

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA



DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA

XXVI CICLO

**ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA DI BIOFILM
FOTOSINTETICI IN AMBIENTE RUPESTRE**

**Tutor
Chiar.mo Prof. Paolo Caputo**

Candidata

**Co-tutor
Prof.ssa Paola Cennamo**

Dott.ssa Antonella Giorgio

**Coordinatore
Chiar.mo Prof. Luciano Gaudio**

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

PREMESSA	5
CAPITOLO 1: IL BIODETERIORAMENTO DEI BENI CULTURALI	8
1.1 I FENOMENI DI BIODETERIORAMENTO	9
1.2 BIORICETTIVITÀ DEI MATERIALI	10
1.3 MECCANISMI DI COLONIZZAZIONE MICROBICA	12
1.4 CONSEGUENZE DELLA CRESCITA MICROBICA	18
1.5 INFLUENZA DELL' AMBIENTE NEI FENOMENI DI BIODETERIORAMENTO	21
1.6 SISTEMATICA DEI BIODETERIOGENI	23
1.6.1 BACTERIA	23
1.6.2 CYANOPHYTA	23
1.6.3 CHLOROPHYTA	24
INDICE DELLE FIGURE	26
CAPITOLO II: I FENOMENI DI BIODETERIORAMENTO IN AMBIENTE RUPESTRE	28
2.1 GLI AMBIENTI RUPESTRI: GROTTA A FUNZIONE VOTIVA	29
2.2 IL BIODETERIORAMENTO DI AFFRESCHI E PITTURE MURALI	30
2.3 LE UNITÀ RUPESTRI SUL TERRITORIO CAMPANO	33
2.4 ANALISI DELLE ALTERAZIONI A CARICO DELLE SUPERFICI	36
2.5 DISCUSSIONE	38

2.6 CONCLUSIONI	38
INDICE DELLE FIGURE	40
CAPITOLO III: ANALISI QUALITATIVA DEI BIOFILM FOTOSINTETICI IN AMBIENTE RUPESTRE	
3.1 METODOLOGIE DI INDAGINE DEI BIOFILM FOTOSINTETICI	51
3.2 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI BIOFILM FOTOSINTETICI	52
3.3 MICROSCOPIA OTTICA ED ELETTRONICA	53
3.4 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE	55
3.4.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO	55
3.4.2 AMPLIFICAZIONE PCR	56
3.4.3 CLONAGGIO MOLECOLARE	57
3.4.4 SEQUENZIAMENTO	57
3.5 ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI	58
3.5.1 CLUSTER ANALYSIS	58
3.5.2 TEST DI KRUSKAL WALLIS	59
3.6 RISULTATI	59
3.7 ANALISI STATISTICA DEI CAMPIONI	77
3.8 DISCUSSIONE	78
3.9 CONCLUSIONI	80
INDICE DELLE FIGURE	81

CAPITOLO IV: ANALISI QUANTITATIVA DEI BIOFILM FOTOSINTETICI	95
4.1 ANALISI QUANTITATIVE IN CAMPO AMBIENTALE	96
4.2 REAL-TIME PCR	97
4.3 MATERIALI E METODI	100
4.3.1 COSTRUZIONE DEI PRIMER	100
4.3.2 REAL-TIME PCR	101
4.4 RISULTATI	102
4.5 DISCUSSIONE	105
4.6 CONCLUSIONI	106
INDICE DELLE FIGURE	107
CAPITOLO V: BIBLIOGRAFIA	120

PREMESSA

La conservazione del patrimonio culturale rappresenta un problema importante per la società moderna, sia da un punto di vista economico che culturale. L'ampia distribuzione di beni architettonici nei paesi del Bacino del Mediterraneo, e la loro importanza culturale, artistica e religiosa sottolinea il potenziale impatto sociale che i fenomeni di biodeterioramento hanno su di essi. La conoscenza dei vari fattori responsabili del deterioramento dei monumenti e delle opere d'arte ha una fondamentale importanza per definire idonee strategie di conservazione mirate anche alla prevenzione. Diverse discipline, tra cui la chimica, la biologia e la geologia si sono adoperate a supportare quella che può essere oggi definita la scienza dei Beni Culturali.

Tutti i materiali sono, per la loro natura, esposti all'azione di fattori fisici, chimici e biologici che provocano cambiamenti sia strutturali che composizionali (Warscheid et al., 2000). Negli ultimi anni è stato ampiamente dimostrato il ruolo svolto dai microorganismi nei fenomeni di degradazione dei beni culturali: la crescita, lo sviluppo e le attività metaboliche possono apportare danni fisico-chimici ed estetici ai manufatti artistici, tanto da avere conseguenze negative per la loro conservazione. Moltissime specie di microorganismi (batteri, alghe unicellulari, funghi, piante superiori) possono trovare condizioni favorevoli per il loro sviluppo sia su opere statuarie e monumentali che su resti archeologici (Kovacik, 2000). Nel complesso tutti questi fenomeni di alterazione vanno sotto il nome di biodeterioramento (Hueck, 1965).

Lo scopo del lavoro di tesi del mio dottorato è stato la caratterizzazione morfologica e molecolare dei principali microorganismi che si sviluppano in grotte naturali situate in ambiente rupestri. In particolare l'attenzione viene rivolta ai fenomeni di biodeterioramento che insistono su affreschi e dipinti murali rinvenuti all'interno di grotte votive. Lo studio della microflora biodeteriogenica si è concretizzato attraverso una serie di campionamenti ambientali effettuati in uno stesso periodo dell'anno e miranti all'individuazione degli organismi più frequenti, a una loro analisi morfologica e molecolare, finalizzata al riconoscimento del tipo di organismo e della sua azione di degrado sul monumento.

Sono stati individuati vari siti, presenti sul territorio Campano, che presentano le caratteristiche di ambiente rupestre sopra indicate. I siti sono: *La Grotta delle Formelle* e *la Grotta dei Santi* a Calvi Risorta (Caserta), *la Grotta di San Michele* a Camigliano

(Caserta), la *Grotta di San Michele* a Preturo (Avellino), la *Grotta di San Michele* a Faicchio (Benevento), *Grotta dell'Angelo* ad Olevano sul Tusciano (Salerno), la *Grotta di San Michele* di Curti (Gioia Sannitica, Caserta) e la *Grotta di Sant'Angelo d'Alife* (Caserta). In ogni sito sono state prelevate porzioni di *biofilm*, dalle superfici affrescate e da quelle rocciose, al fine di caratterizzarne la composizione, valutarne le eventuali differenze e analizzare l'importanza della tipologia di substrato per la colonizzazione microbica. A tal scopo sono state utilizzate tecniche di microscopia ottica ed elettronica e di biologia molecolare; le tecniche di microscopia hanno consentito di ottenere informazioni preliminari sugli organismi presenti nel *biofilm*. Le tecniche di biologia molecolare, basate su PCR ambientali e clonaggio molecolare, hanno consentito un'indagine qualitativa più approfondita dei *biofilm* e dei microorganismi coinvolti nei fenomeni di biodeterioramento. Dopo aver analizzato la composizione microbica dei *biofilm* sono state eseguite tramite Real-time PCR, varie analisi quantitative sui principali taxa fotosintetici presenti nei *biofilm* analizzati, ovvero quello delle Chlorophyta e delle Cyanophyta. Lo scopo è di valutare quanto le variazioni di substrato e dei parametri ambientali possano incidere sull'abbondanza relativa di questi microorganismi.

CAPITOLO I

IL BIODETERIORAMENTO

DEI BENI CULTURALI

1.1 I FENOMENI DI BIODETERIORAMENTO

Il termine biodeterioramento è stato definito circa 45 anni fa da Hueck (1965) come un “*qualsiasi cambiamento indesiderato nelle proprietà di un materiale, causato dall’attività vitale degli organismi viventi*”. In molti ambienti naturali le trasformazioni fisiche e chimiche dei materiali sono considerate delle condizioni necessarie e positive; tuttavia su un materiale artistico le trasformazioni del substrato indotte dalla microflora colonizzante, in associazione con vari fattori ambientali, sono viste come un fenomeno distruttivo e negativo, sia da un punto di vista culturale che economico (Kovacik, 2000). Per molto tempo gli effetti biologici sui materiali da costruzione sono stati considerati dirette conseguenze dei processi di degrado fisici e chimici e immediati risultati dei fenomeni di inquinamento atmosferico; si pensava ad essi come ad un problema secondario, che si verifica solo dopo un avanzato stato di degrado predeterminato da processi fisici e chimici. In altre parole si pensava che i fattori abiotici, inducendo delle modificazioni a carico del substrato, ne condizionassero le proprietà fisico-chimiche, facilitando la successiva colonizzazione microbica. Inoltre si riteneva che i fenomeni di biodeterioramento andassero a modificare il substrato solo da un punto di vista estetico, ovvero inducendo la comparsa di patine e macchie colorate sulla superficie, in seguito al rilascio di pigmenti biogenici. Recentemente, diversi approcci analitici hanno dimostrato il ruolo svolto dai microorganismi nei fenomeni di deterioramento, che già nei primi stadi di esposizione sono responsabili di modificazioni fisiche, chimiche ed estetiche della superficie colonizzata (Urzi et al., 2001). Questi possono utilizzare la superficie come supporto per la crescita, servendosi delle componenti minerali o dei depositi superficiali quali metaboliti necessari per lo sviluppo. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato, che la velocità e l’entità della colonizzazione microbica sono influenzate oltre che da parametri ambientali, quali la disponibilità di acqua, anche dalle proprietà fisico-chimiche del materiale, come la composizione mineralogica. Infatti, sebbene i microorganismi colonizzino in maniera permanente un determinato ambiente, la loro attività dannosa non è costante, ma periodica e definita dalle molteplici condizioni che caratterizzano l’habitat colonizzato. Oggi il concetto di biodeterioramento è inteso con un’accezione più ampia: si sa infatti che il fenomeno è controllato da rapporti sinergici e antagonisti tra microflora colonizzante e fattori ambientali; quindi esso non può essere considerato come un fenomeno isolato, in quanto si verifica in concomitanza con altri fenomeni di degrado fisico e chimico, e risulta

per questo difficile attribuire ogni danno specifico ad una singola causa. I beni architettonici vanno intesi come degli ambienti complessi ed eterogenei; l'eterogeneità è legata alle numerose interrelazioni tra le varie popolazioni biologiche e tra queste ed il substrato, così come per altri processi che si verificano nell'ambiente circostante.

1.2 BIORICETTIVITÀ DEI MATERIALI

La colonizzazione biologica di un substrato o materiale esposto a condizioni esterne (fontane, statue, monumenti, siti archeologici) è sempre influenzata dalle condizioni microclimatiche; esiste infatti una stretta correlazione tra sviluppo biologico e fattori abiotici quali tipo di substrato, fenomeni meteorologici o tipologia ambientale (ad esempio urbana o rurale). Molti organismi, tra cui fotoautotrofi, possono sfruttare un dato substrato come supporto per la crescita e, in particolari circostanze favorire fenomeni di colonizzazione più complessi con conseguenti effetti di biodeterioramento. Questi organismi si sviluppano utilizzando le componenti minerali o i depositi superficiali dei substrati colonizzati modificando in maniera negativa lo stesso materiale in seguito ad attività metabolica. Gli organismi che promuovono questi effetti di decadimento biologico sono definiti biodeteriogeni.

Con il termine di bioricettività (Guillitte, 1995), introdotto per i materiali lapidei e successivamente esteso a tutti i beni culturali, si indica l'attitudine di un materiale ad essere colonizzato da uno o più gruppi di microorganismi. Comprende l'insieme delle proprietà di un materiale che favoriscono e/o danno inizio alla colonizzazione microbica. Possono essere definiti diversi livelli di bioricettività: la bioricettività primaria o intrinseca" è collegata al potenziale iniziale di colonizzazione di un substrato. In seguito all'azione degli organismi e di altri fattori fisici, chimici e biologici, questa si trasforma in bioricettività secondaria; infine, i trattamenti conservativi applicati ai substrati, ne modificano le caratteristiche e inducono una bioricettività terziaria.

Qualsiasi materiale da costruzione è soggetto ad un'alterazione meteorica irreversibile indotta dall'azione sinergica di fattori esterni ed intrinseci, con differenti livelli deteriorativi e con differenti cambiamenti composizionali e geometrici. I materiali, siano essi naturali o artificiali, sono caratterizzati da una propria struttura petrografica, tessitura, colorazione, composizione chimica e mineralogica. Rugosità superficiale, porosità,

igroscopicità, composizione chimica e stato di conservazione del materiale sono tra i fattori più importanti a favorire la bio-colonizzazione e possono, in vario modo, portare al deterioramento di un'opera d'arte (Caneva et al., 2007a). Rocce sedimentarie (calcare, arenaria, travertino, tufo), metamorfiche (marmi), ignee (basalto) e plutoniche (granito) sono state comunemente utilizzate come materiale da costruzione e per composizioni artistiche. Allo stesso modo è ampiamente diffuso l'uso di materiali artificiali quali ceramiche, stucchi e affreschi.

La porosità indica il rapporto tra gli spazi vuoti (pori) e il volume totale del materiale considerato; tale proprietà modifica la permeabilità del materiale e i fenomeni di diffusione molecolare (Amoroso, 2002). Pori di grandi dimensioni aumentano la permeabilità del materiale; al contrario spazi interstiziali di dimensioni ridotte aumentano la diffusione molecolare. I microorganismi fotoautotrofi, come cianobatteri coccoidi e alghe verdi, durante le fasi di colonizzazione primaria di un materiale sfruttano le nicchie ecologiche formate dagli spazi porosi dello stesso materiale, come supporto per la crescita. Anche spore e semi possono depositarsi all'interno di questi pori e iniziare a svilupparsi nel momento in cui le condizioni micro ambientali diventano favorevoli. È stato dimostrato che la macroporosità influenza il numero di siti d'attacco per i microorganismi, facilitandone la diffusione e lo sviluppo all'interno del sistema di pori (Guillitte, 1995). Pori di grandi dimensioni promuovono la colonizzazione microbica solo temporaneamente in quanto non garantiscono una buona ritenzione idrica, mentre materiali con pori piccoli favoriscono la formazione di un sistema di capillarità permanente migliorando la capacità di trattenere l'acqua. Quest'ultima è una condizione fondamentale per sostenere la colonizzazione microbica.

Nei fenomeni di colonizzazione microbica l'igroscopicità è una caratteristica fondamentale da considerare. È strettamente correlata alla porosità del materiale, alla pressione capillare dell'acqua presente all'interno del materiale e ai fenomeni di trasporto, ritenzione e diffusione dell'acqua. L'acqua, sia in forma liquida che di vapore può essere assorbita in seguito a processi di imbibizione o condensazione. Inoltre la quantità di vapor acqueo all'interno del materiale è correlata ai livelli di umidità dell'ambiente esterno: maggiore è la percentuale di umidità relativa esterna maggiore è l'assorbimento di acqua. L'acqua in fase liquida è assorbita per capillarità e all'interno del materiale circola per diffusione o per

osmosi. La disponibilità di acqua è essenziale per lo sviluppo degli organismi ma è cruciale la capacità di ritenzione, il tempo di permanenza dell'acqua all'interno del materiale. Di conseguenza, un altro parametro da considerare è il processo di evaporazione dell'acqua, per il quale minore è il tasso di evaporazione, maggiore è il grado di ritenzione e di colonizzazione microbica.

La rugosità può essere intesa come l'insieme delle irregolarità o delle imperfezioni superficiali di un materiale ed è dovuto ai cambiamenti climatici, fattori fisici, eutrofizzazione e fenomeni di inquinamento e successione biologica. È stato ampiamente dimostrato che una più elevata colonizzazione microbica si verifica in corrispondenza di un aumento di rugosità del materiale poiché aumenta l'area superficiale totale, aumentano le forze di coesione e aumenta l'assorbimento di acqua.

I componenti chimici, quali micro e macroelementi di un materiale, possono influenzare la crescita microbica e i tipi di microorganismi coinvolti, in quanto modificano la disponibilità di nutrienti inorganici. Quando la superficie del materiale di interesse è eutrofizzata, la composizione chimica naturale viene modificata e altri microorganismi possono svilupparsi, come funghi e batteri eterotrofi.

1.3 MECCANISMI DI COLONIZZAZIONE MICROBICA

Come già accennato in precedenza, i meccanismi di colonizzazione microbica hanno inizio nel momento in cui un organismo trova le condizioni idonee per attaccare un substrato, crescere e moltiplicarsi. Questo contatto iniziale cellula-substrato è regolato da un'attrazione chimica transitoria, difficile da caratterizzare, e dipendente dalle caratteristiche del microhabitat. Gli organismi fotosintetici si sviluppano facilmente sulle superfici e possono portare allo sviluppo di consorzi microbici molto più complessi, caratterizzati dalla presenza anche di organismi eterotrofi, dotati di attività deteriotrofica ancora più determinante (Tiano et al., 1993; Tomaselli et al., 2000). Questi organismi fotoautotrofi porteranno alla formazione di un *biofilm*, ovvero un sistema complesso di cellule monostratificato o pluristratificato, incorporate in una matrice polimerica extracellulare idratata e arricchito di sostanze organiche ed inorganiche (Morton et al., 1994; Roldan et al., 2003). Tali consorzi microbici possono svilupparsi in qualsiasi contesto ambientale, su qualsiasi substrato solido in condizioni di elevata disponibilità di

acqua. Sono infatti costituiti principalmente da acqua (70-95%), sostanze polisaccaridiche e microorganismi fotoautotrofi (alghe, cianobatteri, diatomee) ed eterotrofi (batteri, funghi, protozoi), incorporati in questa matrice idratata. La proporzione tra ciascun gruppo di organismi varia a seconda delle stagioni ed è influenzata dalla tipologia di habitat. I *biofilm* inglobano al loro interno anche detriti cellulari, particolato e pulviscolo atmosferico, spore e materiale inorganico di natura differente assorbito dal substrato (Warscheid, 2000). La complessità strutturale dei *biofilm* è mantenuta tale dalla presenza di biopolimeri quali esopolisaccaridi, o EPS, aventi proprietà adesive e indispensabili nelle prime fasi dello sviluppo dei *biofilm*, poiché facilitano l'attacco delle cellule al substrato (Decho et al., 2000; Barranguet et al., 2005).

È stato ampiamente dimostrato che lo sviluppo dei *biofilm* può essere schematizzato in stadi (Morton et al., 1994), che si susseguono secondo lo schema seguente (Figura 1.1):

- Modificazione molecolare della superficie: prima dell'attacco dei microorganismi si assiste alla formazione di uno strato organico molecolare sulla superficie del substrato. L'adesione di nutrienti organici ed inorganici influenzerà le fasi successive.
- Attacco reversibile: l'attacco iniziale e reversibile da parte dei colonizzatori primari (principalmente batteri) può avvenire per sedimentazione, attraverso moti convettivi all'interno di masse liquide che trasportano i batteri sulle superfici, attraverso un movimento attivo delle cellule mobili o in seguito all'instaurarsi di interazioni elettrostatiche cellula-substrato. Questo è lo stadio che influenza maggiormente lo sviluppo del *biofilm*, in quanto reversibile può portare all'interruzione dell'intera sequenza di eventi.
- Attacco irreversibile: i microorganismi legati reversibilmente alla superficie cominciano a produrre EPS, attraverso la stimolazione sensoriale garantita dalla presenza di specifiche proteine di membrana. Si sviluppano così ponti cellula-cellula, che contribuiscono a rafforzare il legame con la superficie e a rendere il distacco da essa sempre più difficile. È questo lo stadio in cui si assiste allo sviluppo di colonizzatori secondari (cianobatteri, alghe e funghi).

- Colonizzazione: rappresenta lo stadio finale di sviluppo del *biofilm*. I colonizzatori, ormai legati irreversibilmente alla superficie, cominciano a dividersi formando microcolonie, considerate l'unità organizzativa di base del *biofilm*. Da questo momento in poi è facilitato il legame di altre cellule alla superficie e si assiste ad un aumento di complessità strutturale del *biofilm*. È da sottolineare che la colonizzazione di una superficie da parte di un colonizzatore primario influenza in maniera sostanziale i tipi di microrganismi che si svilupperanno successivamente.

Da questa sequenza di eventi si giunge alla formazione di un *biofilm* maturo (Figura 1.2), caratterizzato da una complessa eterogeneità genetica, tale da conferire stabilità e resistenza alla biocenosi contro gli stress ambientali (Flemming, 1993). La porzione superiore del *biofilm* è tipicamente dominata da microorganismi fotoautotrofi in attiva divisione per l'elevata concentrazione di sostanze nutritive, come i cianobatteri e le alghe, mentre gli strati sottostanti sono costituiti da batteri anossici, come i solfobatteri, con tasso di crescita fortemente ridotto. Lo sviluppo di un *biofilm* dipende da processi stocastici e meccanici, da fenomeni deterministici e cambiamenti temporali; è influenzato da condizioni ambientali (specialmente la luce, la temperatura e la disponibilità di acqua), dalle caratteristiche del substrato e dalla tipologia di microorganismi presenti in quel determinato contesto ambientale. Lo sviluppo della flora biodeteriogenica è altresì influenzato dall'insieme delle interazioni tra fattori biotici ed abiotici; da tali interazioni possono infatti scaturire differenti dinamiche e differenti meccanismi di successione ecologica.

La manifestazione più evidente della colonizzazione di un substrato da parte della microflora epilitica è la presenza di biopatine, che alterano l'aspetto estetico fisico e chimico del substrato (Krumbein, 2003). A tali formazioni, ben visibili sul substrato, si aggiungono le associazioni microbiche che si istaurano più in profondità, e che vanno a modificare l'assetto strutturale di base del materiale. Da questo punto di vista è possibile distinguere gli organismi colonizzatori in due gruppi: epilitici ed endolitici, a seconda delle loro capacità di interazione con il substrato (Golubic et al., 1981). I microorganismi epilitici si sviluppano esclusivamente sulla superficie del materiale colonizzato, mentre gli endolitici si spingono in profondità, attraverso le microcavità e la discontinuità presenti nel materiale. continuando la classificazione gli organismi endolitici possono essere

ulteriormente suddivisi in: casmoendolitici (colonizzano crepe, fessure o pori presenti sulla superficie), criptoendolitici (colonizzano pori o fessure all'interno del substrato formando in profondità strati paralleli alla superficie) ed euendolitici (penetrano attivamente all'interno del substrato formando nuove cavità e modificando l'assetto strutturale del materiale). In generale, la colonizzazione endolitica è una strategia vincente di sopravvivenza, soprattutto quando la superficie è soggetta a variazioni ambientali sfavorevoli; infatti questo tipo di microhabitat offre protezione dalle intense radiazioni solari e dall'essiccamento, garantendo allo stesso tempo nutrienti minerali e una superficie idonea per la crescita (Walker et al., 2005).

Sulla base dei dati presenti in bibliografia possiamo suddividere la colonizzazione microbica in: A) crescita epilitica con aspetto micro-coloniale, B) formazioni epilitiche con aspetto di patina e C) sviluppo casmo-endolitico; ciascuna categoria può essere formata da una o più specie (Cuzman et al., 2011). Gli organismi epilitici possono aderire alla superficie di un materiale in vario modo, sfruttando meccanismi chimici o meccanici; alghe, cianobatteri ed altri organismi fotoautotrofi sintetizzano ad esempio esopolisaccaridi (EPS) con proprietà adesive, mentre funghi e piante superiori utilizzano specifiche strutture meccaniche, quali ife, rizoidi o radici sfruttando l'architettura porosa del materiale colonizzato. Di seguito si riporta una breve descrizione delle tipologie di crescita microbica (Cuzman et al., 2011; Amoroso, 1995):

A. Crescita epilitica con aspetto micro-coloniale

A.1 Pustole: stadio di colonizzazione pioniera, dall'aspetto gelatinoso dovuto alla secrezione di EPS e struttura pseudoparenchimatica. Le formazioni sono costituite da uno o più biotopi fotoautotrofi comprendenti specie di alghe verdi, cianobatteri (*Pleurocapsa minor*) e diatomee (*Navicula* sp.). Sono tipiche di ambienti estremamente umidi e di ambienti ipogei.

A.2 Crescita microbica nascosta: formazione dall'aspetto polveroso, determina l'erosione del materiale colonizzato ed è difficile da evidenziare su particolari substrati, quali affreschi e dipinti murali in genere. Il consorzio microbico è costituito principalmente da generi batterici (*Nitrobacter* sp., *Bacillus* sp.), la cui attività metabolica può portare a cambiamenti cromatici del substrato, così come a reazioni chimiche di ossidazione o

riduzione delle componenti strutturali. Tipica di substrati porosi o rocciosi e di superfici affrescate, in ambienti urbani, cripte, tombe e catacombe.

A.3 Macchie colorate: formazione dall'aspetto irregolare e colorazione differente a seconda del tipo di pigmento rilasciato dagli organismi colonizzatori. Il colore nero è indicativo del rilascio di melanine, melanoidi e prodotti di degradazione delle clorofilla, il colore verde implica la secrezione di pigmenti fotosintetici da parte di alghe e cianobatteri, la colorazione giallo-arancio è dovuta alla presenza di caroteni, carotenoidi e ficobiliproteine mentre il rosa o rosso è indice di colonizzazione da parte di batteri chemioorganotrofi o della presenza di prodotti di degradazione di composti ferrosi da parte del metabolismo fotoautotrofo. Possono assumere aspetto mucoso o compatto a seconda del tipo di microorganismo coinvolto e delle caratteristiche ambientali. Sono costituite principalmente da funghi (*Alternaria* sp.), lieviti, batteri eterotrofi (*Micrococcus* sp.), attinomiceti (*Streptomyces* sp.) e batteri chemioorganotrofi (*Bacillus* sp.). Rinvenibile in tombe, catacombe e ambienti ipogei.

B. Formazione epilitica con aspetto di patina

B.1 Film: associazione formata da sottili lamine cellulari, monostratificate e omogenee. Queste associazioni si sviluppano generalmente a partire da pustole anche se all'aumento di complessità strutturale non corrisponde un aumento della biodiversità. In presenza di condizioni ambientali favorevoli può evolvere in organizzazioni più complesse; si sviluppano per lo più in superficie o all'interno di fessure naturali. È formata principalmente da batteri, microorganismi fotoautotrofi (*Pleurocapsa* sp., *Chlorogloea* sp.) e microfunghi. Tipica di ambienti estremamente umidi.

B.2 Biofilm subaereo: aggregato di microorganismi immersi in una matrice organica mucillaginosa (EPS) ed evidenziabile esclusivamente in ambienti umidi. Si forma all'interfaccia tra il substrato solido e l'atmosfera e, a seconda della disponibilità di acqua il substrato può esserne completamente o parzialmente ricoperto; può crescere anche in profondità, all'interno del substrato colonizzato, in seguito a penetrazione attiva dei microorganismi (*biofilm* subaerei endolitici). Si tratta di formazioni microbiche tipiche di ambienti ipogei, catacombe, substrati rocciosi e interessati da fenomeni di percolamento dell'acqua. La crescita è generalmente irregolare, e si presentano strutturalmente più

complessi dei film ma di organizzazione più semplice dei tappeti microbici. Possono assumere colorazioni caratteristiche in seguito al rilascio di pigmenti organici (clorofilla, melanine, carotenoidi); la colorazione dipende dal tipo di biocenosi, dal suo stadio dello sviluppo e dalla fase di crescita delle specie prevalenti. L'architettura strutturale complessa consente ai microorganismi di tollerare e crescere in condizioni sfavorevoli. Tipici organismi di queste formazioni sono cianobatteri coccoidi e filamentosi (*Chlorococcum* sp., *Phormidium* sp., *Leptolyngbya* sp.), alghe coccoidi e filamentose (*Chlorella* sp., *Muriella* sp., *Trentepohlia* sp.), batteri eterotrofi e funghi (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.). Colonizzano ambienti umidi caratterizzati da condensazione e percolamento di acqua, catacombe, cripte e ambienti ipogei.

B.3 Tappeti microbici: formazione fotoautotrofa di spessore considerevole, caratterizzata dalla presenza di specie filamentose che si sviluppano all'interfaccia tra il substrato e l'atmosfera. Si tratta di un tipo di *biofilm* più complesso e con una stratificazione dovuta all'aggregazione di biocenosi differenti. Può avere consistenza mucosa (*Phormidium* sp., *Diademsia* sp.) o fibrosa (*Cladophora* sp. e *Melosira* sp.). Tipica di aree caratterizzate da una lunga alternanza di cicli secco-umido.

B.4 Croste: associazioni derivanti dall'azione sinergica tra processi chimico-fisici (precipitazione della calcite) e attività metabolica, o in seguito a diffusione sulla superficie di specifici gruppi di organismi, tra cui licheni. Interessano per lo più gli strati superficiali del materiale colonizzato e fino ad 1 cm di profondità, e sono costituite da una microflora complessa e stabile. Si rinvengono in ambienti caratterizzati da alternanza di cicli secco-umido, che favoriscono i processi di mineralizzazione ma con un sufficiente grado di umidità, quali parchi, ambienti rurali, urbani e ambienti ipogei.

B.5 Croste nere: biocenosi derivanti all'interazione tra substrati di natura calcarea e inquinanti atmosferici; a queste formazioni può aderire un gran numero di microorganismi capaci di metabolizzare i componenti inorganici ed organici in esse presenti, contribuendo ad aumentarne la complessità morfologica e strutturale. Tra questi si annoverano batteri (*Bacillus* sp.), funghi (*Cladosporium* sp.), cianobatteri (*Nostoc* sp.) e licheni. Si rinvengono in ambienti umidi ed esposti alla luce, di habitat rurali o urbani.

B.6 Efflorescenze bianche: associazioni causate da una crescita eterotrofica irregolare dovuta a miceli funginei o da specie batteriche coloniali, di aspetto simile alle efflorescenze saline. Ne sono la causa organismi quali funghi (*Fusarium* sp.), attinomiceti (*Streptomyces* sp.) e batteri (*Pseudomonas* sp.). Tipici di habitat ricchi di sostanza organica, ambienti umidi, affreschi e dipinti murali, catacombe, ambienti ipogei e rupestri.

B.7 Forme di crescita a tappeto: associazioni caratterizzate dalla presenza di briofite, raramente licheni fogliosi con crescita a tappeto. Si sviluppano sulla superficie del materiale colonizzato o con crescita uniassiale o ramificata. Tipiche di ambienti umidi, siti archeologici, parchi e ambienti rurali.

C. Crescita casmoendolitica

C.1 Microcavità: cavità formate dalla dissoluzione attiva del substrato per opera di cianobatteri e licheni endolitici e caratterizzate da colorazioni verdi o nere. Organismi coinvolti sono cianobatteri (*Hyella* sp.), funghi e licheni endolitici. Si rinvencono in ambienti umidi e bui, spesso su superfici sporadicamente bagnate e esposte alla luce, di habitat rurali o urbani.

C.2 Strutture microcoloniali: sono formate da cianobatteri e funghi meristemati che causano colorazione del substrato e formazione di fessure. Si formano su superfici esposte alla luce solare diretta, ma con sufficiente grado di umidità se coinvolgono organismi fotoautotrofi di habitat urbani e rurali.

C.3 Biofilm endolitici subaerei: si formano non solo a livello superficiale ma anche negli strati più profondi del substrato, creando nuove nicchie ecologiche nelle quali gli effetti di alterazioni ambientali sono tamponati.

1.4 CONSEGUENZE DELLA CRESCITA MICROBICA

Le variazioni di colore conseguenti la crescita dei microorganismi su di un determinato substrato sono state considerate per molto tempo come un effetto dannoso dal solo punto di vista estetico; al contrario l'alterazione indotta dai pigmenti biogenici può avere delle influenze anche sulle caratteristiche fisico-chimiche del substrato. Le alterazioni estetiche possono infatti causare un aumento di stress fisici, in quanto inducono un aumento della temperatura superficiale, un'alterazione dei fenomeni di espansione termo-idrici e

un'aumentata ritenzione idrica. Possiamo infatti considerare due differenti tipi di biodeterioramento, differenti da quello estetico e indotto dalla microflora colonizzante: biogeofisico e biogeochimico (Tiano, 1995; Tiano, 1998; Warscheid, 2000). Mentre gli effetti e l'entità dei processi di degrado biogeochimici sono controllati e determinati dalla chimica dei minerali che costituiscono il substrato lapideo, i meccanismi biogeofisici sono per lo più regolati da fattori intrinseci quali la porosità e la forma dei pori del materiale colonizzato (Tavola 1.1).

Il degrado biogeochimico è dovuto all'azione diretta dell'attività metabolica dei microorganismi sul substrato. La modificazione chimica del materiale colonizzato può essere dovuta al rilascio di intermedi metabolici o di sostanze con funzione inibitoria, o a processi d'assimilazione, con la possibile produzione di enzimi extracellulari, quando i microorganismi utilizzano il substrato ai fini nutrizionali. Il rilascio di acidi corrosivi è probabilmente il più noto e più comune fenomeno biogeochimico studiato, a carico dei materiali inorganici. Il processo, noto come biocorrosione, implica il rilascio di acidi organici che possono solubilizzare i minerali di cui è costituito il materiale colonizzato; la trasformazione di sostanze inorganiche attraverso reazioni di ossido-riduzione porta alla formazione di sostanze acide che corrodono la superficie, contribuendo alla formazione di sali (Krumbein, 1998). Per esempio, i microorganismi aerobi fotoautotrofi producono, attraverso la respirazione, biossido di carbonio che, trasformandosi in acido carbonico contribuisce alla degradazione del substrato e comporta la formazione di sali solubili, tra cui i sali di calcio e di magnesio. Alcuni acidi rilasciati dai microorganismi fotoautotrofi agiscono, oltre che da corrosivi, anche da agenti chelanti, che sequestrano cationi metallici come Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} e Mn^{3+} , favorendone poi la precipitazione sotto forma di sali. Il rilascio di acidi organici come l'acido lattico, succinico, ossalico e acetico è associato inoltre alla dissoluzione dei materiali lapidei. Un aumento della quantità dei sali a livello superficiale può causare stress all'interno dei pori, con formazione di fessure, crepe, scagliature ed esfoliazioni. La presenza di sali a livello superficiale può indurre anche alveolizzazione, un fenomeno che ha come risultato finale la disgregazione del materiale. Le soluzioni saline, in seguito ad evaporazione del solvente, tendono a cristallizzarsi con conseguente aumento di volume. Di conseguenza, viene esercitata una pressione a livello della struttura porosa del materiale con conseguente distacco disgregazione di ampie porzioni del materiale. Manifestazione del fenomeno è la presenza di cavità (alveoli),

anche molto profonde, distribuite con andamento irregolare sulla superficie del materiale lapideo. I cianobatteri endolitici e le alghe possono indurre un deterioramento biogeochimico anche attivamente, attraverso la dissoluzione del carbonato, per consentirne la penetrazione all'interno del substrato modificando la porosità del materiale.

Il deterioramento biogeofisico include tutti quei meccanismi che inducono decoesione del substrato e che derivano dall'azione meccanica dei microorganismi. Questi processi promuovono il distacco di frammenti di dimensioni variabili, a seconda dell'entità del processo, che si distaccano dal substrato a causa della pressione esercitata dalla crescita dei microorganismi. I *biofilm* costituiti da cianobatteri ed alghe possono subire variazioni di volume, raggiungendo dimensioni tali da esercitare una notevole forza attraverso cicli di essiccamento e umidificazione. Ciò può determinare un'alterazione della distribuzione e della dimensioni dei pori nel materiale colonizzato e modificazioni nello schema di circolazione di umidità e temperatura. La formazione dei *biofilm* altera l'assorbimento capillare dell'acqua e la diffusione dei gas, aumentando la velocità di deposizione di acidi e di conseguenza dei fenomeni di deterioramento. Un aspetto importante del deterioramento biogeofisico dei materiali artistici collegato alla crescita di microorganismi endolitici, è la contrazione periodica e l'espansione di EPS, che induce sollecitazioni meccaniche superficiali; in particolare quando i polimeri biogenici penetrano nel materiale ne viene stimolata la disgregazione.

I *biofilm* fotoautotrofi svolgono anche un ruolo indiretto nel biodeterioramento dei materiali attraverso l'interazione sinergica con i microorganismi eterotrofi quali funghi e batteri. Durante lo sviluppo dei *biofilm* fotoautotrofi si verifica una successione di microorganismi appartenenti a gruppi differenti: ai produttori primari si susseguono gruppi tassonomici di complessità ecologica sempre maggiore, fino ad arrivare alla colonizzazione da parte dei consumatori secondari. Infatti l'attività fotosintetica dei microorganismi converte biossido di carbonio in composti organici, disponibili per la frazione eterotrofa costituita proprio da batteri e funghi (Roeselers et al., 2007). Inoltre, l'accumulo di biomassa fotosintetica sulle superfici lapidee apporta elementi nutritivi per la crescita di altre comunità, che utilizzano sia le sostanze polisaccaridiche rilasciate dai microorganismi adesi al substrato (alghe e cianobatteri), nonché i detriti cellulari. Pertanto la formazione dei *biofilm* microbici deve essere intesa come fenomeno ad elevata complessità

e di grande impatto per i fenomeni di biodeterioramento. L'individuazione e l'identificazione dei microorganismi coinvolti è estremamente importante per gli studi riguardanti il biodeterioramento e per lo sviluppo di pratiche di prevenzione e controllo.

1.5 INFLUENZA DELL' AMBIENTE NEI FENOMENI DI BIODETERIORAMENTO

Nell'ambito della conservazione dei beni culturali possiamo distinguere tre differenti tipologie di ambienti terrestri, che svolgono un ruolo determinante nei processi di colonizzazione e di deterioramento dei materiali (Albertano et al., 2008).

- 1) **Ambienti confinati:** sono caratterizzati da scambi con l'ambiente esterno assenti o fortemente ridotti. Tale tipologia ambientale comprende:
 - a) **Musei.** Le condizioni microclimatiche interne degli ambienti museali, sono spesso controllate e monitorate, e dipendenti dalla località, dal sito geografico, dalle caratteristiche costruttive e dalla gestione museale. Tipici organismi colonizzatori rinvenibili in questi ambienti sono batteri eterotrofi e funghi.
 - b) **Chiese e cripte.** Le condizioni microclimatiche interne di tali ambienti presentano una certa stabilità, in quanto poco influenzate dalle variazioni climatiche giornaliere e stagionali. Sono invece notevolmente influenzate dalla funzionalità dell'ambiente (numero di visitatori, riscaldamento) e dalle intrinseche caratteristiche strutturali e architettoniche. Tali ambienti sono frequentemente colonizzati da microorganismi quali attinomiceti, cianobatteri, microalghe e funghi.
 - c) **Tombe, catacombe e ambienti ipogei.** Trattandosi di ambienti sotterranei, sono caratterizzati microclimaticamente da valori elevati e costanti di umidità relativa (> 70%) e temperature basse e relativamente costanti (10-18°C). La stabilità di tali parametri dipende dalla dimensione e dalla profondità dell'ambiente ipogeo, dalle caratteristiche del terreno circostante, dal grado di inquinamento atmosferico e dall'assenza di visitatori. In tali ambienti si rinvencono microorganismi quali archeobatteri, batteri, attinomiceti, cianobatteri, microalghe, funghi, muschi e insetti.

- 2) **Ambienti outdoor:** presentano caratteristiche differenti a seconda del contesto climatico, geografico e topografico nel quale si trovano. Tale tipologia ambientale comprende:
- a) **Ambienti urbani.** Tali ambienti sono caratterizzati da elevate densità di popolazione e da intensi fenomeni di urbanizzazione. Le caratteristiche microclimatiche cambiano a seconda delle attività antropiche e dei livelli di inquinamento atmosferico. Tipici colonizzatori di questi ambienti sono batteri, cianobatteri, funghi, piante vascolari, licheni, funghi, insetti e avifauna.
 - b) **Parchi e ambienti rurali, siti archeologici.** Le condizioni microclimatiche di tali ambienti risentono della copertura vegetale e sono caratterizzate da basse temperature, basso grado di inquinamento chimico, elevata umidità relativa, elevata disponibilità di nutrienti e di contaminanti biologici. Si rinviene in questi ambienti una grande varietà di forme colonizzatrici tra cui batteri, cianobatteri, alghe, funghi, muschi, licheni, piante vascolari, micro e macrofauna.
 - c) **Ambienti costieri.** Le caratteristiche microclimatiche di tali ambienti sono influenzate dall'azione del mare, con elevate concentrazioni di sale marino sia a livello atmosferico che del substrato. Tali ambienti sono colonizzati da organismi alofitici e alotoleranti, alghe, cianobatteri, funghi, licheni, muschi e piante.
 - d) **Fontane.** Rappresentano una tipologia di microhabitat localizzati in ambienti esterni, come parchi, e in ambienti urbani; in quest'ultimo caso saranno più o meno soggetti a fenomeni di inquinamento. L'apporto di acqua è costante o sporadico; possono essere completamente o parzialmente ricoperti di acqua. Sono colonizzati da comunità acquatiche, da una microflora subaerea, licheni, muschi, piante vascolari e pesci.
- 3) **Ambienti semi-confinati:** sono parzialmente circoscritti da materiale naturale (pareti, rocce, suolo).
- a) **Logge o porticati.** Le condizioni microclimatiche di questi ambienti possono essere uniformi o fortemente fluttuanti; ciò dipende dall'architettura della struttura, dalla distanza dal suolo, dall'altezza dalla pavimentazione, dall'inclinazione e dalla

percentuale di copertura. Tali ambienti sono colonizzati da microorganismi fotoautotrofi, quali cianobatteri e alghe, eterotrofi, licheni e briofite.

- b) **Ambienti rupestri e cave.** Sono localizzati in ambienti naturali, scavati nella roccia e generalmente a stretto contatto con il suolo circostante. Le condizioni microclimatiche variano enormemente a seconda della distanza con l'esterno; possono essere assimilati, per elevata umidità e ridotte temperature, agli ambienti ipogei. Sono colonizzati da cianobatteri sciafili, microalghe, batteri, micro funghi ed insetti.
- c) **Siti archeologici riparati.** Le condizioni microclimatiche di tali ambienti variano a seconda delle dimensioni e del tipo di copertura, ma in generale con livelli di umidità solitamente bassi. In tali ambienti si rinvengono microorganismi fotoautotrofi, licheni, muschi, piante e micro o macrofauna.

1.6 SISTEMATICA DEI BIODETERIOGENI

Di seguito si riporta una breve descrizione dei principali taxa rinvenibili su substrati di natura differente e coinvolti nei fenomeni di biodeterioramento.

1.6.1 BACTERIA

I Batteri sono gli organismi più piccoli, semplici e abbondanti sulla Terra e, insieme agli Archea, costituiscono il dominio procariotico. Sono attualmente conosciute 2500 specie diverse di batteri, presenti in tutti gli habitat compresi quelli estremi. Si tratta di organismi unicellulari variabili sia dal punto di vista morfologico che metabolico; molto comuni sono le specie a forma di bastoncino (Bacilli), di forma sferica (Cocchi) e a spirale (Spirilli). A queste tipologie se ne aggiungono altre meno comuni, quali le Sarcine (a forma di cubo) e i Vibrioni (a virgola). A differenza degli eucarioti non sono mai pluricellulari, anche se alcuni batteri formano filamenti o masse di cellule.

1.6.2 CYANOPHYTA

I Cianobatteri costituiscono uno dei principali phyla di eubatteri, quello delle *Cyanophyta* (Woese, 1987). La divisione, con l'unica classe Cyanophyceae, comprende più di 2000 specie che, secondo il sistema di classificazione proposto da Anagnostidis & Komàrek

(1985), vengono suddivise in quattro ordini: Chroococcales (Komàrek & Anagnostidis, 1986), Nostocales (Anagnostidis & Komàrek, 1988), Stigonematales (Komàrek & Anagnostidis, 1989) e Oscillatoriales (Komàrek & Anagnostidis, 2005). Questi microorganismi fotoautotrofi sono capaci di colonizzare una grande varietà di ambienti, compresi quelli estremi (ghiacciai, deserti, ambienti ipersalini e termali) ma il maggior numero di specie si trova nelle acque dolci e nel suolo. I cianobatteri presentano un'alta diversificazione fenotipica, documentata dalla presenza di generi con morfologia unicellulare, filamentosa (tricoma) ramificata o non ramificata. Caratteristica è la presenza, esternamente alla parte cellulare di una massa esterna di materiale mucillaginoso che costituisce un notevole vantaggio per la colonizzazione e la sopravvivenza dell'organismo, anche in condizioni ambientali sfavorevoli. A differenza degli altri organismi fotosintetici le membrane tilacoidali sono libere nel protoplasto, in una particolare regione detta cromatoplasma; in essa i tilacoidi non sono impilati gli uni sugli altri ma si presentano isolati, singoli ed equidistanti tra loro. I tipici pigmenti fotosintetici dei cianobatteri sono la clorofilla *a*, vari tipi di carotenoidi come il β -carotene, la zeaxantina e la mixoxantofilla e pigmenti accessori quali le fico cianine, alloficocianine e ficoeritrine. Oltre alle cellule vegetative numerose specie filamentose possiedono cellule differenziate, le eterocisti, colorate internamente e circondate da una doppia parete. Tali cellule conferiscono all'organismo la capacità di fissare l'azoto atmosferico, in condizioni anaerobiche e quindi una maggior possibilità di sopravvivenza in ambienti dove le disponibilità di ammonio e nitrati sono limitanti.

1.6.3 CHLOROPHYTA

Le Chlorophyta comprendono circa 500 generi e 8000 specie, che in massima parte vivono nel plancton o nel benthos di acqua dolce, anche se si conoscono specie adattate completamente alla vita terrestre (van den Hoek et al., 1995). Si pensa che dalle alghe verdi si siano evolute le piante superiori perché, al pari di queste ultime, possiedono clorofilla *a* e *b*, accumulano amido come carboidrato di riserva all'interno dei plastidi (ciò è una caratteristica esclusiva di alghe verdi e piante), possiedono il fragmoplasto (sistema di fibrille che si forma tra due nuclei figli durante la telofase), hanno un involucro nucleare che scompare all'inizio della mitosi e nei perossisomi presentano la glicolato ossidasi. Il phylum include specie unicellulari, coloniali e pluricellulari anche di grandi dimensioni,

filamentose, semplici o ramificate, spesso formanti organismi di struttura complessa, paragonabili a talli. Alcuni organismi, soprattutto di habitat terrestri possiedono, a livello della parete la sporopollenina (costituente delle spore e dei pollini), che conferisce loro la capacità di resistere al disseccamento. I loro cloroplasti, di colore verde, sono formati da 2 a 6 tilacoidi fusi a formare grana, e circondati da una doppia membrana: possono essere presenti in numero di uno o più ed avere forme varie, a nastro, a granulo, a spirale, a stella. I pigmenti clorofilliani, le clorofille *a* e *b*, sono contenuti all'interno dei cloroplasti, mentre i carotenoidi sono generalmente accumulati all'esterno, insieme agli altri pigmenti antenna. Possiedono un unico pirenoide, che generalmente è situato internamente ai cloroplasti e più precisamente tra le membrane fotosintetiche; a livello del pirenoide si accumula amido, sintetizzato in forma di granuli.

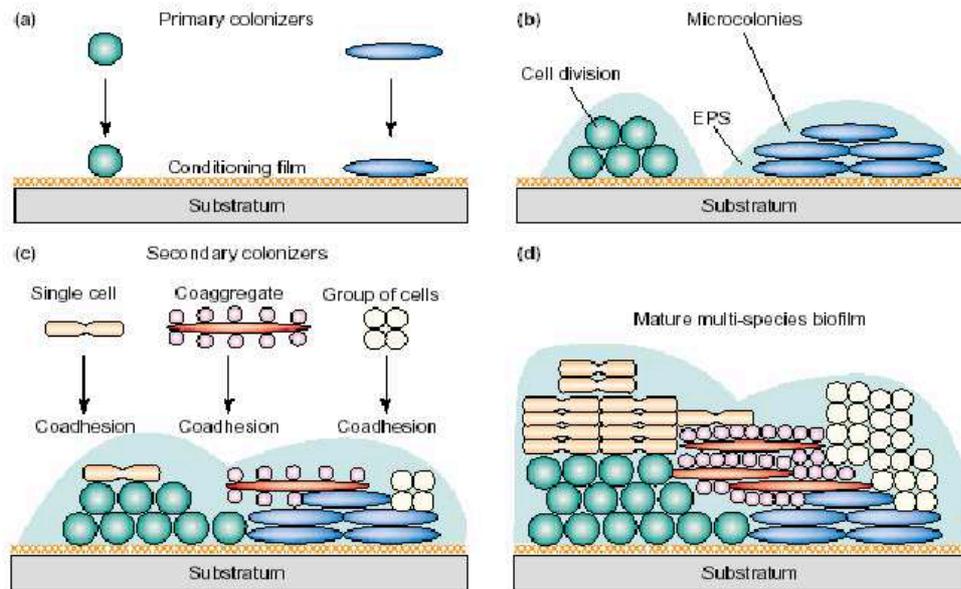


Figura 1.1: Sviluppo di *biofilm* subasereo.



Figura 1.2: Tipologie di *biofilm* subaerei su substrati architettonici.



Tavola 1.1 Meccanismi di deterioramento biogeofisico e biogeochimico. Efflorescenze su substrato roccioso (A); biocorrosione (B); sbiancamento superficiale (C); fratturazione (D); sfaldamento superficiale (E); alveolizzazione (F).

CAPITOLO II

I FENOMENI DI

BIODETERIORAMENTO IN

AMBIENTE RUPESTRE

2.1 GLI AMBIENTI RUPESTRI: GROTTA A FUNZIONE VOTIVA

A partire dal Medioevo, sono state utilizzate a scopo liturgico-devozionale e talvolta anche funerario grotte naturali scavate nella roccia e riconosciute con il nome di “unità rupestri”. In alcuni casi si trovano cavità artificiali, collegate direttamente al luogo di culto o del tutto indipendenti, interpretate come residenza di monaci o eremiti (Tavola 2.1). L’espressione più evidente dell’utilizzo culturale delle cavità naturali è costituita dalle immagini sacre dipinte sulle pareti, la maggior parte delle quali risalente al periodo bizantino e longobardo (Ebanista, 2007; Amodio & Ebanista, 2008). I beni culturali che si rinvergono nelle unità rupestri costituiscono complessi in cui l’attività dell’uomo si sovrappone strettamente a quella della natura. Per la loro collocazione in ambiente naturale si trovano a stretto contatto con il terreno sovrastante e circostante, spesso arricchito di nutrienti organici legati all’uso di fertilizzanti nelle attività agricole, alle deiezioni animali per pascolamento o, ancora, alle attività industriali che possono comportare lo scarico di sostanze inquinanti.

Tali ambienti soffrono spesso dei danni caratteristici e peculiari degli ambienti ipogei: infiltrazioni di acqua piovana, condensazione termoinerziale e umidità per igroscopicità. Questi ultimi fenomeni sono determinati da un’abbondante presenza di sali dovuta, ad esempio, ad un prolungato uso improprio dell’ambiente. Le condizioni microclimatiche degli ambienti rupestri sono peculiari e risentono, in misura più o meno accentuata, del clima esterno e dell’esposizione. Sono inoltre condizionate dalle caratteristiche architettoniche dell’edificio, dai materiali costitutivi e dalle tecniche costruttive, oltre che dalle dimensioni delle aree di scambio con l’esterno. Il microclima di questi ambienti si differenzia a seconda che il sito sia di piccole dimensioni e di forma regolare o abbia una struttura maggiormente articolata. Nel primo caso i valori di temperatura ed umidità possono essere piuttosto uniformi, mentre nel secondo caso tendono a mostrare un comportamento eterogeneo, soprattutto in relazione alla diversa distanza con le aperture esterne. Generalmente procedendo verso l’interno, la luce naturale diminuisce gradualmente così come l’aerazione e la ventilazione, mentre i valori di umidità aumentano per poi stabilizzarsi (Hoffmann, 2002; Caneva et al., 2007b).

Come qualsiasi altro ambiente, anche l’habitat rupestre è caratterizzato dalla presenza di microorganismi differenti a seconda delle caratteristiche climatiche (Czerwik-

Marcinkowska & Mrozinska, 2009). Dal punto di vista ecologico il principale fattore limitante la diffusione dei microrganismi è l'acqua, che può provenire da precipitazioni meteoriche, da percolamenti o da fenomeni di risalita capillare. Nella porzione più vicina all'esterno si possono osservare biocenosi naturali simili a quelle che si rinvengono in habitat all'aperto, mentre all'interno si assiste ad una selezione di tutti i potenziali colonizzatori, in adattamento alle diverse condizioni microclimatiche. La crescita dei microrganismi in habitat rupestre si osserva, di norma, nelle zone ben illuminate e prossime ai punti di collegamento con l'ingresso; è evidenziabile per la presenza di patine di vario spessore e colorazione, costituite maggiormente da microflora fotosintetica, con popolamenti di specie epilittiche ed endolitiche di cianobatteri, alghe verdi e talli lichenici. Nelle zone costantemente umide interessate da percolamenti di acqua, da elevati valori di umidità o da fenomeni di ristagno, possono prevalere colonizzazioni di Chlorophyceae e di licheni idrofilo gelatinosi, che necessitano di un elevato e costante apporto di acqua. Nel caso in cui l'ambiente rupestre sia abbastanza esteso, la luce assume un ruolo di particolare rilievo in quanto fattore limitante per la crescita degli organismi fotosintetizzanti. In assenza di impianti di illuminazione artificiale, la graduale diminuzione della luce solare comporta una distribuzione delle specie in relazione alle singole esigenze di illuminazione (Hoffmann, 2002). L'azione discriminante di tale fattore si esplica anche seguendo il periodo stagionale, l'esposizione delle pareti e la loro inclinazione. Procedendo verso l'interno si assiste, quindi, alla riduzione del numero di specie vegetali e alla scomparsa della microflora endolitica e dei licheni. In alcuni casi però l'estensione delle patine biologiche sulla superficie può comunque rimanere molto ampia, determinata da specie fortemente selezionate ed adattate all'habitat di crescita. Analizzando la composizione specifica delle biocenosi delle zone meno illuminate, risulta che esse sono costituite principalmente da Cyanophyceae, e in misura minore da Bacillariophyceae, Xanthophyceae e Chlorophyceae (Asencio & Aboal, 2001; Caneva et al., 2007b; Urzì et al., 2010).

2.2 IL BIODETERIORAMENTO DI AFFRESCHI E PITTURE MURALI

Caratteristica distintiva delle grotte impiegate a scopo liturgico è la presenza di affreschi e pitture murali che richiamano al culto (Tavola 2.2). In generale le pitture possono essere di due tipi: le pitture ortodosse sono a base di oli disciolti in solventi organici, mentre le

idropitture sono a base di acrilico o vinile, entrambi disciolti in acqua. Sono in gran parte costituite da leganti che consentono l'adesione della pittura ad un dato supporto, da pigmenti che conferiscono colorazione ed opacità e da solventi, che facilitano la dispersione delle pitture sul supporto. I leganti sono essenzialmente sostanze polimeriche, disciolte o sospese all'interno delle pitture per mezzo di emulsionanti; i più diffusi sono l'olio di lino e l'olio di semi di soia. Le resine a base di solventi più utilizzate sono quelle alchidiche. Gli affreschi contengono una vasta gamma di costituenti organici ed inorganici, che fungono da nicchia ecologica per una grande varietà di microrganismi (Ciferri, 1999). I dipinti murali sono realizzati con tecniche e materiali differenti; i pigmenti colorati sono dispersi in acqua o olio, in presenza di leganti quali la caseina, e vengono applicati su uno strato di intonaco a calce umida. Il carbonato di calcio formato a contatto con l'aria consolida i pigmenti. Così, nel complesso, i dipinti murali contengono principalmente elementi inorganici, e la flora microbica che colonizza questi substrati può, almeno nei primi stadi, differire sostanzialmente da quella che interessa dipinti su tela o su carta. I pigmenti che compongono le pitture, naturali o sintetici, conferiscono alla pittura un'ampia varietà di colori e di possibili sfumature e possono essere classificati in organici ed inorganici. I primi sono più luminosi, stabili e possiedono intrinseche proprietà di assorbimento della luce ultravioletta; di conseguenza forniscono una naturale protezione ai leganti. I pigmenti inorganici sono più economici, sono stabili al calore ed alla luce e rientrano quali costituenti essenziali dei colori bianco e nero; non è possibile, infatti, ottenere il bianco ed il nero da pigmenti organici. C'è da considerare che lo spettro di composti presenti a livello del substrato può modificarsi nel tempo; nuovi componenti possono essere aggiunti durante il restauro, contaminanti ambientali possono accumularsi con il passare degli anni. Tutto ciò può rappresentare un'altra fonte non trascurabile di nutrienti, determinante per la colonizzazione microbica.

Data l'ampia gamma di molecole organiche e inorganiche presenti, microrganismi differenti possono svilupparsi e crescere sugli affreschi, a condizione che i parametri ambientali di umidità, temperatura, luce e pH siano favorevoli. La crescita dei microrganismi sui dipinti murali ed affreschi può, così come su qualsiasi altro substrato, essere evidenziata per la presenza di *biofilm*, ovvero sistemi complessi di cellule monostratificati o pluristratificati, incorporate in una matrice polimerica extracellulare idratata (Barranguet et al., 2005). La crescita dei microrganismi può causare danni estetici

e strutturali. I primi sono evidenziati dalla presenza di macchie e patine colorate e come scolorimento del substrato; i danni strutturali si esplicano, invece, attraverso la rottura e la disintegrazione degli strati di vernice, il degrado di polimeri di sostegno o dei leganti, con conseguente formazione di bolle di vernice (Tavola 2.2). Naturalmente, i due tipi di danni sono fortemente correlati e, nel tempo, i danni strutturali influiscono profondamente sulla qualità estetica di un dipinto; viceversa, i danni estetici possono indurre lesioni gravi ai materiali. A questi danni si aggiungono le alterazioni a carico del substrato inflitte dai metabolici secondari, spesso di natura acida, e da enzimi extracellulari secreti dai microrganismi; questi composti possono modificare i colori, nonché la stabilità degli strati pittorici e del substrato.

I danni a carico delle superfici dipendono strettamente dal tipo di organismo colonizzatore e dai tempi di crescita; i funghi, ad esempio, nei primi stadi della colonizzazione delle pitture murali causano solo danni estetici senza incidere sulla struttura della superficie dipinta. In seguito, la crescita delle ife fungine comporta la disgregazione della pellicola pittorica, la degradazione di alcuni componenti (in particolare colle e leganti) e una riduzione della coesione degli strati pittorici (Saiz-Jimenez & Samson, 1981; Jurado et al., 2010). Allo stesso modo, cianobatteri e alghe che crescono sui affreschi esposti alla luce, possono causare danni considerevoli; oltre ai danni estetici dovuti a patine verdi, nere, marroni e gialle, possono incidere sugli strati superficiali provocando l'erosione del substrato, il distacco di porzioni di verniciato nonché dell'intonaco sottostante (Ortega-Calvo et al., 1993; Nugari et al., 2009). Inoltre, la presenza di specifici gruppi di organismi, quali i cianobatteri azotofissatori, può fornire un' importante sorgente di materiale organico su cui i batteri eterotrofi e i funghi possono prosperare; ciò comporta ulteriori danni estetici e strutturali ai dipinti (Tomaselli et al., 1979).

Salvo poche eccezioni, la caratterizzazione della flora microbica presente su affreschi o dipinti murali è limitata a gruppi selezionati di microrganismi piuttosto che a tutti i tipi di microrganismi che possono essere presenti su un dato substrato. Così, in generale, l'analisi della composizione dei *biofilm* presente su tali substrati è limitata a funghi, batteri, alghe e cianobatteri (Milanesi et al., 2009; Pinar et al., 2009). Numerosi studi hanno dimostrato che su affreschi situati in ambienti rupestri i primi colonizzatori del substrato sono batteri dell'ordine Actinomycetales; la maggior parte appartiene al genere *Streptomyces* sp. ed

altri al genere *Nocardia* sp. (Giacobini et al., 1988) Segue l'attacco da parte di funghi, cianobatteri, in particolare appartenenti al genere *Lyngbya* sp. e alghe verdi, dei generi *Chlorella* sp., *Pseudococcomyxa* sp. e *Pseudopleurococcus* sp. (Albertano et al., 1991 a-b).

Presentare un unico schema esplicativo dell'intero processo di colonizzazione microbica dei dipinti murali è alquanto difficoltoso. Il problema principale deriva dall'ampia varietà di sostanze chimiche rinvenibili a livello del substrato dipinto e dalla difficoltà ad accertarne l'origine. Nuove tecnologie hanno semplificato il riconoscimento e l'analisi chimica delle pitture murali; non è altrettanto semplice risalire al tipo di pigmento base o emulsionante o protettivo impiegato. Al deterioramento biologico si collegano i danni derivanti dagli inquinanti atmosferici che modificano negativamente il substrato e offrono materie prime per lo sviluppo della microflora algale e batterica.

2.3 LE UNITÀ RUPESTRI SUL TERRITORIO CAMPANO

Gli ambienti rupestri sono ampiamente diffusi sul territorio campano, quale espressione dell'utilizzo culturale delle cavità naturali. In Campania la natura della roccia calcarea, molto dura e difficile da lavorare, ha indotto l'uomo ad adattare le cavità naturali piuttosto che a creare delle grotte artificiali. Se si eccettuano alcuni luoghi di culto scavati nel banco tufaceo, si assiste per lo più al semplice utilizzo delle cavità naturali con limitati interventi architettonici lontani dalla ricerca spaziale testimoniata altrove e con il solo apporto figurativo degli affreschi (Ebanista, 2007). La trasformazione delle cavità naturali in chiese prevede, infatti, la realizzazione di opere murarie, finalizzate ad articolare gli spazi e a regolarizzare le superfici della grotta per accogliere le immagini devozionali. Lo studio analitico delle unità rupestri della Campania risulta particolarmente difficoltoso, poiché non si dispone di una completa rilevazione dei siti che sono noti grazie a studi e pubblicazioni per lo più a carattere locale. La maggior parte delle unità rupestri non è stata studiata in maniera adeguata sotto il profilo archeologico e storico-artistico, sicché permangono forti dubbi sul numero dei luoghi di culto rupestri, sulla loro esatta ubicazione e sull'attribuzione cronologica dell'utilizzo culturale. Alcune unità rupestri, tra cui quelle oggetto di studio, sono tutt'oggi di grande interesse e ancora utilizzate a scopo di culto. I fenomeni di biodeterioramento sono stati analizzati nei siti di seguito elencati (Figura 2.1):

La *Grotta delle Formelle* situata nel territorio di Calvi Risorta (Caserta), posta sul costone orientale del grande fossato difensivo percorso dall' antica via Latina, è ricavata all'interno di un'antica cava ipogea a sezione trapezoidale (Tavola 2.3). Entrando nella grotta, si riconosce una serie di affreschi, databili al secolo X-XI; molti si trovano in uno stato di conservazione piuttosto precario a causa dell'elevato biodeterioramento, dell'eccessiva umidità dell'ambiente e dello stato di completo abbandono in cui versano. Sono stati analizzati i danni fisici, chimici ed estetici a carico di cinque superfici affrescate e tre superfici rocciose.

Situato in un territorio per gran parte circondato da colline, Camigliano confina a Nord con l'area occupata dal Monte Maggiore e a Sud con la pianura attraversata dal Volturno. Tra i luoghi di culto presenti sul territorio, assai suggestiva è la *Grotta di San Michele*; la grotta, quasi certamente d'origine vulcanica, è formata da un piano superiore molto ampio con un' unica apertura e di un piano inferiore a forma d'imbuto rovesciato (Tavola 2.4). Al piano superiore si accede attraversando un giardino, oltre il quale è presente un altare riparato da un tempietto in muratura, che poggia sulla parte destra della parete rocciosa. Gli affreschi, tutti databili tra la fine del XV e l'inizio del XVI secolo, si mostrano in un elevato stato di deterioramento. All'interno della grotta, i danni derivanti dalla crescita microbica sono stati analizzati in otto differenti punti.

La *Grotta dell'Angelo* o di San Michele si trova a Preturo (Montoro Inferiore, Avellino) su una collina tra il Monte Romola e il Monte Bufoni; nominata in documenti ufficiali già nell'841, è stata dedicata dai Longobardi a San Michele Arcangelo (Tavola 2.5). La grotta è una cavità naturale creata dall'erosione della roccia, come dimostrano le numerose stalattiti e stalagmiti. È composta da due antri: il primo è più grande, e conserva un altare di marmo con una statua di San Michele, mentre il secondo è ricco di concrezioni. Sulle pareti della grotta sono presenti tre affreschi, risalenti al periodo bizantino e fortemente degradati a causa di agenti biologici e delle numerose infiltrazioni di acqua piovana. Sono stati valutati visivamente i danni in corrispondenza di cinque punti, di cui due in corrispondenza degli unici affreschi leggibili rinvenuti all'interno della grotta.

La *Grotta Di San Michele* di Faicchio (Benevento) è posta in una gola quasi inaccessibile del versante Sud del Monte Monaco di Gioia (Tavola 2.6). La grotta ha un'apertura semicircolare al cui interno, dopo due piccoli ambienti, si arriva al locale

adibito a chiesa. Un corridoio che parte dal fondo di questo ambiente conduce in una cappella quasi del tutto intonacata ed affrescata. All'interno della cappella vi è un altare ricavato scavando nella roccia. Gli affreschi, forse della fine dell'XI e inizio del XII sec, appaiono di realizzazione locale, ancorché si riconoscano tratti bizantini. Sono stati analizzati le alterazioni del substrato su cinque superfici affrescate e tre rocciose.

La provincia di Salerno è ricca di grotte dedicate a San Michele, ma la zona di Olevano sul Tusciano è una tra le più caratteristiche. La *Grotta di San Michele Arcangelo* (860-870), nota anche come *Grotta dell'Angelo* è collocata sul fianco sinistro della profonda valle incisa del Fiume Tusciano (Tavola 2.7). All'interno della grotta sono state realizzate sei architetture completamente indipendenti, completate ognuna da una copertura a tetto o a cupola. La prima delle sei cappelle è più grande e riccamente decorata da affreschi riguardanti il ciclo cristologico; la seconda, posta sulla sinistra, è più piccola e ricoperta da una cupola che ricorda le costruzioni a trullo. Tutte le rappresentazioni pittoriche, databili tra il X e XI secolo e caratterizzate da motivi che richiamano lo stile longobardo, risultano fortemente danneggiate a causa dell'elevato tasso di umidità e dell'attacco di microorganismi incrostanti. In corrispondenza di nove punti sono state annotate le alterazioni estetiche.

A Gioia Sannitica (Caserta), in località Curti è presente una piccola chiesa rupestre d'epoca longobarda dedicata al culto di San Michele Arcangelo (Tavola 2.8). L'area, più che una vera e propria grotta, è quasi un riparo sotto la roccia in cui, con la realizzazione di costruzioni murarie, si è ricavata una zona pianeggiante ove sono localizzate un'edicola affrescata, un altare e dei gradini di accesso alla vera e propria cavità naturale, protetta a sua volta da un muro affrescato e da una porta in legno. La cappella votiva di fronte all'ingresso presenta una tipica copertura a capanna, costituita da un manto di coppi sovrapposti. Le immagini della grotta di Curti hanno tutte riferimenti in affreschi della fine dell'XI e XII secolo; si tratterebbe quindi di opere di buon livello da inserire tra la metà e la fine del XII secolo. In corrispondenza dei quattro affreschi presenti e delle quattro superfici rocciose circostanti, sono stati analizzati i danni superficiali.

All'interno di un inghiottitoio carsico lungo circa 60 m, ai piedi della collina di Rupe Canina (Sant'Angelo di Alife, Caserta), è posto un vero e proprio "santuario rupestre", dedicato a San Michele Arcangelo, che ha poi dato origine al toponimo di *Grotta*

di Sant'Angelo (Tavola 2.9). Sul fondo della grotta sono presenti delle costruzioni tra cui un'edicola centrale coperta da una cupola sorretta da quattro pilastri, collegati da rozzi archi a tutto sesto. Lateralmente due arcosoli con tracce di affreschi sono posti in prossimità della roccia. Una costruzione circolare appena visibile è considerata il vero e proprio fonte battesimale del santuario. Infine, un recinto in muratura separa come una vera balaustra tutta l'area sacrale dal resto della grotta. Sono state analizzate le alterazioni sia sulle superfici affrescate poste all'interno dell'inghiottitoio e sulla parete esterna della grotta e su due superfici rocciose.

2.4 ANALISI DELLE ALTERAZIONI A CARICO DELLE SUPERFICI

In ciascuna grotta sono stati analizzati, da un punto di vista estetico, le principali alterazioni a carico delle superfici e derivanti dalla colonizzazione microbica. I danni fisici, chimici ed estetici sono stati osservati su ciascun tipo di substrato e in differenti condizioni microclimatiche.

Nella Grotta delle Formelle sono stati riscontrate condizioni di penombra e valori di umidità relativa elevati, ma costanti all'interno dell'intero ambiente. La crescita microalgale è evidenziabile per la presenza di associazioni epilittiche con aspetto di patina e casmoendolitiche (Tavola 2.3). I film ed i *biofilm* si presentano di colorazione e spessore variabile e tendono a ricoprire il substrato in maniera eterogenea. In alcuni casi l'attività metabolica provoca fenomeni di biocorrosione, formazione di efflorescenze e sbiancamento degli strati pittorici.

Nella Grotta di Camigliano i valori di umidità sono relativamente elevati e l'illuminazione scarsa in tutta la grotta. L'analisi macroscopica ha rilevato la presenza di due principali tipi di alterazione biologica a carico delle superfici: *biofilm* sub-aerei e film, sia su superfici affrescate che rocciose di colorazione variabile dal verde chiaro al verde scuro. È stata evidenziata la presenza di incrostazioni di colore nero, dovuta a crescita fungina. L'attività dei microorganismi determina il distacco di porzioni di substrato più o meno ampie, perforazioni e sbiancamento delle pitture (Tavola 2.4).

Nella Grotta di San Michele a Preturo sono stati riscontrati valori di umidità differenti e illuminazione variabile. I campioni analizzati sono riconducibili ad associazioni microbiche differenti; crescite epilittiche con aspetto microcoloniale, *biofilm* di

colorazione variabile dal verde brillante al verde scuro, tendente al nero e crescita casmoendolitica. Le condizioni microclimatiche non sembrano favorire lo sviluppo di complessi cellulari strutturati, come i tappeti microbici. Dirette conseguenze della crescita microalgale sono la fratturazione del substrato, affrescato e roccioso e lo sbiancamento degli strati pittorici, derivante dal rilascio di sostanze extracellulari (Tavola 2.5).

Nella Grotta di San Michele di Faicchio sono stati riscontrati valori di umidità elevati ma differenti valori di illuminazione. Dall'analisi visiva è emersa la presenza di più associazioni microbiche all'interno della grotta: film di colore verde chiaro/verde oliva, *biofilm* di colore verde brillante, biocenosi a crescita microcoloniale e a crescita casmoendolitica. In particolare si evidenzia una crescita microbica nascosta, dall'aspetto polveroso e determinante l'erosione del materiale colonizzato. L'attività metabolica delle specie facenti parte del consorzio causano cambiamenti cromatici del substrato. L'attività microbica si esplica anche attraverso il decoesione di strati pittorici, fratturazione ed erosione superficiale e sbiancamento superficiale (Tavola 2.6).

All'interno della grotta dell'Angelo ad Olevano sono stati riscontrati differenti valori di umidità relativa, in corrispondenza di differenti livelli di illuminazione. Dall'analisi delle alterazioni macroscopiche è emersa la presenza di tappeti microbici di consistenza mucillaginosa e di colorazione nera, elemento tipico di ambienti rupestri dove la radiazione solare è nulla e l'umidità relativa elevata durante tutto l'anno (Tavola 2.7). Gli affreschi della prima cappella sono stati restaurati circa due anni fa e pertanto non sono visibili patine corrispondenti a *biofilm* fotoautotrofi maturi. Sono invece evidenziabili macchie nere e bianche, attribuibili a stadi iniziali della colonizzazione microbica. Sono evidenti associazioni epilitiche dall'aspetto microcoloniale e biocenosi casmoendolitiche, responsabili di disgregazione, fratturazione e sbiancamento del substrato.

Nella Grotta di San Michele di Curti si rinvencono valori di umidità elevati e differenti gradi di illuminazione. L'analisi visiva dei campioni ha consentito l'individuazione di differenti tipologie di associazioni microbiche (Tavola 2.8). Le biocenosi microcoloniali, i film ed i *biofilm* fotosintetici promuovono frammentazione e rottura del substrato, formazione di microcavità superficiali oltre che sbiancamento delle superfici affrescate.

Nella Grotta dell'Angelo ad Alife i valori di umidità e di illuminazione variano notevolmente. L'analisi visiva dei campioni rivela la presenza di tappeti microbici, *biofilm* fotoautotrofi e associazioni casmoendolitiche. L'elevata umidità relativa e l'assenza di illuminazione naturale promuovono il deterioramento biogeochimico e biogeofisico delle superfici. Gli effetti più evidenti della crescita microbica sono l'erosione superficiale e la fratturazione del substrato (Tavola 2.9).

2.5 DISCUSSIONE

Dalle analisi è emersa una sinergia tra fattori biologici e fisico-chimici; le tipiche caratteristiche microclimatiche degli habitat rupestri tra cui le elevate umidità, l'assenza di ventilazione e le basse intensità luminose, promuovono la colonizzazione microbica e la formazione di *biofilm* mucillaginosi e viscosi. La presenza di idrogel, costituiti per il 98% di acqua, consentirebbe una migliore adesione delle cellule al substrato e l'assimilazione di particelle e contaminanti atmosferici. Tali condizioni facilitano i processi di corrosione chimica, l'ossidazione e la trasformazione di ioni metallici e dei pigmenti delle pitture. Le elevate umidità promuovono la formazione di efflorescenze saline; la presenza di sali può ulteriormente modificare le proprietà delle sostanze polisaccaridiche extracellulari con conseguente riduzione della viscosità. Ne consegue anche un'alterazione della superficie del *biofilm*, con conseguente sviluppo di irregolarità che facilitano lo sviluppo di un'ampia varietà di microrganismi rendendo le superfici affrescate molto più bioricettive. Dato lo sviluppo di nicchie ecologiche più favorevoli, la biodiversità microbica tende ad aumentare così come i danni alle superfici.

2.6 CONCLUSIONI

Data la peculiarità ed unicità degli ambienti analizzati, non è stato possibile attribuire una determinata tipologia di crescita microalgale alla presenza di specifici componenti pittorici. Sulla base del decreto legislativo Normal 3/80 (1980), è consentito il prelievo di una porzione minima di *biofilm* dai beni culturali, secondo modalità tali da non danneggiare il substrato architettonico. Di conseguenza, data la scarsità di materiale architettonico a disposizione, non è stato possibile approfondire le analisi mineralogiche e chimiche dei costituenti delle pitture murali. Inoltre non è stato possibile riprodurre in vitro le pitture murali, dal momento che non si hanno sufficienti informazioni bibliografiche sul tipo di

pittura dei siti investigati e sulla loro composizione originaria. Il totale abbandono in cui si trovano le grotte e l'assenza di controlli periodici non consentono di valutare quanto la composizione originaria sia stata modificata dal contesto microclimatico di appartenenza e quindi dal susseguirsi di eventi naturali. Il continuo monitoraggio potrebbe consentire anche un'analisi più dettagliata dei fenomeni di crescita microbica per poter poi mettere in atto metodiche di conservazione specifiche per ciascuno stadio di colonizzazione.

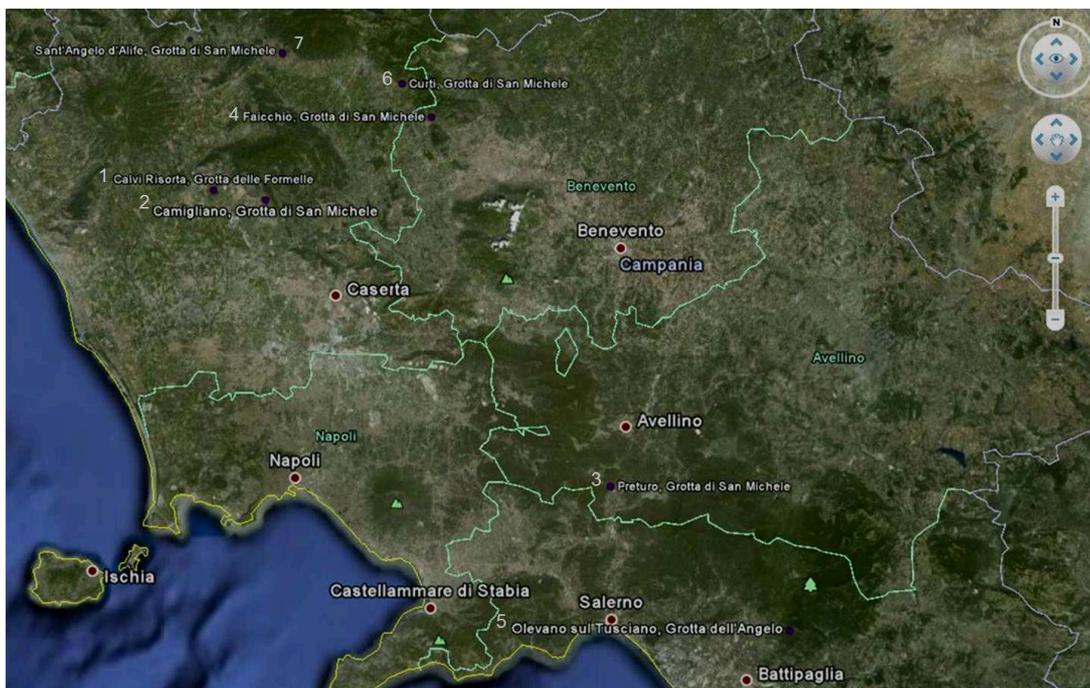


Figura 2.1 Ambienti rupestri individuati sul territorio campano ed oggetto di studio.
1-Grotta delle Formelle a Calvi Risorta, 2- Grotta di San Michele a Camigliano,
3- Grotta di San Michele a Preturo, 4- Grotta di San Michele a Faicchio, 5-
Grotta dell'Angelo ad Olevano, 6- Grotta di San Michele di Curti, 7- Grotta di
San Michele ad Alife.

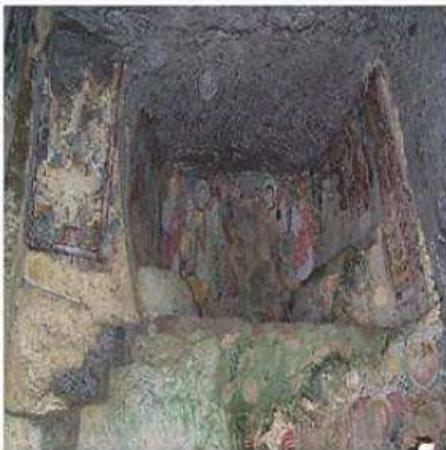


Tavola 2.1 Esempi di ambienti rupestri e grotte adibite a culto

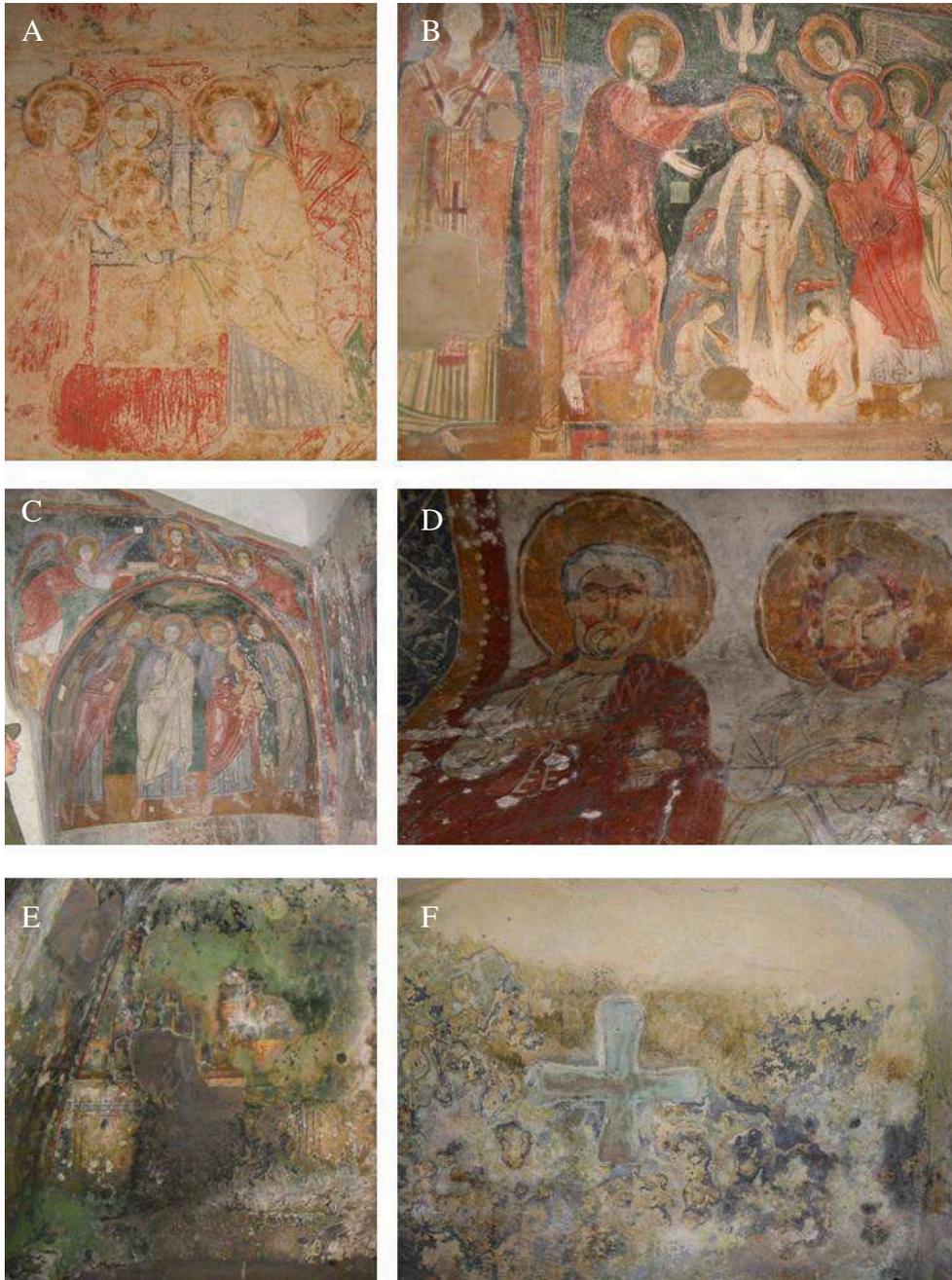


Tavola 2.2 Tipologie di affreschi rinvenibili in ambienti rupestri (A-D) e danni derivanti da crescita microbica. Patine biologiche (E), sbiancamento degli strati pittorici (F).

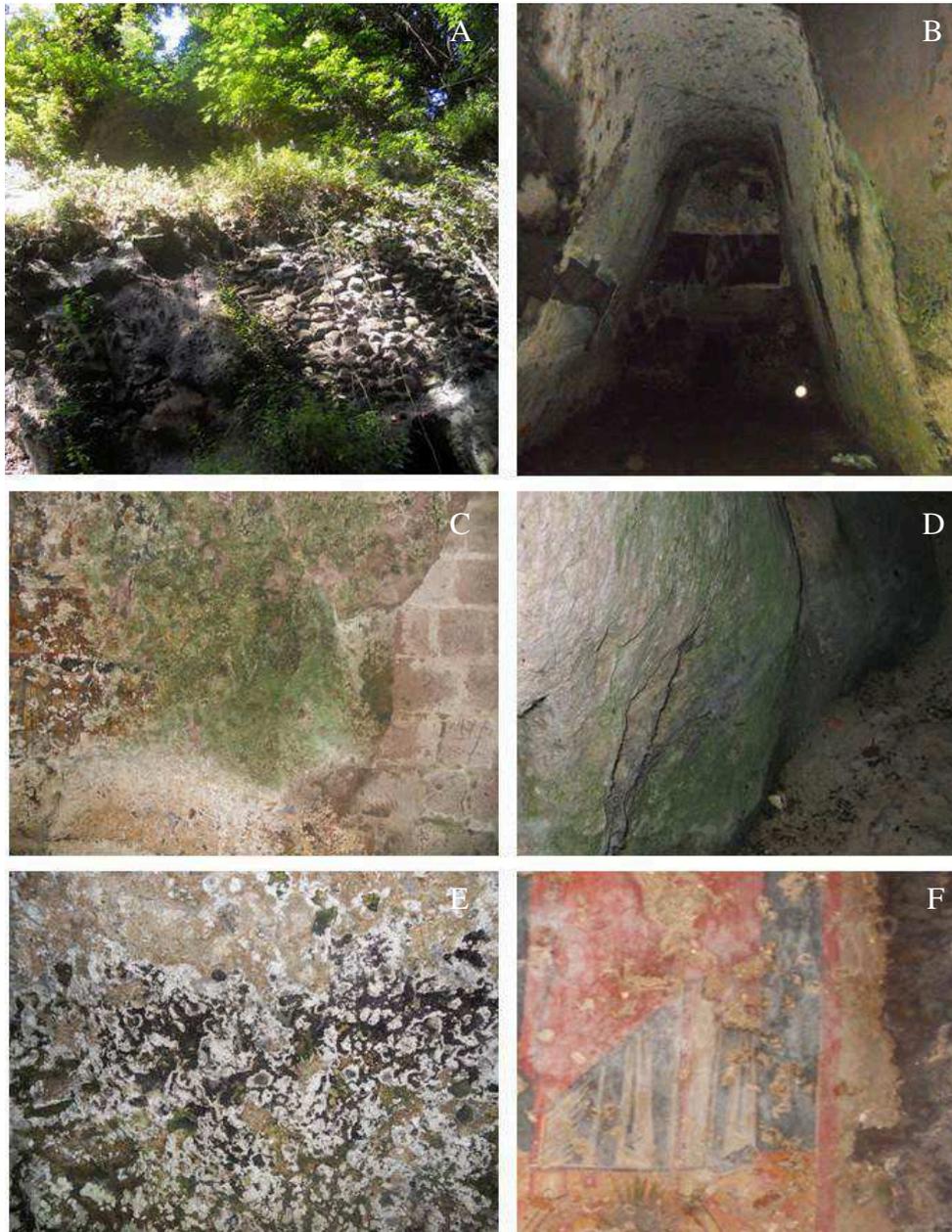


Tavola 2.3 Esterno ed interno della Grotta delle Formelle (A-B). Crescita epilitica con aspetto di patina: *biofilm* (C-D) e sbiancamento superficiale (C), crescita casmoendolitica con efflorescenze (E), sbiancamento della superficie pittorica (F).

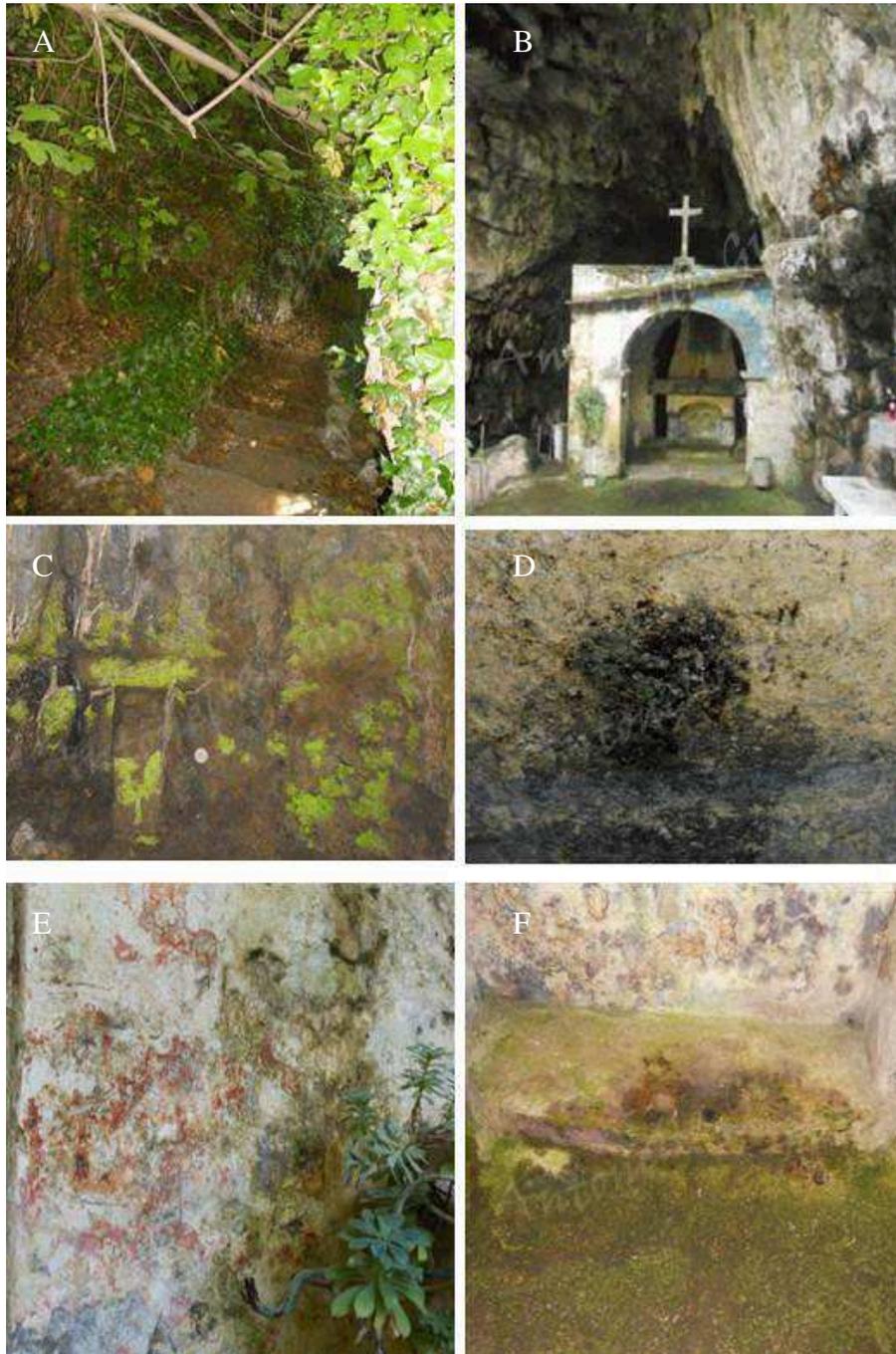


Tavola 2.4 Esterno ed interno della Grotta di San Michele a Camigliano (A-B). Crescita epilitica con l'aspetto di macchia (C), croste nere (D); fratturazione e sfaldamento superficiale (E), crescita epilitica e sbiancamento superficiale (F).



Tavola 2.5 Esterno ed interno della Grotta di San Michele a Preturo (A-B). Crescita epilitica microcoloniale (C), *biofilm* fotosintetico (D), crescita casmoendolitica e fratturazione del substrato (E) sbiancamento superficiale (F).

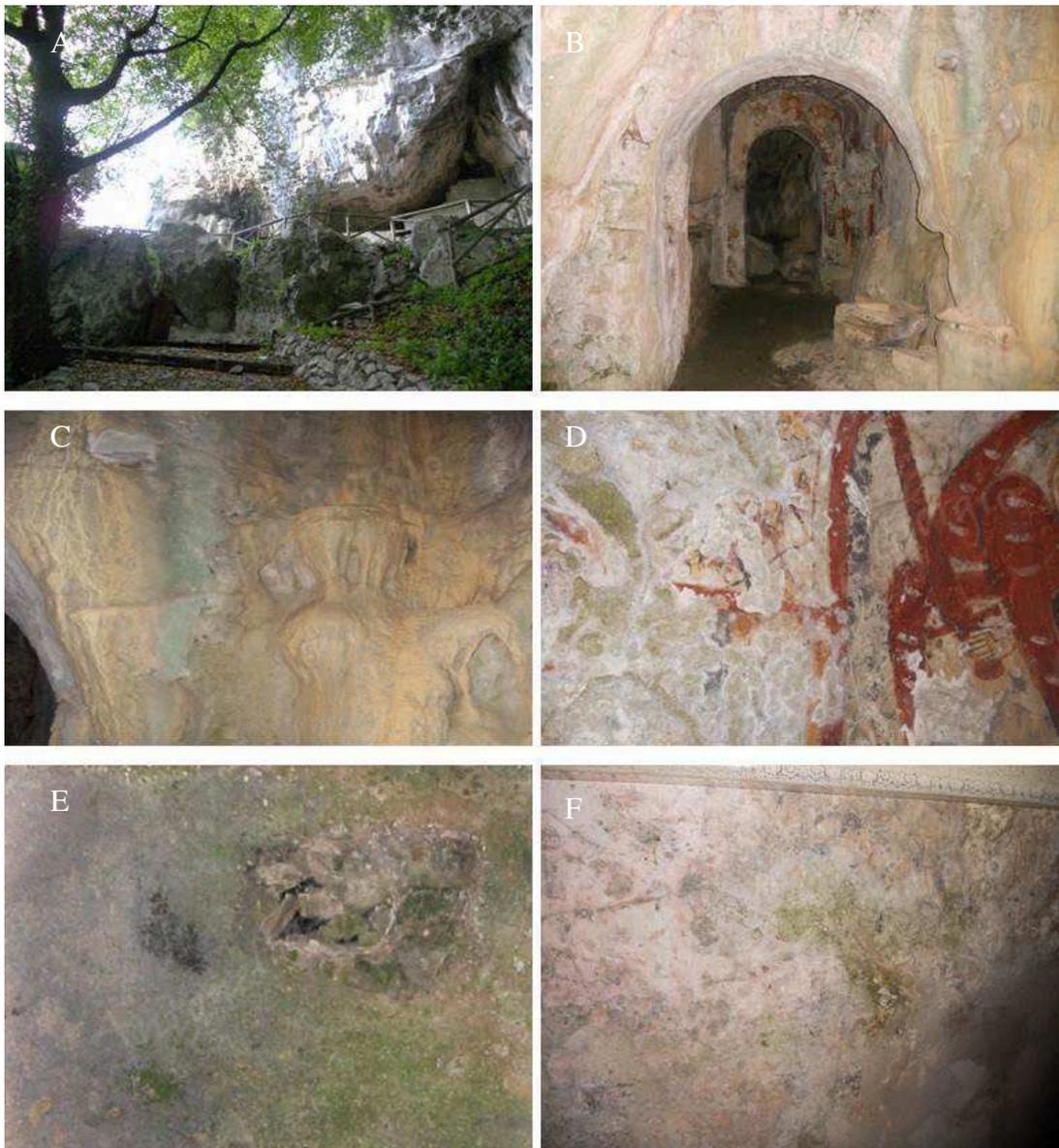


Tavola 2.6 Esterno ed interno della Grotta di San Michele a Faicchio (A-B). Film epilitico (C), crescita epilitica microcoloniale con erosione superficiale (D), *biofilm* fotosintetico e croste nere (E), crescita casmoendolitica e fratturazione (F).

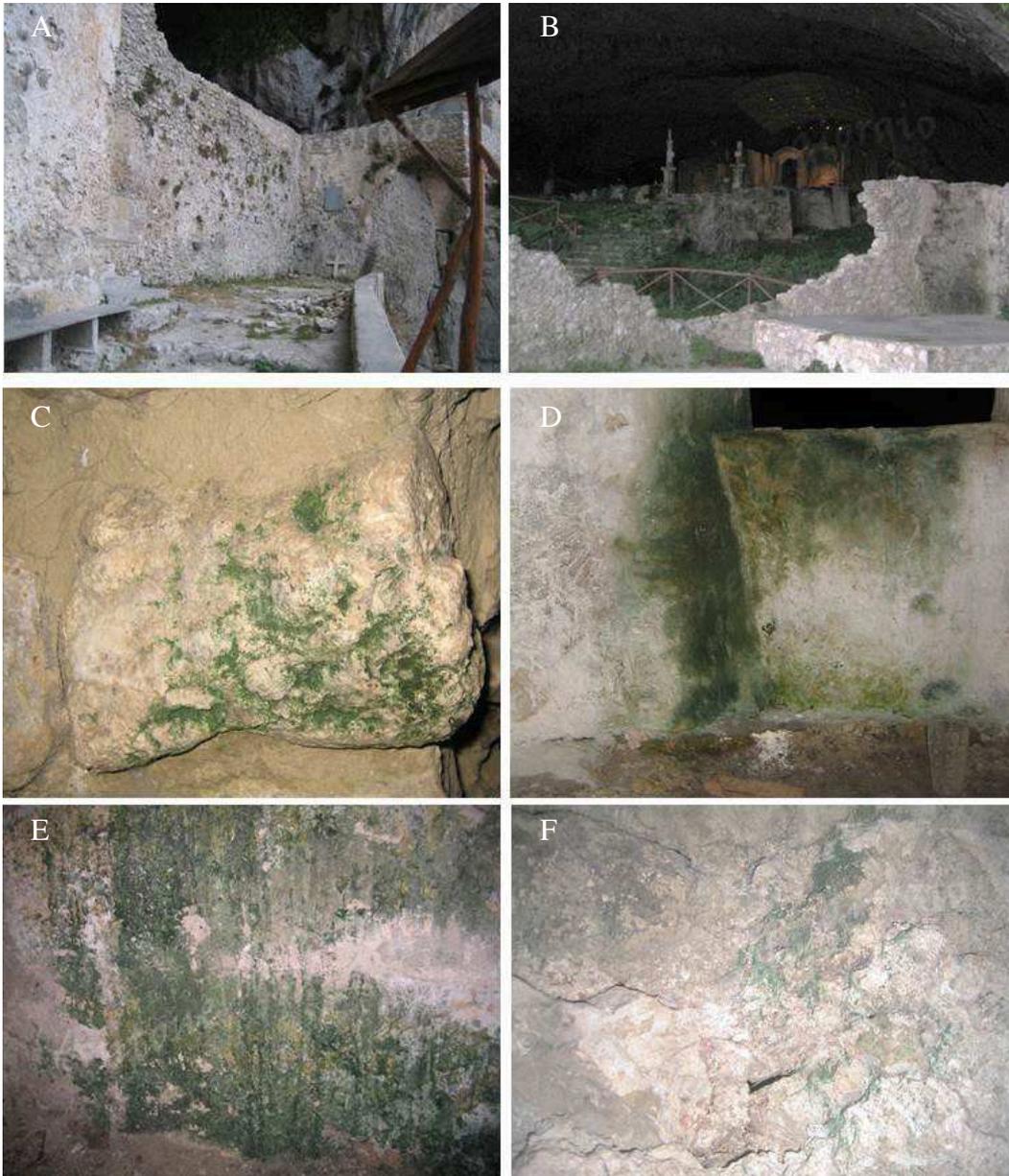


Tavola 2.7 Esterno ed interno della Grotta dell'Angelo ad Olevano (A-B). Crescita casmoendolitica (C), tappeti microbici con sbiancamento del substrato (D), *biofilm* fotosintetico (E), crescita casmoendolitica e erosione superficiale (F).



Tavola 2.8 Esterno ed interno della Grotta di San Michele di Curti (A-B). Crescita microcoloniale e fratturazione superficiale (C), film epilithico fotoautotrofo ed erosione del substrato (D), *biofilm* fotosintetico e sbiancamento degli strati pittorici (E-F).



Tavola 2.9 Esterno ed interno della Grotta dell'Angelo ad Alife (A-B). Tappeti microbici (C-D), *biofilm* fotoautotrofo (D), crescita casmoendolitica (E), *biofilm* e sbiancamento superficiale (F).

CAPITOLO III

**ANALISI QUALITATIVA DEI
BIOFILM FOTOSINTETICI
IN AMBIENTE RUPESTRE**

3.1 METODOLOGIE DI INDAGINE DEI BIOFILM FOTOSINTETICI

Al fine di individuare i principali microrganismi responsabili dell'attività biodeteriogenica è necessario uno studio approfondito sui vari componenti biologici dei *biofilm*. Identificare i vari biodeteriogeni consente di definirne l'habitat e la pericolosità, fattori importanti che permettono di individuare le condizioni ambientali e i parametri fisico-chimici che favoriscono l'attività di deterioramento. Le tecniche di identificazione utilizzate a tale scopo sono differenti per ogni gruppo considerato e il livello di identificazione (genere o specie) è diverso in base alle procedure che si utilizzano. Per questo motivo si utilizzano sia tecniche tradizionali di microscopia ottica ed elettronica che tecniche di biologia molecolare; le tecniche tradizionali sono state utilizzate per molto tempo al fine di identificare i principali agenti biodeteriogeni (Saiz-Jimenez et al.,1990). Si sono rivelate estremamente utili per dimostrare l'importanza dei microrganismi nei processi di biodeterioramento e per comprenderne la fisiologia e morfologia. Tuttavia tali tecniche sono laboriose e necessitano di grandi quantità di campioni, e ciò può essere un problema, soprattutto quando si hanno a disposizione solo piccole quantità di materiale su cui lavorare. Inoltre non consentono di avere informazioni complete sulla composizione delle comunità microbiche, in quanto alcuni microrganismi difficilmente sono coltivabili in condizioni artificiali. Ci sono molte ragioni per il fallimento delle tecniche di coltura; il più comune è che non si riescono a riprodurre le condizioni che i microrganismi richiedono per la crescita. Tale osservazione è valida per una grande varietà di ambienti, compresi i monumenti e le opere d'arte, dove i microrganismi sono per lo più membri di un consorzio microbico complesso, e il loro sviluppo è dipendente da nutrienti specifici (Laiz et al., 2003). Per superare questi problemi, nel corso dell'ultimo decennio, anche nel campo ambientale, sono state ampiamente utilizzate tecniche di biologia molecolare, basate sull'analisi di specifiche sequenze di DNA al fine di individuare microrganismi a crescita lenta e difficile. Tali tecniche richiedono una ridotta quantità di campione su cui condurre le analisi e consentono di ottimizzare le informazioni sul tipo di microrganismi che colonizzano differenti materiali.

Di seguito verranno analizzati gli step analitici e le metodiche utilizzate per una completa analisi qualitativa dei *biofilm* in habitat rupestre. Il prelievo di campioni biologici da superfici affrescate e rocciose è stato seguito dalle analisi morfologiche e molecolari per l'identificazione dei principali taxa. I dati ricavati dalle analisi sono stati relazionati alle

differenti condizioni di crescita (parametri microclimatici, caratteristiche del substrato) per evidenziare variazioni qualitative della composizione delle biocenosi microbiche in funzione di suddetti parametri.

3.2 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI BIOFILM FOTOSINTETICI

In ciascuna delle sette grotte precedentemente individuate sul territorio campano, ho effettuato campionamenti di porzioni di *biofilm* dagli affreschi e dalla roccia circostante, cercando di ottenere una quantità di materiale rappresentativo delle diverse condizioni di crescita dei microorganismi. Il prelievo è stato eseguito mediante tecniche non distruttive, con l'utilizzo di anse e bisturi (Normal 3/80). Tale modalità di campionamento consente di rimuovere superficialmente porzioni di *biofilm*, evitando di arrecare un ulteriore stress meccanico e fisico al substrato, ed è in genere utilizzato quando si eseguono analisi microscopiche o qualitative. Per ogni campione sono state scattate fotografie e annotate le caratteristiche del substrato, di illuminazione e di colorazione del *biofilm* (Tabella 3.1, Tavola 3.1-Tavola 3.7). In particolare sono state analizzate le associazioni microalgali rinvenute in tre differenti condizioni di illuminazione, indicate con luce, penombra e buio. Con il termine di luce si indicano quelle condizioni in cui le intensità luminose elevate colpiscono direttamente il substrato colonizzato; per buio, invece, si intendono quelle situazioni nelle quali le intensità luminose sono scarse durante tutto l'anno. La condizione di penombra si identifica con delle intensità luminose variabili ma mai direttamente indirizzate sul substrato.

Le tecniche colturali sono volte alla preparazione di colture monoalgali; solo dopo le metodiche di isolamento è possibile procedere all'identificazione microscopica (Normal 9/88). In questo modo è più immediata e semplice la caratterizzazione morfologica e la classificazione tassonomica dei microorganismi, in base all'osservazione delle caratteristiche fenotipiche. A tal proposito i campioni di *biofilm*, corrispondenti a ciascun sito di campionamento sono stati trasferiti in laboratorio; una parte è stata inoculata in terreni di coltura liquidi e solidi. In particolare sono stati utilizzati i terreni Bold Basal Medium (Bischoff, 1963) e Blue Green 11 (Castenholz, 1988) per consentire la crescita rispettivamente delle alghe verdi e dei cianobatteri che, da analisi bibliografiche, rappresentano i principali componenti fotosintetici dei *biofilm* (Tabella 3.2; Tabella 3.3). I campioni sono stati conservati in termostato ad una temperatura variabile tra i 18 e i 24°C e

in condizioni di illuminazione differenti, a seconda delle naturali condizioni di crescita. Ogni 15 giorni le colture sono state rinnovate al fine di garantire alle comunità microbiche una completa disponibilità delle sostanze nutritive necessarie per la crescita e per garantire il mantenimento della variabilità specifica dei *biofilm* oggetto di studio. In parallelo è stato utilizzato il terreno Nutrient Agar (American Public Health Association, 1920) per l'allestimento di colture batteriche su terreno solido (Tabella 3.4). Le singole colonie, dopo crescita overnight a 24°C sono state isolate e congelate in 20 µl di acqua sterile per il successivo riconoscimento su base molecolare.

La restante porzione di *biofilm* è stata diluita in 1,5 ml di acqua sterile e congelata per le successive analisi molecolari.

3.3 MICROSCOPIA OTTICA ED ELETTRONICA

L'utilizzo del microscopio ottico ed elettronico permette di analizzare la struttura del *biofilm*, di identificare i microorganismi coinvolti nei fenomeni di biodeterioramento e di valutare il tipo di interazione tra i microorganismi e il substrato. Ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di elevati ingrandimenti, che forniscono importanti informazioni utilizzabili poi durante i processi di restauro e di conservazione delle opere d'arte. L'utilizzo del microscopio elettronico, grazie all'elevato potere risolutivo consente di analizzare con maggior dettaglio e sensibilità la componente biologica e la struttura del *biofilm*. Le osservazioni sono state eseguite su un'aliquota di campione in coltura tramite l'utilizzo del microscopio ottico Nikon Eclipse E800 con ingrandimenti 40X, 60X e 100X; sono state scattate microfotografie degli organismi osservati per l'allestimento di un database per il successivo riconoscimento tassonomico dei microorganismi. Le analisi di microscopia elettronica sono state condotte con un microscopio a scansione (SEM Zeiss DSM 950 a 10 kV). L'identificazione tassonomica dei componenti fotosintetici è stata effettuata utilizzando monografie e tavole di riconoscimento tassonomico e impiegando quali elementi diagnostici, la forma e dimensione cellulare, presenza e assenza del pirenoide, numero e forma del cloroplasto (Bourrelly, 1986; Van den Hoek et al., 1995). Di seguito viene proposto il protocollo utilizzato per la preparazione dei campioni per le analisi di microscopia elettronica:

1. Aggiungere a 500 µl di sospensione algale 500 µl di formaldeide 2% (fissativo).

2. Conservare overnight a 4°C.
3. Centrifugare per 10 minuti a 5000 rpm.
4. Effettuare tre lavaggi successivi con 500 µl terreno di coltura Bold Basal Medium, per eliminare il fissativo. Dopo ogni lavaggio centrifugare la sospensione a 5000 rpm per 5 minuti.
5. Al termine dell'ultimo passaggio eliminare il surnatante e aggiungere 500 µl di Tetrossido di Osmio 1%.
6. Conservare i campioni a 4°C per 2 ore.
7. Eseguire tre lavaggi consecutivi con acqua distillata per eliminare l'osmio. Ad ogni lavaggio centrifugare 5 minuti a 5000 rpm.
8. Eliminare il surnatante e effettuare passaggi con soluzioni di etanolo a concentrazione crescente, per disidratare i campioni. Ad ogni passaggio centrifugare i campioni 5 minuti a 5000 rpm.
9. Lasciare i campioni eluiti in etanolo 100% a temperatura ambiente e aggiungere 500 µl di Freon.
10. Procedere con Critical Point Drying (CPD). La tecnica consente di disidratare il materiale biologico rendendolo idoneo all'analisi microscopica ed evitando i rischi correlati al disseccamento all'aria. Lo strumento CPD consente di monitorare il passaggio da liquido a gas di un liquido inerte, quale il Freon o il biossido di carbonio, capace di sostituire le molecole d'acqua all'interno delle cellule. In seguito alla sostituzione e ad induzione di variazioni termiche e di pressione, si assiste al passaggio delle molecole inerti dalla fase liquida alla fase gassosa senza passare dalla fase di vapore. Vengono così evitate le distorsioni morfologiche e ultrastrutturali derivanti dall'istaurarsi di tensioni superficiali.
11. I campioni essiccati sono sottoposti a metallizzazione e osservati al SEM.

3.4 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Le tecniche di biologia molecolare basate sull'analisi di specifiche sequenze di DNA sono state utilizzate per individuare microorganismi a crescita lenta e difficile. Tali tecniche richiedono una ridotta quantità di campione su cui condurre le analisi e consentono di ottimizzare le informazioni sul tipo di microorganismi che colonizzano differenti materiali. Di seguito vengono riportati gli step analitici, eseguiti sui campioni di *biofilm* prelevati in ciascuna delle sette grotte.

3.4.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

È stato utilizzato il metodo cTAB di Doyle e Doyle (1987) per estrarre il DNA genomico dai campioni di *biofilm*. Il protocollo di estrazione è stato eseguito sui campioni congelati utilizzando il seguente protocollo:

1. Scongellare i campioni e centrifugare per 3 minuti a 5000 rpm.
2. Eliminare il surnatante e aggiungere 700 µl di CTAB 2x e 1.4 µl di β-mercaptoetanolo (10 mg/ml).
3. Incubare i campioni a 60°C per 30 minuti e poi trasferirli in ghiaccio per 5-10 minuti.
4. Aggiungere un ugual volume di cloroformio / alcol isoamilico (24:1) e centrifugare per 10 minuti a 8.000 rpm, per rimuovere i residui delle pareti cellulari e le proteine, con successivo recupero della fase acquosa superiore.
5. Aggiungere al surnatante un uguale volume di cloroformio / alcol isoamilico (24:1); centrifugare per 10 minuti a 8.000 rpm.
6. Aggiungere al surnatante alcol isopropilico, 70% del volume raccolto.
7. Lasciare il campione a - 20°C overnight per la precipitazione del DNA.
8. Centrifugare a freddo, 13.200 rpm per 15 minuti ed eliminare il surnatante.
9. Eseguire 1-2 lavaggi con 500 µl di etanolo al 70% e centrifugare a freddo per 10 minuti a 13.000 rpm.

10. Dopo l'ultimo lavaggio far evaporare l'etanolo in eccesso.

11. Sospendere il pellet in 50-100 µl di acqua sterile.

12. Conservare a - 20°C.

La purezza e la concentrazione del DNA estratto è stata stimata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 0,8% in tampone TEB 1% per circa 40' a 70V (Figura 3.1). Una stima più precisa della quantità del DNA estratto è stata eseguita al NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.4.2 AMPLIFICAZIONE PCR

Per il riconoscimento molecolare dei taxa è stata eseguita un' amplificazione PCR di specifiche regioni del DNA ribosomiale (Nubel et al., 1997; Raji et al., 2008). Per l'identificazione della componente algale è stata utilizzata la coppia di primer A: EuKA 1F (5'–CTG GTT GAT CCT GCC AG– 3') e EuK516 Rev (5' –ACC AGA CTT GCC CTC C– 3'), specifica per una regione de DNA ribosomiale 18S di lunghezza pari a 500bp. Per la componente cianobatterica è stata amplificata una specifica regione del DNA ribosomiale 16S utilizzando la coppia di primer B: CYA371 F (5' –CCT ACG GGA GGC AGC AGT GGG GAA TTT TCC AC– 3') e CYA783 Rev (5' –GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CT– 3', con prodotto di amplificazione atteso lungo circa 400bp. Per l'identificazione molecolare delle specie batteriche è stata utilizzata la coppia di primer C: 479F (5'-GTG CCA GCA GCC GCG GT- 3') e 1392 Rev (5' -GAC GGG CGG TGW GTR CA- 3'), specifica per una regione del DNA ribosomiale 16S lunga circa 900bp.

Per l'amplificazione della componente algale e cianobatterica la reazione PCR è stata eseguita utilizzando 25ng di DNA genomico per un volume finale di 25 µl, seguendo il protocollo DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific). Per il riconoscimento delle specie batteriche le reazioni sono state allestite utilizzando quale templatato le singole colonie isolate da terreno solido. Per la coppia di primer A e C è stato utilizzato il seguente programma di amplificazione che ha previsto un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C per 5', seguito da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 45'', annealing a 55°C per 45'' ed estensione a 72°C per 1'; l'estensione finale è stata condotta a 72°C per 5'. Per la coppia di

primer B è stato utilizzato lo stesso programma di amplificazione, modificato nella fase di annealing, eseguita a 58°C.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio alla concentrazione di 1,5 % in tampone TEB 1 % e, utilizzando un marcatore a peso molecolare noto, ne è stata stimata la concentrazione (Figura 3.1).

3.4.3 CLONAGGIO MOLECOLARE

La tecnica ha consentito l'isolamento di uno specifico frammento di DNA dal genoma di un organismo riuscendo ad identificare anche i DNA meno rappresentati all'interno di una singola reazione di PCR. I prodotti PCR sono stati sottoposti a clonaggio molecolare con Kit CloneJet PCR Cloning Fermentas (Thermo Scientific) e, così come da protocollo, è stato effettuato uno screening in PCR di tali colonie, utilizzando la coppia di primer specifici pJET1.2 F (5'- CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC -3') e pJET1.2 Rev (5'- AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG -3').

3.4.4 SEQUENZIAMENTO

Per ciascun clone è stata ottenuta una sequenza consenso attraverso sequenziamento automatico (Genetic Analyzer mod. 3130_Applied Biosystems). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite secondo il protocollo standard del BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Le reazioni di sequenza sono state purificate secondo il protocollo di seguito riportato:

1. Aggiungere al prodotto di reazione (5 µl) 2.5 µl di sale sodio acetato (3M, pH 4.6), 20 µl di acqua e 50 µl di etanolo 100%.
2. Lasciare 30' a -20°C.
3. Centrifugare a 4°C per 15 minuti a 13.200 rpm.
4. Eliminare il surnatante ed eseguire 1-2 lavaggi con 180 µl di etanolo al 70 %; dopo ogni lavaggio i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 13.200 rpm a 4°C.
5. Al termine dei lavaggi far evaporare l'etanolo residuo.

6. Conservare a -20°C o risospendere in $12\ \mu\text{l}$ di formammide.
7. Denaturare a 94°C per 3 minuti e caricare al sequenziatore.

La sequenza ottenuta da ciascun clone è stata editata, controllata con programma Bioedit e utilizzata per le successive analisi di riconoscimento tassonomico in GenBank, attraverso il database online del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.5 ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

I dati ricavati sulla composizione biologica dei *biofilm* sono stati sottoposti ad analisi statistica. L'obiettivo è cercare di capire se le specie identificate si distribuiscono in maniera differente a seconda della grotta (quindi sulla base delle differenze geografiche e/o delle condizioni climatiche generali), se la distribuzione è dipendente dalla tipologia di substrato (roccia o affresco) o se le variazioni composizionali dei *biofilm* dipendono dalle specifiche condizioni di nicchia (ad esempio la quantità di luce a disposizione). Quanto appena detto si traduce nel voler valutare se esistono differenze statisticamente significative tra le comunità algali rinvenute in grotte diverse, su substrati diversi e in condizioni di illuminazione diverse. A tal scopo sono state utilizzate la Cluster Analysis e il test di Kruskal Wallis.

3.5.1 CLUSTER ANALYSIS

La Cluster Analysis consiste in un insieme di tecniche statistiche atte ad individuare gruppi di unità tra loro simili rispetto ad un insieme di caratteri presi in considerazione, e secondo uno specifico criterio (Todeschini, 2003). L'obiettivo che ci si pone è sostanzialmente quello di riunire unità tra loro eterogenee in più sottoinsiemi tendenzialmente omogenei e mutuamente esaustivi. Le unità statistiche vengono, in altri termini, suddivise in un certo numero di gruppi a seconda del loro livello di "somiglianza" valutata a partire dai valori che una serie di variabili prescelte assume in ciascuna unità. La Cluster Analysis, a differenza di altre tecniche statistiche multivariate, non compie alcuna assunzione "a priori" sulle tipologie fondamentali esistenti che possono caratterizzare il collettivo studiato. In questo caso la tecnica ha un ruolo esplorativo di ricerca di strutture latenti, al fine di desumere la partizione più probabile. La Cluster Analysis è infatti un metodo puramente empirico di classificazione, e come tale, in primo luogo, una tecnica induttiva. I

dati sono stati ridotti in forma grafica attraverso un dendogramma (Metodo gerarchico di raggruppamento), in modo tale da rendere facile la lettura delle informazioni rilevate e parsimoniosa la presentazione dei risultati.

3.5.2 TEST DI KRUSKAL WALLIS

La valutazione dell' influenza di specifici fattori su un gruppo di popolazioni è di norma affidata all'insieme di procedure statistiche che vanno sotto il nome di Analisi della Varianza (Conover, 1999). Tuttavia, l'ANOVA è un metodo affidabile soltanto nel caso siano verificati alcuni prerequisiti, tra i quali la distribuzione normale delle misure e la distribuzione normale delle varianze (omoscedasticità). Nel caso in studio, i rilievi sono rappresentati prevalentemente da indicazioni di presenza-assenza, quindi, da dati "nominali", non numerici, che mal si prestano all'analisi della varianza. Il test di Kruskal Wallis che ho impiegato è un metodo per verificare l'uguaglianza delle mediane di diversi gruppi; cioè per verificare che tali gruppi provengano da una stessa popolazione (o da popolazioni con uguale mediana). Questo metodo è il corrispondente non parametrico dell'analisi di varianza, in cui i dati vengono sostituiti dal loro rango, e viene solitamente usato quando non vengono verificati i prerequisiti dell'ANOVA.

3.6 RISULTATI

Le osservazioni al microscopio ottico ed elettronico hanno permesso l'identificazione solo di alcune delle specie microalgali facenti parte della biomassa fotosintetica, in particolare cianobatteri, alghe verdi e alcune diatomee (Tavola 3.8- Tavola 3.11). Le analisi di microscopia elettronica sono state importanti anche per la valutazione del tipo di interazione tra i vari taxa e tra questi e il substrato. Le analisi molecolari hanno confermato la presenza dei taxa identificati su base microscopica ed hanno consentito l'identificazione di microorganismi presenti anche in tracce, la cui caratterizzazione morfologica è risultata difficile. Per ogni grotta le analisi sono state condotte su quattro campioni di *biofilm*, due prelevati da substrato roccioso e due da superfici affrescate. In alcuni casi i campioni analizzati sono stati tre a causa della presenza di un unico manufatto pittorico.

Di seguito si riporta una breve descrizione dei generi e delle specie identificate nei campioni oggetto di studio (Tabella 3.5, Tabella 3.6, Tabella 3.7).

BACTERIA:

Aminobacter sp. (Urakami et al., 1992)

Proteobacteria - AlphaProteobacteria - Rhizobiales - Phyllobacteriaceae.

Al genere appartengono batteri Gram-negativi, di forma bastoncellare con estremità arrotondate. Le cellule sono mobili per la presenza di flagelli subpolari. Formano solitamente colonie di colore bianco o giallo. Il genere comprende specie chemioorganotrofe con metabolismo ossidativo aerobio.

Bacillus sp. (Jonassen, 1985).

Firmicutes - Bacilli - Bacillales - Bacillaceae.

Il genere comprende batteri Gram-positivi sporigeni, di elevata eterogeneità morfologica e metabolica. Possiedono metabolismo aerobio obbligato o anaerobio facoltativo. Hanno tipicamente forma bastoncellare e sono aerobi obbligati o facoltativi. Colonizzano una grande varietà di habitat tollerando un ampio range di parametri ambientali.

Blastochloris sp. (Hiraishi, 1997).

Proteobacteria - Alphaproteobacteria - Rhizobiales - Hyphomicrobiaceae.

Il genere include alfa-proteobatteri Gram-negativi. Non possiedono una parete di peptidoglicano. Le cellule possiedono due membrane, una formata da peptidoglicano e l'altra da polisaccaridi. Sono anaerobi facoltativi e in presenza di ossigeno mostrano metabolismo eterotrofo. In condizioni anaerobiche il metabolismo diviene fotoeterotrofo; utilizzano la luce quale fonte di energia. Il genere comprende specie prettamente ambientali, di habitat acquatici o terrestri.

Brevibacillus sp. (Shida et al., 1996).

Firmicutes - Bacilli - Bacillales - Paenibacillaceae.

Al genere appartengono batteri Gram-positivi sporigeni di forma bastoncellare. Sono aerobi e tipicamente ambientali (suolo, acque, e aria).

Desulfobacterium sp. (Bak & Widdel, 1988).

Proteobacteria - Deltaproteobacteria - Desulfobacterales - Desulfobacteraceae.

Il genere comprende specie di batteri solfato-riduttori di forma bastoncellare. Comprende specie acquatiche e terrestri.

Erythrobacter sp. (Shiba & Simidu, 1982).

Proteobacteria - Alphaproteobacteria - Sphingomonadales - Erythrobacteraceae.

Il genere include alfa-proteobatteri Gram-negativi asporigeni. Hanno forma variabile da ovale e bastoncellare; sono aerobi obbligati e possiedono batterioclorofilla e carotenoidi, responsabili della colorazione rosso-arancio. È un tipico genere di habitat terrestri o d'acqua dolce.

Micrococcus sp. (Cohn, 1872).

Actinobacteria - Actinobacteridae - Actinomycetales - Micrococcineae - Micrococcaceae.

Al genere appartengono batteri Gram-positivi, di forma coccoide e formano spesso raggruppamenti irregolari o tetradi cellulari. Sono aerobi obbligati. Gli individui appartenenti al genere sono stati isolati in differenti contesti (pelle, suolo, acqua).

Pseudomonas sp. (Migula, 1894).

Proteobacteria - Gammaproteobacteria - Pseudomonadales - Pseudomonadaceae.

Il genere include batteri Gram-negativi, aerobi obbligati. Hanno forma coccoide e flagelli polari che ne consentono il movimento. Alcune specie secernono muco e altre sostanze polisaccaridiche che ne facilitano l'adesione al substrato. Si rinvencono nel suolo e nelle acque.

Stenotrophomonas sp. (Palleroni & Bradbury, 1993).

Proteobacteria - Gammaproteobacteria - Xanthomonadales - Xanthomonadaceae.

Il genere comprende batteri Gram-negativi, aerobi obbligati e asporigeni. Di forma bastoncellare e mobili per la presenza di due flagelli polari. Ubiquitari di ambienti d'acqua dolce e suoli.

Streptomyces sp.: (Waksman & Henrici, 1943).

Actinobacteria - Actinobacteridae - Actinomycetales - Streptomycineae - Streptomycetaceae.

Il genere comprende batteri Gram-positivi aerobi obbligati. Le cellule, di forma filamentosa e ramificata, formano miceli vegetativi ramificati e spesso pigmentati. Il genere si rinviene in habitat terrestri, principalmente suolo.

CYANOPHYTA:

Aphanocapsa sp. (Nägeli, 1849)

Cyanophyceae - Chroococcales - Merismopediaceae - Merismopedioideae.

Il genere comprende specie unicellulari, coloniali. Le cellule hanno generalmente forma sferica; le colonie microscopiche assumono forma sferica o irregolare, quelle microscopiche appaiono come ammassi irregolari di cellule. Le mucillagini coloniali sono tipicamente colorate (gialle o brunastre), con margini indistinti. Genere tipicamente d'acqua dolce anche se molte specie vive in habitat sub-aerofitici, tra cui rocce umide e pareti rocciose.

Aphanothece sp. (Nägeli, 1849).

Cyanophyceae - Chroococcales - Synechococcaceae - Aphanothechoideae.

Il genere comprende specie unicellulari coloniali. Le cellule hanno forma variabile, da ovale a cilindrica con estremità arrotondate; raramente la forma è fusiforme o arcuata. Le colonie possono essere microscopiche o macroscopiche, con cellule organizzate irregolarmente e circondate da mucillagini di colore verde o marrone. Il genere è ampiamente distribuito in acque stagnanti e in habitat terrestri (rocce umide).

Calothrix sp. (Agardh ex Bornet et Flahault, 1886).

Cyanophyceae - Nostocales - Rivulariaceae.

Il genere comprende specie filamentose, eteropolari. I filamenti, formati da cellule cilindriche, si differenziano in una porzione basale (che aderisce al substrato) e una apicale. I filamenti sono semplici, talvolta con false ramificazioni laterali; sono solitari o uniti a formare piccoli gruppi di filamenti indipendenti. I filamenti possiedono eterocisti

basali o intercalari. I filamenti sono spesso avvolti da guaine di colore giallo-bruno. Alcune specie crescono in ambienti acquatici, altre in habitat terrestri.

Chlorogloea sp. (Wille, 1900).

Cyanophyceae - Oscillatoriophyceae - Chroococcales - Entophysalidaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, talvolta coloniali. Le cellule di forma sferica, ellissoidale o irregolare contengono, a livello citoplasmatico granuli di colorazione variabile (giallo, blu, grigio). Le colonie hanno forma irregolare e dall'aspetto mucillaginoso; ciascuna colonia è formata da piccoli raggruppamenti cellulari, a livello dei quali le cellule sono tenute insieme da una mucillagine comune. Comprende specie marine, d'acqua dolce e terrestri (rocce e suolo umidi).

Chroococciopsis sp. (Geitler, 1933).

Cyanophyceae - Chroococcales - Xenococcaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, talvolta coloniali. Le cellule possono avere forma sferica, emisferica o irregolare e sono circondate da guaine mucillaginose. Possiedono spesso un contenuto citoplasmatico colorato (blu-verde o giallo) e tilacoidi liberi. Le colonie hanno forma sferica o irregolare, di consistenza mucillaginosa. Molte sono le specie endolitiche su rocce e substrati umidi.

Chroococcus sp. (Nägeli, 1849).

Cyanophyceae - Chroococcales - Chroococcaceae.

Il genere comprende specie unicellulari coloniali. Le cellule possono avere forma emisferica o irregolare e formano colonie di dimensioni e forma variabile. Le colonie di dimensioni maggiori hanno consistenza gelatinosa e aspetto diffidente. Il contenuto cellulare è omogeneo o granulare, di colorazione variabile dal giallo al viola al verde. I tilacoidi decorrono liberi alla periferia cellulare. Il genere è ampiamente distribuito in ambienti d'acqua dolce; molte sono le specie di habitat terrestri.

Cyanothece sp. (Komárek, 1976).

Cyanophyceae - Chroococcales - Synechococcaceae - Aphanothecoideae.

Il genere comprende specie unicellulari, raramente coloniali. Le cellule assumono forma ovale o cilindrica, con estremità arrotondate; possiedono spesso una guaina indistinta che avvolge i margini. Il genere è distribuito in ambienti d'acqua dolce e in habitat terrestri umidi.

Cylindrospermum sp. (Kützing ex Bornet et Flahault, 1888).

Cyanophyceae - Nostocales - Nostocaceae - Anabaenoideae.

Il genere comprende specie filamentose. I filamenti sono formati da cellule cilindriche, più o meno isodiametriche o maggiormente sviluppante nel senso della lunghezza. I filamenti, leggermente ricurvi o avvolti a spirale si raggruppano in matasse mucillaginose. I singoli filamenti non possiedono guaine ma mucillagini sottili e diffidenti, simmetriche e addossate alla parete cellulari. Si conoscono specie del perifiton, del benthos d'acqua dolce e specie unicamente terrestri.

Gloeotheca sp. (Nägeli, 1849).

Cyanophyceae - Chroococcales - Synechococcaceae - Aphanothecoideae.

Il genere comprende specie unicellulari, coloniali. Le cellule possono avere forma ovale o allungata con estremità arrotondate e di colore verde. Le colonie sono solitamente formate da gruppi di 2, 4 o più cellule, circondate ognuna da guaine e immerse all'interno di una mucillagine comune. Questi piccoli raggruppamenti cellulari possono riunirsi a formare strutture macroscopiche. Generalmente le mucillagini, colorate variamente, possiedono margini ben delimitati. La maggior parte delle specie si rinviene in habitat aerofitici, principalmente rocce umide.

Gloeocapsa sp. (Kützing, 1843).

Cyanophyceae - Chroococcales - Microcystaceae.

Il genere comprende specie unicellulari coloniali. La forma cellulare varia da sferica a ovale, e il contenuto citoplasmatico è solitamente di colore blu-verde. Le colonie possono essere microscopiche o macroscopiche e le cellule che le costituiscono si dispongono in maniera irregolare; ciascuna cellula è rivestita da una guaina mucillaginosa, colorata più o

meno intensamente che si prolunga fino a formare un'unica massa che ingloba tutte le cellule. La maggior parte delle specie occupa habitat terrestri umidi (rocce, suolo, tronchi di alberi).

Leptolyngbya sp. (Anagnostidis & Komárek, 1988).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Pseudanabaenaceae - Pseudanabaenoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule possono essere o isodiametriche o più sviluppate in lunghezza che in larghezza; assumono colorazione verde, blu o gialla. I filamenti sono solitamente ricurvi o avvolti a spirale, isopolari, solitari o raggruppati in colonie ad elevata densità. Spesso intorno a ciascun filamento vi è una guaina colorata; raramente possiedono false ramificazioni. Il genere è molto comune in habitat terrestri, tra cui rocce.

Lyngbya sp. (Agardh ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Oscillatoriaceae - Oscillatorioideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule sono di forma cilindrica e possiedono contenuto colorato con tilacoidi sparsi all'interno del citoplasma. I filamenti, raramente solitari, sono connessi tramite guaine sottili a formare masse stratificate di dimensioni macroscopiche. Raramente i filamenti possiedono false ramificazioni. Il genere colonizza frequentemente substrati aerofitici.

Microcoleus sp. (Desmazières ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Phormidiaceae - Microcoleoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule che compongono i filamenti sono isodiametriche con estremità coniche; i filamenti sono solitari o riuniti in piccolo gruppi; solitamente sono rivestiti da una guaina sottile mucillaginosa e omogenea. Molte sono le specie terrestri, tipiche colonizzatrici di substrati umidi.

Myxosarcina sp. (Printz, 1921).

Cyanophyceae - Chroococcales - Xenococcaceae.

Il genere comprende specie unicellulari coloniali. Le cellule, di forma poligonale o irregolarmente arrotondate, formano solitamente colonie costituite da più di 32 cellule. Le

cellule, densamente raggruppate, sono immerse in una guaina mucillaginosa comune con colorazione tendente al bruno. Il genere colonizza habitat terrestri, prediligendo substrati umidi.

Nodosilinea sp. (Perkerson & Casamatta, 2011).

Cyanobacteria - Oscillatoriophycidae - Oscillatoriales.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule che costituiscono i filamenti sono isodiametri; ben visibili sono i tilacoidi parietali. I filamenti sono raramente multiseriati, con guaine sottili e colorate. Colonizza habitat terrestri.

Nostoc sp. (Vaucher ex Bornet et Flahault, 1888).

Cyanophyceae - Nostocales - Nostocaceae - Nostocoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule che costituiscono i filamenti sono solitamente di forma cilindrica o sferica, di dimensioni variabili. I filamenti sono isopolari, di larghezza uniforme e circondati da guaine mucillaginose; formano solitamente aggregati irregolari e a densità elevata. Caratteristica è la presenza di eterocisti intercalari. Si conoscono specie d'acqua dolce e specie tipiche esclusivamente di ambienti terrestri.

Oscillatoria sp. (Vaucher ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Oscillatoriaceae - Oscillatorioideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule dei filamenti possono essere di forma cilindrica o discoidale; possiedono granuli citoplasmatici colorati e tilacoidi irregolarmente distribuiti all'interno delle cellule. I filamenti isopolari e uniseriati, sono semplici e avvolti da sottili guaine colorate. Sono spesso organizzati a formare strutture stratificate, di dimensioni microscopiche o macroscopiche. Tutte le specie formano masse mucillaginose su substrati di natura differente, tra cui rocce e tronchi di alberi.

Phormidium sp. (Kützing ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Phormidiaceae - Phormidioideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule che costituiscono i filamenti possono avere forma cilindrica, più o meno isodiametrica; il contenuto citoplasmatico è colorato e i tilacoidi decorrono perpendicolarmente alla parete cellulare. I filamenti sono isopolari,

ricurvi o avvolti a spirale e non ramificati; possono o no avere guaine di rivestimento. Si organizzano a formare masse microscopiche o macroscopiche che ricoprono densamente la superficie colonizzata. Le specie colonizzano preferenzialmente substrati terrestri umidi, anche se si conoscono specie d'acqua dolce e marina.

Plectonema sp. (Thuret ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Oscillatoriaceae - Plectonematoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule dei filamenti hanno forma cilindrica o discoidale, colorate a livello citoplasmatico. I filamenti sono isopolari e uniseriati, di forma ricurva e avvolti da guaine sottili; spesso possiedono false ramificazioni. Il genere è tipicamente terrestre.

Pleurocapsa sp. (Thuret in Hauck, 1885).

Cyanophyceae - Chroococcales - Hyellaceae - Hyelloideae.

Il genere comprende specie unicellulari spesso pseudofilamentose. Le cellule hanno forma e dimensione variabile a seconda della specie; possiedono contenuto granulare omogeneo di colore verde. Le cellule si organizzano talvolta a formare raggruppamenti tridimensionali di consistenza mucillaginosa e colorazione differente. Appartengono al genere specie tipicamente terrestri.

Pseudanabaena sp. (Lauterborn, 1915).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Pseudanabaenaceae - Pseudanabaenoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule che compongono i filamenti sono cilindriche, più lunghe che larghe, con contenuto citoplasmatico granulare e tilacoidi organizzati all'estremità. I filamenti sono corti, dritti o ricurvi, semplici e uniseriati. Il genere è distribuito in ambienti acquatici e terrestri.

Pseudophormidium sp. (Anagnostidis & Komárek, 1988).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Phormidiaceae - Phormidioideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule dei filamenti sono isodiametriche, con granuli citoplasmatici colorati ed irregolarmente distribuiti. I filamenti sono uniseriati e irregolarmente ricurvi; sono circondati da guaine mucillaginose e si organizzano a formare

masse di dimensioni variabili che ricoprono densamente il substrato di crescita. Si conoscono specie terrestri (substrati rocciosi e umidi) e d'acqua dolce.

Scytonema sp. (Agardh ex Bornet et Flahault, 1887).

Cyanophyceae - Nostocales - Scytonemataceae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule dei filamenti sono solitamente di forma arrotondata, con contenuto citoplasmatico granulare e colorato. I filamenti, avvolti da guaine mucillaginose, sono isopolari e uniseriati, singoli o con ramificazioni apicali; sono solitari o raggruppati in masse di densità anche elevata. Molte specie colonizzano substrati terrestri; poche sono le specie di acque dolci o marine.

Spirulina sp. (Turpin ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Pseudanabaenaceae - Pseudanabaenoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule dei filamenti sono cilindriche e invisibili al microscopio ottico. Hanno contenuto omogeneo, colorazione verde e tilacoidi. I filamenti sono isopolari, uniseriati, non ramificati, avvolti a spirale nel verso della lunghezza. Sono comunemente organizzati in cluster di dimensioni notevoli. Il genere comprende specie d'acqua dolce e specie terrestri.

Symploca sp. (Kützing ex Gomont, 1892).

Cyanophyceae - Oscillatoriales - Phormidiaceae - Phormidioideae.

Il genere comprende specie filamentose e coloniali. Le cellule che formano i filamenti hanno forma cilindrica e estremità arrotondate. I filamenti sono solitari, avvolti a spirale e rivestiti da guaine di consistenza gelatinosa. Le colonie sono formate da fasci di filamenti orientati parallelamente tra loro. La maggior parte delle specie colonizza habitat aerofitici tra cui suolo, pareti rocciose e rocce nude.

Synechococcus sp. (Nägeli, 1849).

Cyanophyceae - Chroococcales - Synechococcaceae - Synechococcoideae.

Il genere comprende specie unicellulari, raramente coloniali. Le cellule possono avere forma ovale o cilindrica, con tilacoidi parietali; raramente sono rivestite da mucillagini sottili e diffidenti. Le cellule possono formare raggruppamenti microscopici o

macroscopici e spesso pseudofilamenti di 2-4 (20) cellule. Colonizzano habitat acquatici e terrestri.

Tolypothrix sp. (Kützing ex Bornet et Flahault, 1888).

Cyanophyceae - Nostocales - Microchaetaceae - Tolypotrichoideae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule dei filamenti sono di forma cilindrica o isodiametrica, con estremità arrotondate o nastriformi. Il contenuto citoplasmatico è granulare e variamente colorato; spesso si evidenziano vacuoli. I filamenti sono eteropolari e spesso dotati di false ramificazioni; la parte basale possiede eterocisti mentre la porzione apicale è libera. Il genere è tipicamente terrestre.

Xenococcus sp. (Thuret in Bornet et Thuret, 1880).

Cyanophyceae - Chroococcales - Xenococcaceae.

Il genere comprende specie unicellulari e coloniali. Le cellule possono avere forma sferica, ovale, irregolare o poligonale; spesso sono circondate da guaine sottili mucillaginose e colorate (verde-blu o grigio). Le cellule adese al substrato formano colonie circolari o allungate, a densità anche elevata. Alcune specie colonizzano habitat acquatici, altre prediligono ambienti terrestri, principalmente montani.

Westiellopsis sp. (Janet, 1941).

Cyanophyceae - Stigonematales - Fischerellaceae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule possono essere di forma isodiametrica, cilindrica o più sviluppate in lunghezza che in larghezza. I filamenti sono ramificati e rivestiti da guaine diffluenti. Il genere è tipicamente terrestre.

CHLOROPHYTA:

Apatococcus sp. (Brand, 1925).

Trebouxiophyceae - Chlorellales - Chlorellaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, talvolta filamentose. Le cellule, solitamente di forma globulare o coccoide, sono uninucleate e possiedono un unico cloroplasto parietale, lobato e privo di pirenoide. Comprende specie tipicamente terrestri.

Asterarcys sp. (Comas Gonzales, 1981).

Chlorophyceae - Sphaeropleales - Scenedesmaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule possono avere forma sferica, ovale, trapezoidale o triangolare; sono solitamente raggruppate in cenobi di 4 o 8 cellule, disposte su uno o su due piani, circondate da mucillagini. Possiedono un unico cloroplasto a forma di coppa e con un singolo pirenoide centrale. La parete cellulare è sottile e liscia, ricca in sporopollenina; in alcune specie prolungamenti mucilluginosi possono svilupparsi verso l'esterno. Comprende specie planctoniche e terrestri, tipicamente di habitat umidi.

Bracteacoccus sp. (Tereg, 1922).

Chlorophyceae - Sphaeropleales - Bracteacoccaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule di forma sferica sono solitarie o coloniali; possiedono un gran numero di cloroplasti parietali e la maggior parte delle specie è multinucleata. Comprende specie acquatiche e terrestri.

Chlorella sp. (Beyerinck, 1890).

Trebouxiophyceae - Chlorellales - Chlorellaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule possono avere forma sferica o ellissoidale, solitarie o aggregate in piccoli gruppi. Possiedono uno o al massimo due cloroplasti parietali, pirenoide presente o assente e un nucleo in posizione centrale. Il genere è ampiamente distribuito in ambienti acquatici e terrestri.

Chlamydomonas sp. (Ehrenberg, 1833).

Chlorophyceae - Chlamydomonadales - Chlamydomonadaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, solitarie e raramente coloniali. Le cellule hanno solitamente forma sferica o affusolata; presentano anteriormente due flagelli di dimensioni uguali. Possiedono un unico cloroplasto di forma variabile a seconda delle specie; nucleo tipicamente centrale. Il genere è ampiamente diffuso in ambienti acquatici e terrestri; questi ultimi comprendono suoli e rocce nude di ecosistemi umidi.

Chlorosarcinopsis sp. (Herndon, 1958).

Chlorophyceae - Chlamydomonadales - Chlorosarcinaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule, di forma sferica, sono spesso raggruppate in diadi o tetradi; possiedono un unico cloroplasto parietale contenente uno o più pirenoidi. Le specie sono tipicamente terrestri.

Chlorococcum sp. (Meneghini, 1842).

Chlorophyceae - Chlamydomonadales - Chlorococcaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, solitarie e coloniali. Le cellule, di dimensioni variabili, possono avere forma ellissoidale o sferica. Possiedono un unico cloroplasto parietale e diversi pirenoidi; il nucleo è in posizione centrale. Il genere è ampiamente distribuito in ambienti acquatici e aerei (rocce e suolo).

Coelastrum sp. (Nägeli, 1849).

Chlorophyceae - Sphaeropleales - Scenedesmaceae.

Il genere comprende specie unicellulari coloniali. Le cellule di forma globosa, ovale o piramidale, formano cenobi di forma sferica, cuboide o piramidale. La parete cellulare appare liscia e possiede molecole simili alla sporopollenina. Cellule uninucleate con cloroplasto singolo e parietale ed un unico pirenoide. La maggior parte delle specie è planctonica, poche quelle terrestri.

Graesiella sp. (Kalina & Puncochárová, 1987).

Chlorophyceae - Chlamydomonadales - Scotielloccystoidaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule sono di forma ellissoidale o globosa, tipicamente coloniali; la parete cellulare appare liscia esternamente e con rivestimenti polisaccaridici verso l'interno. I protoplasti contengono vacuoli spesso granulari, un unico cloroplasto parietale con pirenoide con un rivestimento di amido. Il genere comprende un elevato numero di specie terrestri.

Muriella sp. (Petersen, 1932).

Trebouxiophyceae - Chlorellales - Chlorellaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, spesso coloniali. Le cellule, di forma coccoide, possiedono un singolo cloroplasto parietale, privo di pirenoide. La parete appare liscia e sottile. Le specie sono tipicamente di habitat terrestri.

Neochloris sp. (Starr, 1955).

Chlorophyceae - Sphaeropleales - Neochloridaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule solitarie hanno per lo più forma sferica; possiedono un cloroplasto parietale, a forma di coppa. Il genere è ampiamente distribuito in habitat terrestri.

Parachlorella sp. (Krieniz et al., 2004).

Trebouxiophyceae - Chlorellales - Chlorellaceae.

Il genere comprende organismi unicellulari. Le cellule hanno forma globosa e spesso sono inglobate all'interno di una matrice gelatinosa. Possiedono un cloroplasto parietale con un grande pirenoide di forma ellissoidale e ricoperto da granuli di amido ben visibili. Il genere è distribuito in ambienti terrestri; poche sono le specie acquatiche planctoniche.

Pseudochlorella sp. (Lund, 1955).

Trebouxiophyceae - Prasiolales - Koliellaceae.

Il genere comprende specie solitarie, talvolta coloniali. Le cellule di forma ellittica o irregolare, sono uninucleate; possiedono un cloroplasto centrale comprendente la maggior parte del cloroplasto. Il pirenoide è singolo e centrale, rivestito da una guaina di amido. La parete cellulare è liscia e sottile, costituita da cellulosa e pectine. Le cellule formano spesso aggregati di forma irregolare. Le specie sono per lo più terrestri o d'acqua dolce.

Scenedesmus sp. (Meyen, 1829).

Chlorophyceae - Sphaeropleales - Scenedesmaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule possono avere forma sferica o ellissoidale, allungata o fusiforme, con apici capitati; sono solitarie o organizzate in cenobi

circondati o meno da guaine mucillaginose. Possiedono un singolo cloroplasto parietale e un nucleo centrale. Il genere è distribuito in ambiente acquatico e terrestre.

Scotiellopsis sp. (Vinatzer, 1975).

Chlorophyceae - Sphaeropleales - Scenedesmaceae.

Il genere comprende specie unicellulari, talvolta coloniali. Le cellule in stadi giovanili possono assumere forma fusiforme, mentre le adulte possiedono forma ovale, con ispessimenti apicali. Le cellule sono uninucleate, con cloroplasto parietale e pirenoide ricoperto da amido. La parete cellulare possiede polisaccaridi nello strato rivolto verso l'interno ed è trilamellare verso l'esterno. Comprende specie tipicamente terrestri, colonizzatrici di tronchi di alberi e rocce di ambienti umidi.

Sthicococcus sp. (Nägeli, 1849).

Trebouxiophyceae - Prasiolales - Prasiolaceae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule sono polari, di forma cilindrica, allungata, raramente ovale, con parete cellulare sottile e prive di guaine mucillaginose. Possiedono un unico cloroplasto parietale, privo di pirenoide; un unico nucleo centrale e spesso con vacuoli polari. I filamenti sono uniseriati e non ramificati, dritti o di forma sigmoide; spesso le estremità sono arrotondate. Le specie sono cosmopolite, con un ampio range di distribuzioni ecologiche, aerei, subaerei e acquatici.

Tetracystis sp. (Brown et al., 1964).

Chlorophyceae - Chlamydomonadales - Chlorococcaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule, di forma sferica o ellissoidale, sono solitarie o riunite in consorzi di forma cubica o irregolare. Possiedono un unico cloroplasto parietale. Comprende specie tipicamente terrestri.

Trebouxia sp. (Puymaly, 1924).

Trebouxiophyceae - Trebouxiales - Trebouxiaceae.

Il genere comprende specie unicellulari. Le cellule di forma globosa, spesso si riuniscono gruppi di forma irregolare. Possiedono uno o più cloroplasti di forma stellata, spesso

ammassati e con un unico pirenoide, in posizione centrale. Il genere è ampiamente distribuito in habitat subaerei.

Trentepohlia sp. (Martius, 1817).

Ulvophyceae - Trentepohliales - Trentepohliaceae.

Il genere comprende specie filamentose. Le cellule hanno forma cilindrica, spesso allungata e sono organizzate a formare filamenti, semplici o ramificati. Possiedono un singolo nucleo e un cloroplasto parietale senza pirenoide. Il genere è tipicamente terrestre ed è distribuito in ambienti prevalentemente umidi.

Di seguito si riportano i risultati suddivisi per grotta:

Nella Grotta delle Formelle è stata rilevata la presenza, nei campioni F4, di colorazione verde chiaro e prelevati da superficie affrescata, di individui appartenenti al taxon *Stigonema* sp.; in nessun altro sito di campionamento ne è emersa la presenza così come per i generi di alghe verdi *Neochloris* sp. e *Scotiellopsis* sp., rispettivamente nei campioni F3 e F2 (Tabella 3.6, Tabella 3.7). La colonizzazione batterica determina, così come evidenziabile nel campione F3, la formazione di patine o macchie bianche attribuibili ai generi *Bacillus* sp. e *Micrococcus* sp. (Tabella 3.5).

A Camigliano, dall'analisi molecolare dei campioni, è emerso che a parità di condizioni microclimatiche, il substrato roccioso facilita la colonizzazione da parte dei cianobatteri, promuovendo una maggior biodiversità di tale comunità microbica. Al contrario, la biodiversità delle specie algali negli stessi complessi analizzati risulta essere maggiore su substrati affrescati (Tabella 3.6, Tabella 3.7). La principale alterazione a carico delle superfici, derivante da colonizzazione batterica, è la presenza di patine di colorazione bianco-grigia, così come evidenziabile nel campione Ca4. Le analisi molecolari hanno consentito di attribuire la tipologia di danno alla presenza dei generi *Bacillus* sp., *Erythrobacter* sp. e *Micrococcus* sp. (Tabella 3.5).

Nella Grotta di San Michele a Preturo è stata rilevata la presenza, nel punto di campionamento P1, di individui appartenenti al genere algale *Diplosphaera* sp. non rinvenuti in altri siti di campionamento (Tabella 3.6, Tabella 3.7). Sono stati identificati

diversi generi batterici, tra cui il genere *Bacillus* sp. e *Xanthomonas* sp. responsabili della presenza di patine e macchie bianche nel campione P3 (Tabella 3.5).

All'interno della Grotta di San Michele a Faicchio è stata riscontrata una biodiversità algale nettamente inferiore rispetto a quella degli altri siti di campionamento e l'assenza di specie algali caratteristiche (Tabella 3.6, Tabella 3.7). I danni derivanti da colonizzazione batterica sono evidenziabili maggiormente nei campioni F2 e F3. In entrambi sono stati identificati i generi *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Micrococcus* sp. e *Xanthomonas* sp. (Tabella 3.5).

Nella Grotta dell'Angelo ad Olevano sul Tusciano sono stati individuati specifici taxa algali che possono essere definiti unici in quanto non rinvenuti in altri siti di campionamento (Tabella 3.6, Tabella 3.7). In particolare su affresco O3 sono identificati, dal punto di vista molecolare individui appartenenti ai taxa *Cylindrospermum* sp. e *Westiellopsis* sp. Nei campioni riconducibili a porzioni di film del sito O4 unica è la presenza dei taxa *Symploca* sp. e *Xenococcus* sp. Nei campioni O3 e O4 la presenza del genere batterico *Stenotrophomonas* sp. sembra determinare l'ampia discolorazione del substrato. Così come per gli altri siti di campionamento i generi *Bacillus* sp. e *Erytrobacter* sp. promuovono la formazione di patine bianche (Tabella 3.5).

Dall'analisi dei taxa è emersa la presenza di specifici consorzi di due o più generi (e/o specie) che ricorrono in campioni anche differenti, prelevati da grotte differenti. Di seguito sono riportati gli esempi di riferimento:

Le specie *Halospirulina tapeticola* e *Spirulina subsalsa* sono presenti nei campioni di *biofilm* prelevati dalle superfici rocciose delle grotte di Olevano e Alife. Caratteristica dei *biofilm* è la colorazione nera, l'esposizione in condizioni di buio perenne e l'elevata umidità relativa. Tali condizioni si rinvengono solo in questi i siti di campionamento e potrebbero spiegare la presenza peculiare in entrambe le grotte di tale associazione microbica.

I taxa *Tolypothrix* sp. e *Chondrocystis* sp. sono stati ritrovati nei campioni di *biofilm* prelevati dagli affreschi nelle grotte di Sant'Angelo d'Alife, di Curti e di Preturo. Tutti e tre i campioni sono stati prelevati da superfici affrescate, aventi in comune

l'esposizione diretta alla luce solare. Di conseguenza queste peculiari caratteristiche sono fondamentali per lo sviluppo di questi taxa.

Individui appartenenti al taxon *Pseudanabaena* sp. sono stati rinvenuti nei *biofilm* prelevati dagli affreschi Fa3 e F3 prelevati rispettivamente nella grotta di Faicchio e di Calvi. Anche in questo caso si hanno caratteristiche specifiche quali il substrato affrescato, associazioni microbiche riconducibili a *biofilm* di colore verde scuro e illuminazione scarsa. Tale dato risulta di particolare interesse perché confermato anche da dati presenti in bibliografia (Zucconi et al., 2011).

La specie *Graesiella emersonii* è stata identificata nei campioni di *biofilm* prelevati da superfici rocciose e corrispondenti ai campioni Ca2 e F2. In questo caso le condizioni di scarsa illuminazione e il substrato naturale condizionano la crescita di questi individui, non rinvenuti in altri siti.

Individui appartenenti al taxon *Leptolyngbya* sp. sono stati individuati per via molecolare in tutti i campioni sottoposti a condizioni di scarsa intensità luminosa. È uno dei taxa dominanti i *biofilm* degli ambienti rupestri e cavernicoli e verosimilmente ubiquitario (Czerwick-Marcinkowska & Mrozinska, 2009).

In accordo con i dati bibliografici, sono state rinvenute specifiche biocenosi di microorganismi all'interno di alcuni campioni analizzati:

Le specie *Chroococcus minutus* e *Stichococcus bacillaris* formano solitamente film di colore verde oliva/verde scuro in corrispondenza delle parti alte delle pareti. Entrambe sono state caratterizzate per via molecolare nei campioni O1 (parete) e Fa3 (affresco), rispecchianti tali caratteristiche (Caneva et al., 2009).

L'analisi molecolare condotta sui campioni prelevati dalla superficie affrescata della Grotta delle Formelle (F3) ha mostrato la presenza di una particolare associazione microalgale, che si instaura tipicamente in condizioni di bassa intensità luminosa (Martinez & Asencio, 2010). Si tratta di un'associazione microbica epilitica, con l'aspetto di patina, i cui organismi rappresentativi appartengono, come confermato dai dati bibliografici, ai taxa: *Gloeotheca* sp., *Gloeocapsa* sp., *Chlorogloea* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp., *Oscillatoria* sp. e *Chlorosarcinopsis* sp..

Il campione P1, prelevato da superficie rocciosa nella grotta di Preturo è microclimaticamente sottoposto ad un'alternanza di cicli secco/umido. È stata evidenziata un'associazione epilitica con l'aspetto di patina a tratti mucosa i cui taxa rappresentativi sono: *Apatococcus* sp., *Phormidium* sp., *Leptolyngbya* sp. e *Oscillatoria* sp.. Anche tale aspetto è stato confermato da dati bibliografici (Mulec et al., 2008).

Scenedesmus sp. e *Scytonema* sp. tipicamente formano consorzi microbici in aree molto umide (Mulec & Kosi, 2009; Pietrini & Ricci, 1993). Dalle analisi molecolari ne è emersa la presenza nei campioni O2, A12 e P2 in rispetto delle specifiche condizioni microclimatiche riscontrate nei suddetti siti di campionamento.

Il campione Ca4 ha mostrato, dall'analisi visiva, la presenza di un *biofilm* compatto, sottile e di colore verde oliva. Così come atteso dai dati bibliografici specie rappresentative della biocenosi microbica sono i taxa *Chlorella* sp., *Chlorosarcinopsis* sp., *Muriella* sp., *Leptolyngbya* sp. e *Phormidium* sp. (Dayner & Johansen, 1991; Urzì et al., 2010).

Le associazioni dei taxa *Chlorella* sp., *Coccomyxa* sp., e *Plectonema* sp. sono particolarmente rappresentative negli ambienti cavernicoli e sono stati identificate anche nei campioni O1, P1 e Cu2 (Mulec et al., 2008).

3.7 ANALISI STATISTICA DEI CAMPIONI

I dati ricavati dalle analisi molecolari sono stati sottoposti ad analisi statistica al fine di valutare differenze significative tra i campioni, sulla base delle variabili substrato e illuminazione. Di seguito vengono schematizzati i risultati:

1. Dalla Cluster Analysis è emerso che gli organismi tendono a raggrupparsi per substrato e non per grotta. In altre parole la loro presenza è, come gruppi, più substrato dipendente che grotta dipendente; nonostante ci siano differenze geografiche e climatiche differenti tra le grotte, queste non modificano la composizione specifica delle associazioni microbiche (Figura 3.2).
2. Sulla base del test di Kruskal Wallis i taxa *Aphanocapsa* sp. (Cyanophyceae, Chroococcales, Merismopediaceae), *Nodosilinea* sp. (Cyanobacteria, Oscillatoriales), *Pleurocapsa* sp. (Cyanophyceae, Chroococcales, Hyellaceae), *Asterarcys* sp. (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae), *Coelastrum* sp.

(Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae), *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae, Chlorococcales, Scenedesmaceae) e *Trebouxia* sp. (Trebouxiophyceae, Microthamniales) sono substrato-dipendenti in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$) e crescono solo su substrato roccioso. La modificazione artificiale del substrato affrescato, quindi la presenza di sostanze organiche, inorganiche e di natura metallica influiscono sostanzialmente sullo sviluppo di tali microorganismi.

3. Il test di Kruskal Wallis non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra la ricchezza in specie della comunità di cianobatteri e di alghe, sia su substrati rocciosi che su superfici affrescate.
4. Il test di Kruskal Wallis ha dimostrato che per i taxa *Aphanothece* sp., *Calothrix* sp., *Scytonema* sp., *Apatococcus* sp., *Bracteacoccus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp., *Chlorosarcinopsis* sp., *Muriella* sp. e *Pseudochlorella* sp. si ha una crescita in relazione a specifiche condizioni di illuminazione in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$). In particolare gli individui appartenenti ai taxa *Aphanothece* sp., *Calothrix* sp. e *Scytonema* sp. prediligono il buio; *Apatococcus* sp., *Bracteacoccus* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Chlorella* sp. prediligono la luce piena, mentre *Chlorococcum* sp., *Chlorosarcinopsis* sp., *Muriella* sp. e *Pseudochlorella* sp. risultano essere “sciafili”.

3.8 DISCUSSIONE

In ognuna delle sette grotte oggetto di studio sono state distinte due aree. A) un' area in corrispondenza dell'ingresso e le cui caratteristiche microclimatiche risultano essere influenzate dal clima esterno; in particolare, l'intensità luminosa è elevata e i valori di temperatura e di umidità relativa seguono le variazioni stagionali. B) la seconda area è ad un livello sottostante e le condizioni microclimatiche diventano caratteristiche degli ambienti cavernicoli; la temperatura e l'umidità si stabilizzano, così come le intensità luminose risultano minime. La colonizzazione batterica è evidenziabile per la presenza, sia su superfici affrescate che rocciose, di patine o macchie di colore bianco-grigio. I Proteobatteri e gli Attinobatteri rappresentano i raggruppamenti tassonomici predominanti.

La comunità cianobatterica presenta una maggior biodiversità se confrontata con quella della comunità algale; include quali ordini rappresentativi quello delle Oscillatoriales, delle Chroococcales (con maggior numero di generi rappresentativi) e delle Nostocales. Tra tutti i generi identificati quello maggiormente rappresentato è *Leptolyngbya* con quattro specie (*L. foveolarum*, *L. cf halophila*, *L. compacta*, *L. mycoidea*), seguito da *Peurocapsa* con due (*P. concharum*, *P. minor*).

La comunità algale include come ordini rappresentativi quello delle Chlorococcales, delle Volvocales, delle Prasiolales, delle Sphaeropleales e delle Chlorellales. Tra i generi identificati quello maggiormente rappresentato è *Chlorella* con quattro specie (*C. pyrenoidosa*, *C. subsphaerica*, *C. mirabilis*, *C. saccarophila*, *C. vulgaris*), seguito da *Scenedesmus* (*S. obliquus*, *S. pectinatus*), *Scotiellopsis* (*S. terrestris*, *S. oocystiformis*) e *Stichococcus* (*S. bacillaris*, *S. chodati*) con due.

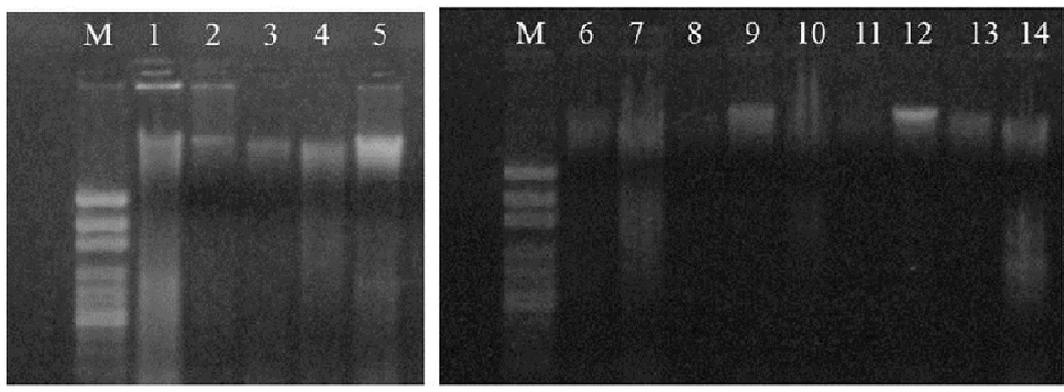
Dalle analisi è emersa una differenziazione generale nella distribuzione delle varie specie microbiche. La componente algale tende a crescere e svilupparsi maggiormente nei siti prossimi ai punti di accesso con l'esterno mentre i cianobatteri, tollerando anche condizioni estreme di illuminazione e umidità, tendono a formare film anche nelle porzioni più interne degli ambienti rupestri. In linea generale si assiste ad una riduzione della biodiversità delle associazioni algali prelevate nelle zone più profonde dell'ambiente cavernicolo. La maggior biodiversità dei campioni prelevati in corrispondenza dei siti prossimi all'ingresso può essere spiegata tenendo anche conto dell'apporto continuo di nutrienti provenienti dall'esterno e che "alimentano" lo sviluppo della comunità microbica. La biodiversità delle specie coccoidi tende ad aumentare nelle zone più illuminate, mentre le specie filamentose si diversificano nelle zone più buie. Le associazioni algali prelevate nei siti con caratteristiche microclimatiche più estreme (bassa luminosità, umidità relativa elevata e/o variabile) possiedono tutta una serie di specializzazioni: sono caratterizzate dalla presenza di matrici mucillaginose, di volume variabile, che fungono da riserva di acqua impedendo la disidratazione e prolungando periodi favorevoli alla crescita. Assumono colorazioni particolari (rosse o rosa) per la presenza di pigmenti organici che agiscono da filtri per ridurre la quantità di luce incidente (Martinez & Asencio, 2010). Allo stesso modo, nei campioni sottoposti ad intensità luminose ridotte ed elevate umidità relative, come ad esempio quelli posti nei punti più interni dell'ambiente cavernicolo, è

stata evidenziata una ridotta biodiversità di taxa fotosintetici, corrispondente ad una maggiore colonizzazione da parte di specie batteriche.

3.9 CONCLUSIONI

Il presente studio ha evidenziato la presenza di una grande varietà di *biofilm* microalgali in ambienti rupestri; in molti casi la caratterizzazione tassonomica dei vari raggruppamenti biologici è risultata difficoltosa se condotta con le tecniche di coltura tradizionali. La distribuzione dei *biofilm* è dipendente dalle caratteristiche microclimatiche tra cui la disponibilità di acqua e le temperature. Inoltre dalle analisi è emersa una biodiversità in taxa peculiare, data la presenza di specie capaci di colonizzare anche microhabitat estremi, ovvero caratterizzati da intensità luminose ridotte e umidità relative elevate. In tutte le grotte le caratteristiche architettoniche, la configurazione strutturale e i punti di collegamento con l'esterno, hanno influenzato la crescita microbica tanto da renderla paragonabile a quella rinvenibile in altri ambienti semiconfinati. In alcuni casi è stata osservata la presenza di associazioni microalgali endolitiche, che penetrano anche ad alcuni millimetri di profondità e la cui caratterizzazione morfo-molecolare è risultata impossibile a causa della difficoltà di prelievo del *biofilm*.

Lo studio dell'intera comunità microbica e il ruolo di ciascun membro all'interno delle comunità è cruciale per mettere in atto idonee strategie di conservazione dei beni culturali. Da questo punto di vista, infatti, la caratterizzazione dei biodeteriogeni ha come obiettivo principale la definizione di interventi preventivi che, per questa tipologia ambientale, potrebbero essere rivolte ad un miglioramento generale dei parametri microclimatici. Per lo stesso motivo all'interno degli ambienti analizzati bisognerebbe periodicamente procedere alla caratterizzazione ecologica per poter poi monitorare lo stato di conservazione delle superfici in maniera più dettagliata.



CODICE	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CAMPIC NC	100 bp DNA ladder	Γ1	Γ2	Γ3	Γ4	O1	O2	O3	O4	P1	P2	P3	A11	A12	A13

Figura 3.1: Risultati dell'elettroforesi su gel di agarosio del DNA estratto con metodo cTAB.

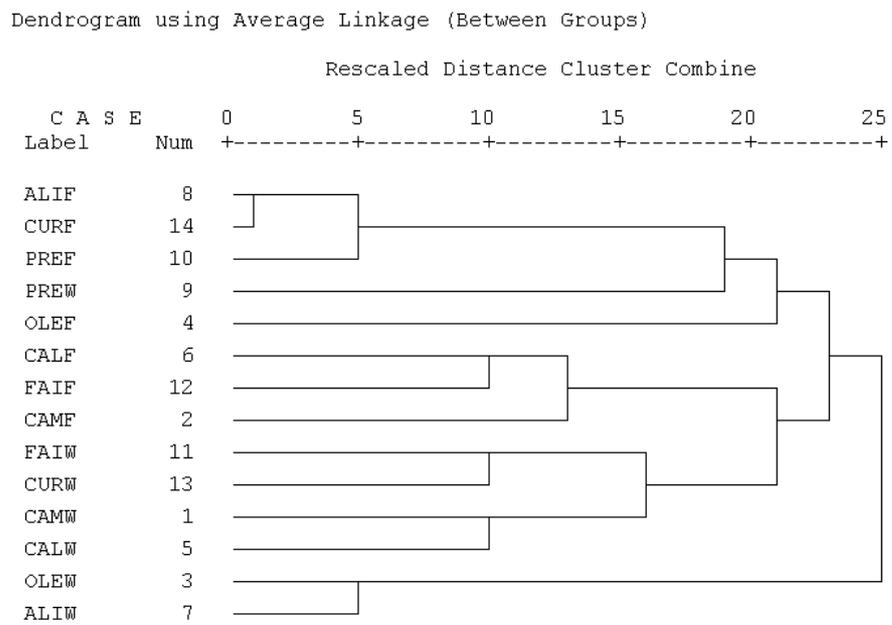


Figura 3.2: Dendrogramma risultante dalla Cluster Analysis.

GROTTA	CODICE CAMPIONE	SUBSTRATO	ALTERAZIONE	ILLUMINAZIONE
FORMELLE	F1	ROCCIA TUFACEA	PATINA VERDE BRILLANTE	PENOMBRA
	F2	ROCCIA TUFACEA	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
	F3	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
	F4	AFFRESCO	PATINA VERDE CHIARO	PENOMBRA
CAMIGLIANO	Ca1	ROCCIA CARBONATICA	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
	Ca2	ROCCIA CARBONATICA	PATINA VERDE BRILLANTE	PENOMBRA
	Ca3	AFFRESCO	PATINA VERDE OLIVA	PENOMBRA
	Ca4	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
PRETURO	P1	ROCCIA CALCAREA	PATINA VERDE BRILLANTE	LUCE
	P2	ROCCIA CALCAREA	PATINA NERA	BUIO
	P3	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	LUCE
FAICCHIO	Fa1	ROCCIA CARBONATICA	PATINA VERDE BRILLANTE	LUCE
	Fa2	ROCCIA CARBONATICA	PATINA VERDE OLIVA	PENOMBRA
	Fa3	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
	Fa4	AFFRESCO	PATINA VERDE OLIVA	PENOMBRA
OLEVANO	O1	ROCCIA CALCAREA	PATINA VERDE SCURO	LUCE
	O2	ROCCIA CALCAREA	PATINA VERDE NERO	BUIO
	O3	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
	O4	AFFRESCO	PATINA VERDE CHIARO	PENOMBRA
CURTI	Cu1	ROCCIA CARBONATICA	PATINA VERDE CHIARO	BUIO
	Cu2	ROCCIA CARBONATICA	PATINA VERDE SCURO	PENOMBRA
	Cu3	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	LUCE
ALIFE	A11	ROCCIA CALCAREA	PATINA VERDE BRILLANTE	BUIO
	A12	ROCCIA CALCAREA	PATINA NERA	BUIO
	A13	AFFRESCO	PATINA VERDE SCURO	LUCE

Tabella 3.1 Elenco dei campioni di *biofilm* prelevati nelle sette grotte per le analisi morfologiche e molecolari.

REAGENTI	COMPOSIZIONE	QUANTITÀ PER 1 LITRO
SOLUZIONE STOCK		
NaNO ₃	10g/400ml	10 ml
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1g/400ml	10 ml
MgSO ₄ * 7H ₂ O	3g/400ml	10 ml
K ₂ HPO ₄	3g/400ml	10 ml
KH ₂ PO ₄	7g/400ml	10 ml
NaCl	1g/400ml	10 ml
MICROELEMENTI		1ml
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8,82g/l	
MnCl ₂ * 4H ₂ O	1,44g/l	
MoO ₃	0,71g/l	
CuSO ₄ * 5H ₂ O	1,57g/l	
Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	0,49g/l	
EDTA	50g/l	1ml
KOH	31,00g/l	1ml
FeSO ₄ * 7H ₂ O	4,98g/l	1ml
H ₃ BO ₃	11,42g/l	1ml
PORTARE AD UN VOLUME FINALE DI 1LITRO		

Tabella 3.2: Composizione del terreno Bold Basal Medium (terreno generico per le Chlorophyta).

REAGENTI	COMPOSIZIONE	QUANTITÀ PER 1 LITRO
SOLUZIONE 1		10ml
K ₂ HPO ₄	4 g/l	10ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5 g/l	10ml
SOLUZIONE 2		10ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6 g	
Acido citrico	0,6 g/l	
Ferro ammonio citrato	0,6 g/l	
EDTA	0.1 g/l	
MICROELEMENTI		1ml
H ₃ BO ₃	2.86 g/l	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g/l	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g/l	
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g/l	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g/l	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4 mg/l	
Na ₂ CO ₃		0.02 g/l
NaNO ₃		1.5 g/l
PORTARE AD UN VOLUME FINALE DI 1LITRO		

Tabella 3.3 Composizione del terreno Blue Green 11 (terreno generico per le Cyanophyta).

REAGENTI	QUANTITÀ PER 1 LITRO
Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
PORTARE AD UN VOLUME FINALE DI 1LITRO	

Tabella 3.4 Composizione del terreno Nutrient Agar (terreno generico per i Bacteria).

BACTERIA	CAMIGLIANO				OLEVANO				FORMELLE				ALIFE			PRETURO			FAICCHIO				CURTI		
	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4	O1	O2	O3	O4	F1	F2	F3	F4	Al1	Al2	Al3	P1	P2	P3	Fa1	Fa2	Fa3	Fa4	Cu1	Cu2	Cu3
<i>Agrobacterium</i> sp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aminobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>Bacillus mucillaginosus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus mycoides</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Bacillus simplex</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Blastochloris</i> sp.	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacillus ruber</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Desulfobacterium</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Erythrobacter</i> sp.	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Micrococcus</i> sp.	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nitrosococcus</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudoaminobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Xanthomonas</i> sp.	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-

CYANOPHYTA	CAMIGLIANO				OLEVANO				FORMELLE				ALIFE			PRETURO			FAICCHIO				CURTI		
	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4	O1	O2	O3	O4	F1	F2	F3	F4	Al1	Al2	Al3	P1	P2	P3	Fa1	Fa2	Fa3	Fa4	Cu1	Cu2	Cu3
<i>Aphanocapsa</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Aphanothece</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Calothrix</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorogloea</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chondrocystis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Chroococciopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Chroococcus</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Chroococcus minutus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cyanothece</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindrospermum</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gloeocalita cavernicola</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gloeocapsa</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gloethece</i> sp.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Halospirulina tapeticola</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp.	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya cf. halophila</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya compacta</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Leptolyngbya mycoidea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lingbya</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Microcoleus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Myxosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nodosilinea</i> sp.	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc calcicola</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>Oscillatoria rosea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Phormidium</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plectonema</i> sp.	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pleurocapsa</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pleurocapsa minor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleurocapsa concharum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudophormidium</i> sp.	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scytonema</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spirulina subsalsa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stigonema</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Symploca</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Synechococcus</i> sp.	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tolypothrix</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Westiellopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xenococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 3.6: Elenco dei generi / delle specie appartenenti alle Chlorophyta identificati nei campioni in studio.

CHLOROPHYTA	CAMIGLIANO			OLEVANO				FORMELLE				ALIFE			PRETURO			FAICCHIO				CURTI			
	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4	O1	O2	O3	O4	F1	F2	F3	F4	Al1	Al2	Al3	P1	P2	P3	Fa1	Fa2	Fa3	Fa4	Cu1	Cu2	Cu3
<i>Asterarcys quadricellulare</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Apatococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bracteacoccus minor</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Bracteacoccus terrestris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Chlamydomonas</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Chlamydomonas rapa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Chlorella</i> sp.	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>Chlorella subphaerica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella saccarophila</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella emersonii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Chlorococcus</i> sp.	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Coccomyxa</i> sp.	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Coelastrum</i> sp.	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Coelastrum morum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Diplosphaera</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Graesiella</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Graesiella emersonii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Muriella</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Neochloris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neochlorosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Parachlorella</i> sp.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Pseudochlorella</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Pseudochlorella subsphaerica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Scenedesmus armatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus pectinatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Scotiellopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scotiellopsis terrestris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scotiellopsis oocystiformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stichococcus</i> sp.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Stichococcus bacillaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Stichococcus chodati</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Tetracystis</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trentepohlia</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Trebouxia</i> sp.	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-

Tabella 3.7: Elenco dei generi / delle specie appartenenti alle Cyanophyta identificati nei campioni in studio.

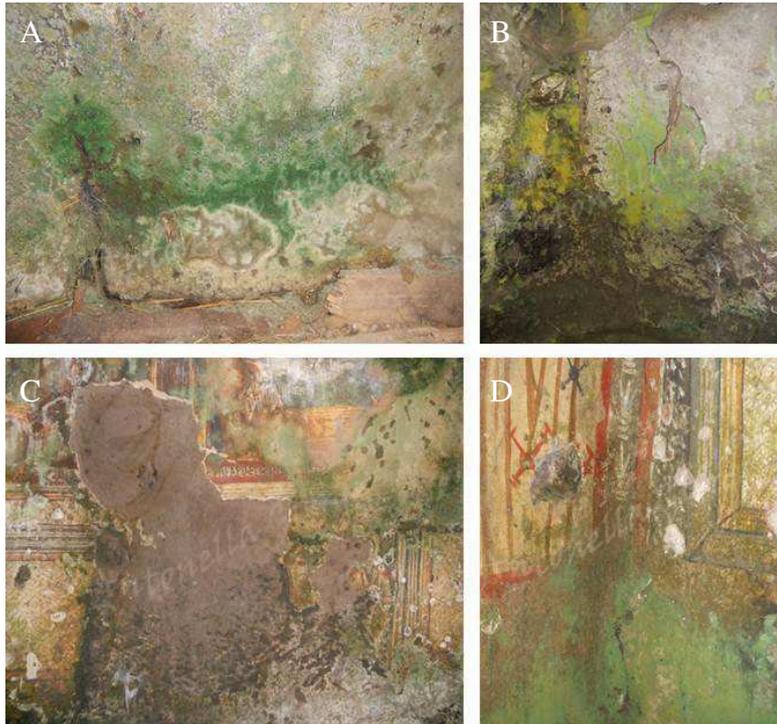


Tavola 3.1: Siti di campionamento nella Grotta delle Formelle a Calvi Risorta. Campione F1 (A), Campione F2 (B), Campione F3 (C), Campione F4 (D).



Tavola 3.2: Siti di campionamento nella Grotta di San Michele a Camigliano. Campione Ca1 (A), Campione Ca2 (B), Campione Ca3 (C), Campione Ca4 (D).

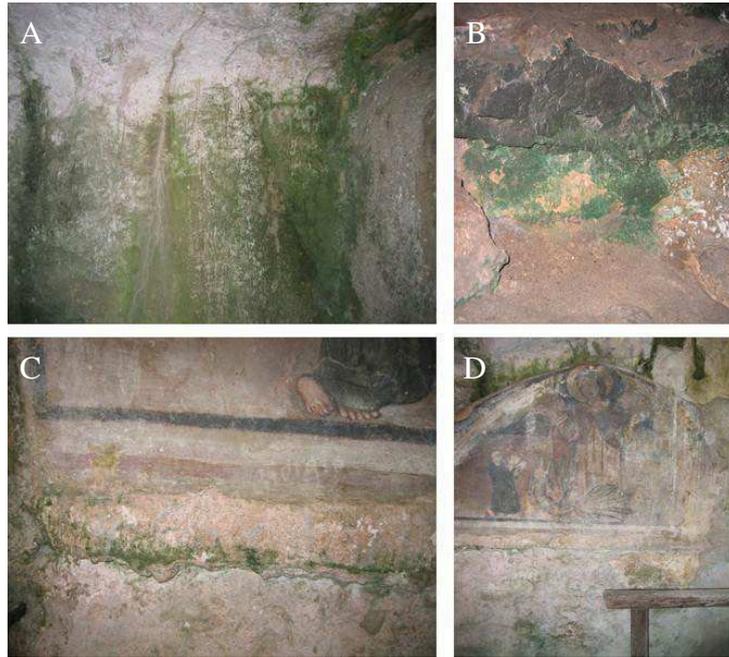


Tavola 3.3: Siti di campionamento nella Grotta di San Michele a Preturo. Campione P1 (A), Campione P2 (B), Campione P3 (C-D).

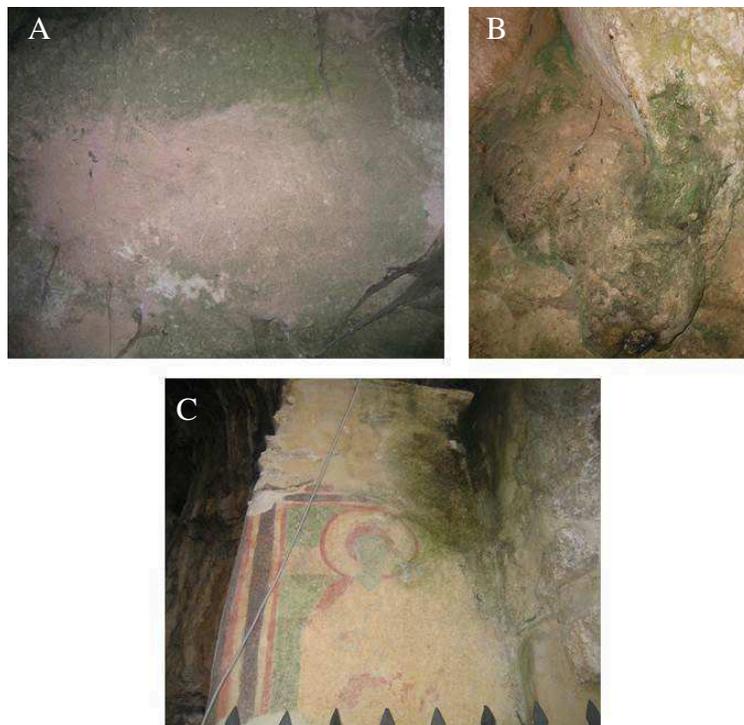


Tavola 3.4: Siti di campionamento nella Grotta di San Michele di Curti. Campione Cu1 (A), Campione Cu2 (B), Campione Cu3 (C).

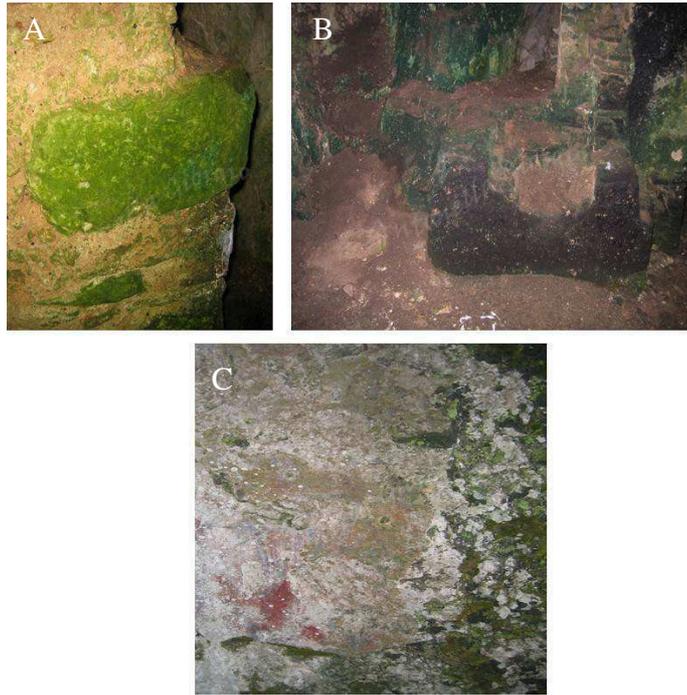


Tavola 3.5: Siti di campionamento nella Grotta di San Michele ad Alife. Campione AI1 (A), Campione AI2 (B), Campione AI3 (C).

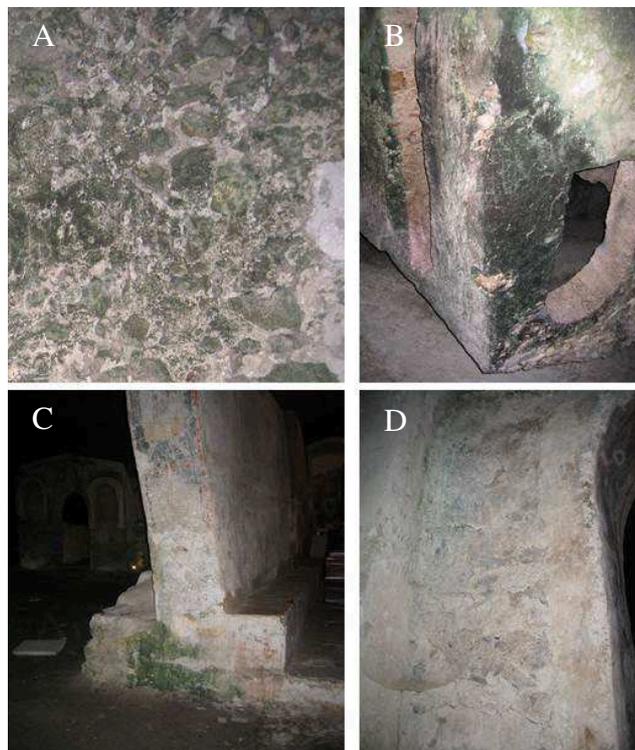


Tavola 3.6: Siti di campionamento nella Grotta dell'Angelo ad Olevano sul Tusciano. Campione O1 (A), Campione O2 (B), Campione O3 (C), Campione O4 (D).



Tavola 3.7: Siti di campionamento nella Grotta di San Michele a Faicchio A- Campione Fa1, B- Campione Fa2, C- Campione Fa3, D- Campione Fa4.

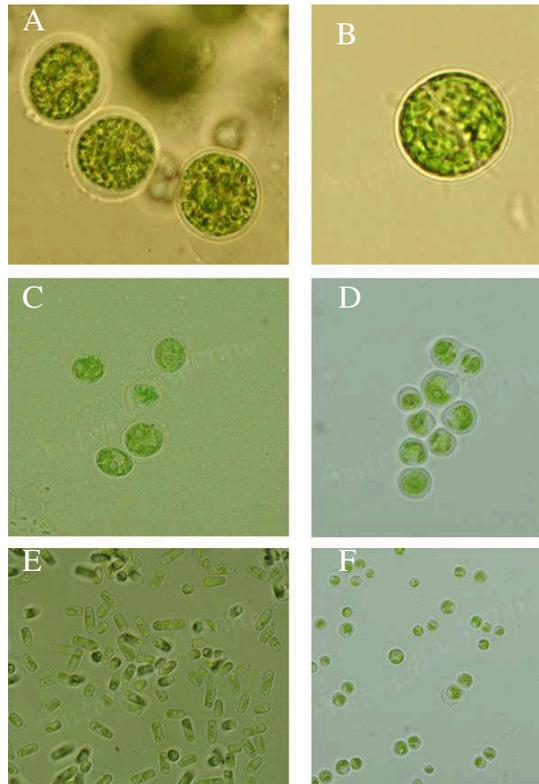


Tavola 3.8 : Analisi di microscopia ottica di alghe verdi appartenenti alla classe Trebouxiophyceae e Chlorophyceae. Campione Fa3 (A-B); campione O3 (C-D); campione F4 (D-E).

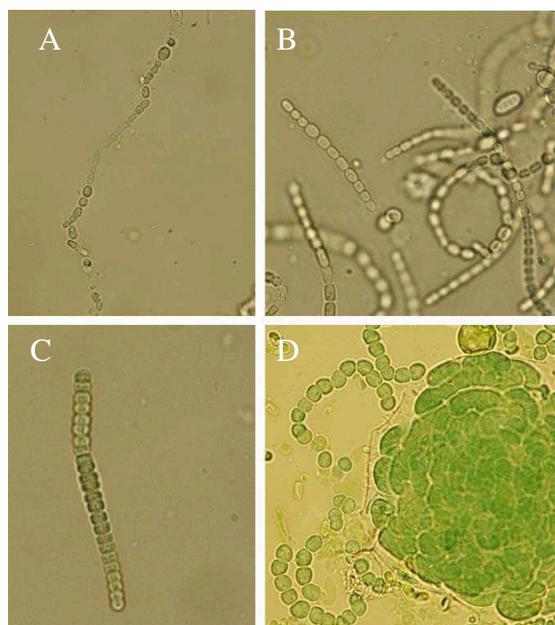


Tavola 3.9: Analisi di microscopia ottica di cianobatteri appartenenti all'ordine Nostocales. Campione Cu1 (A); campione F1 (B); campione Fa4 (C); campione Ca33 (D).

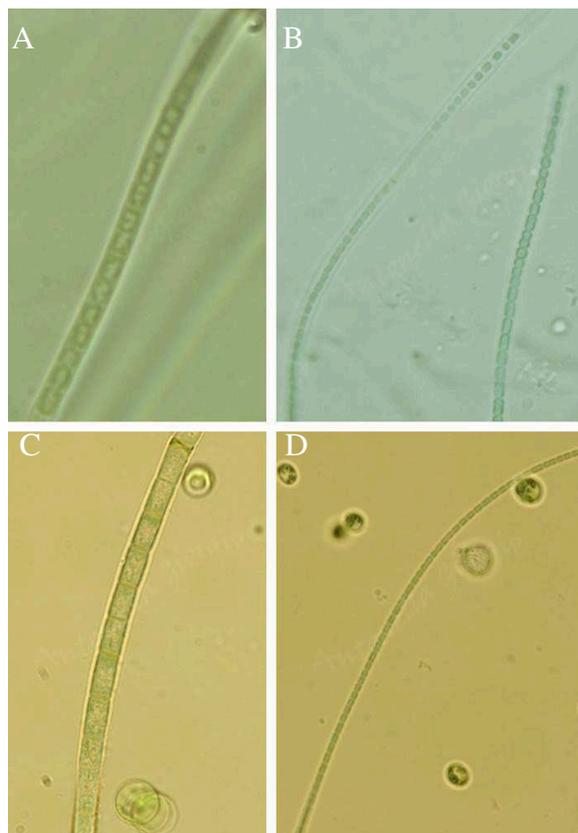


Tavola 3.10: Analisi di microscopia ottica di cianobatteri appartenenti all'ordine Oscillatoriales. Campione Fa3 (A); campione O1 (B); campione Ca4 (C); campione A13 (D).

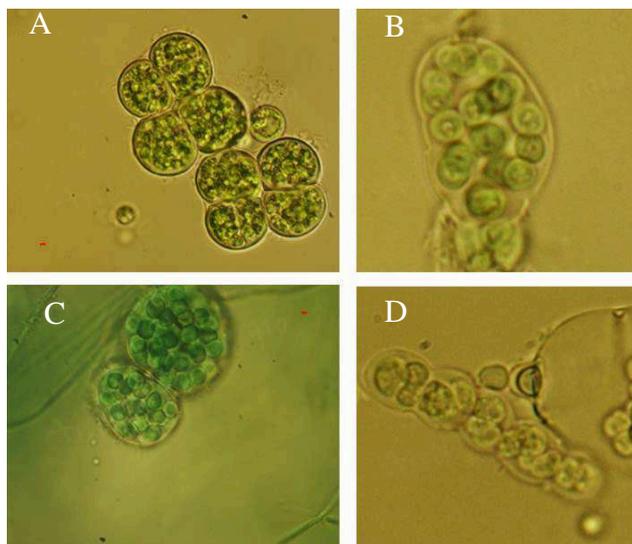


Tavola 3.10: Analisi di microscopia ottica di cianobatteri appartenenti all'ordine Chroococcales. Campione Ca3 (A); campione P1 (B); campione F2 (C); campione A11 (D).

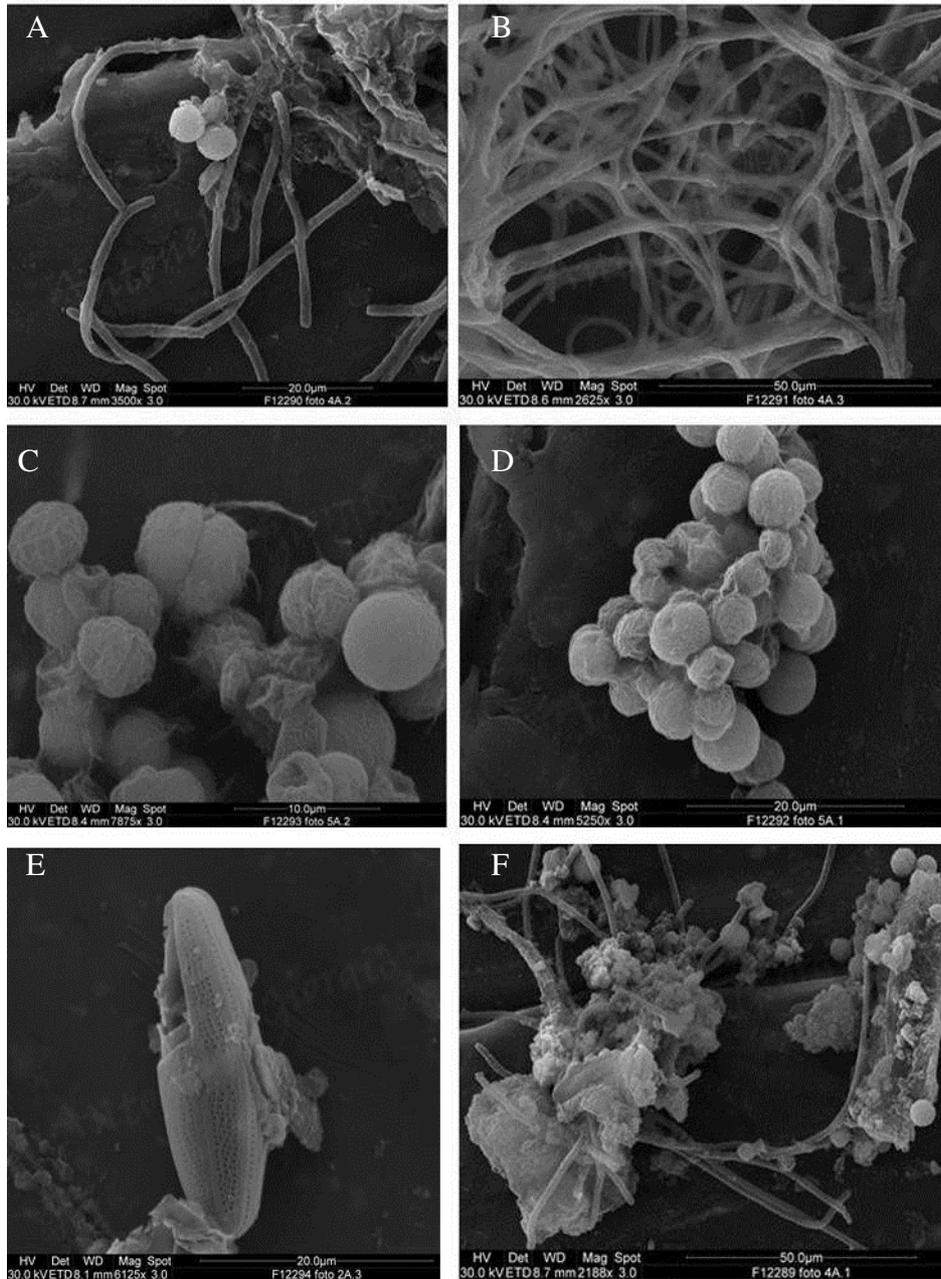


Tavola 3.11: Analisi di microscopia elettronica. Campione F1 con cianobatteri filamentosi e coccoidi (A-B); Campione Ca2 con alghe verdi coccoidi (C); Campione O1 con cianobatteri coccoidi (D); Campione A12 con diatomea e cianobatteri filamentosi (E-F).

CAPITOLO IV

ANALISI QUANTITATIVA

DEI BIOFILM

FOTOSINTETICI

4.1 ANALISI QUANTITATIVE IN CAMPO AMBIENTALE

Negli ultimi anni, allo studio qualitativo delle biocenosi microbiche è stato affiancato lo studio quantitativo, con l'obiettivo principale di analizzare l'abbondanza di specifici raggruppamenti biologici in un contesto strutturalmente articolato quale quello dei *biofilm*. Le tecniche di *Ibridazione in situ* (FISH) sono state ampiamente utilizzate nel campo ambientale per analizzare la composizione dei *biofilm* microbici, la struttura delle comunità microbiche e per evidenziare, all'interno di biocenosi naturali, la presenza di popolazioni dominanti (O' Donnell & Whiteley, 2005, Moter & Gobel, 2000). La tecnica sfrutta sonde oligonucleotidiche specifiche per il DNA ribosomiale che, sulla base del livello tassonomico e molecolare investigato può fornire informazioni quantitative su singoli microorganismi o su unità tassonomiche di livelli gerarchici superiori. Le tecniche microscopiche sono state per molto tempo utilizzate per la quantificazione su base numerica di taxa microalgali anche in contesti ambientali così complessi come quelli dei *biofilm*. Tuttavia, a causa delle ridotte dimensioni degli organismi indagati, la metodologia risulta alquanto laboriosa; richiede infatti una grande esperienza tassonomica e strumentazioni ad elevato potere di risoluzione, dal momento che la distinzione tra specie si basa su caratteristiche morfologiche cellulari e sub-cellulari. Inoltre sono necessarie misurazioni della lunghezza, larghezza e peso dei vari organismi, parametri non facili da monitorare nel caso di organismi unicellulari. A differenza di altre tecniche qualitative (microscopiche e molecolari) le analisi *in situ* consentono di mantenere inalterate le caratteristiche dei microorganismi da identificare, quali la morfologia, le dimensioni cellulari e le relazioni cellula-cellula (La Cono et al., 2003).

In campo ambientale, ad ogni modo, anche la Real-time PCR consente di monitorare quantitativamente le comunità microbiche nel tempo, nello spazio e in differenti contesti ambientali (Smith et al., 2009; Heid et al., 1996; Skovhus et al., 2004; Hermanson & Lindgren, 2001, Zhu et al., 2005). La tecnica sfrutta l'amplificazione PCR di una specifica regione del DNA utilizzando primer appositamente costruiti; in questo modo è garantita l'amplificazione di marcatori siano essi tassonomici o funzionali, all'interno di una comunità mista e la loro corrispondente quantificazione. La tecnica si è dimostrata robusta, altamente riproducibile e sensibile per monitorare, da un punto di vista quantitativo, evoluzioni filogenetiche e funzionali di geni, nel tempo e nello spazio e al variare delle

condizioni ambientali (Hermanson et al., 2001; Godhe et al., 2008; Moro et al., 2009). È possibile ad esempio analizzare l'abbondanza di geni o i livelli di espressione genica al variare di fattori abiotici e biotici o in condizioni di attività biologica differenti. Nel campo dell' ecologia è possibile utilizzare la tecnica per quantificare, all'interno di biocenosi miste, singoli taxa o gruppi di microrganismi; in questo caso l'abbondanza di gruppi di microrganismi tassonomicamente affini, consente di ottenere informazioni dettagliate sulle esigenze ambientali degli stessi, nonché sul modo in cui si relazionano in contesti ambientali specifici e in comunità complesse quali quelle dei *biofilm*.

4.2 REAL-TIME PCR

La tecnica si basa sugli stessi principi della PCR classica; prevede infatti cicli multipli di amplificazione di una specifica regione del DNA. Il DNA target viene denaturato, appaiato a primer complementari alle estremità della regione di interesse e ad opera di una DNA polimerasi termostabile viene sintetizzato il filamento complementare. Il risultato finale è l'amplificazione esponenziale della regione di DNA target e l'aumento di amplicone durante l'intera successione ripetuta di eventi. A differenza della PCR classica, la tecnica abbina il processo di amplificazione con quello di quantificazione; la quantità di amplificato viene monitorata in "tempo reale" tramite l'utilizzo di molecole fluorescenti durante la reazione. I fluorofori, durante il processo di amplificazione, emettono fluorescenza che, rilevata da una telecamera CCD viene convertita in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Da qui il principio chiave della tecnica secondo il quale l'emissione di fluorescenza è direttamente proporzionale alle molecole di DNA target all'interno del campione. Il calcolo della quantità di DNA viene effettuato determinando il ciclo soglia (Ct) della PCR, ovvero il ciclo in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza e dove i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema; il numero di cicli necessari perché un campione raggiunga il proprio Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA iniziale nel campione. È importante sottolineare che la quantificazione non viene effettuata al plateau, ma nella fase esponenziale nella quale l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point".

I metodi di quantificazione includono o l'uso di colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA a doppio filamento, o primer modificati del DNA (sonde) che emettono fluorescenza in seguito ad ibridazione del DNA. Al variare del tipo di report e della chimica di reazione il principio chiave resta lo stesso: all'aumento di fluorescenza corrisponde l'aumento di amplificato. Il sistema di rilevamento più semplice ed utilizzato è il saggio SYBR Green. Il SYBR green è un colorante fluorescente simile al bromuro di etidio che, intercalandosi nella doppia elica del DNA, nel solco minore del DNA, incrementa di circa cento volte la sua fluorescenza, generando quindi un segnale proporzionale al numero di copie presenti visibile dal rivelatore. Il SYBR Green I fa parte dei coloranti aspecifici sviluppati per le reazioni di Real-time PCR: si tratta di una molecola fluorescente, in particolare una cianina asimmetrica la cui fluorescenza aumenta significativamente quando essa si trova complessata con il DNA a doppia elica: la molecola assorbe luce blu ($\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$) ed emette luce verde ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$). Il legame del fluoroforo al DNA avviene secondo due modalità diverse: il SYBR Green, infatti, è in grado sia di intercalarsi tra le coppie di nucleotidi della doppia elica, sia di legarsi al solco minore che si forma nella molecola di DNA (Zipper et al., 2004). Questo modo di legare il DNA rende questo intercalante un reporter generalmente aspecifico, che permette di monitorare l'andamento della reazione, ma non consente di riconoscere a priori il prodotto amplificato che determina la comparsa del segnale di fluorescenza: basandosi solamente sul grafico di amplificazione non è possibile sapere se la fluorescenza è data dal target voluto o da un prodotto aspecifico, è però possibile riconoscere i vari prodotti in base all'analisi delle curve di melting.

Per temperatura di melting (T_m) si intende la temperatura alla quale un DNA a doppio filamento subisce denaturazione. Essa dipende da diversi fattori, fra cui la lunghezza della molecola di DNA e la sua sequenza (ordine delle basi e percentuale di CG), ed è quindi caratteristica di ciascun frammento. Questo permette di identificare più specie di ampliconi prodotti nella stessa reazione e di eventuali amplificati aspecifici, come i dimeri di primer. L'analisi della curva di dissociazione viene fatta dallo strumento al termine della reazione di amplificazione e consiste in un graduale innalzamento della temperatura, a partire da una temperatura prefissata (ad esempio 60°C) fino ad arrivare a circa $90-95^\circ\text{C}$. Lo strumento rileva il segnale di fluorescenza per tutta la durata dell'analisi: all'aumentare della temperatura il SYBR Green si separa lentamente dalle molecole di DNA, ma al

momento della denaturazione dei due filamenti si ha un drastico calo della fluorescenza. Un software apposito trasforma i dati, relativi alla curva di melting, nella derivata prima negativa della funzione descritta dal segnale: ne risulta un grafico che mostrerà un picco nel punto di massima pendenza della curva di melting, e tale picco sarà in corrispondenza della temperatura di melting di quello specifico amplicone. È possibile rendere il saggio SYBR più specifico andando ad ottimizzare la concentrazione dei primer in modo tale da renderli altamente specifici solo per il DNA target; infatti prodotti di amplificazione aspecifici potrebbero generare un segnale fluorescente aggiuntivo con conseguente sovrastima della quantità di DNA oggetto di studio (Zhang et al., 2006; Smith et al., 2009). In parallelo è possibile analizzare le curve di melting, derivanti dalla dissociazione dei doppi filamenti di DNA; consentono di evidenziare la provenienza del segnale fluorescente dal solo DNA target e escludere la formazione di prodotti aspecifici (Giglio et al., 2003; Gonzalez-Escalona et al., 2006).

L'andamento delle reazioni real-time PCR viene visualizzato in forma grafica nel quale, per ogni campione di DNA viene rappresentata la variazione di fluorescenza (Asse Y) misurata in ogni ciclo di reazione (Asse X). Dal grafico vengono evidenziati due parametri fondamentali, la linea di base della curva (Baseline) e la linea soglia (Figura 4.1). La prima è una linea orizzontale al di sotto della quale si trovano i primi cicli di amplificazione e non è misurabile la variazione del segnale fluorescente. La linea soglia invece, è una linea parallela alla linea di base che interseca le curve dei campioni nella fase esponenziale; il punto di intersezione rappresenta il ciclo soglia Ct, il cui valore è fedele alla quantità iniziale di DNA. L'analisi dei risultati può essere effettuata utilizzando due metodi: quello della quantificazione assoluta e della quantificazione relativa. Nel primo caso viene costruita una curva standard tracciando il grafico del logaritmo della concentrazione iniziale del DNA contro il Ct che si ottiene leggendo il segnale fluorescente per ogni diluizione del DNA. Successivamente, dai Ct dei campioni ai quali si rileva il segnale, si ottengono le quantità di DNA ricavandole dalla curva standard. Nella quantificazione relativa vengono confrontati i valori di Ct dei vari campioni di DNA, utilizzando controlli endogeni sulla base dei quali i campioni a concentrazione ignota vengono quantificati, paragonando il loro ΔCt con quello del controllo endogeno. Quando si lavora con campioni di origine ambientale non è possibile normalizzare il DNA con uno standard interno; di conseguenza è possibile lavorare soltanto con una quantificazione relativa assumendo che i

campioni di DNA siano stati estratti con la stessa massima efficienza e verificando che abbiano la stessa concentrazione iniziale. Inoltre, data l'enorme variabilità del numero di copie di geni ribosomiali 16S e 18S non è possibile, in campioni ambientali, risalire al numero di cellule di una data specie (o genere); di conseguenza viene valutato un trend sulle abbondanze relative dei taxa investigati.

4.3 MATERIALI E METODI

Per le quantificazioni Real-time PCR sono stati utilizzati i campioni di DNA precedentemente analizzati dal punto di vista qualitativo (Tabella 3.1). I DNA corrispondenti ai 28 campioni di *biofilm* precedentemente analizzati, sono stati stimati con NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) per valutarne la concentrazione; sono stati poi diluiti ad una concentrazione di 25 ng/μl. Per la preparazione della reazione di Real-time è importante che i DNA di partenza siano alla stessa concentrazione, in modo tale che non ci siano errori per le comparazione quantitative successive.

4.3.1 COSTRUZIONE DEI PRIMER

È stata eseguita una reazione di Real-time PCR con chimica SYBR Green e quantificazione relativa. Il principio di base della tecnica è la comparazione dei valori di C_t per determinare cambiamenti quantitativi nei livelli del DNA target in un campione rispetto ad un altro scelto come calibratore. Data la scarsità di dati bibliografici a supporto, per monitorare variazioni quantitative dei principali taxa fotosintetici tra i campioni, ho scelto di utilizzare quali geni target i DNA ribosomiali 18S per le Chlorophyta e 16S per le Cyanophyta. Entrambi contengono regioni conservate e variabili in accordo con la propria stabilità genetica e, sulla base della variabilità di sequenza, gli organismi possono essere attribuiti a taxa di circoscrizioni tassonomiche differenti. Infatti organismi appartenenti allo stesso dominio spesso mostrano la stessa sequenza di DNA nella maggioranza delle regioni conservate, mentre specie dello stesso genere possono differenziarsi per differenze nella sequenza delle regioni variabili (Woese et al., 1990).

Nel caso del DNA ribosomiale 18S, utilizzato per la quantificazione delle Chlorophyta, le sequenze ottenute dal precedente clonaggio molecolare (Capitolo 3) sono state suddivise in classi di appartenenza tassonomica e allineate con le sequenze di riferimento presenti nel database online GenBank, utilizzando il programma ClustalW implementato in BioEdit

(Hall, 1999). L' allineamento è stato poi analizzato con il programma online Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) per la costruzione dei primer. Al fine di valutare la specificità dei primer nei confronti delle Chlorophyta si è proceduto ad un'analisi in vitro e in silico dei primer. Le analisi in silico sono state eseguite su sequenze di Chlorophyta presenti nel database online GenBank, corrispondenti al DNA ribosomiale 18S e su sequenze di taxa differenti corrispondenti allo stesso gene. In entrambi i casi si è scelto di utilizzare sequenze di organismi che, da dati bibliografici, risultano costituenti di *biofilm* fotosintetici di habitat rupestri ma che, poichè non sono stati individuati nel mio studio, sono da considerarsi organismi non-target, da escludere dalla quantificazione. Tali sequenze sono state allineate con il programma ClustalW implementato in BioEdit ed è stata valutata la complementarietà dei primer (Hall, 1999). I test di specificità in vitro sono stati eseguiti via PCR su colture pure di Chlorophyta e Cyanophyta utilizzando i primer precedentemente disegnati (Tabella 4.1).

Per quanto riguarda il DNA ribosomiale 16S, dalle ricerche bibliografiche sono stati identificati primer specifici per il gruppo delle Cyanophyta (Schönhuber et al., 1998). I primer individuati sono stati: CYA361 Forw, CYA664 Rev e CYA762 Rev. Sono stati eseguiti anche in questo caso test in silico e test in vitro. Nel primo caso i primer sono stati allineati con le sequenze derivanti dal precedente clonaggio molecolare e i rispettivi riferimenti Blast; successivamente agli allineamenti sono state aggiunte sequenze 16S di altri organismi non-target. Per le analisi in vitro sono stati amplificati via PCR i DNA estratti di colture pure di Chlorophyta e Cyanophyta (Tabella 4.1).

Per ciascuna coppia di primer è stata calcolata l'efficienza mediante costruzione di una curva di calibrazione. A tal scopo è stato utilizzato il DNA di una coltura pura di Chlorophyta (*Chlorella saccharophyla* CCAP 211/9a A) e di una di Cyanophyta (*Leptolyngbya* sp. PCC 73110), le cui sequenze rDNA 18S e 16S sono state utilizzate per la costruzione dei primer.

4.3.2 REAL-TIME PCR

La reazione Real-time PCR è stata allestita seguendo il protocollo standard iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Ciascun campione è stato preparato in triplice copia con:

- 5 ng di DNA templatato (25ng/μl),
- 2 pmol di primer Forw (5 μM) e 2 pmol di primer Rev (5 μM),
- 8 μl di SybrGreen Supermix,
- acqua, fino ad ottenere un volume finale di 15 μl.

È stato utilizzato il programma di reazione previsto dal protocollo iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), con temperatura di annealing di 55°C.

4.4 RISULTATI

Per la reazione Real-time i primer disegnati sulla base degli allineamenti delle sequenze precedentemente ottenute sono: 5_Forw e 5_Rev (Tabella 4.2). Le analisi in silico, condotte sulle sequenze Blast hanno mostrato una complementarità dei primer con le sequenze algali oggetto di studio e con le sequenze del DNA ribosomiale 18S di alghe verdi non identificate nei campioni ma potenziali colonizzatori di ambienti rupestri. Non è stata mostrata specificità contemporanea dei due con il DNA ribosomiale 18S di altri organismi, quali funghi, alghe rosse o diatomee che, sulla base di dati bibliografici, potrebbero essere possibili colonizzatori degli habitat rupestri. Le amplificazioni PCR delle colture pure hanno mostrato esito positivo solo per le Chlorophyta. Per quanto riguarda il gruppo delle Cyanophyta le analisi in silico hanno evidenziato una maggior specificità della coppia CYA361Forw / CYA762Rev con le sequenze analizzate. I test in vitro sulle colture pure hanno mostrato risultato negativo per le Chlorophyta (Figura 4.2).

Per ciascun campione è stato calcolato il Ct e la quantità relativa sia per il taxon Chlorophyta che per il taxon Cyanophyta (Tabella 4.3, Tabella 4.4). La quantità relativa è stata calcolata prendendo come riferimento il campione di DNA che da quantificazione ha mostrato il valore più basso, e di conseguenza è stato utilizzato quale calibratore. Di seguito vengono riportati i risultati delle amplificazioni Real-time condotte utilizzando i primer 18S e 16S, suddivisi per grotta. In grafico si riportano i livelli di espressione relativi in funzione dei campioni analizzati.

Grotta di San Michele a Camigliano (Caserta). La maggior percentuale relativa di Chlorophyta è stata riscontrata nei campioni Ca2 e Ca3, corrispondenti a *biofilm* di colore

verde oliva tendente al verde chiaro (Figura 4.3). A parità di condizioni di illuminazione e di umidità relativa, le minori quantità relative si rinvennero nei campioni di colorazione scura. In particolare la quantità di Chlorophyta nel campione Ca2 è di circa 13 volte maggiore di quella riscontrata nel campione Ca4 preso come riferimento. Per quanto riguarda i cianobatteri i campioni Ca1 e Ca4 hanno una quantità rispettivamente 5 e 7 volte maggiore di quella del campione Ca3, di colore verde chiaro (Figura 4.3).

Grotta delle Formelle a Calvi Risorta (Caserta). I campioni sono stati tutti prelevati in condizioni di penombra e di elevate umidità relative. Il fattore discriminante le associazioni microalgali analizzate, ad esclusione della tipologia di substrato, è la colorazione. Le alghe risultano più abbondanti nei campioni di colore verde chiaro F1 e F4 (quantità relative relativamente di circa 400 e 100 volte maggiori) mentre nei campioni di colorazione scura le abbondanze relative sono nettamente inferiori (Figura 4.4). Per i cianobatteri la colorazione scura del *biofilm* tende ad essere indicatrice di una maggior abbondanza di tali specie (Figura 4.4); i campioni F2 e F3 possiedono una quantità relativa di Cyanophyta di circa 15 e 25 volte maggiore rispetto a quella calcolata per il campione F4 preso come riferimento.

Grotta di San Michele a Faicchio (Benevento). I campioni sono stati prelevati sia in condizioni di penombra che di luce, in presenza di elevati valori di umidità relativa. La quantità maggiore di alghe verdi si rinviene nel campione Fa1, di colore verde brillante e sottoposto a intensità luminose maggiori; la quantità relativa di Chlorophyta è di circa 30 volte maggiore di quella rinvenuta nel campione Fa4. I campioni in penombra Fa2, Fa3 e Fa4 mostrano una percentuale di Chlorophyta inferiore di circa 2, 10 e 30 volte rispetto al campione Fa4 (Figura 4.5). I cianobatteri, da un punto di vista quantitativo si distribuiscono in maniera più uniforme e soltanto nel campione Fa3 la quantità di cianobatteri è di circa 3 volte maggiore rispetto a quella degli altri campioni (Figura 4.5).

Grotta di San Michele di Curti (Gioia Sannitica, Caserta). Le Chlorophyta sono più abbondanti nel campione Cu3, esposto alla luce e nel quale l'abbondanza relativa del taxon è di circa 4 volte maggiore di quella calcolata nel campione Cu1 prelevato in condizioni di buio (Figura 4.6). Per le Cyanophyta la maggior abbondanza relativa si ha nel sito al buio Cu1, per il quale la quantità di cianobatteri è 13 volte maggiore rispetto a quella del sito Cu3, esposto alla luce (Figura 4.6).

Grotta di San Michele a Preturo (Avellino). I campioni sono stati prelevati in condizioni di umidità e illuminazione differenti. La maggior quantità di Chlorophyta si ritrova nel campione in penombra P3; in esso l'abbondanza relativa del taxon è circa 4 volte maggiore di quella rinvenuta nel campione P1, prelevato in condizioni di luminosità maggiore (Figura 4.7). Per le Cyanophyta, i campioni in penombra P2 e P3 mostrano una quantità relativa maggiore di circa 4 e 5 volte, rispetto a quella calcolata per il campione P1 (esposto alla luce). Per i cianobatteri in condizioni di penombra (P3), si ha l'abbondanza relativa maggiore, di circa 5 volte maggiore rispetto a quella del sito P1 esposto alla luce (Figura 4.7).

Grotta dell'Angelo ad Olevano sul Tusciano (Salerno). I campioni analizzati sono stati prelevati in condizioni microclimatiche differenti, tenendo conto delle intensità luminose e delle umidità. La maggior quantità di alghe verdi è stata calcolata per i siti in penombra, di colorazione verde chiaro (Figura 4.8). Ad esempio nel campione O4 la quantità relativa di Chlorophyta è circa 25 volte maggiore di quella rinvenuta nel sito O1 esposto invece ad Intensità luminose elevate. Anche i cianobatteri sono abbondanti nei siti in penombra; in condizioni di luce e buio la percentuale dei taxa è nettamente inferiore (Figura 4.8). Così ad esempio il campione O3 possiede una quantità relativa di Cyanophyta è 5 volte maggiore di quella del sito O1.

Grotta di Sant'Angelo d'Alife (Caserta): nei campioni analizzati la quantità minima di alghe verdi si riscontra nel sito alla luce A13; negli altri siti la quantità è di 2 o 3 volte maggiore (Figura 4.9). Per i cianobatteri non sussistono grandi variazioni quantitative tra i campioni (Figura 4.9).

I risultati delle curve di dissociazione (analisi melting), condotte per entrambe le coppie di primer, hanno mostrato delle differenze tra i campioni per i valori di T_m e, in alcuni casi, sussistono due differenti valori di T_m (Tavola 4.1, Tavola 4.2) in uno stesso campione. A supporto della specificità dei primer sono state condotte prove differenti:

- I primer non dimerizzano.
- Non c'è evidenza di dissociazione nel campione controllo negativo.

- Le sequenze di DNA di ciascuna specie oggetto di studio, ricavate dai precedenti clonaggi e utilizzate per la costruzione dei primer, sono state analizzate con il programma online “Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator” per il calcolo delle temperature di melting. I valori differiscono notevolmente anche al variare della specie; questo dato potrebbe spiegare la presenza di valori differenti tra i campioni che verosimilmente corrispondono a gruppi differenti di sequenze.
- Il clonaggio molecolare del frammento amplificato con i primer 18S e 16S utilizzati per la reazione di Real-time PCR, ha evidenziato la mancanza di aspecificità e la presenza di sole Chlorophyta nel caso del 18S e di Cyanophyta nel caso del 16S.

4.5 DISCUSSIONE

Una delle principali difficoltà riscontrate nel corso dello studio è stata la costruzione di primer specifici per il riconoscimento e la successiva quantificazione molecolare. È stato necessario lo studio approfondito della biodiversità molecolare del campione per una scelta ottimale dei marcatori. I due marcatori individuati e cioè il DNA ribosomiale 16S e il DNA ribosomiale 18S possiedono un sufficiente livello di variabilità in sequenza tale da favorire la discriminazione a livello di taxon. L’analisi delle sequenze in silico e in vitro hanno consentito la costruzione di primer complementari alla regione più conservata del DNA ribosomiale 18S all’interno del raggruppamento tassonomico delle Chlorophyta e alle sequenze precedentemente caratterizzate. Analogamente, per le Cyanophyta, i primer individuati dalle ricerche bibliografiche sono risultati specifici per gli organismi presenti all’interno dei campioni analizzati; allo stesso tempo non sono complementari con le sequenze degli altri organismi presenti all’interno dei campioni ambientali.

Dal confronto tra i campioni è emersa una correlazione tra colorazione del *biofilm* e quantità relativa di Chlorophyta o Cyanophyta, a parità di condizioni climatiche (Figura 4.10, Figura 4.11). Infatti i campioni di colore verde chiaro confrontati con i *biofilm* di colorazione scura, mostrano quantità relative maggiori di alghe verdi; nei *biofilm* scuri la quantità di Cyanophyta è maggiore. In condizioni di intensità luminose differenti e di costanti valori di umidità relativa, i *biofilm* che ospitano una maggior quantità di alghe verdi sono quelli soggetti a situazioni di luce maggiore, se confrontati con quelli prelevati in condizioni di intensità luminose basse o assenti. Tuttavia, in alcune situazioni, le elevate

intensità luminose possono determinare una riduzione dell'umidità relativa a livello del substrato. In questi casi, la condizione di luce è di ostacolo alla colonizzazione da parte di alghe verdi; i campioni alla luce mostrano infatti una quantità relativa di alghe inferiore rispetto a quella dei campioni prelevati in condizioni di penombra. Per quanto riguarda i cianobatteri, invece, vi è una tendenza maggiore alla colonizzazione di substrati al buio rispetto a quelli alla luce, se sottoposti alle stesse condizioni di umidità. Le condizioni di umidità ridotta non sembrano, infatti, modificare negativamente la colonizzazione di questo gruppo di microorganismi.

4.6 CONCLUSIONI

La Real-time PCR è una tecnica efficace per quantificare specie microbiche e analizzare l'abbondanza relativa di differenti taxa anche in contesti ambientali. In questo studio la tecnica è stata utilizzata per analizzare le comunità microalgali e valutare variazioni quantitative a seconda delle condizioni microclimatiche di crescita (intensità luminose e umidità relativa). Si possono ottenere elevati livelli di specificità e sensibilità, nonostante si lavori con comunità miste e sequenze di elevata diversità. A seconda della circoscrizione tassonomica indagata e quindi, sulla base dei marcatori utilizzati, è possibile ottenere informazioni in merito alle abbondanze relative di vari gruppi di microrganismi, ed è possibile in tempi rapidi quantificare singoli organismi e riportare le abbondanze percentuali a specifici contesti ambientali. Vengono inoltre superati i problemi relativi alla conta al microscopio ottico o elettronico, dovuti principalmente alle difficoltà di coltivazione di alcune specie algali.

Le informazioni relative all'abbondanza di un taxon in sistemi microbici complessi, quali quelli dei *biofilm*, assumono particolare importanza nell'ottica delle strategie di conservazione e salvaguardia dei beni culturali. Uno dei principali contributi di questo studio risulta essere lo sviluppo di una metodica rapida ed efficace per la quantificazione molecolare dei principali taxa di biodeteriogeni, Chlorophyta e Cyanophyta. L'attribuzione delle abbondanze relative dei due taxa a determinate associazioni microalgali, a particolari tipologie di substrato e a particolari condizioni microclimatiche rende le analisi dei fenomeni di biodeterioramento più rapida ed immediata.

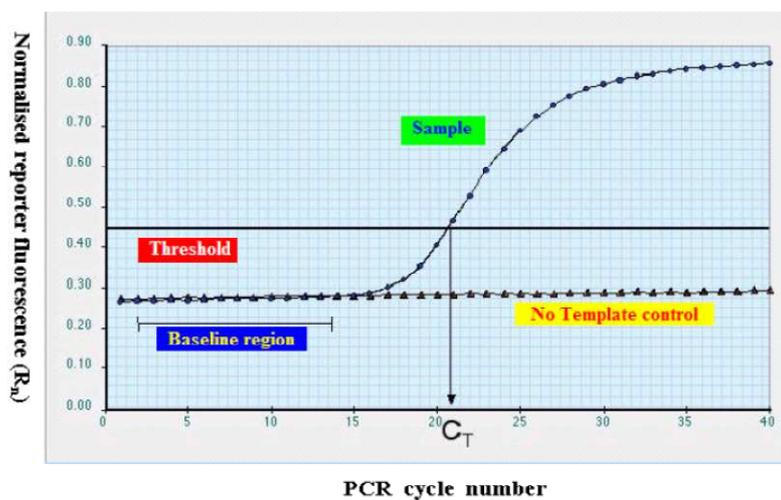


Figura 4.1: Grafico della fluorescenza in funzione del numero di cicli.

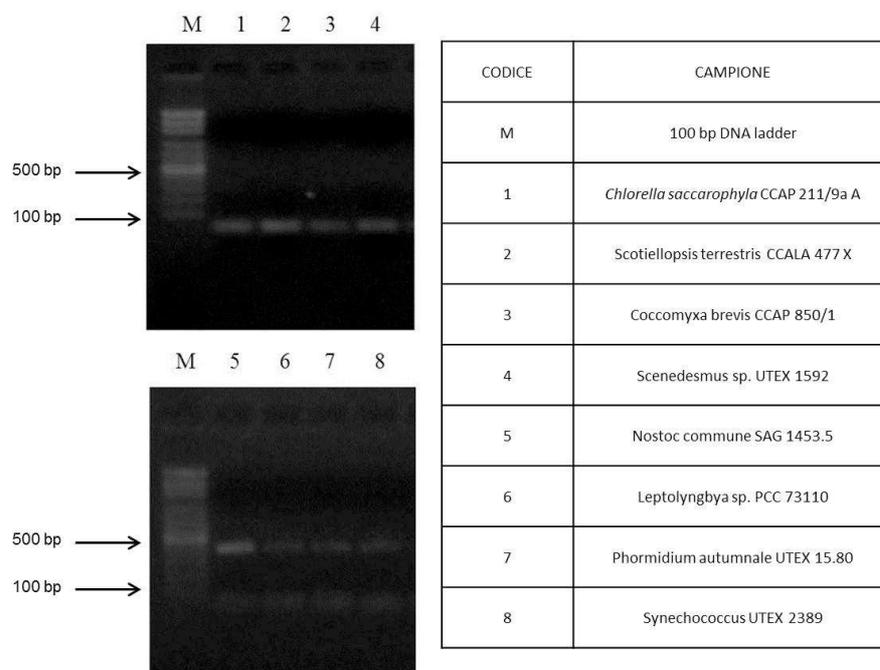


Figura 4.2: Risultati del test di specificità in vitro dei primer 361 Forw e 762 Rev .

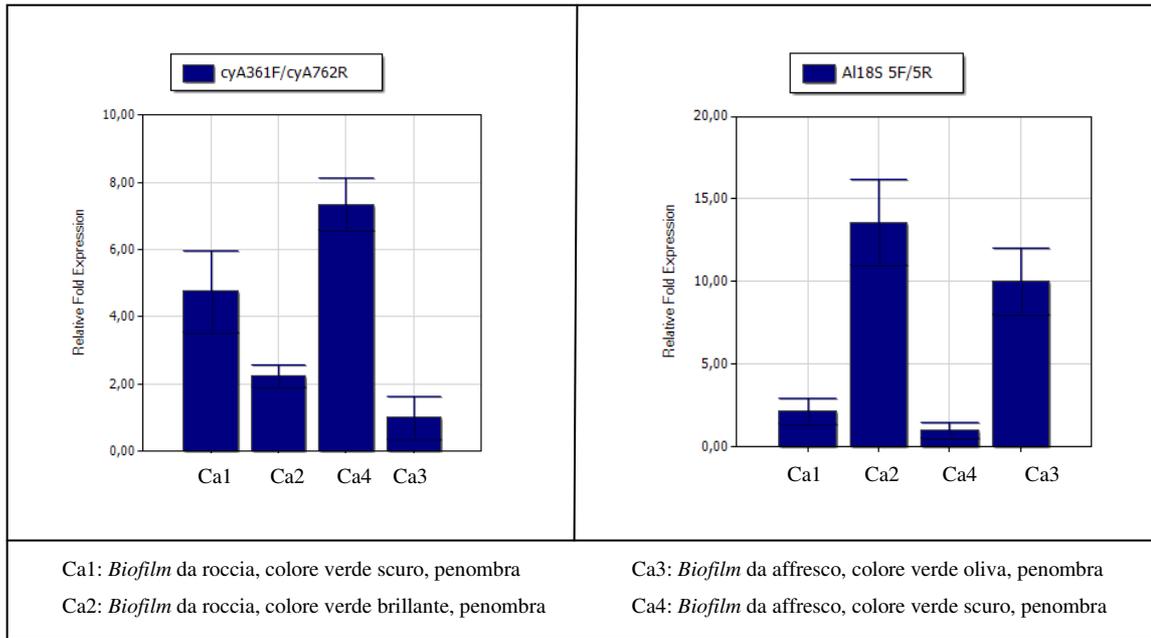


Figura 4.3: Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophta (B) nei quattro campioni analizzati all'interno della Grotta di San Michele a Camigliano.

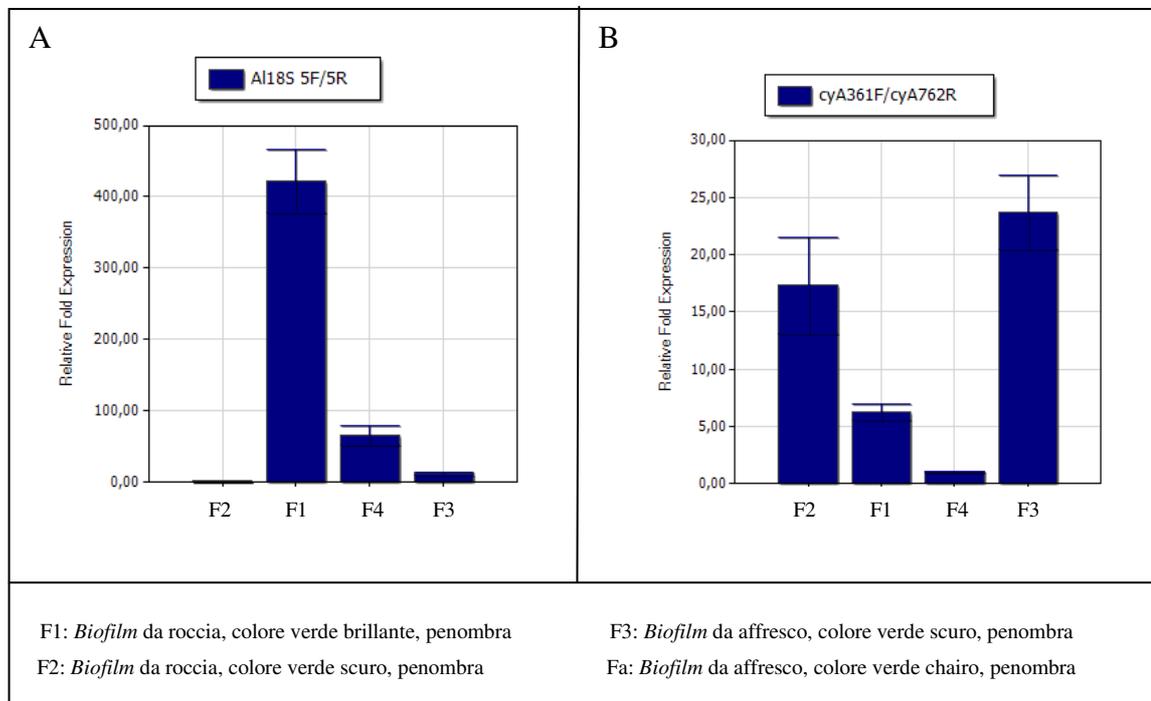


Figura 4.4: Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophta (B) nei quattro campioni analizzati all'interno della Grotta delle Formelle a Calvi Risorta.

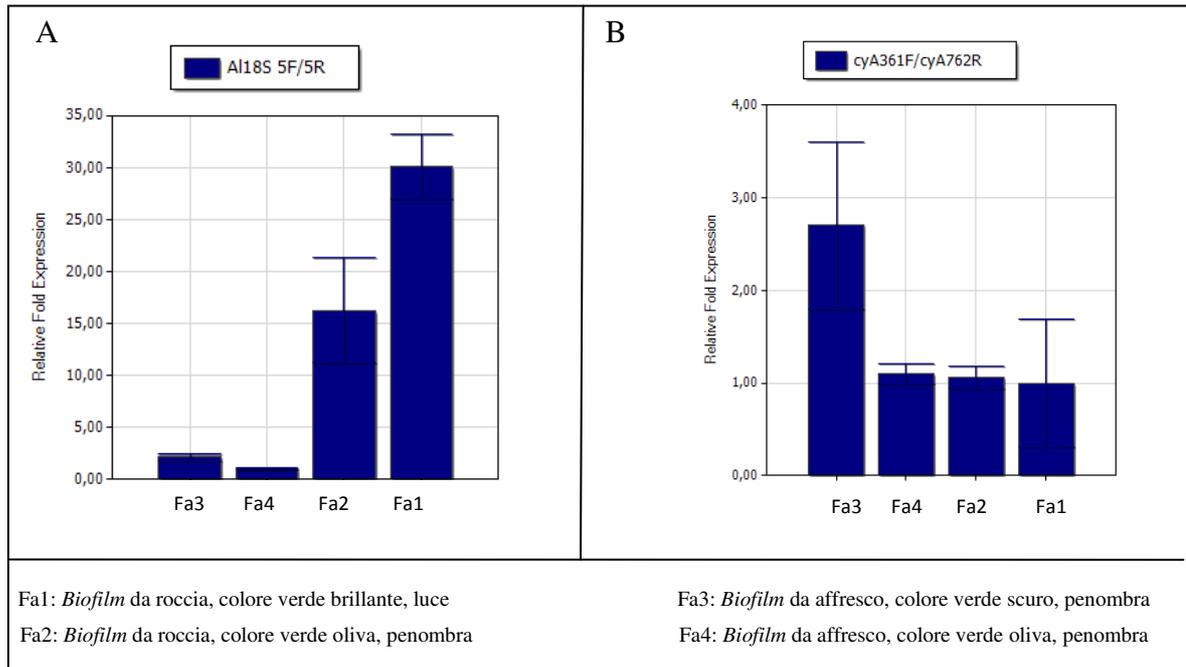


Figura 4.5 : Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophyta (B) nei quattro campioni analizzati all'interno della Grotta di San Michele a Faicchio.

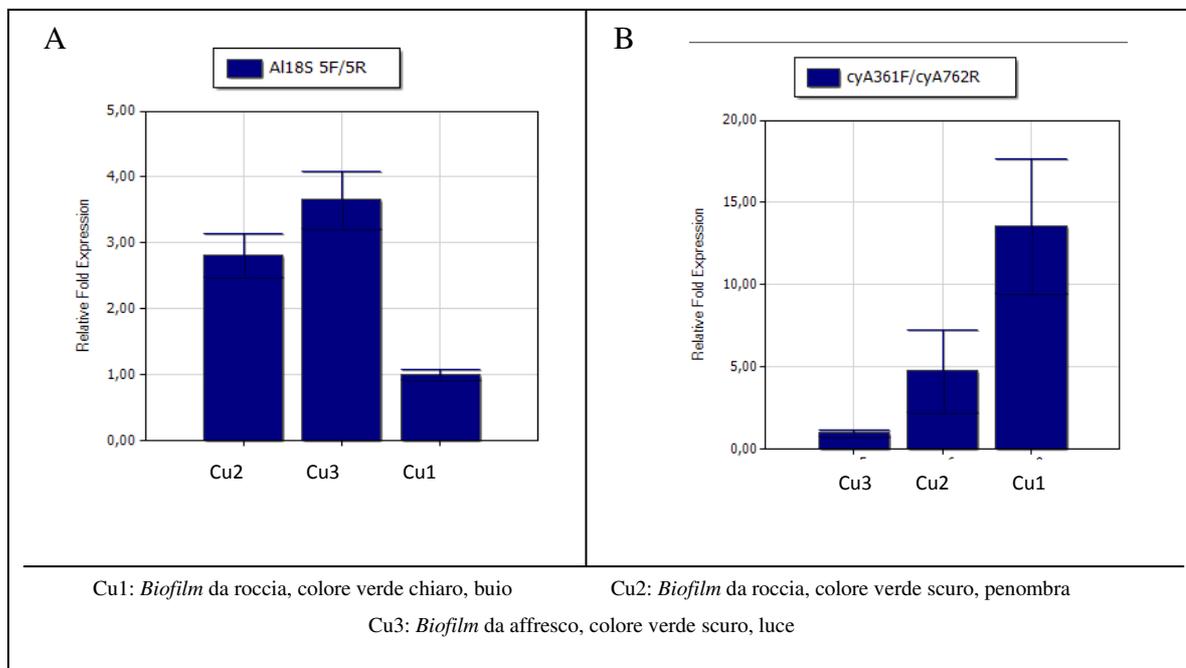


Figura 4.6 : Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophyta (B) nei tre campioni analizzati all'interno della Grotta di San Michele a Curti.

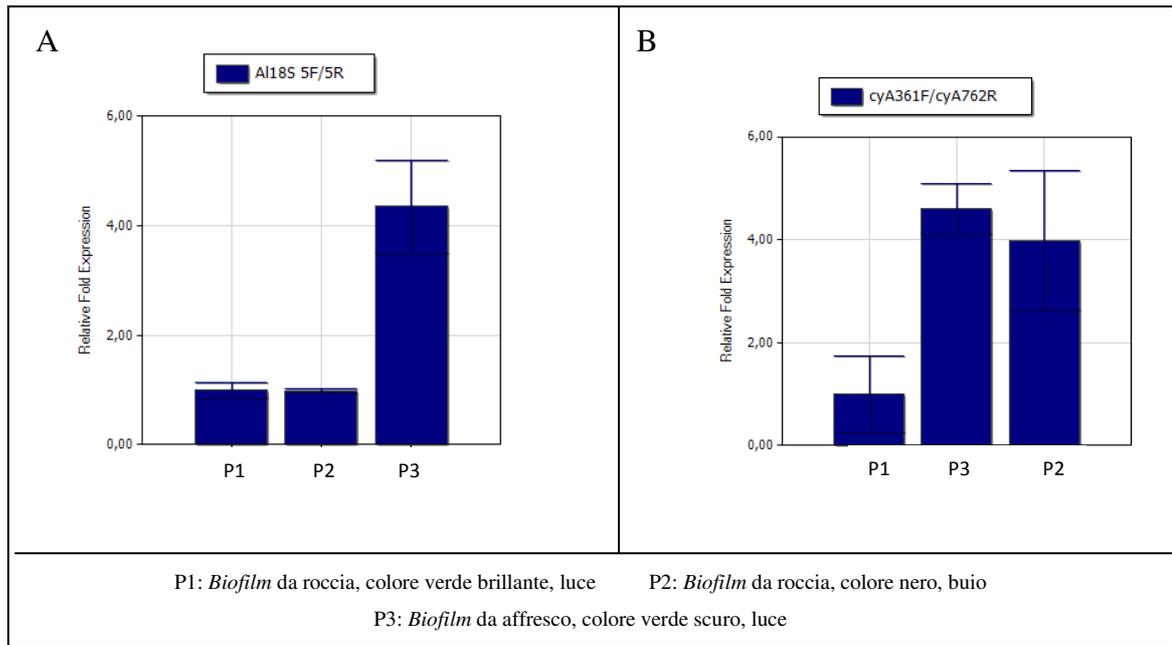


Figura 4.7: Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophyta (B) nei tre campioni analizzati all'interno della Grotta di San Michele a Preturo.

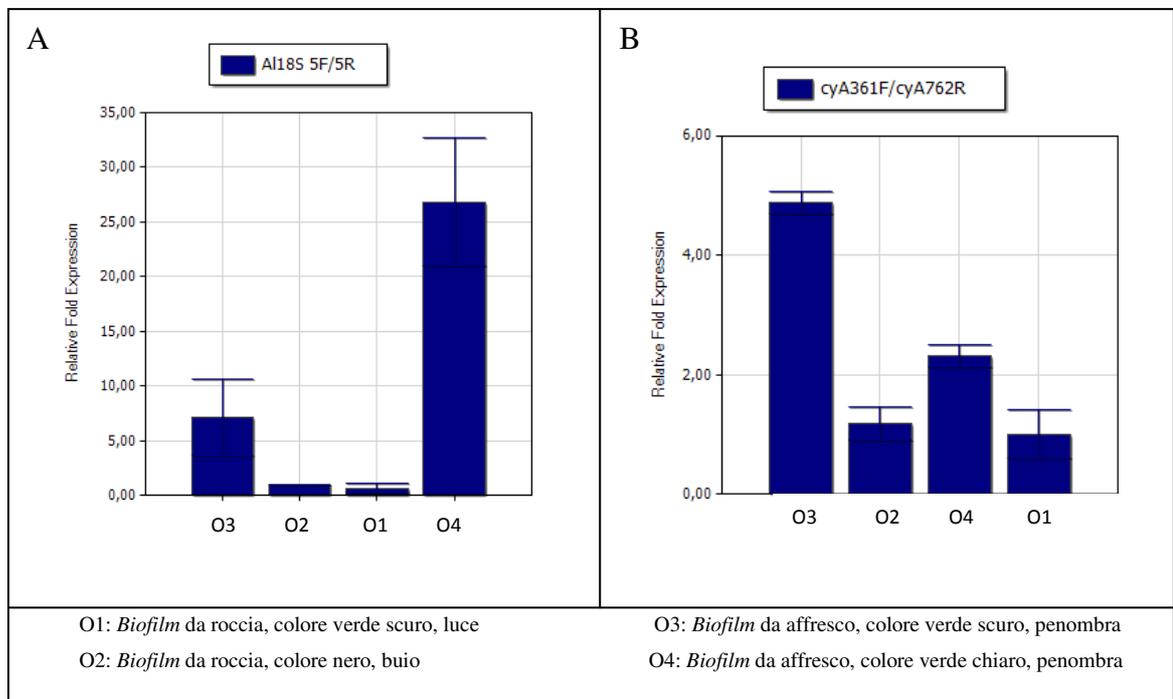


Figura 4.8: Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophyta (B) nei quattro campioni analizzati all'interno della Grotta dell'Angelo ad Olevano.

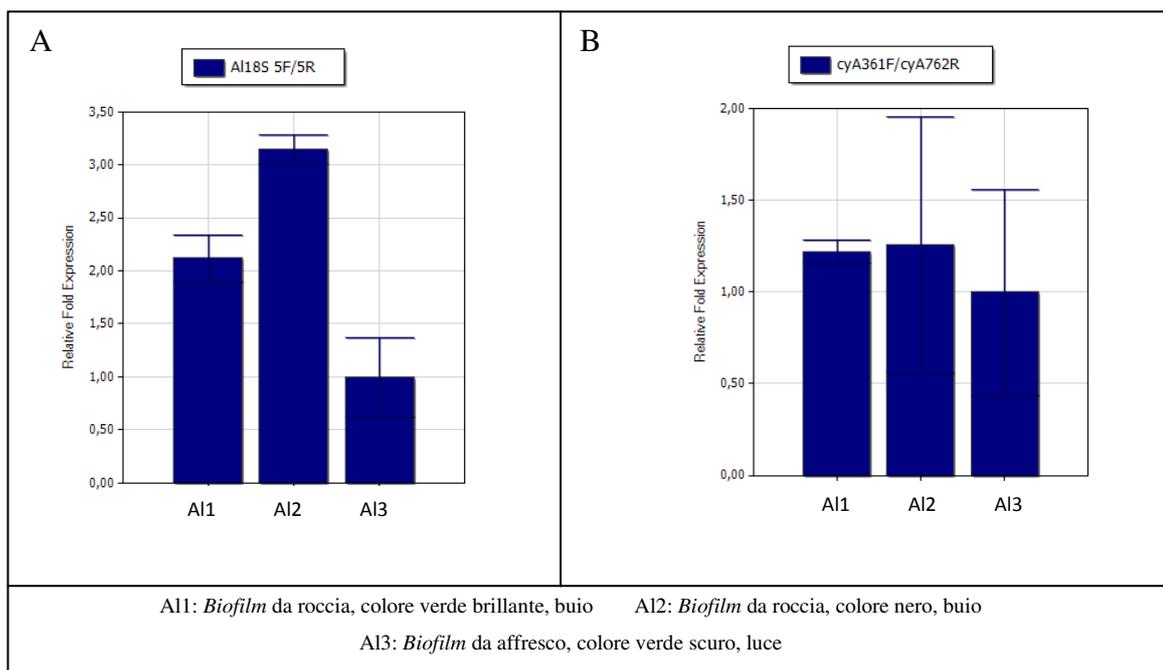
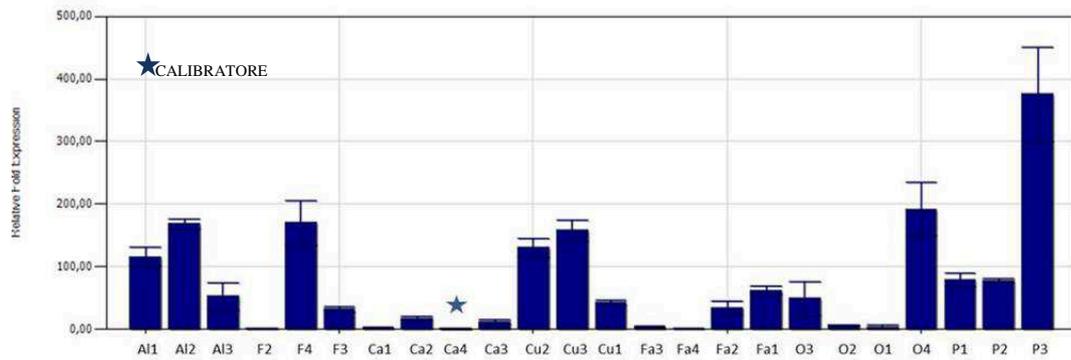


Figura 4.9 : Abbondanza relativa di Chlorophyta (A) e di Cyanophyta (B) nei tre campioni analizzati all'interno della Grotta di Sant'Angelo ad Alife.

Amplificazione con oligo Chlorophyta 18S

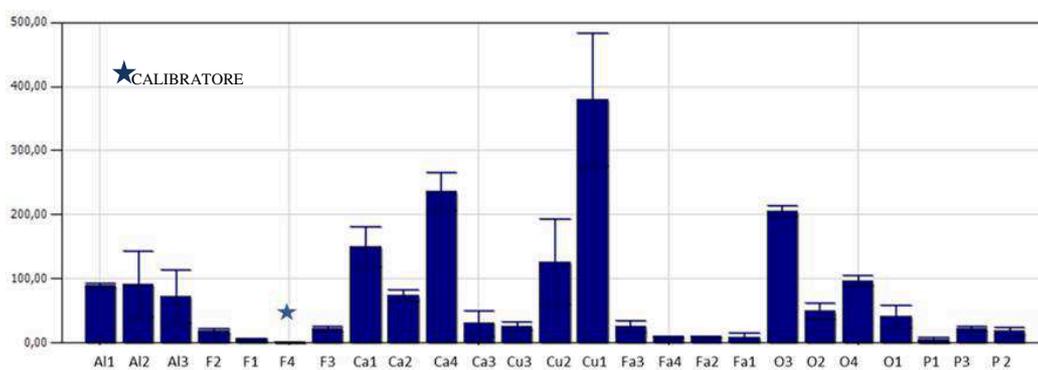


Codice	Campione
Al1	Campione Alife 1
Al2	Campione Alife 2
Al3	Campione Alife 3
F2	Campione Formelle 2
F3	Campione Formelle 3
F4	Campione Formelle 4
Ca1	Campione Camigliano 1
Ca2	Campione Camigliano 2
Ca3	Campione Camigliano 3
Ca4	Campione Camigliano 4
Cu1	Campione Curti 1
Cu2	Campione Curti 2

Codice	Campione
Cu3	Campione Curti 3
Fa1	Campione Faicchio 1
Fa2	Campione Faicchio 2
Fa3	Campione Faicchio 3
Fa4	Campione Faicchio 4
O1	Campione Olevano 1
O2	Campione Olevano 2
O3	Campione Olevano 3
O4	Campione Olevano 4
P1	Campione Preturo 1
P2	Campione Preturo 2
P3	Campione Preturo 3

Figura 4.10 : Confronto tra le abbondanze relative di Chlorophyta in tutti i campioni analizzati.

Amplificazione con oligo Cyanophyta 16S



Codice	Campione
Al1	Campione Alife 1
Al2	Campione Alife 2
Al3	Campione Alife 3
F1	Campione Formelle 1
F2	Campione Formelle 2
F4	Campione Formelle 4
Ca1	Campione Camigliano 1
Ca2	Campione Camigliano 2
Ca3	Campione Camigliano 3
Ca4	Campione Camigliano 4
Cu1	Campione Curti 1
Cu2	Campione Curti 2

Codice	Campione
Cu3	Campione Curti 3
Fa1	Campione Faicchio 1
Fa2	Campione Faicchio 2
Fa3	Campione Faicchio 3
Fa4	Campione Faicchio 4
O1	Campione Olevano 1
O2	Campione Olevano 2
O3	Campione Olevano 3
O4	Campione Olevano 4
P1	Campione Preturo 1
P2	Campione Preturo 2
P3	Campione Preturo 3

Figura 4.11 : Confronto tra le abbondanze relative di Cyanophyta in tutti i campioni analizzati.

Taxa	CLASSE	FAMIGLIA	GENERE
Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas</i> sp. SAG 3.72
	Trebouxiophyceae	Chlorellaceae	<i>Scottiellopsis terrestris</i> CCALA 477 X
	Chlorophyceae	Coccomyxaceae	<i>Coccomyxa brevis</i> CCAP 850/1
	Chlorophyceae	Bracteacoccaceae	<i>Bracteacoccus minor</i> UTEX 1591
	Chlorophyceae	Scenedesmaceae	<i>Scenedesmus</i> sp. UTEX 1591
	Trebouxiophyceae	Chlorellaceae	<i>Chlorella saccharophyla</i> CCAP 211/9a A
Cyanophyta	Cyanophyceae	Nostocaceae	<i>Nostoc commune</i> SAG 1453.5
	Cyanophyceae	Pseudanabaenaceae	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 73110
	Cyanophyceae	Oscillatoriaceae	<i>Plectonema</i> sp. SAG 39.80
	Cyanophyceae	Phormidiaceae	<i>Phormidium autumnale</i> UTEX 15.80
	Cyanophyceae	Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> sp. CCAP 1473/3
	Cyanophyceae	Synechococcaceae	<i>Synechococcus</i> sp. UTEX LB 2389

Tabella 4.1: Specie target di Chlorophyta e Cyanophyta utilizzate per la specificità dei primer.

Primer	Target	Sequenza (5'->3')	Tm (°C)	GC (%)	Lunghezza dell'amplificato (bp)
5_Forw	18S Chlorophyta	GTAGGATAGAGGCTACCATGG	62	54	113
5_Rev	18S Chlorophyta	CCTGCTGCCTTCCTGGA	58	61	
CYA361_F	16S Cyanophyta	GGAATTTTCCGCAATGGG	54	50	320
CYA762_R	16S Cyanophyta	CGCTCCCCTAGCTTTCGTC	62	63	

Tabella 4.2 : Primer selezionati per le reazioni Real-time PCR con relative caratteristiche.

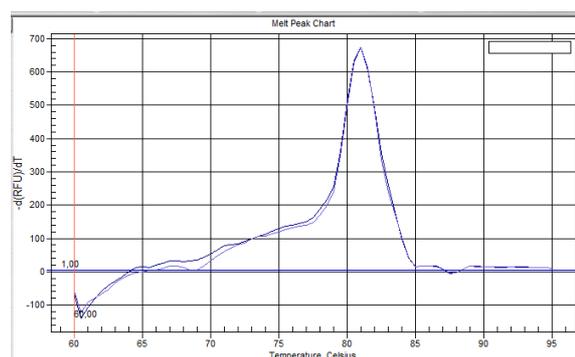
Campione	C _t	Quantità relativa
Ca1	22.55	2.93
Ca2	19.92	18.10
Ca3	20.41	12.91
Ca4	23.67	1.00
Fa1	18.11	63.51
Fa2	18.97	35.47
Fa3	21.92	4.52
Fa4	23.03	2.10
Cu1	18.65	43.75
Cu2	17.07	130.97
Cu3	16.78	159.11
O1	21.89	4.62
O2	21.30	7
O3	18.46	50.14
O4	16.51	192.48
Al1	17.23	117.09
Al2	16.70	168.90
Al3	18.35	53.71
P1	17.77	80.15
P2	17.79	78.89
P3	15.56	376.28
F2	22.72	2.62
F4	16.68	170.63
F3	19.06	32.82

Tabella 4.3: Valori di Ct e di abbondanza relativa di Chlorophyta dei campioni analizzati via Real-time PCR.

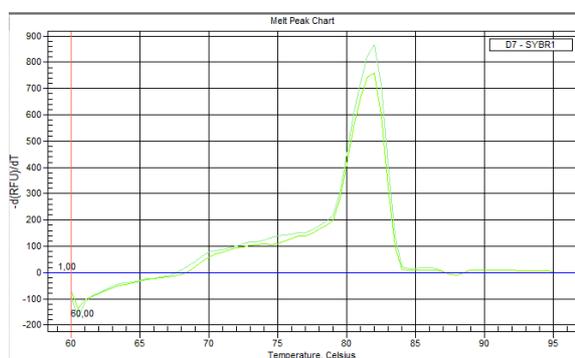
Campione	C _t	Quantità relativa
Ca1	14.76	147
Ca2	15.78	72.88
Ca3	17.02	30.76
Ca4	14.10	232
Fa1	18.65	9.57
Fa2	18.71	9
Fa3	17.31	25.21
Fa4	18.61	10.21
Cu1	13.43	369
Cu2	15.49	125
Cu3	17.22	26.75
O1	16.58	41.70
O2	16.34	49
O3	14.29	203
O4	15.36	97.09
Al1	15.49	89.05
Al2	15.45	91.37
Al3	15.78	72.91
P1	19.65	4.96
P2	17.76	18.86
P3	17.47	22.57
F2	17.74	18.67
F3	17.42	23.27
F4	21.96	1.00

Tabella 4.4: Valori di C_t e di abbondanza relativa di Cyanophyta dei campioni analizzati via Real-time PCR.

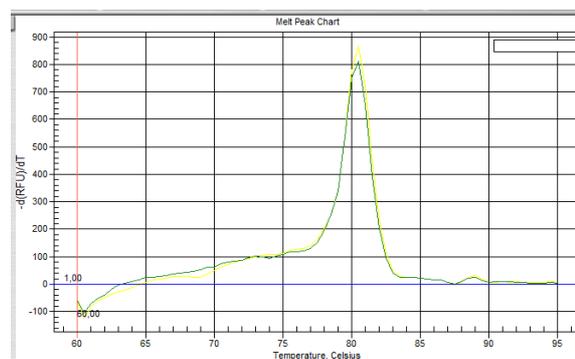
Campione	Tm
Ca1	81.00
Ca2	80.50
Ca3	83.00
Ca4	80.50
Fa1	81.50
Fa2	81.00
Fa3	80.50
Fa4	81.50
Cu1	81.50
Cu2	82.00
Cu3	82.00
O1	80.50
O2	82.00
O3	80.50
O4	80.50
Al1	81.50
Al2	81.50
Al3	81.50
P1	81.50
P2	81.50
P3	81.50
F2	81.50
F4	81.50
F3	82.00



Campione Ca1 Tm= 81.00



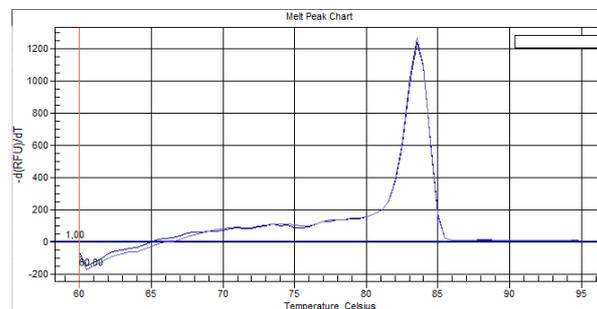
Campione Cu2 Tm= 82.00



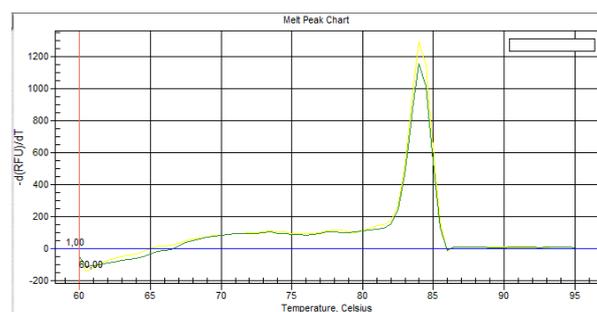
Campione Fa1 Tm= 81.50

Tavola 4.1 Valori delle temperature di melting relativi alle Chlorophyta, in seguito ad amplificazione Real-time PCR dei campioni di *biofilm*.

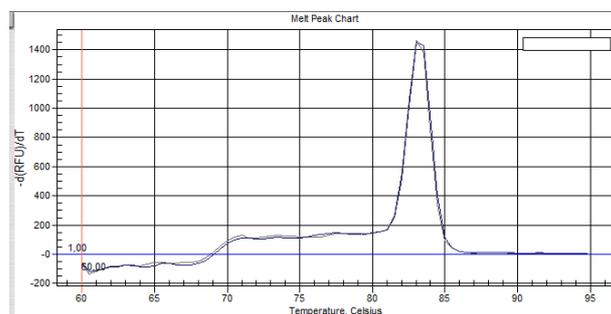
Campione	Tm
Ca1	83.50
Ca2	83.50
Ca3	83.50
Ca4	83.50
Fa1	84.00
Fa2	84.00
Fa3	84.00
Fa4	83.50
Cu1	84.50
Cu2	83.00
Cu3	84.00
O1	84.50
O2	85.00
O3	84.00
O4	84.00
Al1	84.50
Al2	84.00
Al3	84.00
P1	84.00
P2	84.50
P3	84.00
F2	85.00
F4	85.00
F3	85.00



Campione Ca3 Tm= 83.50



Campione Cu3 Tm= 84.00



Campione Cu2 Tm= 83.00

Tavola 4.2 Valori delle temperature di melting relativi alle Cyanophyta, in seguito ad amplificazione Real-time PCR dei campioni di *biofilm*.

CAPITOLO V

BIBLIOGRAFIA

Albertano P., Luongo L., Grilli Caiola M., 1991 (a). Observations on cell structure of micro-organisms of an epilithic phototrophic community competing for light. *Nova Hedwigia* 53: 369–381.

Albertano P., Luongo L., Grilli Caiola M., 1991 (b). Influence of different lights on mixed cultures of microalgae from ancient frescoes. *Int Biodeterior* 27: 27–38.

Albertano P., Altieri A., Caneva G., Ceschin S., Maggi O., Nugari M. P.; Pasquariello G., Persiani A. M., Piervittori R., Pietrini M., Pinna D., Ricci S., Roccardi A., Urzì C., Tomaselli M.L., Valenti P., 2008. Problems of biodeterioration in relation to particular types of environments. In: *Plant biology for cultural heritage*, The Getty Conservation Institute, 171-218, ISBN 978-0-89236-939-3, Los Angeles, USA.

American Public Health Association, American Chemical Society, Association of Official Agricultural Chemists, 1920. *Standard Methods for the Examination of Water and Sewage*. American public health association.

Anagnostidis K., Komárek J., 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 1–Introduction. – *Arch Hydrobiol Suppl* 71/*Algological Studies* 38/39: 291–302.

Anagnostidis K., Komárek J., 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3–Oscillatoriales. – *Arch Hydrobiol Suppl* 80/*Algological Studies* 50–53: 327–472.

Amodio M., Ebanista C., 2008. Aree funerarie e luoghi di culto in rupe: le cavità artificiali campane tra tarda antichità e medioevo. [A stampa in *Atti VI Convegno Nazionale di Speleologia in Cavità Artificiali*, Napoli, 30 maggio-2 giugno 2008 («Opera ipogea», 1/2 (2008), 117-144 © degli autori – Distribuito in formato digitale da “Reti Medievali”].

Amoroso G.G., 1995. Incrostazioni, patine e alterazioni delle superficie lapidee. In: *Il restauro della pietra nell’architettura monumentale*, Dario Flaccovio Editore, 111-144, ISBN 88-7758-244-8, Italy.

Amoroso G.G., 2002. Trattato di scienza della conservazione dei monumenti. Alinea Editrice, ISBN 88-8125-410-7, Firenze, Italy.

Asencio A.D., Aboal M., 2001. Biodeterioration of wall paintings in caves of Murcia (SE Spain) by epilithic and casmoendolithic microalgae. *Algological studies* 103: 131-142.

Barranguet C., Veuger B., van Beusekom S.A.M., Marvan, P., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2005. Divergent composition of algal bacterial biofilms developing under various external factors. *Eur J Phycol* 40: 1-8.

Bourrelly P. 1986. Les Algues d'Eau Douce. Tome III. Les Algues Bleues et Rouges, Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. Second Edition. N. Boubée et Cie, Paris.

Bischoff H.W., Bold, H.C. 1963. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological Studies IV. Univ. Texas Publ.* 6318: 1-95.

Caneva G., Lombardozzi V., Nugari M.P., Pietrini A.M., Salvadori O., 2009. Biodeterioration problems of mural paintings in rock habitat: the prehistoric site of Filiano (BASILICATA, ITALY). In: *Evaluation of damage: Restoration and Conservation of Mobile Cultural Heritage*.

Caneva G., Nugari M. P., Salvadori O., 2007 (a). *La Biologia vegetale per i beni culturali Vol. 1 Biodeterioramento e Conservazione*. Nardini Editore, Firenze.

Caneva G., Ceschin S., Tomaselli M. L. 2007 (b). *Monumenti e manufatti in ambienti urbani*. In: *La biologia vegetale per i beni culturali. Vol I, Biodeterioramento e conservazione*, Nardini Press, Firenze, pp 190-196.

Castenholz R. W., 1988. Culturing methods for cyanobacteria. *Method Enzymol* 167: 68–93.

Ciferri O., 1999. Microbial Degradation of Paintings. *Appl Environ Microbiol*: 879–885.

Conover W.J., 1999. *Practical nonparametric Statistics*. 3d ed. New York: John Wiley & Sons.

Cuzman O. A., Tiano P., Ventura S., Frediani P., 2011. Biodiversity on Stone Artifacts. In: Environmental Sciences-The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity. Edited by Jordi Lopez Pujol, ISBN 978-953-307-751.

Czerwik-Marcinkowska J., Mrozinska T., 2009. Epilithic algae from caves of the Krakowsko-Czestochowska upland (Southern Poland). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*: 78 301-309.

Dayner D. M., Johansen J. R., 1991. Observations on the Algal Flora of Seneca Cavern, Seneca County, Ohio. *Ohio J Sci* 91 (3): 118-121.

Decho A.W., 2000. Microbial biofilm in intertidal systems an overview. *Cont Shelf Res* 20: 1257-1273.

Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Anal* 19: 11-15.

Ebanista C., 2007. L'utilizzo culturale delle grotte campane nel Medioevo. *Atti I Convegno Regionale di Speleologia "Campania Speleologica"*.

Flemming H.C., 1993. Biofilms and environmental protection. *Water Sci Technol* 27: 1-10.

Giacobini C., De Cicco M. A., Tiglie I., Accardo G., 1988. Actinomycetes and biodeterioration in the field of fine art: 418-423. In: D. R. Houghton, R. N. Smith, and H. O. W. Egging; *Biodeterioration*, Vol. 7. Elsevier Applied Science, New York, N.Y.

Giglio S, Monis P. T., Saint C. P., 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleid Acids Res* 31.

Godhe A., Asplund M. E., Harnstrom K., Saravanan V., Tyagi A., Karunasagar I., 2008. Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol*: 7174-7182.

Gonzalez-Escalona N., Fey A., Hofle M. G., Espejo R. T., Guzman A., 2006. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae*

cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environ Microbiol* 8: 658–666.

Golubic S., Friedmann I., Schneider J., 1981. The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganism. *J Sediment Petrol* 51:475-478.

Guillitte O., 1995. Bioriceptivity: a new concept for building ecological studies. *Sci total Environ* 167.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98

Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986–994.

Hermanson A., Lindgren P. E., 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl Environ Microb* 67: 972–976.

Hoffmann L., 2002. Caves and other low-light environment: aerophilic photoautotrophic microorganism. In: Bitton G., *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, John Wiley & Sons, New York: 835-843.

Hueck H.J., 1965. The biodeterioration of materials as a part of Hylobiology. *Mater Org* 1: 5-34.

Komárek J., Anagnostidis K., 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 2– Chroococcales. – *Arch. Hydrobiol. 73/Algological Studies* 43: 157–226.

Komárek J., Anagnostidis K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 4– Nostocales. – *Arch. Hydrobiol. Suppl. 82/Algological Studies* 56: 247–345.

Komárek J., Anagnostidis K., 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. – In: Büdel B., Gärdner G., Krienitz L., Schagerl M. (eds). *Süßwasserflora von Hašler et al. Epipellic filamentous cyanobacteria Mitteleuropa*, vol. 19/2. – 759 pp., Elsevier, München.

Kovacik L., 2000. Cyanobacteria and algae as agents of biodeterioration of stone substrata of historical buildings and other cultural monuments, In: Proceedings of the New Millenium International Forum on Conservation of Cultural Property, Daejeon, Korea, Choi S. & Suh M. (ed) pp 44-58

Krumbein W. E., 1988. Microbial interactions with mineral materials. In: Houghton, D.R., Eggins, S. (Eds.), *Biodeterioration* 7, Elsevier Applied Science, 78-100.

Krumbein W. E., 2003. Patina and cultural heritage - a geomicrobiologists perspective. p.39-47 in: R. Kozlowski (ed.): Proceedings of the 5th European Commission Conference "Cultural Heritage Research: a Pan European Challenge", Cracow, 16-18 May 2002.

Jurado V., Porca E., Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C., 2010. Fungal outbreak in a show cave. *Sci total environ* 408: 3632-3638.

La Cono V., Urzi C., 2003. Fluorescent in situ hybridization applied on samples taken with adhesive tape strips. *J Microbiol Meth* 55: 65– 71.

Laiz L., Pinar G., Lubitz W., Saiz-Jimenez C., 2003. The colonization of building materials by microorganism as revealed by culturing and molecular methods. In Saiz-Jimenez C. (Ed.) *Mol Biol Cult Herit*, A.A. Balkema, Lisse: 23-28.

Martinez A., Asencio A. D., 2010. Distribution of cyanobacteria at the Gelada Cave (Spain) by physical parameters. *Journal of Cave and Karst Studies* 72: 11–20.

Milanesi C., Baldi F., Borin S., Brusetti L., Ciampolini F., Iacopini F., Cresti M., 2009. Deterioration of medieval painting in the chapel of the Holy Nail, Siena (Italy) partially treated with Paraloid B72. *Int Biodeter Biodegr* 63: 844–850.

Moro C. V., Crouzet O., Rasconi S., Thouvenot A., Coffe G., Batisson I., Bohatier J., 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of chlorophyceae and bacillariophyceae in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*: 5729–5733.

Morton L. H. G., Surman, S. B., 1994. Biofilms in biodeterioration a review. *Int Biodeterior Biodegr* 32: 203–221.

Moter A., Gobel U. B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Meth* 41: 85–112.

Mulec J., Kosi G., 2009. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of Cave and Karst Studies* 71 (2): 109–115.

Mulec J., Kosi G., Vrhovsek D., 2008. Characterization of cave aerophytic algal communities and effects of irradiance levels on production of pigments. *Journal of Cave and Karst Studies* 70: 3–12.

Normal 3/80. *Materiali lapidei: campionamento*. CNR-ICR, Comas grafica, Roma 1980.

Normal 9/88, 1988. *Microflora autotrofa ed eterotrofa: tecniche di isolamento in coltura*. Istituto Centrale del Restauro-Commissione Normal, ICR-CNR, Rome, Italy.

Nubel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., 1997. PCR primers to Amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*: 3327–3332.

Nugari M. P., Pietrini A. M., Caneva G., Imperi F., Visca P., 2009. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *Int Biodeterior Biodegr* 63 (6) 705-711.

O'Donnell A. G., Whiteley A. S., 2005. *Fluorescent In Situ Hybridization and the analysis of the single cell from methods in biotechnology*. Environmental Monitoring of Bacteria. Edited by C. Edwards Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Ortega-Calvo J. J., Hernandez-Marine M., Saiz-Jimenez C., 1993. Cyanobacteria and algae on historic buildings and monuments: 173–203. In Garg K. L., Garg N., Mukerji K. G. (Ed.), *Recent advances in biodeterioration and biodegradation*, Vol. I. Naya Prokash, Calcutta, India.

Pietrini A.M., Ricci S., 1993. Occurrence of a calcareous blue-green alga, *Scytonema julianum* (Kutz.) Meneghini, on the frescoes of a church carved from the rock in Matera, Italy. *Cryptogamic Botany* 3: 290-295.

Pinar G., Ripka K., Weber J., Sterflinger K., 2009. The micro-biota of a sub-surface monument the medieval chapel of St. Virgil (Vienna, Austria). *Intern Biodeterior Biodegr* 30: 1-9.

Raji A. I., Moller C., Litthauer D., Heerden E. V, Piater L. A., 2008. Bacterial diversity of biofilm samples from deep mines in South Africa. *Biokemistri* 20 (2): 53-62.

Roeselers G., van Loosdrecht M. C. M., Muyzer G., 2007. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecol* 54:578-585

Roldan M., Calero E., Hernandez Marine M., 2003. Aerophytic biofilms in dim habitats. In: Saiz- Jimenez C. (Ed), *Mol Bio Cult Herit*. A.A. Balkema, Lisse 163-169.

Saiz-Jimenez, C., Samson R. A., 1981. Biodegradacion de obras de arte. Hongos implicados en la degradacion de los frescos del monasterio de la Rabida (Huelva). *Botanica Macaronesica* 8-9: 255-264.

Saiz-Jimenez C., Garcia-Rowe J., Garcia Del Cura M. A., Ortega-Calvo J. J., Roekens E., Van Grieken R., 1990. Endolithic cyanobacteria in Maastricht limestone. *Sci Total Environ*: 94 (3) 209-220.

Schonhuber W., Zarda B., Eix S., Rippka R., Herdman M., Ludwig W., Amann R., 1998. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*: 1259-1267.

Skovhus T. L., Ramsing N. B., Holmstrom C., Kjelleberg S., Dahllorf I., 2004. Real-Time Quantitative PCR for Assessment of Abundance of *Pseudoalteromonas* Species in Marine Samples. *Appl Environ Microbiol*: 2373-2382.

Smith C. J., Osborn A. M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *Microbiol Ecol* 67: 6-20.

Tiano, P., 1993. Biodegradation of cultural heritage: decay mechanisms and control methods. In: *Conservation of stone and other materials*. Vol. 2. Prevention and treatment, Thiel M.J. (ed), Rilem/UNESCO Paris, pp. 573-580, ISBN 0419188509 , E & FN Spon Press, London.

Tiano P., 1995. Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules. *Studies in Conservation* 40: 171–176,

Tiano P., 1998. Biodeterioration of Monumental rocks: decay mechanisms and control methods. *Sci Technol Cultural Heritage* 7, 19-38.

Todeschini R., 2003. *Introduzione alla chemiometria*, 1^a ed., Napoli, EdiSES.

Tomaselli L., Margheri M. C., Florenzano G., 1979. Indagine sperimentale sul ruolo dei cianobatteri e delle microalghe nel deterioramento di monumenti ed affreschi: 313–325. In *Atti del 3° Congresso Internazionale sul Deterioramento e la Conservazione della Pietra*, Venice, Italy. University of Padua, Padua, Italy.

Tomaselli L., Lamenti G., Bosco M., Tiano P., 2000. Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *Int Biodeterior Biodegr* 46: 251-258

Urzì C., Albertano P., 2001. Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments, in Doyle R.J (Eds.). *Method Enzimol* 336:340-355.

Urzì C., De Leo F., Bruno L., Albertano P., 2010. Microbial diversity in Paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microbial Ecol* 60: 116-129.

van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M., 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge, University Press, Cambridge pp. 1-627.

Walker J. J., Spear J. R., Pace N. R., 2005. Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment. *Nature* 434: 1011-101

Warscheid T., 2000. Integrated concepts for the protection of cultural artifacts against biodeterioration. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Eds) *Of microbes and Art – The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, Kluwer Academic, New York, pp. 185-201.

Woese C. R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51(2): 221–271.

Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* 87: 4576-4579.

Zhang T., Fang H. H. P., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotech* 70: 281–289.

Zhu F., Massana R. , Not F., Marie D., Vaulot D., 2005. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiol Ecol* 52: 79–92.

Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32(12).

Zucconi L., Gagliardi M., Isola D., Onofri S., Andaloro M. C., Pelosi C., Pogliani P., Selbmann L., 2011. Biodeterioration agents dwelling in or on the wall paintings of the Holy Saviour's cave (Vallerano, Italy). *Int Biodeterior Biodegr* 70: 40-46.