

# **M**ICROSCOPY AND MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR THE STUDY OF BIOCENOSIS DIVERSITY IN SEMI-CONFINED ENVIRONMENTS

***Franco Palla\**, *Noemi Billeci*, *Francesco Paolo Mancuso***

Dipartimento di Scienze Botaniche, Laboratorio di Biologia Molecolare  
Università degli Studi di Palermo

***Lorella Pellegrino***

Centro Regionale Progettazione e Restauro, Palermo

***Lucia Cecilia Lorusso***

Dipartimento Difesa della Natura, ISPRA, Roma

*Keywords:* biocenosis, cave environment, CLS microscopy, molecular analyses

## **1. Introduction**

The “Grotto of the Saints” is part of a cave complex (see colour Figure 1, p. 234) in the countryside of Licodia Eubea, Catania [1]. Historical evidence and studies on archaeological artifacts found over the years, lead to the assumption that the site had always had an important social and religious role [2], at least until the fifteenth century, when it was neglected and abandoned and was only rediscovered during the last century. The cave was given its name due to the presence of mural paintings, depicting a Theory of Saints [2, 3], which decorate the walls of the room facing north-east. It was used by the early Christians to bury important members of their religious community. In the Middle Ages the cave became an oratory [4], which housed a panel representing the Crucifixion of Jesus Christ (see colour Figure 2, p. 234). The aim of this study was to characterize the micro-and macro biological systems colonizing this particular habitat (see colour Figure 3a-3b, p. 235), and to understand the relationship between deterioration processes and biological systems [5-8], paying particular attention to those representing potential deteriogens for the conservation of the mural paintings [9]. In conclusion, it was considered more appropriate not to remove the biocenosis to avoid a drastic change in the microclimatic and environmental parameters. A systematic screening of the biological

---

\* Corresponding author: e-mail fpalla@unipa.it

consortia and their development over the surfaces [10] was suggested. We also suggested the monitoring of micro-climatic parameters, RH, temperature and light, which, as is well-known, are closely related to biological proliferation [11].

## **2. Materials and methods**

### ***Samples***

Biofilm sampling was performed with sterile scalpels (see colour Figures 4a-4b, p. 236) on the wall surfaces of the north-east room. Small fragments of different pigmentation were removed:

- i) black (SC1);
- ii) green (SC2);
- iii) differently pigmented (SC3). Samples were stored in sterile tubes at 4°C until their use in laboratory.

### ***Optical Microscopy***

Samples SC1, SC2 and SC3, were observed through a stereomicroscope Leica Zoom 2000 (magnification 40X) This allowed the identification of mosses and *Bryophytes* (see colour Figure 3b, p. 235) in symbiotic association with other organisms. In addition, numerous insects (see colour Figure 5, p. 237) were found, some collected (sample SC4) and observed by stereomicroscope. The presence of these insects is promoted by the nutrient sources (fungi and mold) and the abundance of debris in the cave.

### ***Confocal Laser Scanning Microscopy***

The examination of the biofilms was performed with a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus FV-300 equipped with Argon laser ( $\lambda = 488$  nm, green light) and Helium / Neon laser, ( $\lambda = 543$  nm, red light), magnification 40 X. By using this technique it was possible to see the composition of different biofilms, and collect serial optical sections from the SC specimens, on which autofluorescent biological systems were clearly observed [12].

### ***Microbial DNA extraction***

The characterization of bacterial species was performed using molecular protocols, which involves the extraction of microbial genomic DNA from SC1 and SC3 samples, using the Genomic DNA purification kit (*Fermentas*). 100 mg of each biofilm sample were added to 400  $\mu$ l of Lysis Solution/ 5  $\mu$ l of protease K (20 mg/ml), to facilitate cell lyses,

and incubated in a Stuart Oven / Shaker S130H, for 16 hours at 65°C. After extraction with chloroform, the DNA was precipitated by the addition of the Precipitation Solution and the molecules recovered by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, in Eppendorf microfuge.

DNA molecules were used as a template for the following PCR reactions [13, 14].

### **PCR amplification**

The Polymerase Chain Reaction, or PCR [15] enables selective *in vitro* amplification of specific target sequences, which in our case corresponds to a portion of the cyanobacterial 16S ribosomal gene. The PCR reactions were performed by the Ready-to-Go (*Amersham Biosciences*) reaction mixture and by (1  $\mu$ m) forward and reverse oligonucleotide primers: Cy 408R (5'-TTC AA (CT) CCA A (AG) (AG) (AG) C CTT CCT CCC-3') and Cy 27F1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') [16]. The PCR products resolved by electrophoresis on agarose gel (2%) were DNA fragments of 400 bp in length. The sequencing was performed by Eurofins MWG Operon sequencing service.

### **3. Results and conclusion**

In this study we emphasize a multiple approach to define the composition and structure of the microflora and their role in the surface biodeterioration of the Grotto of the Saints (and the associated mural paintings) present in this semi-confined environment located in Licodia Eubea (Sicily). After a macroscopic analysis, *Parietaria diffusa* M. et K. was revealed at the beginning of the cave, and *Adiantum capellus-veneris* L., 1753 [17], inside the cave. This multiple approach was based on microscopy techniques, including optical and CLSM (see colour Figure 6, p. 237) and molecular analysis by DNA extraction and PCR *in vitro* amplification of 16S rDNA target sequence (Figure 7). The results provided information regarding the organization of the biological consortia and highlighted the symbiotic relationships between micro- and macro-organisms. Among them, we identified photosynthetic systems, such as Bryophytes, Pteridophytes, Cyanobacteria, but also insects

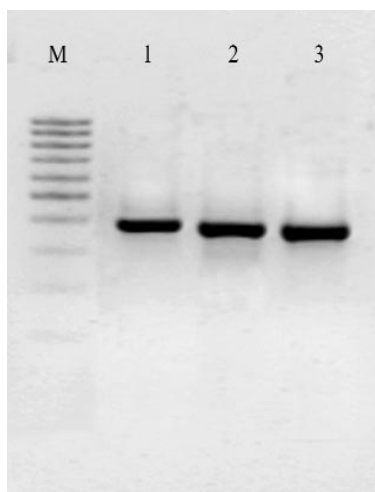


Figure 7. Molecular analysis by DNA extraction.

belonging to the species of *Diptera*, *Brachycera*, Schiner 1862 [18] (B. Manachini, personal communication). The study also allowed to relate some of the processes of degradation to specific biological systems identified by the use of molecular protocols [19]. In particular, the presence of cyanobacteria (confirming the CLSM observation) belonging to the genus *Cyanobium* was made evident, its presence being strictly related to temperature and water [20]. We also found *Aspergillus* and *Trichoderma*, two commonly associated fungal species.

For this reason it was established that the monitoring of the environment is needed in order to plan a strategy for the control and prevention of surface biodeterioration [21].

Moreover, this approach is also useful for evaluating the potential impact of microbial metabolic products (toxins, microbial detritus) on the health of workers and visitors [22], for the sustainable use of this archaeological site.

### Acknowledgements

We would like to thank the Archeoclub of Licodia Eubea, the *Soprintendenza ai Beni Culturali of Catania* and the *Municipio* of Licodia Eubea. Thanks go to Barbara Manachini (Department of Animal Biology, University of Palermo) for the entomological analysis and to Giovanni Morici (Department of Cellular and Developmental Biology, University of Palermo) who performed the CLSM analysis.

### References

- [1] BONACINI E. 2008, *Il Borgo cristiano di Licodia Eubea*, Trento, Ed. UNI Service.
- [2] MESSINA A. 1994, *Le chiese rupestri della Val di Noto*, Palermo, Istituto Siciliano di Studi Bizantini e Neoellenici.
- [3] GIGLIO S. 2002, *La cultura rupestre di età storica in Sicilia e Malta*, I Luoghi del culto. Ed. Lussografica.
- [4] AGNELLO G. 1962, *Le arti figurative nella Sicilia Bizantina*, Palermo, Istituto Siciliano di Studi Bizantini.
- [5] HERNANDEZ MARINE M., CLAVERO E., ROLDAN M. 2003, *Why there is such luxuriant growth in the hypogean environments?* Arch. Hydrobiol. Algologi. Studies 109, 229-240.
- [6] HOFFMANN L. 2002, *Caves and other low-light environments: aerophytic photoautotrophic microorganisms*, in G. BITTON. ED. ENCYCLOPEDIA OF ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, New York, NY., John Wiley & Sons, 171-177.
- [7] ROLDAN M., CLAVERO & HERNANDEZ MARINE M. 2003, *Aerophytic biofilms in dim habitats*, in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse, C. Saiz-Jimenez ed. Swets & Zeitlinger, 151-162.

- [8] SINEO L., MANACHINI B., CAROTENUTO G., PIOMBINO-MASCALI D., ZINK A.R., PALLA F. 2008, *The Palermo Capuchin catacombs project: a multidisciplinary approach to the study of a modern mummy collection (ca 1600-1900)*, Conservation Science in Cultural Heritage 8/2008, Bologna, Pitagora Editrice 155-165.
- [9] STOMEIO F., LAIZ L., GONZALES J.M., SAIZ-JIMENEZ C. 2006, *Microbial diversity on paintings and engravings in Dona Trinidad Cave (Ardales, Spain)*, in *Heritage, Weathering and Conservation*, Fort, Alvarez de Buergo, Gomez-Heras and Vazquez-Calvo, eds. Taylor & Francis Group, 355-360.
- [10] GOMOIU I., MOHANU I., MOHANU D. 2008, *Biodeterioration of mural paintings from Ravens stone Church-Romania*, Messina, 14<sup>th</sup> International Biodeterioration & Biodegradation Symposium 6-11 Ottobre 2008.
- [11] ELSE T.A., PANTLE C.R., AMY P.S. 2003, *Boundaries for biofilm formation: humidity and temperature*, Applied Environmental Microbiology 69, 5006-5010.
- [12] PALLA F., MORICI G. 2007, *Monitoring microbial colonization on works of art by Confocal Microscopy and molecular biology techniques*, in *Conservation Science*, London, Archetype Publ.
- [13] PALLA F. 2004, *Le biotecnologie molecolari per la caratterizzazione e la valutazione del ruolo dei microrganismi nei processi di degrado dei manufatti di interesse storico artistico*, Quaderni di Scienza della Conservazione 4/2004, Bologna, Pitagora Editrice, 183-194.
- [14] PALLA F., TARTAMELLA E. 2007, *Chromatic alteration on marble surfaces analysed by molecular biology tools*, Conservation Science in Cultural Heritage 7/2007, Bologna, Pitagora Editrice, 1-11.
- [15] MULLIS K.B., FALOONA F.A 1987, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, Methods Enzymol. 155, 335-350.
- [16] CRISPIN C.A., GAYLARDE C.C., GAYLARDE P.M., COPP J., NEILAN B.A. 2003, *Molecular biology for investigation of cyanobacterial populations on historic buildings in Brazil*, in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse, C. Saiz-Jimenez ed. Swets & Zeitlinger, 141-144.
- [17] PIGNATTI S. 1982, *Flora d'Italia*, Bologna, Edagricole.
- [18] YEATES D.K., WIEGMANN B.M., COURTNEY G.W., MEIER R., LAMBKIN C., PAPE T. 2007, *Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects*, Zootaxa 1668, 565-590.
- [19] BRUNO L., URZÌ C., BILLI D., ALBERTANO P. 2006, *Genetic characterization of epilithic cyanobacteria and their associated bacteria*, Geomicrobiol J. 23, 293-299.
- [20] ALBERTANO P., URZÌ C. 1999, *Structural interaction among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganism in Roman hypogea*, Microb. Ecol. 38, 244-252.
- [21] ALBERTANO P., MOSCONE D., PALLESCHI G., HERMOSIN B., SAIZ JIMENEZ C., SANCHEZ-MORAL S., HERNANDEZ-MARINE M., URZÌ C., GROTH I., SCHROECKH V., SAREELA M., MATTILA-SANDHOLM T., GALLON J.R., GRAZIOTTIN F., BISCONTI F., GIULIANI R. 2003, *Cyanobacteria attack rocks (CATS): control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria*

and associated microorganisms in Roman hypogean monuments, in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse, C. Saiz-Jimenez ed. Swets & Zeitlinger, 151-162.

- [22] PELTOLA J., ANDERSSON M.A., HAAHTELA T., MUSSALO-RAUHAMAA H., RAINEY F.A., KROPPENSTEDT M., SAMSON R.A., SALKINOJA-SALONEN M.S. 2001, *Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment*, Applied Environmental Microbiology 67, 3269-3274.

### **Studio delle biocenosi in ambienti semi-confinati mediante tecniche microscopiche e di biologia molecolare**

*Parole chiave: biocenosi, ambienti ipogei, microscopia CLS, analisi molecolare*

#### **1. Introduzione**

Il complesso rupestre, di cui fa parte la "Grotta dei Santi" (Figura 1 a colori, p. 234) si sviluppa nel territorio di Licodia Eubea, Catania [1]. Le testimonianze archeologiche e documentarie lasciano ipotizzare che il sito abbia subito, a partire dalla tarda antichità, varie frequentazioni rivestendo un'importante ruolo sociale e religioso [2], fino almeno al XV secolo, quando fu abbandonato, per essere riscoperto solo durante il secolo scorso. La denominazione della Grotta, è riconducibile alla presenza di tracce di pannelli raffiguranti una "Teoria di Santi" [2, 3], la quale doveva ornare le pareti dell'antro rivolto a nord-est, destinato in epoca paleocristiana alla sepoltura di importanti membri della comunità religiosa del luogo. A testimonianza della successiva destinazione d'uso della Grotta, adibita nel basso Medioevo ad oratorio [4], rimane il catino absidale ricavato nella parete orientale dell'antro adiacente, che accoglie un pannello raffigurante la Crocifissione di Gesù Cristo (Figura 2, p. 234). Data l'evidente presenza di biocenosi, soprattutto dell'ambiente situato a nord-est, uno degli obiettivi di questo studio, è stata la caratterizzazione di micro e macrosistemi (Figure 3a-3b, p. 235) colonizzanti questo particolare habitat e coinvolti nei processi di degrado [5-8]. In particolare, l'attenzione è stata rivolta alle biocenosi che costituiscono un rischio per la conservazione dei dipinti murali [9]. In conclusione, è stato consigliato di non rimuovere le biocenosi presenti al fine di non causare drastici stress sull'equilibrio ecologico dell'ambiente, piuttosto un monitoraggio sistematico dello sviluppo e della complessità dei consorzi biologici che colonizzano la grotta e le superfici dipinte [10]. Inoltre, suggeriamo di monitorare puntualmente i parametri microclimatici, temperatura, U.R. e illuminazione che, come noto, influenzano lo sviluppo dei sistemi biologici [11].

#### **2. Materiali e Metodi**

##### **Campionamento**

Il campionamento dei biofilm di diversa composizione e colore (Figure 4a-4b), presenti sulle pareti dell'antro posto a nord-est, è stato eseguito mediante l'uso di un bisturi sterili:

- i) scuro (campione SC1);
- ii) verde (campione SC2);
- iii) con cromie diverse (campione SC3).

I campioni sono stati conservati all'interno di tubi sterili alla temperatura di 4°C sino al momento dell'uso in laboratorio.

### **Microscopia ottica**

I campioni SC1, SC2 e SC3, sono stati osservati mediante uno stereo microscopio Leica Zoom 2000, (con ingrandimento 40X). Ciò ha permesso l'identificazione di muschi e Briofite (Figura 3b, p. 235), in associazione simbiotica con altri microrganismi. Inoltre, sono stati riscontrati numerosi insetti, (Figura 5, p. 237), che sono stati campionati (SC4) ed osservati allo stereo microscopio. La presenza di questi insetti è favorita da alcune fonti nutrizionali, come muffe, funghi e detriti vari, abbondantemente presenti nel sito.

### **Confocal Laser Scanning Microscopy**

L'analisi dei biofilm è stata condotta mediante microscopio confocale a scansione laser (confocal laser scanning microscopy, CLSM) Olympus FV-300 equipaggiato con laser ad Argon ( $\lambda = 488\text{nm}$ , green light) e elio/neon ( $\lambda = 543\text{ nm}$ , red light), con ingrandimento 40 X. Per mezzo di questa tecnologia [13] è stato possibile osservare i diversi strati dei campione SC, la cui scansione mostra chiaramente la presenza di sistemi biologici autofluorescenti [12].

### **Estrazione DNA microbico**

L'identificazione delle specie batteriche è stata effettuata ricorrendo a protocolli molecolari, che hanno previsto l'estrazione del DNA genomico microbico, dai campioni SC1 e SC3, utilizzando il Genomic DNA purification kit (Fermentas). Aliquote da 100 mg di biofilm sono state utilizzate e ad esse aggiunti 400  $\mu\text{l}$  di Lysis Solution (+ 5  $\mu\text{l}$  di Proteasi K, alla concentrazione 20 mg/ml, per agevolare la lisi cellulare). I campioni sono quindi stati incubati, in un Stuart Oven/Shaker S130H, per 16 ore alla temperatura di 65°C. Dopo estrazione con cloroformio, il DNA è stato precipitato grazie all'aggiunta della Precipitation Solution, ottenendo un pellet dopo centrifugazione a 14.000 rpm per 10 min, in Eppendorf microfuge. Le molecole di DNA così ottenute, sono state utilizzate come stampo per le successive reazioni di PCR [13, 14].

### **Amplificazione in vitro (PCR) delle sequenze bersaglio**

La reazione a catena della polimerasi, PCR o Polimerase Chain Reaction [15] permette l'amplificazione selettiva in vitro di una specifica sequenza bersaglio, nel nostro caso corrispondente ad una porzione del gene ribosomale 16S cianobatterico. Le reazioni di PCR sono state eseguite ricorrendo al kit Ready-to-go (Amersham Biosciences) utilizzando gli oligonucleotidi primer [16] Cy 408R = (5'- TTC AA(CT) CCA A(AG) (AG) (AG) (AG)C CTT CCT CCC-3') e Cy 27F1 = (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3'), entrambi ad una concentrazione finale 1  $\mu\text{M}$ . Dei prodotti di PCR, frammenti di DNA di circa 400 bp, risolti mediante elettroforesi su gel di agarosio (2%), ne è stata determinata la composizione nucleotidica ricorrendo al servizio Eurofins MWG Operon.

### **3. Risultati e conclusione**

Il presente studio, rientra nell'intervento di conservazione sia delle testimonianze artistiche sia antropologiche del sito della grotta dei Santi (e dei dipinti murali presenti), un ambiente semi-confinato presente nel territorio di Licodia Eubea (Sicilia). L'indagine macroscopica ha permesso di evidenziare la presenza di Parietaria diffusa M. et K., nella parte iniziale della grotta, e di Adiantum capellus-veneris L., 1753 [17], nelle parti interne della grotta. Questo approccio multidisciplinare ha previsto l'applicazione di tecniche di microscopia sia ottica che confocale (Figura 6, p. 237) e di biologia molecolare, basate sull'estrazione del DNA microbico e l'amplificazione in vitro di sequenze bersaglio, 16S-rDNA, (Figura 7). I risultati hanno fornito informazioni sull'organizzazione dei consorzi biologici e hanno permesso di ipotizzare le associazioni simbiotiche tra micro e macrorganismi. Inoltre, abbiamo rivelato sia la presenza di sistemi fotosintetici come Briofite, Pteridofite, Cianobatteri, sia di numerosi insetti appartenenti alla specie dei Dipteri, Brachiceri, Schiner 1862 [18] (B. Manachini, per-

sonal communication), la cui presenza è favorita da fonti nutrizionali quali muffe, ifee fungine e detriti. Lo studio ha inoltre permesso di ricondurre alcuni dei processi di degrado a specifici sistemi biologici identificati mediante l'ausilio di protocolli molecolari [19]. In particolare è stata mostrata la presenza nel sito di cianobatteri del genere *Cyanobium* appartenenti al Phylum dei batteri fotosintetici, la cui presenza è relazionata a specifici parametri ambientali, come temperatura, U.R. Inoltre, è stata evidenziata la presenza di *Aspergillus* e *Trichoderma*, due specie fungine spesso associate [20]. Per tale motivo è stata indicata la necessità di monitorare periodicamente gli ambienti e di pianificare una strategia di controllo e prevenzione del biodeterioramento [21]. Inoltre, questa metodologia d'indagine è utile per valutare l'impatto di eventuali prodotti dell'attività metabolica microbica (tossine, detriti microbici) sulla salute degli operatori/visitatori [22] per una fruizione sostenibile di questo sito archeologico.

## Summary

This study is part of a wider conservation project of artistic and anthropological finds located in the Grotto of the Saints (Licodia Eubea, Alia, Sicily), and represents an opportunity for investigating the micro-and macro biological systems colonizing this particular environment. It is well-known that the bio-receptivity of surfaces is strongly related to its constituent materials and environmental parameters, whose effects promote the establishment of specific biotic communities. This is particularly true for caves, hypogea and semi-confined environments and, in particular for the Grotto of the Saints, where besides the presence of different nutrient sources, there are also high humidity values, percolating water and an aerobiological exchange with the surrounding countryside. Moreover, the weathering of this structure is enhanced by the canyon effect of the wind and the day-night temperature range. The identification and characterization of the biocenosis present in this environment was performed combining microscopy (optical, fluorescent, CLSM) and molecular biology analysis (DNA sequences). The aim was to identify the biological systems able to trigger the degradation processes, in order to plan their growth control and to prevent the colonization of the entire environment.

## Riassunto

Questo studio, che rientra in un più ampio intervento di conservazione delle testimonianze artistiche e antropologiche della Grotta dei Santi (Licodia Eubea, Alia, Sicilia), ha come obiettivo la rivelazione e caratterizzazione dei micro e macrosistemi biologici che colonizzano questo particolare habitat. È noto che la biorecettività delle superfici è fortemente correlata ai materiali costitutivi e ai parametri ambientali, i cui effetti favoriscono l'instaurarsi di specifiche biocenosi. Questo è particolarmente riscontrato in ambienti come grotte, ipogei e ambienti semi-confinati. In particolare per la Grotta dei Santi, dove è stata riscontrata la presenza di fonti nutrizionali, elevata umidità e acqua percolante, oltre ad uno scambio aerobiologico con la campagna circostante. Inoltre, il degrado di questa struttura è accelerato dagli effetti canyon conseguenti alla circolazione del vento e dalla rilevante escursione termica tra il giorno e la notte. Utilizzando tecniche di microscopia (ottica, fluorescenza, CLSM) e l'analisi molecolare (sequenziamento e analisi di porzioni bersaglio del DNA) abbiamo eseguito la caratterizzazione delle biocenosi presenti. Lo scopo è stato quello di identificare i sistemi biologici in grado di innescare processi di degrado, per elaborare un'ideale pianificazione del controllo della colonizzazione dell'intero ambiente.

## Résumé

Cette étude, qui rentre dans une plus ample intervention de conservation des témoignages artistiques et anthropologiques de la Grotta dei Santi (Licodia Eubea, Alia, Sicilia), a comme objectif la



révélation et la caractérisation des micro et macrosystèmes biologiques qui colonisent cet habitat particulier. On sait que la bioréceptivité des surfaces est fortement corrélée aux matériaux constitutifs et aux paramètres environnementaux, dont les effets favorisent l'instauration de biocénoses spécifiques. C'est particulièrement vérifié dans des espaces comme les grottes, les souterrains et des espaces partiellement limités. En particulier pour la Grotta dei Santi, où a été relevée la présence de sources nutritionnelles, humidité élevée et eau percolante, en plus d'un échange aérobiologique avec la campagne environnante. En outre, la dégradation de cette structure est accélérée par les effets canyon conséquents à la circulation du vent et à l'importante excursion thermique entre le jour et la nuit. En utilisant des techniques de microscopie (optique, fluorescence, CLSM) et l'analyse moléculaire (séquençement et analyse de portions cible de l'ADN) nous avons effectué la caractérisation des biocénoses présentes. Le but a été celui d'identifier les systèmes biologiques en mesure de déclencher des procès de dégradation, pour élaborer une planification appropriée du contrôle de la colonisation de tout l'environnement.

### **Zusammenfassung**

Diese Untersuchung, die zu einer umfangreicheren Maßnahme zur Erhaltung der künstlerischen und anthropologischen Zeugnisse der Grotta dei Santi (Licodia Eubea, Alia, Sizilien) gehört, setzt sich als Ziel die Erfassung und Charakterisierung der biologischen Mikro- und Makrosysteme, die dieses besonders Habitat besiedeln. Es ist bekannt, dass die Bioanfälligkeit der Oberflächen stark mit ihren Materialien und mit den Umweltparametern korreliert ist, deren Wirkungen die Entstehung spezifischer Biozönosen begünstigen. Dies bestätigt sich besonders in Umgebungen wie Grotten, Höhlen und teilweise abgeschlossenen Räumen, und speziell in der Grotta dei Santi, wo Nahrungsquellen, eine hohe Luftfeuchtigkeit und Sickerwasser angetroffen wurden, dazu ein aerobiologischer Austausch mit dem Umland. Außerdem wird der Verfall dieser Struktur durch Canyon-Effekte beschleunigt, die in Folge der Windzirkulation auftreten, und durch das hohe Temperaturgefälle zwischen Tag und Nacht. Unter Verwendung von Mikroskopietechniken (optische, Fluoreszenz, CLSM) und der Molekularanalyse (Sequenzierung und Analyse von Zielabschnitten der DNA) haben wir die Charakterisierung der vorhandenen Biozönosen durchgeführt. Das Ziel war die Bestimmung der biologischen Systeme, die in der Lage sind, Zerfallsprozesse auszulösen, um eine geeignete Planung der Kolonisierungskontrolle des ganzen Raums ausarbeiten zu können.

### **Resumen**

Este estudio, que se encuadra en una intervención más amplia de conservación de los testimonios artísticos y antropológicos de la Grotta dei Santi (Licodia Eubea, Alia, Sicilia), tiene como objetivo la revelación y caracterización de los micro y macrosistemas biológicos que colonizan este hábitat en particular. Es bien sabido que la bio-receptividad de las superficies está fuertemente correlacionada con los materiales que las constituyen y con los parámetros ambientales, cuyos efectos favorecen la instauración de biocenosis específicas. Esto se ha detectado particularmente en ambientes como grutas, hipogeos y espacios semi-confinados. En particular, en la Grotta dei Santi, donde se ha detectado la presencia de fuentes nutricionales, altos niveles de humedad y agua percolante, además de un intercambio aerobiológico con la campiña en torno. Además, el deterioro de esta estructura se acelera debido al efecto cañón que se produce por la circulación del viento y a la importante diferencia térmica entre el día y la noche. Utilizando técnicas de microscopía (óptica, fluorescencia, CLSM) y el análisis molecular (secuenciamiento y análisis de porciones diana del DNA) hemos efectuado la caracterización de las biocenosis presentes. La finalidad ha sido identificar los sistemas biológicos capaces de poner en marcha los procesos de degradación, para elaborar una idónea planificación del control de la colonización de todo el medio.

## Резюме

Настоящее исследование, являющееся частью более широкой акции по консервации художественных и антропологических памятников Пещеры Святых (Ликодия Эубея, Алия, Сицилия), имеет целью раскрытие и описание характеристики биологических микро и макросистем, колонизирующих эту особую сферу обитания. Известно, что биорецептивность поверхностей в значительной степени коррелируется с составными материалами и параметрами окружающей среды, воздействие которых способствует обоснованию на месте специфического биоценоза. Это было обнаружено преимущественно в таких средах как пещеры, катакомбы и частично ограниченные помещения. В особенности для Пещеры Святых, где обнаружено наличие источников питания, высокой влажности и просачивающейся воды, а также аэроббиологического обмена с окружающей сельской местностью. Кроме того, деградация этой структуры ускорена воздействием "эффектов каньона", являющихся результатом циркуляции ветра и значительных перепадов дневных и ночных температур. Используя приемы микроскопии (оптическая, флуоресцентная, CLSM - Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия) и молекулярного анализа (секвенирование и анализ мишеневых долей ДНК), мы выполнили характеризацию присутствующих биоценозов. Целью было определение таких биологических систем, которые в состоянии порождать процессы деградации, чтобы разработать соответствующее планирование контроля колонизации всей среды.