω -6 presenti nella nostra dieta e le loro fonti alimentari.

Diverse linee di evidenza suggeriscono che gli esseri umani si sono evoluti basandosi su una dieta che aveva un rapporto fra PUFA ω -6 ed ω -3 di 1:1, mentre nella dieta occidentale questo rapporto è aumentato a 15:1 (Simopoulos, 2008). Ciò si traduce in una maggiore attività delle risposte pro-infiammatorie mediate dall'acido arachidonico (un ω -6 a catena lunga), che a loro volta provocherebbero l'aumento dell'incidenza di malattie cardiovascolari e certi tipi di cancro. Un rapporto fra PUFA ω -6 ed ω -3 di 4:1 nella dieta riduce del 70% la mortalità nella prevenzione secondaria delle malattie cardiovascolari, mentre un rapporto di 2,5:1 riduce la proliferazione cellulare rettale in pazienti con cancro coloretale o sopprime l'infiammazione in pazienti con artrite reumatoide (Simopoulos, 2008). Inoltre, gli ω -3 hanno un ruolo importante nella funzione cerebrale: il DHA rappresenta il 40% dei fosfolipidi di membrana nel cervello e studi con primati non umani e neonati umani indicano che il DHA è essenziale per lo sviluppo funzionale del cervello, in particolare nei neonati prematuri (Simopoulos, 2011).

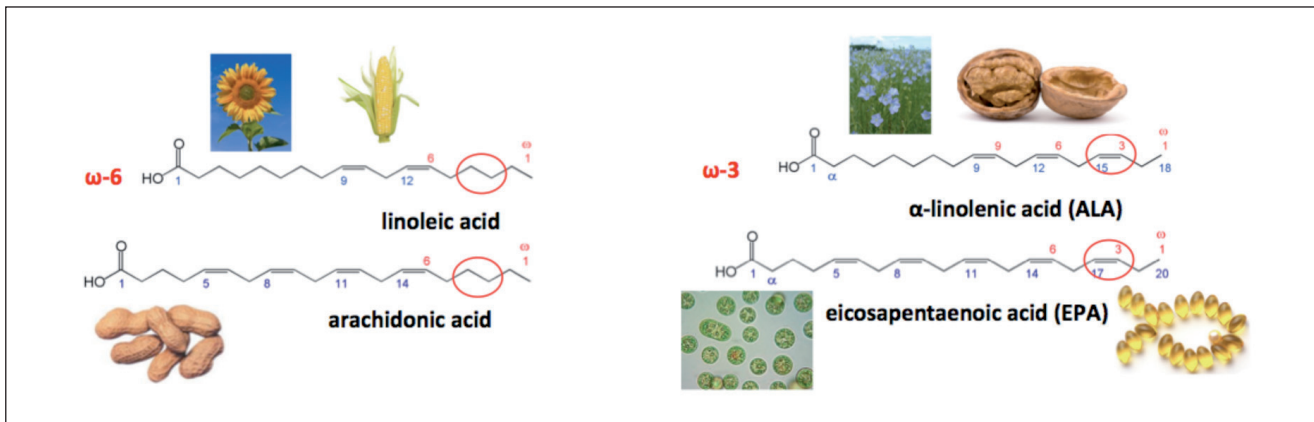


FIGURA 2 Acidi grassi polinsaturi ω -3 ed ω -6 e loro fonti alimentari. La posizione del doppio legame che distingue le due classi di molecole è evidenziata da un cerchio rosso
Fonte: ENEA

La maggior parte degli ω -3 nella nostra dieta è presente sotto forma di acido ω -linolenico (ALA), un PUFA comune nelle noci e nell'olio di lino (figura 2). Nel nostro corpo, l'ALA viene convertito in DHA ed EPA in maniera inefficiente (<10%). Le principali fonti alimentari di DHA e EPA sono il pesce (tonno, salmone, sardine, aringhe) e l'olio di pesce. Le proiezioni mostrano una stabilizzazione della produzione ittica mondiale, con la cattura progressivamente sostituita dall'acquacoltura (figura 3), mentre la produzione mondiale di olio di pesce è attualmente di circa 1 Mtonnellate/anno e presenta un trend leggermente decrescente.

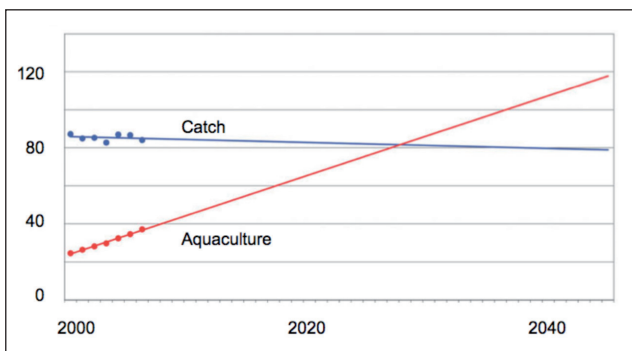


FIGURA 3 Produzione ittica mondiale proiettata, da cattura e dell'acquacoltura
Fonte: FAO, 2008

L'aumento del pesce prodotto tramite acquacoltura presenta un problema di sostenibilità: il mangime dei pesci più pregiati, come orate, branzini e salmone, contiene proteine e olio derivati dal pesce catturato. Nel settore generale dell'acquacoltura il rapporto fra pesce catturato utilizzato per i mangimi e pesce prodotto è di 0,63, ma esso sale fino a 5,0 per il salmone (Naylor et al, 2009). La domanda crescente per le proteine e l'olio di pesce per acquacoltura ha portato ad un aumento del 30-40% del loro prezzo nel 2012.

Ma la domanda più forte di ω -3 a catena lunga proviene dal settore della nutrizione umana. Assumendo una dose giornaliera raccomandata di 2 grammi/giorno di olio ricco in ω -3 e una popolazione mondiale di 9 Mld nel 2050, la domanda potenziale per l'alimentazione umana è di 6,5 Mln di tonnellate, o 260 Mld di € al costo attuale di 40 €/Kg. Di questo, solo 1 Mln di tonnellate sarà verosimilmente coperto dall'olio di pesce. Appare evidente come fonti alternative a basso costo vadano reperite rapidamente.

Carotenoidi

Il mercato dei carotenoidi è stimato in circa € 1,2 miliardi nel 2010, con la possibilità di crescere a € 1,4 miliardi nel 2018. Fra i composti più venduti sono il beta-carotene e la luteina (usati rispettivamente come supplementi alimentari per la prevenzione

dell'avitaminosi A e della degenerazione maculare legata all'età, una malattia degenerativa della retina) e l'astaxantina, usata come additivo alimentare nell'industria ittica, ma con potenziali applicazioni anche come antiossidante nell'alimentazione umana (Greaves et al, 2012) (figura 4). I prezzi variano notevolmente, da 20 €/kg per il beta-carotene, a 4.000 €/kg per l'astaxantina. Il mercato attuale è dominato dai composti di sintesi chimica, con

l'eccezione della luteina, che viene estratta dai petali della calendula e l'annatto, che viene estratto dai semi di *Bixa orellana*. Le microalghe sono in grado di sintetizzare la maggior parte di questi composti, spesso in una forma altamente pura, come il beta-carotene prodotto da *Dunaliella salina* e l'astaxantina prodotta da *Haematococcus pluvialis*. L'obiettivo della ricerca biotecnologica è ridurre i costi di produzione da microalghe fino a livelli

Gene expressed	Function	Expression level achieved	Application
HSV8-Isc	First mammalian protein expressed, antibody	Detectable	Pharmaceutical
CTB-VP1	Cholera toxin B subunit fused to foot and mouth disease VP1	3% TSP	Vaccine
HSV8-scFv	Classic single-chain antibody	0.5% TSP	Pharmaceutical
hMT-2	Human metallothioneine-2	Detectable	Pharmaceutical, UV-protection
hTRAIL	Human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)	~0.67% TSP	Pharmaceutical
M-SAA	Bovine mammary-associated serum amyloid	~5% TSP	Therapeutics, oral delivery
CSFV-E2	Swine fever virus E2 viral protein	~2% TSP	Vaccine
hGAD65	Diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase 65	~0.3% TSP	Diagnostics and therapeutics
ARS2-crEpo-his6	Human erythropoietin fused to ARS2 export sequence w/6xhis tag	100 µg/l culture	Pharmaceutical, protein export
83K7C	Full-length IgG1 human monoclonal antibody against anthrax protective antigen 83	0.01% dry algal biomass	Therapeutics
IgG1	Murine and human antibodies (LC and HC)	Detectable	Therapeutics
VP28	White spot syndrome virus protein 28	~10.5% TSP	Vaccine
CTB-D2	D2 fibronectin-binding domain of <i>Staphylococcus aureus</i> fused with the cholera toxin B subunit	0.7% TSP	Oral vaccine
10NF3, 14FN3	Domains 10 and 14 of human fibronectin, potential antibody mimics	14FN3: 3% TSP 10FN3: detectable	Therapeutics
M-SAA-Interferon β 1	Multiple sclerosis treatment fused to M-SAA	Detectable	Therapeutics
Proinsulin	Blood sugar level-regulating hormone, type I diabetes treatment	Detectable	Therapeutics
VEGF	Human vascular endothelial growth factor isoform 121	2% TSP	Therapeutics
HMGB1	High mobility group protein B1	2.5% TSP	Therapeutics

TABELLA 2 Proteine di uso farmaceutico prodotte in *Chlamydomonas*
Fonte: Specht et al, 2010 [10]

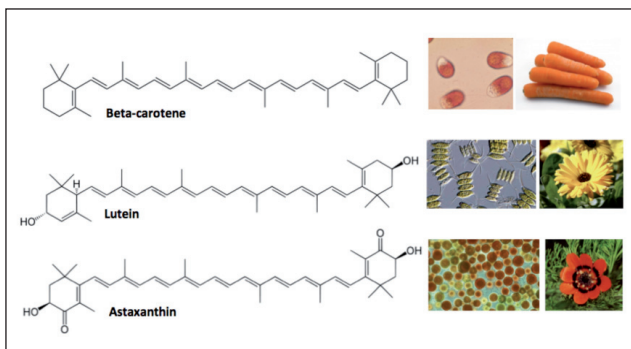


FIGURA 4 Struttura chimica e fonti naturali dei carotenoidi beta-carotene, luteina e astaxantina
Fonte: ENEA

competitivi con quelli dei composti di sintesi. Dato che tali costi sono da 20 a 4.000 volte più alti di quelli dei carburanti fossili, è evidente che questo è un obiettivo molto più facilmente raggiungibile, nel breve periodo, di quello della produzione di biocarburanti.

Proteine per uso alimentare

La *Spirulina* (ora *Arthrospira*) è un cianobatterio molto ricco in proteine, cosmopolita e capace di crescere in acque alcaline, ad un pH di 8-11 e temperature di 32-45 °C, con produzioni potenziali di 30 T proteina/ha/anno. La *Spirulina* veniva utilizzata come cibo dagli Aztechi e, a tutt'oggi, da varie popolazioni africane. Il suo utilizzo per complementare la parte proteica della dieta è stato proposto da numerosi gruppi (Khan et al, 2005).

Una potenziale applicazione della *Spirulina*, e delle microalghe più in generale, è la sostituzione delle proteine di origine animale nei mangimi, in particolare quelli usati in acquacoltura. Le proteine di origine microalgale si sono rivelate dei buoni sostituti per quelle di origine animale nella dieta dei pesci di allevamento (Olvera-Novoa et al, 2008).

Proteine per uso farmaceutico

Infine, le microalghe stanno emergendo come un sistema alternativo per la produzione di farmaci. Questa piattaforma relativamente nuova offre diversi vantaggi, tra cui: 1) un tempo breve dalla generazione della microalga transgenica allo "scaling up" 2) crescita rapida (tempo di duplicazione di poche ore) e facilità di coltivazione, 3) sicurezza, in quanto le microalghe non sono veicolo di agenti patogeni umani o animali e sono generalmente considerate sicure (*Generally Accepted As Safe - GRAS*), 4) crescita in condizioni sterili, il che agevola la produzione di proteine per uso umano. Il sistema modello *Chlamydomonas reinhardtii*, i cui genomi nucleare e plastidiale sono completamente sequenziati e facilmente trasformabili, è stato finora ampiamente usato per la produzione di proteine di interesse farmaceutico (Specht et al, 2010; tabella 2). Altre microalghe, con un potenziale utilizzo nella mangimistica, stanno ricevendo attenzione come veicoli per la produzione di vaccini orali contro le malattie animali più comuni.

Conclusioni

L'interesse per l'uso delle microalghe per la produzione di biocarburanti ha dato l'avvio ad una ricerca intensa sulla loro biologia. La genomica e la biotecnologia delle microalghe, fino a pochi anni fa oggetto di studio da parte di pochi *aficionados*, ricevono un interesse sempre maggiore da parte della comunità scientifica e dell'industria biotecnologica. L'ostacolo maggiore al loro utilizzo è l'attuale costo di produzione, calcolato in circa 5 €/kg di biomassa secca (Norsker et al, 2010). Tale costo va ridotto di almeno 10 volte per un utilizzo nel settore dei biocarburanti, mentre è già ora compatibile con la produzione di altri prodotti, come additivi alimentari, molecole per la chimica fine, proteine di interesse farmaceutico, vaccini animali a basso costo. La ricerca in questi settori è foriera di risultati interessanti nel breve-medio periodo.



- [1] Brennan L, Owende P (2010) *Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 557-577.
- [2] Dittmann E, Wiegand C (2006) *Cyanobacterial toxins-occurrence, biosynthesis and impact on human affairs*. Mol Nutr Food Res 50: 7-17.
- [3] Greaves R, Petkovich MCON, Miyazawa TCON, Albertini B (2012) *Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. Royal Society of Chemistry.
- [4] Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS (2005) *Nutritional and therapeutic potential of Spirulina*. Current pharmaceutical biotechnology 6: 373-379.
- [5] Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 217-232.
- [6] Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, Nichols PD (2009) *Feeding aquaculture in an era of finite resources*. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 15103-15110
- [7] Norsker NH, Barbosa MJ, Vermue MH, Wijffels RH (2011) *Microalgal production-a close look at the economics*. Biotechnol Adv 29: 24-27.
- [8] Olvera-Novoa MA, Dominguez-Cen LJ, Olivera-Castillo L, Martinez-Palacios CA (2008) *Effect of the use of the microalga Spirulina maxima as fish meal replacement in diets for tilapia, Oreochromis mossambicus (Peters), fry*. Aquaculture Research 29: 709-715.
- [9] Simopoulos AP (2008) *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease*. Asia Pac J Clin Nutr 17 Suppl 1: 131-134.
- [10] Simopoulos AP (2011) *Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain*. Mol Neurobiol 44: 203-215.
- [11] Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S (2010) *Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production*. Biotechnol Lett. 32(10):1373-83.

Agrobiopolis: una infrastruttura di ricerca a supporto dello sviluppo delle biotecnologie e della *green chemistry*

Il Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis rappresenta una infrastruttura di ricerca a supporto dello sviluppo ed applicazione delle biotecnologie e della *Green Chemistry*. Agrobiopolis, potendo contare su una dotazione strumentale ed impiantistica d'avanguardia, costituisce oggi un Polo Tecnologico multidisciplinare in grado di fornire Servizi Tecnologici Avanzati nei settori agroindustriale ed agroenergetico e aperto alle collaborazioni con soggetti privati (PMI) e pubblici. Nell'articolo, si riportano le schede sintetiche di alcuni casi applicativi di successo realizzati mediante l'impiego delle strumentazioni scientifico-tecnologiche di Agrobiopolis

■ Roberto Balducchi

Il **Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis** (figura 1), realizzato nell'ambito del Programma Fondi Strutturali dell'Unione Europea, situato all'interno del Centro Ricerche Trisaia dell'ENEA di Rotondella (MT), costituisce un Polo Tecnologico multidisciplinare aperto alle collaborazioni con soggetti pubblici e privati. Le attività di RS&T vengono effettuate utilizzando le infrastrutture scientifico-tecnologiche ivi disponibili e si pongono la finalità generale di sviluppare ed applicare processi e metodologie su base biotecnologica nei settori agroindustriale, agroalimentare ed agro-energetico. Agrobiopolis è articolato in aree funzionali comprendenti un Complesso Impiantistico Multifunzionale nella Hall Tecnologica, una serie di Laboratori Specialistici

ed un Demo Center. La disponibilità contestuale di Laboratori Specialistici attrezzati con strumentazioni avanzate e di Unità Operative Pilota installate nella



FIGURA 1 Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis
Fonte: ENEA

■ Roberto Balducchi

ENEA, Unità Tecnica Tecnologie Trisaia

Hall Tecnologica, rende possibile progettare e sviluppare processi su base chimico-biotechologica, dalla scala laboratorio fino alla scala preindustriale, e valutare il grado di innovazione dei risultati ottenuti verificandone la sostenibilità tecnico-economica e la possibilità di trasferimento su scala industriale.

Il Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis

La strumentazione e gli impianti disponibili consentono di operare in molteplici aree scientifico-tecnologiche tra cui quelle di genomica, proteomica, metabolomica, fermentazione, estrazione con fluidi supercritici, *Mild Technologies* per il settore agroalimentare, diagnostica alimentare e fitopatologica, analisi NMR, valorizzazione produzioni vegetali, preparazione di Materiali di Riferimento per l'agroalimentare (figura 2). L'acquisizione, anche recente, di avanzate strumentazioni da laboratorio, ha permesso di dotare Agrobiopolis di elevate capacità di RS&T in settori e discipline fortemente collegate sia alle esigenze del mondo della ricerca che del mondo produttivo. La dotazione del Complesso Impiantistico Multifunzionale è costituita da una serie di Unità Operative Pilota progettate sia per essere gestite autonomamente che per integrarsi tra loro al fine di poter sperimentare, fino alla scala pilota, differenti processi nei settori agro-industriale ed agro-energetico. Agrobiopolis costituisce quindi un importante punto di riferimento infrastrutturale, tecnico-scientifico ed

organizzativo nella strategia dell'Agenzia e del sistema della ricerca industriale, sia in attività finalizzate, sia al conseguimento di un aumento della conoscenza, sia nei confronti delle collaborazioni con il sistema pubblico/privato. Presso Agrobiopolis è possibile inoltre usufruire dell'offerta di servizi tecnologici specialistici avanzati, ospitare società di *spin-off* e *start-up*, usufruendo inoltre di training formativi di elevata specializzazione. Attraverso le competenze e le facilities disponibili, le attività di RS&T svolte presso Agrobiopolis si pongono in definitiva l'obiettivo generale di introdurre fattori di innovazione lungo i processi produttivi allo scopo di privilegiare le esigenze di sostenibilità delle diverse fasi, nonché rispondere, attraverso lo sviluppo di nuovi prodotti e processi basati sul potenziale innovativo delle biotecnologie, alla sempre crescente richiesta di prodotti a più alto contenuto tecnologico e di servizio ed a minore impatto ambientale.

Si riportano di seguito alcuni casi applicativi realizzati mediante l'impiego delle infrastrutture scientifico-tecnologiche di Agrobiopolis, sia nell'ambito di progetti finanziati condotti in partenariato pubblico/privato, che in risposta alla domanda proveniente dal sistema produttivo.

Processi di produzione su larga scala di lieviti ad attività antagonista

I danni causati alle produzioni ortofrutticole dagli agenti patogeni assumono, per alcune specie e varietà e, particolarmente, in alcune fasi della filiera

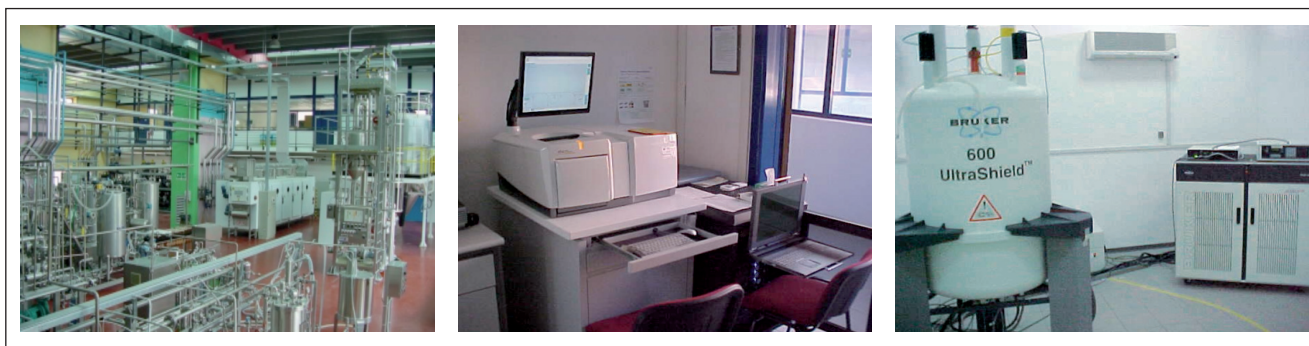


FIGURA 2 Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis a) La Hall Tecnologica b) High Throughput Sequencing Lab c) Laboratorio NMR
Fonte: ENEA



FIGURA 3 Azione inibitrice di lieviti antagonisti evidenziata su piastra Petri
Fonte: ENEA



FIGURA 4 Stazione BIOLOG, Laboratorio Fitopatologia, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA



FIGURA 5 Fermentatori scala laboratorio, Laboratorio Camera Bianca Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA

quali il post-raccolta ed il successivo stoccaggio, dimensioni che possono raggiungere anche il 60% di perdita del prodotto, con gravi evidenti ripercussioni economiche. Tra gli agenti di danno maggiormente significativi si annoverano principalmente i funghi fitopatogeni ed opportunisti, per il cui controllo e contenimento si utilizzano principi chimici ad attività fungicida. Tale consuetudine è accompagnata però dal crescente pericolo che possano essere trascinati nel prodotto finale residui chimici a livelli elevati e quindi potenzialmente tossici, con evidente rischio per il consumatore. In particolare la salubrità dei prodotti frutticoli è posta maggiormente a rischio quando l'uso dei fungicidi è effettuato dopo la raccolta, soprattutto nei casi in cui i tempi fra il trattamento ed il consumo sono ristretti, come spesso accade per specie quali gli agrumi, le fragole e l'uva. La legislazione vigente è in tal senso molto stringente e quindi, in teoria, non dovrebbero essere mai presenti, oltre certi limiti, residui di principi attivi nel prodotto "al banco". Nonostante ciò e nonostante i continui controlli, sia interni che esterni, è un rischio che oggettivamente esiste. Da tali osservazioni e da una serie di elementi di contesto più generale, quali la globalizzazione dei mercati, la mutata domanda di tipologia di prodotti da parte del consumatore, orientato maggiormente di un tempo verso le produzioni biologiche e comunque verso una maggiore qualità complessiva delle

produzioni agroalimentari, la riduzione o il divieto di utilizzo di alcuni presidi fitosanitari, l'aumentata selezione verso ceppi fungini resistenti esercitata dai prodotti chimici, già da diverso tempo ci si è orientati verso la ricerca e lo sviluppo di metodologie biologiche di controllo di tali fitopatie, in sostituzione o integrazione di quelle esistenti. Più in particolare, una metodologia alternativa di controllo di fitopatie prevede l'utilizzo di microrganismi che ne contrastino lo sviluppo, secondo varie strategie metaboliche, e tra questi, fra i più promettenti, vi sono i funghi (lieviti) cosiddetti "antagonisti".

Molti sono i lieviti isolati che sembrano avere marcata attività antagonista verso importanti patogeni. La stessa industria degli agro-farmaci è sempre più impegnata nella ricerca e sviluppo di presidi su base biologica utilizzabili nell'ambito di piani di difesa integrata ecocompatibile. Spesso però la gran parte di tale attività è testata solo fino alla scala di laboratorio ed è noto come la difficoltà maggiore per rendere tale capacità potenziale effettivamente utilizzabile su scala industriale, sia quella di riuscire a trasferire la metodologia dal laboratorio fino alla scala pilota, definendo con sufficiente precisione sia la metodologia di processo su scala pre-industriale che la fattibilità e convenienza tecnico-economica generale dello stesso. Nell'ambito di alcuni Progetti finanziati ed in partenariato con altri soggetti pubblici e privati,



FIGURA 6 Unità Operativa Pilota di Fermentazione (50 e 500 litri), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA



FIGURA 7 Unità Operativa Pilota di Liofilizzazione (Capacità di carico 3 mq), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA

l'ENEA ha messo a punto una metodologia finalizzata alla produzione su scala pilota (pre-industriale) di microrganismi antagonisti (lieviti del genere *Pichia* selezionati da ambienti naturali) da impiegare in programmi di lotta biologica in fase di pre-raccolta ed in post-raccolta contro funghi patogeni agenti di decadimento della frutta (in particolare verso agrumi, uva e fragole) (figura 3).

Inizialmente i ceppi selezionati sono stati caratterizzati sia dal punto di vista metabolico (mediante stazione BIOLOG - figura 4) che molecolare (mediante rRNA Sequencing) per la corretta identificazione. Successivamente si è messo a punto il protocollo di allevamento culturale

su scala laboratorio (fermentatore da 5 litri- figura 5), prediligendo terreni e substrati minimi o derivati anche da materie prime vegetali povere.

La fase successiva ha visto il trasferimento e adattamento della metodologia messa a punto in laboratorio su fermentatore in scala pilota da 50 litri e quindi da 500 litri (figura 6). Da questo punto in poi il resto delle fasi del processo sono state effettuate su alcuni altri impianti su scala pilota di Agrobiopolis.

La biomassa ottenuta, dopo opportuna separazione mediante centrifugazione, è stata quindi liofilizzata (figura 7) e conservata in adatto *packaging*. Lungo le varie fasi produttive è stata verificata la qualità



FIGURA 8 Campioni di lievito liofilizzato ottenuto alla fine del processo produttivo su scala pilota
Fonte: ENEA

complessiva della biomassa ottenuta, sottoponendone dei campioni alla determinazione dell'identità e vitalità, nonché alla verifica dell'assenza di microrganismi contaminanti, ricorrendo a metodiche microbiologiche, biochimiche e molecolari rapide, affidabili e riproducibili.

Il prodotto liofilizzato così ottenuto a base di lieviti (figura 8) possiede proprietà antagoniste nei confronti dei funghi agenti di marciume dei frutti di agrumi, uva e fragole.

Gli effetti dell'applicazione diretta del liofilizzato in sospensione acquosa ad idonee concentrazioni sui frutti, sono rappresentati da un contenimento del processo infettivo da parte dei funghi e quindi da una ridotta dannosità economica dell'infezione.

L'efficacia dei lieviti liofilizzati è stata attualmente provata esclusivamente a livello sperimentale in campo e nei magazzini di stoccaggio della frutta. Si prevede pertanto di sviluppare tutta la RST&D necessaria alla formulazione e registrazione di un biofungicida commerciale a base di lieviti (con le relative sperimentazioni in campo tossicologico ed ecologico).

Processi di estrazione di principi attivi da matrici vegetali con l'anidride carbonica (CO₂) allo stato supercritico

Le piante superiori sintetizzano un gran numero di sostanze chimiche e biologicamente attive, conosciute anche come "metaboliti secondari". Queste sostanze possono essere sfruttate, in funzione della specifica composizione chimica, per la preparazione di prodotti farmaceutici, cosmetici, liquoristici, di sostanze coloranti, di oli essenziali, di ingredienti per l'industria alimentare, di prodotti per la difesa delle colture. Le tecniche di estrazione utilizzate, le cui radici affondano in tempi antichi, sono oggi le più svariate. Tra queste si rammentano le semplici tecniche di spremitura, macerazione e percolazione, la distillazione in corrente di vapore, l'utilizzo di ultrasuoni, l'estrazione con fluidi supercritici fino alla più recente tecnica di estrazione che utilizza l'estrattore Naviglio. Ognuna di queste presenta caratteristiche particolari che la rendono applicabile e preferibile a seconda dei casi.

In determinati casi molte delle tecniche di estrazione

solido-liquido citate non risultano soddisfacenti (difficoltà nel recuperare l'estratto in maniera selettiva ed esaustiva, difficoltà nel calcolare i tempi ed i costi di processo, presenza spesso a livelli elevati di residui di solvente negli estratti ecc.). Per tali motivi la ricerca, per trovare delle valide alternative, si è indirizzata già da diversi anni verso l'utilizzo di estrazioni mediante l'utilizzo di fluidi allo stato supercritico (*SFE, Supercritical Fluid Extraction*): infatti le tecnologie di estrazione in fluidi supercritici hanno molte applicazioni potenziali nei processi di estrazione e frazionamento, come alternativa ai processi di separazione convenzionali. Il fluido comunemente impiegato è costituito da anidride carbonica allo stato supercritico. I motivi di questa scelta sono ambientali (la CO₂ non è tossica, non contamina gli estratti ed è poco costosa) e tecnico (possono essere raggiunte facilmente sia la sua temperatura critica che la pressione critica). Nei processi industriali, la CO₂ inoltre può essere riciclata minimizzandone il consumo. L'anidride carbonica in fase supercritica assume le caratteristiche di solvente non polare: con questo metodo è perciò possibile estrarre principalmente composti non polari da matrici generalmente solide. Il vantaggio della SFE è che alla fine dell'estrazione il solvente (l'anidride carbonica) viene allontanato sotto forma di gas dando la possibilità di recuperare i composti estratti concentrati e privi di residui di solvente. Questa tecnica trova attualmente applicazioni a livello industriale come l'estrazione dell'olio dai semi, della caffeina dal caffè, della nicotina dal tabacco, del grasso dell'olio di semi ecc. Accanto a questi settori trova applicazione nel settore degli aromi e delle essenze e, più recentemente, nel settore farmaceutico e dei materiali.

L'ENEA, da più di due decenni, è impegnata nello sviluppo e messa a punto di protocolli di estrazione di metaboliti secondari e sostanze utili impiegando la tecnica SFE mediante l'utilizzo degli impianti su scala laboratorio (figura 9) e su scala pilota (figura 10) disponibili presso le proprie infrastrutture tecnologiche di Agrobiopolis in Trisaia, che completano ed integrano quelle disponibili presso il Centro Ricerche della Casaccia (Roma).

Tra le piante o parti di esse (fiori, foglie, radici, bucce ecc.) che sono state oggetto di indagini utilizzando

la SFE, si citano, tra le altre, piante officinali, l'olivo, l'alloro, gli agrumi, la vite, nonché le biomasse residue al termine delle colture (carciofo) o i residui di lavorazione industriale e agricola (pomodoro, carciofo, vite) allo scopo di ricavarne principi attivi di interesse industriale: sostanze bioattive, nutraceutici e/o antiossidanti (flavonoidi, fenilpropanoidi, antociani e secoiridoidi).

Tra le applicazioni della tecnica SFE più recentemente utilizzate si segnalano quelle per ottenere sostanze naturali da specie vegetali (alloro, arancio dolce, olivo) da poter impiegare nella difesa delle colture agrarie e quelle finalizzate ad estrarre sostanze ad attività antiossidante (da farine di grano saraceno) e farmaceutica (da bucce di specifiche cvs di limoni). La caratterizzazione chimica degli estratti e la loro stabilità e composizione nel tempo vengono effettuate tipicamente mediante analisi chimica, cromatografia liquida o gascromatografia. I protocolli di estrazione e caratterizzazione sono stati messi a punto sia su scala laboratorio che su scala pilota.

Processi di trasformazione e valorizzazione del latte d'asina

Tale azione si inserisce nel quadro più generale che ha come obiettivo la valorizzazione di produzioni agroalimentari tipiche e tradizionali. L'obiettivo che ci si è prefissati, nel caso specifico della filiera del latte d'asina e dei suoi derivati, è quello di tentare di trovare soluzione ad aspetti tecnologici che ne limitano la effettiva trasformazione e successiva commercializzazione. Ciò può essere perseguito sia mettendo a punto metodologie produttive che sistemi di trasformazione e conservazione che consentano di passare dall'attuale modello produttivo artigianale ad un modello che risponda ai requisiti minimi tipici di un sistema di produzione di livello industriale. Tale passaggio richiede consistenti modifiche ed integrazioni al modello esistente, integrazioni e modifiche che, per la parte tecnologica, vanno testate su piccola scala prima del successivo passaggio su scala maggiore.

Le tendenze verso una alimentazione di qualità e "sostenibile", nel senso più ampio del termine, sono in costante crescita e compito del mondo della ricerca



FIGURA 9 Impianto CO₂ SFE da Laboratorio (Capacità fino a 1 litro), Laboratorio di chimica analitica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA

industriale è anche quello di individuare soluzioni che concilino tali esigenze con quelle del mercato (industria e consumatore) e dello sviluppo rurale. In tale contesto si inserisce la richiesta pervenuta da parte degli operatori del settore tesa a valorizzare una produzione tipica e di elevato valore aggiunto, quale quella del latte d'asina.

L'interesse legato a questa particolare produzione da parte degli operatori del settore va di pari passo con l'interesse mostrato dal consumatore verso i *farma-food*, o nutraceutici, ed il crescente desiderio



FIGURA 10 Unità Operativa Pilota CO₂ SFE (Matrici solide, liquide e viscosi; capacità fino a 15 litri), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA



FIGURA 11 Unità Operativa Spray-dryer (Capacità 20 Kg/h), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche TRISAIA
Fonte: ENEA

di poter disporre di produzioni agroalimentari e zootecniche orientate a garantire il benessere e la salute. Il latte d'asina, per il suo particolare profilo biochimico, che lo rende il più simile a quello materno, è considerato per tali motivi già di per sé un nutraceutico particolarmente utile nell'alimentazione dei lattanti e nell'infanzia nei casi di intolleranza o allergie ad altri tipi di latte. La presenza nel latte d'asina di sostanze ad attività probiotica, di anticorpi e di composti azotati ad azione antibatterica, rende peraltro questo alimento molto utile anche nell'alimentazione delle persone anziane e debilitate. Altro impiego noto fin dall'antichità è inoltre quello cosmetico. Studi recenti su bambini allergici al latte vaccino hanno dimostrato che il latte di asina è tollerato dalla maggior parte di loro. Il sapore dolce lo rende infatti gradevole e ben accetto a differenza delle alternative



FIGURA 12 Cosmetico a Base di liofilizzato di latte d'asina
Fonte: ENEA

formule speciali a base di idrolisati proteici o di aminoacidi, il cui utilizzo nei bambini è compromesso proprio dal retrogusto amaro.

L'ENEA, su specifica richiesta di Associazioni di allevatori, ha partecipato a programmi di ricerca industriale che avevano l'obiettivo di superare alcuni limiti nell'impiego su scala industriale di tale prodotto (modesta produzione in volume di latte per capo, discontinuità temporale e parcellizzazione logistica della produzione su scala nazionale, scarsa conservabilità) tra i quali, in particolare, l'esigenza di trasformare rapidamente il latte fresco, mantenendone inalterate le caratteristiche biochimico-fisiche e nutraceutiche.

A tal fine si sono effettuate delle prove preliminari di liofilizzazione *mild* su piccola scala, verificando l'efficacia di alcuni protocolli. Dopo aver individuato la tecnologia più adeguata di liofilizzazione (basata sull'utilizzo dello *Spray-dryer* – figura 11) e messo a punto il protocollo, si sono impiegate le *facilities* impiantistiche su scala pilota disponibili presso Agrobiopolis per verificare la fattibilità tecnico-economica su grande scala trasformando 600 litri di latte. I risultati ottenuti dalle analisi chimico-fisiche hanno confermato la sostenibilità del processo.

Accanto a questo risultato, con la polvere di latte liofilizzato ottenuto a valle del processo su scala pilota, gli operatori industriali hanno messo a punto e commercializzato anche dei prodotti cosmetici (figura 12).

Il ruolo dell'ICT nelle scienze omiche *high-throughput*

Lo sviluppo delle nuove scienze “omiche” (genomica, trascrittomica, metabolomica ecc.) e della strumentazione ad alta efficienza (*high throughput*) ha prodotto, in un’area scientifica originariamente legata prevalentemente ad attività di laboratorio, una forte richiesta di supporto dal settore dell’informatica avanzata e del calcolo ad alte prestazioni. L’enorme mole di dati continuamente resa disponibile dagli esperimenti con nuovi strumenti *high throughput* rende indispensabile una forte collaborazione con l’informatica. Nel presente lavoro, vengono passate in rassegna le principali metodologie in uso nella genomica e nella trascrittomica *high throughput*, mostrate le problematiche computazionali che esse generano ma anche le importanti prospettive di sviluppi di conoscenza che sono in grado di aprire in settori importanti come le biotecnologie e la medicina

■ Giuseppe Aprea, Giulio Gianese, Marco Pietrella, Vittorio Rosato, Valentina Spedaletti

Introduzione

Il sequenziamento del DNA è considerato uno strumento essenziale per la ricerca biologica per correlare il genotipo di un organismo al fenotipo che ne deriva. Il progetto “Genoma Umano”, durato più di 10 anni con investimenti considerevoli, ha consentito di sequenziare l’intero DNA umano ed è stato una pietra miliare per la ricerca sui geni che causano le patologie genetiche che sono oggetto di studio in molti laboratori.

L’approccio al sequenziamento, basato sul tradizionale metodo Sanger, unica metodica disponibile fino a

qualche anno fa, ha subito un’improvvisa accelerazione negli ultimi anni con lo sviluppo di metodologie di nuova generazione (NGS) le quali, implementando un sistema dotato di maggiore processività per la lettura delle sequenze in parallelo, sono in grado di sequenziare fino a 600 miliardi di basi (gigabasi o GB)¹ con un ciclo di sequenziamento che dura una decina di giorni, contro le circa 1.000.000 basi/giorno ottenute con il metodo Sanger. Parallelamente a questo straordinario sviluppo in termini di *throughput*, vi è stata una drastica riduzione in termini di costi che ha portato il sequenziamento di una Mb a costare ~1 dollaro contro i ~10.000 dollari necessari per ottenere lo stesso risultato nel 2000. Conseguentemente, il sequenziamento di grandi genomi è diventato accessibile a numerosi laboratori, determinando una vera e propria rivoluzione nel settore. In particolare, la gestione e l’analisi dei dati hanno determinato la nascita e lo sviluppo della bioinformatica, una disciplina che integra le competenze nell’ambito della biologia e dell’ICT.

■ Giuseppe Aprea, Vittorio Rosato
ENEA, Unità Tecnica Modellistica Energetica e Ambientale

■ Giulio Gianese, Marco Pietrella,
Valentina Spedaletti
Ylichron s.r.l., Laboratorio Genechron, c/o Centro Ricerche
Casaccia, Roma

Applicazioni delle tecniche di NGS

I sequenziatori di nuova generazione sono diventati gli strumenti d'elezione per analisi approfondite nel campo della biologia e della medicina. L'ENEA ne possiede di due tipi: uno con tecnologia Roche-454 localizzato nel Centro Ricerche Trisaia ed un altro, con tecnologia di terza generazione Ion Torrent, dislocato nel Centro Ricerche Casaccia. Questi strumenti consentono di approcciarsi in maniera nuova e più globale ad una serie di applicazioni riportate di seguito.

- Sequenziamento *de novo* [1,2]: si applica ad un genoma per il quale non si dispone già di dati di riferimento, e permette di ottenere informazioni essenziali per studi strutturali e funzionali. L'analisi di genomi o trascrittomi complessi è l'ambito che maggiormente ha beneficiato dell'aumento della processività e dell'abbattimento dei costi raggiunti con l'NGS. Basti pensare che oggi il sequenziamento del genoma umano impiegherebbe pochi giorni contro i 10 anni che sono stati necessari per l'ottenimento del primo *draft* [3].
- Sequenziamento del trascrittoma (*RNAseq*) o dei *microRNA* (piccoli RNA non codificanti ad attività regolativa): si può considerare un altro formidabile strumento d'indagine per lo studio delle funzioni biologiche di una cellula, in quanto fornisce informazioni quantitative sulle differenze nei livelli di espressione dei geni in tessuti diversi o in uno stesso tessuto analizzato in diverse condizioni sperimentali (ad esempio sottoposto a diversi trattamenti) o in differenti stadi di sviluppo [4]. Questo tipo di analisi, inoltre, permette un approccio globale allo studio di eventuali alterazioni strutturali e a problemi biologici complessi come lo studio della regolazione genica.
- *Resequencing*: è il risequenziamento di un intero genoma già sequenziato (o di una sua specifica porzione), che viene effettuato allo scopo di identificare eventuali "difetti" genetici quali mutazioni di un singolo nucleotide (SNP), inserzioni e delezioni di sequenze più o meno lunghe in determinate posizioni del genoma e variazioni nel numero di copie di determinati geni (CNV). Questa tecnica è stata applicata con successo

allo studio delle patologie umane, consentendo l'identificazione di nuovi loci genici coinvolti nella loro eziogenesi, come testimonia uno studio sul morbo di Chron, una malattia infiammatoria cronica dell'intestino con una patogenesi poco nota [5]. Le informazioni ottenute non solo possono contribuire alla comprensione dei meccanismi di sviluppo della patologia, ma possono fornire anche informazioni sul trattamento del paziente. Oltre all'intero genoma, le piattaforme NGS possono essere utilizzate per sequenziare selettivamente determinate regioni genomiche o specifici geni (tramite le tecniche di *targeted resequencing* ed *amplicon sequencing*) o per ottenere informazioni sull'intero esoma (l'insieme di tutte le regioni codificanti, tramite il *whole exome-sequencing*). Quest'ultimo approccio si è rivelato particolarmente utile per la ricerca di geni candidati in patologie poligeniche e multifattoriali. Recentemente, infatti, tramite esperimenti di *whole exome-sequencing* sono state identificate delle mutazioni in geni che risultano correlati con i disturbi pervasivi dello sviluppo o dello spettro autistico [6].

- Sequenziamento dei genomi di intere comunità microbiche per studi di metagenomica: è un'analisi che si applica a campioni prelevati direttamente dall'ambiente naturale [7]; ciò permette di ovviare alla necessità, dettata dalle tecnologie tradizionali, di dover coltivare separatamente le specie batteriche per poter procedere al loro sequenziamento. L'impatto di queste nuove metodiche di analisi, in studi di biodiversità microbica, ha permesso di ottenere l'accesso ad informazioni enormemente maggiori di quelle ottenibili in precedenza. Le applicazioni possibili sono innumerevoli e comprendono la caratterizzazione delle comunità microbiche umane a fini clinici e lo studio di popolazioni microbiche ambientali al fine di identificare geni (e specie codificanti) utili per scopi commerciali quali la produzione di biocarburanti o di altri composti a carattere farmaceutico, agrochimico o enzimatico e per *bioremediation* [8,9]. In relazione alle applicazioni in ambito clinico, va menzionato il recente utilizzo delle tecnologie NGS per lo studio della variabilità genomica di virus patogeni, quali HIV e HCV [10]. Per studi tassonomici volti ad identificare i generi

batterici presenti in una comunità microbica e la loro abbondanza relativa, invece, è stato sviluppato un approccio NGS differente basato sul sequenziamento di regioni variabili di RNA ribosomale 16S (rRNA 16S). Tale applicazione può essere condotta con piattaforme a minore throughput pur fornendo un notevole livello di informazione sulla biodiversità del campione analizzato.

- **Chromatin ImmunoPrecipitation-Sequencing** (sequenziamento di cromatina immunoprecipitata) o ChIP-seq: è una tecnica utilizzata per analizzare le interazioni tra DNA e proteine ad attività regolativa. Il *binding* dell'enzima RNA polimerasi, necessario per la trascrizione genica, è regolato da diversi fattori, quali la metilazione del DNA, la sua accessibilità, mediata da proteine note come istoni o la presenza di fattori di trascrizione (TF) in prossimità dei punti di inizio della trascrizione. Qualsiasi alterazione relativa alla sequenza su cui si lega un TF o la RNA polimerasi o riguardante i TF stessi e gli istoni può pregiudicare il corretto funzionamento della trascrizione determinando eventuali stati patologici [11-13]. La tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina consente di selezionare in maniera specifica quelle porzioni di DNA legate da uno specifico TF o istone; il successivo sequenziamento di questi frammenti di DNA permette, quindi, di ottenere un quadro complessivo dell'attività regolativa della proteina analizzata.

Bioinformatica e analisi dei dati: il ruolo dell'ICT nella genomica

L'evoluzione delle strumentazioni per il sequenziamento è illustrata sinteticamente nella tabella 1

I cambiamenti principali sono stati:

- riduzione dei costi (solo dal 2005 al 2009 i costi si sono abbassati di un fattore 10 all'anno);
- riduzione dei tempi;
- aumento del *throughput*;
- migliore qualità delle *read*;
- riduzione della lunghezza delle *read* (ad esclusione della tecnologia Roche 454).

L'unico limite delle piattaforme NGS consiste, escludendo la tecnologia Roche-454, nella minore lunghezza delle *read* sequenziate. Questo punto è importante poiché la minore estensione delle *read* rende più difficoltoso recuperare la sequenza intera di partenza. Per ovviare a questo problema, sono in continua evoluzione algoritmi in grado di sfruttare gli altri punti di forza delle nuove tecnologie, ossia l'alto *coverage*² e la possibilità di sequenziare *read paired-end* o *mate-pair*, ovvero coppie di *read* per cui, da protocollo, è nota la distanza (alcune decine di migliaia di basi) sulla sequenza di DNA.

Lo sviluppo dell'ICT ha dunque agevolato quello del *Next Generation Sequencing*; questo è avvenuto sia grazie ai progressi fatti nel tempo dall'hardware e dal software di sistema, sia tramite lo sviluppo di algoritmi

Technology	Sanger Sequencing	Next Generation Sequencing			
Manufacturer	Applied Biosystems	Roche 454	Illumina	Life Technologies	
Model	ABI 3730XL	GS FLX Titanium XL+	HiSeq 2000 dual flow cell	SOLiD 4 System	Ion PGM
Bases per RUN	~ 96 Kb	700 Mb	600 Gb	100 Gb	1 Gb
Time per RUN	2 h	~1 day	~11 days	~14 days	4.5 h
Reads per RUN	96	1 million	6 billions (paired-end)	1.4 billions	5 millions
Reads length	up to 1000 bp	up to 1000 bp (mode 700 bp)	2*100 bp	2*50 bp	up to 400 bp

TABELLA 1 Tabella comparativa tra la precedente e l'attuale generazione di sequenziatori e tra le differenti tipologie di questi ultimi
Fonte: raccolta di specifiche tecniche di strumentazione disponibili online sui siti dei produttori [14-18]

più avanzati che hanno permesso di elaborare in maniera sempre più efficiente i dati e di renderli disponibili alla comunità scientifica.

Lo storage

Il punto di partenza per l'analisi di sequenze NGS è senz'altro lo spazio-disco necessario per conservare i dati iniziali e tutte le successive elaborazioni. Si deve considerare, infatti, che ad una base sequenziata possono corrispondere da 8 fino a 16 byte (ma anche oltre, a seconda del tipo di analisi) e che una corsa HiSeq 2000 o SOLiD può portare ad una richiesta di alcuni TB di spazio, trascurando backup o eventuali ridondanze. Per avere un'idea della quantità di dati prodotti da piattaforme NGS, ci si può riferire ai circa 9 petabyte (18×10^{50} byte) generati nel 2010 solamente dal Sanger Institute, uno dei maggiori centri per il sequenziamento al mondo. Naturalmente è importante che questi dati siano adeguatamente accessibili sia per la consultazione sia per il processamento, il che comporta l'utilizzo di sistemi di gestione dati e di rete ad alte prestazioni. L'ENEA implementa già un'infrastruttura di questo tipo, denominata CRESCO, presente nel Centro Ricerche Portici. CRESCO si può considerare una delle primissime infrastrutture in Italia, dotata di un volume di storage GPFS cumulato di oltre 250 TB e collegata, tramite connessione infiniband a 20 Gbit/s, ai circa 3.000 core di calcolo.

L'elaborazione

Le applicazioni legate al sequenziamento si basano, per l'ottenimento del risultato finale, sull'assemblaggio e/o sull'allineamento delle read. La quantità già notevole e sempre crescente di dati prodotti pone delle problematiche complesse dal punto di vista sia delle richieste *hardware* (memoria totale richiesta e prestazioni delle *cpu*), sia dell'efficienza degli algoritmi.

L'assemblaggio *de novo*

L'assemblaggio *de novo* ha l'obiettivo di ricostruire una o più sequenze (l'intero genoma, i cromosomi,

i geni ecc.) partendo dalle *read* sequenziate che ne costituiscono i frammenti. Poiché la produzione di questi frammenti avviene in modo casuale, derivando da più copie dello stesso DNA o RNA di partenza, si verificano delle sovrapposizioni tra di essi che possono essere sfruttate per riottenere l'intera sequenza originaria. A tal proposito, la possibilità di sequenziare solo delle *read* corte con i sequenziatori di nuova generazione a maggiore *throughput*, rappresenta un problema rilevante. Se già in precedenza i software difficilmente erano in grado di risolvere porzioni genomiche con pattern complessi di sequenze ripetute, attualmente, con la riduzione della lunghezza delle read, tale problematica risulta ancora più evidente. Per completare l'assemblaggio possono essere utili sistemi NGS capaci di produrre read più lunghe, come lo strumento 454 della Roche; questa piattaforma permette, infatti, di ottenere frammenti lunghi fino a 1.000 bp, analogamente al sequenziamento con metodo Sanger. Una strategia alternativa, e largamente utilizzata, è il sequenziamento di librerie *paired-end* o *mate-pair* che, permettendo di determinare quali sequenze si trovano ad una specifica distanza fra loro, semplificano l'assemblaggio anche in presenza di lunghe porzioni altamente ripetitive. In generale, gli algoritmi di assemblaggio, partendo dalla sovrapposibilità (parziale) delle read sequenziate, operano inizialmente la ricostruzione dei primi assemblati o *contig*, e, successivamente, l'organizzazione di questi ultimi in strutture ordinate e orientate o *scaffold*. Sfruttando, quindi, l'informazione sulla distanza contenuta nelle librerie *paired-end* o *mate-pair*, si possono determinare in maniera univoca le posizioni reciproche dei *contig* all'interno degli *scaffold*.

I software più utilizzati per l'assemblaggio si possono dividere in due grandi categorie:

- *software* che utilizzano gli algoritmi *Overlap-Layout-Consensus* (OLC) come Newbler [19], Celera Assembler [20] e Arachne [21]. Questi algoritmi costruiscono un grafo in cui i nodi sono le read unite da un link in caso di *overlap* tra loro. Una volta completato, il grafo viene manipolato per estrarre gli insiemi di allineamenti multipli privi di *branch* (*contigs*) e successivamente viene considerata

l'informazione sulla distanza per ricavare gli scaffold. Questo approccio è più indicato per *read* medio-lunghe e a lunghezza variabile (tipicamente *read* 454 e Ion Torrent).

- *software* basati sui grafi di de Bruijn (DBG) come Euler [22], Velvet [23], Abyss [24] e SOAP2 [25]. In questo caso i nodi rappresentano sottostringhe di lunghezza k (k -mer) che va determinata in base alla lunghezza delle *read* disponibili e aggiustata eseguendo più tentativi; un link unisce due k -mer nel caso in cui essi si sovrappongano per $k-1$ basi. Anche in questo caso, dopo aver costruito il grafo relativo ai dati, esso viene manipolato eliminando, ove possibile, gli artefatti (*branch*, *loop*) per giungere agli *scaffold* finali. Rispetto ai *software* basati su algoritmi OLC, in questo caso si evita la prima fase di calcolo degli allineamenti (*cpu-demanding*) e risultano più semplici le manipolazioni sul grafo per estrarre i *contig*. Questo approccio è più indirizzato a trattare grandi quantità di *read* medio-corte (tipicamente *read* SOLiD e Illumina).

I problemi tipici che questi algoritmi incontrano sono dovuti ad errori di sequenziamento delle *read* e a porzioni della sequenza da ricostruire che risultano altamente ripetitive; questi elementi causano *loop* o rami ciechi nel grafo, complicando o rendendo impossibile la rilevazione di *contig* e *scaffold*.

In entrambi i casi, l'uso dei grafi consente di moderare la richiesta di memoria che rimane comunque notevole; per dare un'idea più precisa, se si considera un genoma da circa una Gigabase, sequenziato con un *coverage* 20x (come quello di pomodoro, nel cui progetto di sequenziamento l'ENEA è stato tra i capofila), la memoria RAM richiesta è di 60 GB, nel caso di un *software* come Newbler che sfrutta l'algoritmo OLC, e di circa 10 GB per Abyss, che invece utilizza quello DBG (considerando *read* di lunghezza media pari a 100 nucleotidi e una probabilità d'errore di 0,01 per base).

L'allineamento

L'allineamento delle sequenze è utilizzato in tutte le applicazioni legate al NGS. Nel caso di un genoma eucariote, milioni di *read* devono essere allineate al

genoma di riferimento ed i problemi che si possono riscontrare sono: la memoria richiesta, i tempi di calcolo, la gestione delle porzioni di sequenza ripetute sul genoma, gli eventuali errori presenti nelle *read* (SNP) o delezioni e inserzioni presenti nel genoma.

Anche in questo caso si sono affermate due tipologie di *software*: quelle basate sulle tabelle di *hashing*, e quelle basate sulla trasformata di Burrow-Wheeler (BW).

I *software* basati sulle tabelle di *hashing* (SSAHA [26], GASSST [27], SHRiMP2 [28]) operano un'indicizzazione³ della sequenza di riferimento per contenere l'utilizzo di memoria e velocizzare le ricerche. È possibile trattare errori (algoritmo *seed and extend*), ma questi non devono essere uniformemente distribuiti sulle *read*, poiché impedirebbero l'ancoraggio di almeno una loro porzione (da utilizzare come *seed*) e di conseguenza il completamento dell'allineamento; la lunghezza del *seed* è un parametro che va scelto a seconda del caso e degli scopi dell'analisi. Questi *software* hanno problemi di prestazioni nel caso di allineamenti su zone del riferimento con molte ripetizioni.

I *software* basati sulla trasformata BW (BWA [29], Bowtie [30]), invece, sono molto veloci anche negli allineamenti su porzioni di sequenza con ripetizioni. Al contrario, non esiste ancora una tecnica consolidata in grado di rilevare gli allineamenti in presenza di errori. Di seguito sono riportati degli esempi di applicazioni NGS per le quali è necessario l'allineamento delle *read*.

Studio dell'espressione differenziale dei geni. Il campione sequenziato è rappresentativo dell'effettivo trascrittoma della cellula, in quanto conserva i rapporti tra le concentrazioni degli mRNA presenti e quindi rende possibile un'analisi differenziale della loro espressione. Una caratteristica dei geni trascritti, che rende più difficoltosa l'analisi, è lo *splicing*. Negli organismi eucarioti la sequenza dell'mRNA "maturo", che viene tradotto in proteina/e, deriva infatti da un processo di rimozione (lo *splicing*) di alcuni segmenti genici (gli introni) dal pre-mRNA e dalla conseguente unione delle porzioni rimanenti e codificanti (gli esoni). Inoltre, uno stesso gene può andare incontro ad un processo di *splicing* alternativo che genera delle "varianti di *splicing*" o isoforme, ovvero mRNA

con sequenza differente sebbene originati dallo stesso gene. La determinazione delle espressioni differenziali di queste isoforme può essere utile per delineare il loro ruolo funzionale.

È possibile identificare quattro *step* principali nell'analisi dei dati di RNA-seq:

- **allineamento:** in questo caso il processo di *splicing* rende più difficoltoso l'allineamento perché una *read* potrebbe includere due esoni successivi presenti sulla sequenza genomica di riferimento. Si creano quindi dei *gap* che possono portare ad un fallimento dell'allineamento. Diversi *software* (Mapsplice [31], Tophat [32], GSNAP [33], QPALMA [34]), per rimediare a questo inconveniente, sono in grado di frammentare le *read* e di allineare i frammenti generati in modo da ricostruire l'allineamento comprendendo i *gap*; in questo modo, tali algoritmi consentono anche di identificare isoforme sconosciute.
- **ricostruzione dei trascritti:** i *software* che si occupano di questo *task* si possono dividere principalmente in 2 gruppi: quelli che effettuano una ricostruzione guidata utilizzando il genoma (Scripture [35], Cufflinks [36]) e quelli che invece lavorano senza utilizzare alcun riferimento (Velvet, TransAbyss [37]). Scripture e Cufflinks hanno anche una maggiore sensibilità nell'identificare le isoforme.
- **quantificazione dell'espressione:** la possibile esistenza di più isoforme per un trascritto crea delle ambiguità nello stabilire da quale di esse abbia origine una specifica *read*, e quindi per quale di esse conteggiarla. Esistono *software* come Alexa-seq [38] che stimano l'espressione conteggiando, per ogni isoforma, solamente le *read* che vi mappano unicamente e quindi quelle che allineano a livello di un esone associabile ad un'unica isoforma. Altri codici come Cufflinks, Miso [39] e RSEM [40] affrontano il problema costruendo delle funzioni di verosimiglianza che modellano il processo di RNA-seq. Le stime di espressione finali sono quelle che massimizzano tali funzioni, ovvero le più compatibili con le *read* ottenute da sequenziamento secondo il modello usato.
- **analisi differenziale dell'espressione:** dopo aver ottenuto le stime per l'espressione dei trascritti, il passo finale consiste nel valutare le differenze tra

i diversi campioni. In realtà, data la variabilità che comunque esiste nei risultati dell'RNA-seq e la variabilità intrinseca delle grandezze biologiche, sarebbe importante avere a disposizione un certo numero di repliche per ogni campione per poter procedere ad una corretta stima delle differenze. Qualora si disponga di repliche biologiche, si possono ottenere stime empiriche della variabilità con *software* del tipo di Myrna [41]. Tuttavia, è più frequente che non sia presente un numero sufficiente di repliche. Per ovviare a questa mancanza, sono stati sviluppati diversi modelli (ad es. in EdgeR [42], DESeq [43], Cuffdiff [36]) che permettono di ottenere livelli di significatività per l'espressione differenziale, anche in assenza di un gran numero di repliche.

Analisi ChIP-seq. Le sequenze derivate da questa analisi dovrebbero risultare particolarmente arricchite in *read* provenienti da quelle porzioni di DNA che l'immunoprecipitazione ha selezionato rispetto al resto dei frammenti del DNA (*background*). Quindi, dopo l'allineamento, tipicamente si producono dei picchi a livello dei siti di legame tra fattore di trascrizione o istone e DNA che devono essere rilevati; quest'operazione risulta molto delicata per la relativa facilità con cui si possono avere falsi positivi e falsi negativi. Durante l'analisi occorre quindi trovare il giusto bilanciamento tra sensibilità (capacità di rilevare un picco) e specificità (capacità di minimizzare i falsi positivi), a seconda degli scopi. Esistono diverse decine di programmi disponibili (tra cui CisGenome [44], Erange [45], MACS [46]) che si differenziano principalmente per la tecnica di *peak-detection*, per il modo col quale si stabilisce successivamente la significatività di un picco e per la gestione del segnale di *background*. Dopo aver definito quali zone del riferimento corrispondono ai picchi di allineamento, l'analisi può procedere diversamente a seconda degli scopi:

- utilizzando *software* come MEME [47], Scope [48], CisGenome per estrarre i motivi maggiormente ricorrenti dalle regioni corrispondenti ai picchi. Tali *software* sono utili per individuare i motivi di legame di uno specifico TF (ognuno infatti ha una sequenza preferenziale di nucleotidi alla quale si lega);

- utilizzando un programma di *motif search* come MAST [49] per individuare in quali e quanti picchi si ha un riscontro per il motivo cercato. Questo programma permette di individuare se e dove si è legato al genoma un TF in base al motivo di legame noto.

Analisi delle variazioni geniche. In questo caso lo scopo è determinare le differenze statisticamente rilevanti tra uno o più campioni e una sequenza di riferimento (ad es. il genoma). Una *pipeline* piuttosto consolidata per la rilevazione delle varianti si basa su SAMtools [50] e prevede, dopo l'allineamento, i seguenti *step*:

- *pileup* delle sequenze: per ogni posizione sul riferimento vengono considerate le read che la ricoprono e se queste confermano o meno la base azotata prevista; successivamente viene calcolata la verosimiglianza dei dati per ogni possibile genotipo;
- chiamata delle varianti significative: tramite inferenza bayesiana⁴ vengono rilevate le varianti significative. Questa fase richiede un'opportuna scelta dei parametri; ad esempio, le soglie per la rilevazione di varianti germinali (congenite e quindi presenti in tutte le cellule dell'organismo) possono essere piuttosto severe, mentre quelle per la rilevazione

di varianti somatiche (non congenite, e quindi che possono essere solo in alcune cellule del campione) devono essere più basse.

Conclusioni

Le tecniche di NGS hanno permeato le attività di biologia molecolare in vari settori, dalle biotecnologie vegetali alla genetica medica, favorendo la comprensione di numerosi meccanismi alla base della fisiologia e della patologia delle specie viventi. Accanto agli straordinari progressi della biologia molecolare, in grado di realizzare nuove metodiche e protocolli di analisi "customizzati" su apposite piattaforme tecnologiche (composte da specifici strumenti e dal software di acquisizione dati), l'informatica e le tecniche di analisi dati stanno contribuendo in maniera significativa a decretare il successo delle nuove piattaforme e l'acquisizione di importanti progressi scientifici in questi settori.

ENEA, come altre istituzioni di ricerca in Italia e nel mondo, sta attivamente collaborando e partecipando a questo sforzo della comunità scientifica internazionale intervenendo, con le proprie competenze e le proprie strumentazioni, in numerosi programmi internazionali sulle specie vegetali di maggiore importanza



FIGURA 1 Il personale del laboratorio Genechron dello spin-off ENEA Ylichron S.r.l.
Fonte: ENEA



agroalimentare (grano, patata, pomodoro). Molte competenze tecnico-scientifiche del settore della genomica e NGS sono state trasferite ad un proprio spin-off (Ylichron s.r.l.) che le sta portando sul mercato

negli ambiti della diagnostica medica, attivando nuove collaborazioni con importanti centri di ricerca medica per la realizzazione di nuovi servizi basati sull'utilizzo delle nuove tecniche di biologia molecolare.

Note

1. Per dare un'idea degli ordini di grandezza in gioco si pensi che il genoma del virus HIV è di 3,5 kB, del batterio E. coli 4,6 MB, quello umano 3,2 GB.
2. Il numero di volte per cui una data regione di DNA è sequenziata.
3. Operazione che consiste nel suddividere la sequenza di riferimento in sottostringhe s di breve lunghezza (10-20 basi) che vengono associate a degli indici (ad es interi binari crescenti) e ad un vettore che contiene tutte le posizioni del riferimento in cui ha inizio quella sottostringa s.
4. Procedimento per la stima di parametri che, partendo da un'idea della distribuzione di probabilità per i parametri (distribuzione a priori), determina, utilizzando anche i risultati osservati, la distribuzione detta "a posteriori", la cui massimizzazione fornisce la stima a cui si è interessati.

Bibliografia

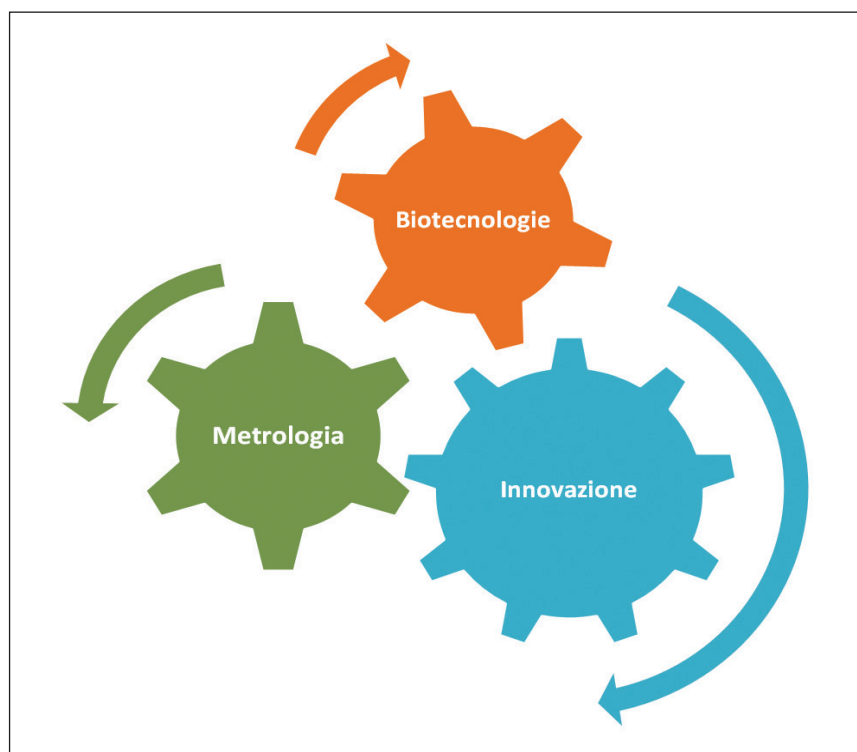
- [1] Potato Genome Sequencing Consortium. *Genome sequence and analysis of the tuber crop potato*. Nature 2011; 475(7355): 189-95.
- [2] Tomato Genome Consortium. *The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution*. Nature 2012; 485(7400): 635-41.
- [3] International Human Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 2001; 409, 860-921.
- [4] Massa AN et al. *The transcriptome of the reference potato genome Solanum tuberosum Group Phureja clone DM1-3 516R44*. PLoS One 2011; 6(10): e26801.
- [5] Rioux JD et al. *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat Genet 2007; 39(5): 596-604.
- [6] Sanders SJ et al. *De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism*. Nature 2012; 485(7397): 237-241.
- [7] Turnbaugh PJ et al. *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature 2009; 457(7228): 480-4.
- [8] Jaenicke S et al. *Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing*. PLoS One 2011; 6(1): e14519.
- [9] Schloss PD and Handelsman J. *Biotechnological prospects from metagenomics*. Curr Opin Biotechnol 2003; 14(3): 303-10.
- [10] Parameswaran P et al. *Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity*. J Virol 2012; 86(16): 8546-58.
- [11] Jiang C and Pugh BF. *Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics*. Nat Rev Genet 2009; 10(3): 161-72.
- [12] Henikoff S. *Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression*. Nat Rev Genet 2008; 9(1): 15-26.
- [13] Ku CS et al. *Studying the epigenome using next generation sequencing*. J Med Genet 2011; 48(11): 721-30.
- [14] <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/3730XL>
- [15] <http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp>
- [16] http://www.illumina.com/systems/hiseq_2000_1000.ilmn
- [17] <https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Next-Generation-Sequencing/Next-Generation-Sequencing-Systems-Accessories.html>
- [18] <https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Semiconductor-Sequencing/pgm.html>
- [19] Margulies M et al. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature 2005; 437(7057): 376-80.
- [20] Myers EW et al. *A whole-genome assembly of Drosophila*. Science 2000; 287 (5461): 2196-2204.
- [21] Batzoglou S et al. *ARACHNE: a whole-genome shotgun assembler*. Genome Res 2002; 12: 177-189.
- [22] Pavel A et al. *An Eulerian path approach to DNA fragment assembly*. PNAS 2001; 98(17): 9748-9753.
- [23] Zerbino DR and Birney E. *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs*. Genome Res 2008; 18: 821-829.
- [24] Simpson JT et al. *ABySS: A parallel assembler for short read sequence data*. Genome Res 2009; 19: 1117-1123.
- [25] Li R et al. *SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment*. Bioinformatics 2009; 25(15): 1966-7.
- [26] Ning Z et al. *SSAHA: a fast search method for large DNA databases*. Genome Research 2001; 11(10): 1725-9.
- [27] Rizk G and Lavenier D. *GASSST: global alignment short sequence search tool*. Bioinformatics 2010; 26(20): 2534-40.
- [28] Rumble SM et al. *SHRIMP: accurate mapping of short color-space read*. PLoS Comput Biol 2009; 5(5): e1000386.
- [29] Li H and Durbin R. *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform*. Bioinformatics 2009; 25: 1754-60.
- [30] Langmead B et al. *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biol 2009; 10: R25.
- [31] Wang K et al. *MapSplice: accurate mapping of RNA-seq read for splice junction discovery*. Nucleic Acids Res 2010; 38: e178.
- [32] Trapnell C et al. *TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq*. Bioinformatics 2009; 25: 1105-1111.
- [33] Wu TD and Nacu S. *Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short read*. Bioinformatics 2010; 26: 873-881.
- [34] De Bona F et al. *Optimal spliced alignments of short sequence read*. Bioinformatics 2008; 24: i174-i180.

- [35] Guttman M et al. *Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs*. Nat Biotechnol 2010; 28: 503-510.
- [36] Trapnell C et al. *Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation*. Nat Biotechnol 2010; 28: 511-515.
- [37] Birol I et al. *De novo transcriptome assembly with ABySS*. Bioinformatics 2009; 25 (21): 2872-2877.
- [38] Griffith M et al. *Alternative expression analysis by RNA sequencing*. Nature Methods 2010; 7(10): 843-847.
- [39] Katz Y et al. *Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation*. Nature Methods 2010; 7: 1009-1015.
- [40] Wang X et al. *Isoform abundance inference provides a more accurate estimation of gene expression levels in RNA-seq*. J Bioinform Comput Biol 2010; 8 (Suppl.1): 177-192.
- [41] Langmead B et al. *Cloud-scale RNA-sequencing differential expression analysis with Myrna*. Genome Biol 2010; 11: R83.
- [42] Robinson MD et al. *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics 26, 139-140 (2010).
- [43] Anders S and Huber W: *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biology 2010; 11: R106.
- [44] Ji H et al. *An integrated software system for analyzing ChIP-chip and ChIP-seq data*. Nat Biotechnol 2008; 26: 1293-1300.
- [45] Mortazavi A et al. *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nature Methods 2008; 5: 621-628.
- [46] Zhang Y et al. *Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS)*. Genome Biology 2008; 9: R137.
- [47] Bailey TL and Elkan C. *Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers*. Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 1994; pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California.
- [48] Chakravarty A et al. *A novel ensemble learning method for de novo computational identification of DNA binding sites*. BMC Bioinformatics 2007; 8: 249.
- [49] Timothy L et al. *Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches*. Bioinformatics 1998; 14(1): 48-54.
- [50] Li H et al. *The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools*. Bioinformatics 2009; 25: 2078-9.

Biotechnologie e Metrologia

■ Giovanna Zappa

Lo sviluppo delle Biotechnologie ha aperto la via alla realizzazione di nuovi sistemi diagnostici basati sull'analisi, la comparazione e la predizione di sequenze geniche e molecolari. Inoltre i grandi progressi nei campi di nanotecnologie e nanomateriali, microelettronica, elettronica molecolare e ICT e la loro integrazione con le biotecnologie hanno reso possibile lo sviluppo di nuovi sensori e microsistemi da impiegare per le analisi cliniche, la sicurezza alimentare e il monitoraggio ambientale. L'allargamento della Metrologia ai settori emergenti della Chimica e della Biologia ha comportato un grande sforzo per omogeneizzare la terminologia e trasferire concetti e metodologie – originariamente sviluppati per le misure di grandezze fisiche – ai nuovi settori applicativi. È ampiamente riconosciuto che soltanto mediante un approccio metrologico è possibile ottenere risultati affidabili, requisito indispensabile quando le misure riguardano la sicurezza e la salute. Un risultato è affidabile quando



può essere dimostrata l'assenza di errori sistematici e quando fornisce tutte le informazioni necessarie per un suo corretto utilizzo ed in particolare i margini di incertezza opportunamente calcolati. Il riferimento internazionale per la valutazione dell'incertezza di misura è la guida ISO/IEC [1]. Diverse sono le difficoltà di trasferimento delle metodologie di calcolo da un settore applicativo

all'altro, tra cui l'instabilità e la variabilità dei campioni, il tipo di variabili casuali (continue o discrete) ed i loro modelli di distribuzione di probabilità (normale, di Poisson, binomiale). Anche se per la chimica analitica è stata sviluppata una guida specifica [2], bisogna considerare che le misure basate sulle Biotechnologie spesso coinvolgono proprietà classificatorie, come l'identità

■ Giovanna Zappa

ENEA, Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale

e la sequenza. Queste sono per definizione “non misurabili”, ma quando entrano in un processo di misura o in qualsivoglia determinazione analitica giocano un ruolo decisivo sia sull’accuratezza che sull’incertezza. Va infatti sempre valutato – in termini di probabilità (di identità, omologia, similarità ecc.) – il contributo all’incertezza finale di misura. I Materiali di Riferimento (RM) rappresentano generalmente l’unico strumento per dimostrare l’affidabilità e la comparabilità delle misure chimiche e biologiche. È indispensabile però impiegare RM idonei per lo specifico scopo e provvedere ad un loro corretto utilizzo all’interno del processo di misurazione [3]. EU-JRC IRMM ha pubblicato una guida sull’incertezza di misura specifica per i test OGM [4] ed una guida sull’utilizzo di

RM nei test genetici [5]. Uno degli esempi più eclatanti di implicazioni per la salute derivanti da un uso improprio della tecnologia RT-qPCR è quello relativo alla diffusione di dati che dimostravano la presenza del virus del morbillo in bambini con disturbi dello sviluppo [6], a sostegno dell’ipotesi di una correlazione diretta tra vaccinazione trivalente, enteropatie ed autismo. L’allarmismo che si diffuse tra la popolazione inglese (con i conseguenti disastrosi effetti dovuti alla diminuzione delle vaccinazioni) venne interrotto solo grazie alla dettagliata analisi di Bustin [7], che dimostrò la presenza di una serie di errori ed imprecisioni nel dosaggio, stabilendo successivamente i requisiti minimi per poter pubblicare risultati ottenuti mediante RT-qPCR [8]. La tecnica RT-PCR, grazie alla facilità

di esecuzione, all’apparente semplicità e allo sviluppo di software user-friendly, è sempre più diffusa ed è pertanto indispensabile – per evitare la generazione di dati inaffidabili – impiegare un approccio metrologico anche per questo settore di misura [9].

Bibliografia

- [1] GUM-ISO/IEC Guide 98-3.
- [2] QUAM-EURACHEM/CITAC Guide (2012).
- [3] ISO-REMCO Guides 30÷35.
- [4] EUR 22756-2009.
- [5] EUR 23256-2008.
- [6] V. Uhlmann et al. *Mol Pathol* 55:84–90 (2002).
- [7] S.A. Bustin. *Eur Pharm Rev Dig* 1:11–16 (2008).
- [8] S.A. Bustin et al. The MIQE guidelines. *Clin Chem* 55:611–622 (2009).
- [9] J. Hugget, S.A. Bustin. *Accred Qual Assur*. 2011.