

La relazione tra i sali e la crescita delle colonie isolate di streptomiceti sugli affreschi di alcune antiche tombe egiziane

Akmal Ali Sakr

Botany Department, Faculty of Science, Zagazig University, Zagazig, Egypt
Conservation Department, National Museum of Egyptian Civilization (NMEC),
Cairo, Egypt

Mohammed Farouk Ghaly

Botany Department, Faculty of Science, Zagazig University, Zagazig, Egypt

Mona Fouad Ali

Conservation Department, Faculty of Archaeology, Cairo University, Cairo, Egypt

Parole chiave: tombe, Egitto, streptomiceti, sali, carotenoidi

1. Introduzione

Gli affreschi situati nelle antiche tombe egiziane solitamente subiscono danni prodotti da colonizzazioni di microrganismi, in particolare streptomiceti. Gli streptomiceti normalmente colonizzano gli ambienti ipogei, come grotte e tombe, caratterizzate da oscurità, basse temperature e sostanze nutritive [1], grazie alla loro abilità di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio e di produrre numerose tipologie di enzimi.

Le attività enzimatiche capaci di decomporre polimeri complessi di foraggio triturato impiegato come riempitivo, o materie organiche contenute nella composizione di calcare o di ife fungine morte, possono essere utilizzate dai microrganismi come fonte di carbonio [2-3].

La crescita e la colonizzazione di colonie di streptomiceti sugli affreschi e sulla superfici lapidee vengono considerati l'indicatore di una fase avanzata di deterioramento e sono i più dominanti nella colonizzazione microbica di questi dipinti [4]. Ogni specie di streptomiceti sembra determinare un ruolo specifico nel deterioramento dei dipinti murali e dei supporti lapidei [5], causando diverse tipologie di deterioramento, come la decolorazione e l'accelerazione del deterioramento meccanico in relazione ai cicli di sali [6].

L'identificazione di microrganismi biodeteriogeni colonizzanti i dipinti murali rappresenta un passo fondamentale nella pianificazione di solide strategie di conservazione. Tuttavia, a causa di problemi imposti dai metodi morfologici nel processo di identificazione, sono stati adoperati metodi molecolari come quello al sequenziamento del gene 16S rDNA batterico per identificare gli Attinomiceti isolati da affreschi e materiali lapidei deteriorati, confermando le chiavi identificative morfologiche e biochimiche [7-12].

Gli streptomiceti sono coinvolti in maniera significativa nel deterioramento degli affreschi in relazione ad altri agenti di deterioramento, in particolare ai sali. Negli affreschi delle antiche tombe egiziane sono stati rilevati numerosi sali provenienti da fonti differenti. Essi provengono dalla composizione di pietra da costruzione e da perdite di acqua sotterranea contenente ioni di sali che migrano dal terreno fino alle murature delle tombe, dal momento che le concentrazioni di NaCl nel terreno delle tombe analizzate raggiungevano il valore di 11574 ppm/g [13].

I sali più comuni ritrovati negli antichi affreschi egiziani erano il cloruro di sodio, cloruro di potassio, il solfato di magnesio e il nitrato di sodio. Il cloruro di sodio (NaCl) è un sale igroscopico e altamente solubile e tale igroscopicità permette di assorbire l'umidità dell'aria e di trattenerla nella struttura muraria producendo delle zone scure sulla superficie [14,16].

Gli Attinomiceti e i batteri alotolleranti possono prosperare in ambienti ostili (energia solare, ipersalinità e radiazione) dove sussiste una limitata competizione microbica. *Micrococcus*, *Arthrobacter* e streptomiceti sono risultati i ceppi più dominanti nei dipinti murali deteriorati da sali [4,6].

Gli streptomiceti isolati erano alotolleranti al NaCl, KCl, Mg SO₄, 7 H₂O, cioè i sali più comuni rinvenuti negli affreschi deteriorati, in aggiunta al *S. rishiriensis* presente negli affreschi delle grotte di Altamira, Spagna, che potrebbe incrementare fino al 15% di NaCl [16]. Inoltre, le specie *Streptomyces diastaticus*, *S. cyaneus*, *S. antimycoticus*, *S. chromofuscus*, *S. exfoliatus*, *S. rochei*, *S. albidoflavus*, *S. anulatus*, *S. roseiflavus*,

S. badius, *S. violaceus*, *S. griseoflavus*, *S. macrosporus*, *S. phaeochromogenes*, *S. griseostramineus* e *Streptomyces* isolate dalla tomba di Maat Tell Basta, erano alotolleranti al 7-13 e 10% di NaCl e $N_2SO_4 \cdot 10 H_2O$ rispettivamente [17].

Saiz-Jimenez e Laiz [16] riportarono che la concentrazione ottimale di sale per la crescita di *Farnkia*, *S. griseus* e *Pseudonocardiaceae* isolate dagli affreschi del Castello di Herberstein, in Austria, era al 10% di solfato di magnesio e del 5% di cloruro di sodio mostrando un colore roseo, mentre la più elevata salinità del 10-15% riduceva la totalità delle cellule microbiche.

Inoltre, la specie di *Halococcus salifodinae* è stata isolata dall'efflorescenza bianca di nitrato di sodio e cloruro di sodio dalla cappella di St. Virgil, a Vienna, in Austria, ed è stato riscontrato che la sua crescita ottimale avveniva al 20-25% di NaCl [18].

Gli streptomiceti esercitano un'azione meccanica sinergica con i sali, poiché essi amplificano il deterioramento meccanico delle superfici lapidee attraverso la penetrazione del loro micelio all'interno dei vuoti intergranulari portando al dissolvimento e alla ricristallizzazione dei sali. Inoltre, il cloruro di sodio è un sale igroscopico e ha un'elevata ritenzione idrica incrementando il volume del micelio degli streptomiceti costituito principalmente da sostanze extracellulari-polimeriche (EPS); mentre i cicli di umidificazione e asciugatura causavano la disintegrazione delle superfici lapidee [3,6,16,19]. D'altronde, l'azione del sale irruvidisce la superficie lapidea predisponendo un sito ottimale per la colonizzazione di diverse comunità di microorganismi [20,21].

È stato riportato che la presenza di sali di solfato possono causare danni irreversibili alle costruzioni storiche; in presenza di umidità possono disciogliere e assorbire strati di pigmento presenti negli affreschi e l'alto contenuto di acqua potrebbe dissolvere il legante che funge da sostanza nutriente per alcuni microorganismi [22].

Inoltre, è stata riscontrata un'interrelazione tra i sali rilevati e la crescita e l'attività metabolica degli streptomiceti isolati, dove i sali obbligano gli streptomiceti a scegliere diversi meccanismi di adattamento come la produzione di molecole protettive, ad esempio melanina e carotenoidi [23-27]. Questi pigmenti causano un danno estetico sui dipinti degradati e negli strati di intonaco, con macchie irreversibili lasciate dai pigmenti prodotti [28,29].

Oltre alla produzione di pigmento, gli streptomiceti producono osmoliti responsabili dell'equilibrio osmotico (glycine betaine, ectoines, praline, N-acetylated diamino acids, N-derivatized glutamine amides e altri aminoacidi derivativi), che sono stati riscontrati in tutte le colonie microbiche isolate nelle efflorescenze saline [16, 25]. La funzione principale degli osmoliti può essere quella di proteggere la conformazione proteica e prevenire la loro denaturazione, o influenzare la stabilità della conformazione degli acidi nucleici indotta da alte concentrazioni di sale [30].

Lo scopo di questa ricerca è quello di isolare e identificare le colonie di streptomiceti dagli affreschi deteriorati di alcune antiche tombe egiziane, e determinare l'effetto dei sali sulla crescita e sull'attività metabolica degli streptomiceti in modo da proporre successive strategie di conservazione adeguate per tali affreschi.

2. Esperimento

2.1. Posizione e campionamento

Otto campioni isolati di streptomiceti sono stati prelevati dagli affreschi deteriorati all'interno delle tombe di Ankh m b3st, Ist, Ankh h.f e Ihi a Tell Basta e nella tomba di Oserkon II a Tanis (Fig.1), basso Egitto, usando il metodo a tampone di cotone sterile. Questi campioni furono coltivati su piatti di amido-nitrato-agar (SNA) (agar 20 g, starch 20 g; KH_2PO_4 1 g; $MgSO_4$ 0.5 g; NaCl 0.5 g; KNO_3 2 g; $CaCO_3$ 3 g in un 1L di acqua distillata), con l'aggiunta di antifungino (Dermatine 10-50 $\mu g / l$) per inibire la crescita di funghi competitivi. I piatti sono stati incubati per 45 giorni a 30°C.

2.2 Identificazione degli streptomiceti

Gli isolati batterici sono stati identificati morfologicamente e biochimicamente secondo le chiavi di identificazione di Kämpfer, [31] e confermate analizzando i sequenziamenti del gene 16S rDNA di questi isolati.



Figura 1. Prelievo del campione: (a) Azzurrite blu nella tomba di Oserkon II con crosta bianca, Tanis. (b): ocre rossa, tomba Ankh m b3st. (c) Azzurrite blu, tomba di Ihi, Tell Basta. (d) Dipinti rossi e gialli, tomba Ankh h3 f, Tell Basta (e) Colore nero dalla tomba di Ankh h3 f, Tell Basta. (f) Crosta bianca di cloruro di sodio, tomba di Ist, Tell Basta.

2.3. Sequenziamento del gene 16S rDNA

Il sequenziamento del gene 16S rDNA è una delle tecniche più promettenti per l'identificazione degli streptomiceti, mentre il DNA totale è stato estratto da otto colonie isolate di Attinobatteri [32]. Il codice genetico del 16S rRNA è stato amplificato da ogni isolato attraverso PCR con primer universali (primer anteriore [F27] 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' [33] e retro primer R1492 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') [34]. Questi primers si fissano a regioni universalmente conservate e permettono l'amplificazione di un frammento di approssimativamente 1500 coppie di basi (bp) in lunghezza. L'amplificazione del PCR è stato condotto da un sistema Gene-Amp PCR 9600 thermocycler (Perkin Elmer). Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: 94 °C per 10 min e 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 s, ricottura-estensione a 56 °C per 1 min, 72 °C per 1 min e un'estensione

a 72 °C per 10 min. La presenza e il rendimento di prodotti PCR specifici (gene 16S rRNA) sono stati analizzati all' 1% in gel d' agarosio. Successivamente, i prodotti PCR sono stati ripuliti usando il Kit di Purificazione GeneJET™ PCR (Fermentas).

I frammenti di DNA amplificati sono stati parzialmente sequenziati a GATC Biotech AG (Konstanz, Germany) usando il sequenziatore ABI 3730xl DNA e utilizzando il primer anteriore (F27). Le sequenze 16S rDNA determinate nel presente studio sono state depositate nel server web NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). L'analisi delle sequenze e il confronto con quelle pubblicate è stato effettuato usando il programma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [35].

2.4. Analisi dei sali

La crosta bianca prelevata dal pigmento blu nel soffitto della stanza del Re Oserkon II a Tanis, è stata analizzata con microscopio SEM-EDS (Energy Dispersive Spectrometry), utilizzando il microscopio elettronico a scansione Philips XL 30 ESEM, presso il National Research Centre, Dokky, Cairo, Egitto.

2.5. Effetto di diverse concentrazioni di Sali NaCl, KCl and MgSO₄·7 H₂O (2.5,5 e 10%) sull'attività metabolica

Per indagare il deterioramento meccanico causato dagli streptomiceti, *S. coelicolor* e *S. canarius* sono stati innestati su dischi di calcare ed incubati per 3 settimane a 30°C.

2.6. Le indagini al microscopio elettronico a scansione (SEM)

I dischi di calcare (diametro 1.5 cm), inizialmente trattati con diverse concentrazioni di NaCl, KCl e MgSO₄·7 H₂O, sono stati innestati in condizioni asettiche con streptomiceti isolati ed incubati per 6 mesi a 30°C in becher contenenti 50 ml di acqua distillata per rendere adeguato l'ambiente umido. I campioni di dischi di calcare sono stati preparati per indagini al SEM secondo Milanesi et al., [21], mentre questi campioni sono stati fissati al 4% di glutaraldeide per 24 h e poi disidratati in alcool etilico al 25, 50, 75 and 100%, (un'ora per ogni step). I campioni sono stati successivamente rivestiti di particelle dorate e studiati al SEM, presso il National Research Centre, Dokky, Cairo, Egitto.

2.7. Estrazione e purificazione del pigmento rosso

Il pigmento rosso extracellulare prodotto dallo *S. canaries* sotto condizioni di stress (a diverse concentrazioni di NaCl) è stato estratto e purificato secondo Sterflinger, [36] e Baskar et al. [37]. Il ceppo dell' *S. canaries* è stato coltivato su medium di amido-nitrato, beute di Erlenmeyer (250 ml) contenenti 50 ml di medium con l'aggiunta di NaCl al 10%, incubato per 7 giorni a 30 °C.

Inoltre, vennero aggiunti 5 grammi di biomassa a una miscela di n-esano e acetone (92/8 v/v), poi centrifugate per 10 min. a 5000 rpm. Il volume della miscela organica che dissolveva il pigmento rosso è stato evaporato fino a 0.1 ml. Il risultante volume del pigmento dissolto è stato purificato su piastre TLC e la frazione del pigmento è stata analizzata utilizzando JASCO. FT/IR 61000, presso il National Research Centre, Dokky, Cairo, Egitto.

2.8. Determinazione degli aminoacidi

Gli aminoacidi prodotti da ceppi di streptomiceti sotto la spinta della salinità sono stati esaminati mediante un rilevatore di fluorescenza, adoperando HPLC analizzatore di aminoacidi LC300 eppendorf-Germania, presso il National Research Centre, Dokky, Cairo, Egitto, secondo Callejon et al., [38] mentre i ceppi degli streptomiceti furono coltivati su un medium di amido-nitrato-agar in beute Erlenmeyer 250 ml, contenenti ognuna 50 ml, incubate a 30°C per 7 giorni. 20µL del liquido vennero iniettati nella colonna (Luna C18,5 µm, 250 × 4.6 mm e guard colum 4.0 × 3.0 mm). Il rilevamento è stato effettuato tramite effluorescenza con una stimolazione a 250 nm ed emissione a 395 nm. La separazione è stata ottenuta a un tasso di flusso di 1 mL min⁻¹ a 34°C. I risultati sono stati riportati alla normalità contro la soluzione standard di 22 aminoacidi.

3. Risultati

3.1. Identificazione degli streptomiceti

La nostra ricerca ha determinato che tutti gli isolati identificati sono stati attribuiti al genere degli streptomiceti e sono stati attribuiti alle specie *S. albidofuscus*, *S.*

ambofaciens, *S. canaries*, *S. chibaensis*, *S. coelicolor*, *S. corchorusii*, *S. nigrifaciens* e *S. parvullus*. I numeri degli autori in ascesa nella Gene Bank internazionale sono stati illustrati nella Tabella 1.

Table 1. Appartenenza filogenetica dei ceppi inoculati (omologia di 16S r DNA e somiglianza in confronto con dati NCBI)

Location	Homology Approximately	Similarity enter genes 16S r DNA	Authors' accession number	G+C content
Azurite blue, tomb of Ihi, Tell Basta.	<i>S. albidofuscus</i>	99 %	Later name is <i>S. pyridomyceticus</i> BankIt1507621 JQ625331	58 %
Yellow color of Southern wall of Ankh h3 f tomb	<i>S. ambofaciens</i>	99 %	BankIt1507642 JQ625332	60.6 %
Blue color, ceiling burial tomb of Oserkon II, Tanis	<i>S. canaries</i>	99 %	BankIt1507650 JQ625337	58.9 %
Black color, tomb Ankh h.f, Tell Basta	<i>S. chibaensis</i>	100%	BankIt1507649 JQ625336	58.9 %
Red color, tomb Ankh m b3st, Tell Basta	<i>S. coelicolor</i>	99 %	BankIt1507648 JQ625335	59.2 %
Limestone, tomb of Oserkon II, Tanis	<i>S. corchorusii</i>	98 %	BankIt1507647 JQ625334	58.9 %
North wall, tomb of Ist, Tell Basta	<i>S. nigrifaciens</i>	98 %	Later name is <i>S. flavovirens</i> BankIt1507149 JQ625330	~56 %
Yellow color of Southern wall of Ankh h3 f tomb	<i>S. parvullus</i>	99 %	BankIt1507645 JQ625333	56.3 %

3.2. SEM-EDX della crosta bianca

Lo spettro SEM-EDX delle croste bianche riscontrate sul pigmento blu nella tomba di Oserkon II, ha rivelato che il cloruro di sodio (NaCl) era approssimativamente in forma pura, come illustrato nella Fig. 2 a.

Inoltre, la Micrografia SEM in figura 2b ha rivelato che il salgemma a forma d'ago, prima di raggiungere i cristalli cubici, si è formato nella forma tipica di salgemma e vene di salgemma nei blocchi di calcare della camera di sepoltura del re Oserkon II, Tanis (Figura 2c). La Figura 2d evidenzia la dissoluzione e precipitazione di calcite di acqua sotterranea in forma di stalattiti. L'analisi EDX delle croste bianche sulla superficie della tomba di Ihy nella figura 2e mostra che le croste sono di alite quasi puro.

3.3. Effetto del cloruro di sodio

In relazione all'effetto del NaCl sulla crescita degli streptomiceti, la Figura 3 e la Tabella 2 mostrano che le specie *S. coelicolor*, *S. ambofaciens*, *S. canarius* avevano riscontrato una buona crescita al 10% di NaCl; Il ceppo di *S. parvullus* raggiunse una buona crescita, le specie di *S. chibaensis*, *S. corchorusii*, *S. nigrifaciens* mostrarono una crescita moderata, mentre il ceppo di *S. albidofuscus* ottenne una crescita bassa alla stessa concentrazione. È stato evidenziato che il tasso di crescita diminuiva con l'aumento della concentrazione di NaCl fino al 10%, e l'*S. canaries* mostrava un'alta tolleranza NaCl al 10% e produceva pigmento rosso, non prodotto sotto culture normali (Fig. 4).

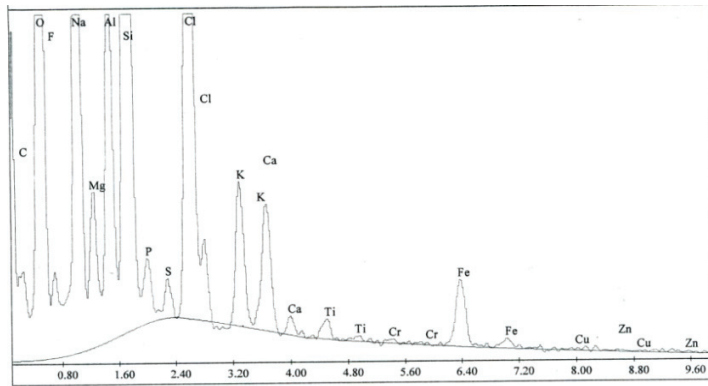


Figura 2.(a) Spettro EDX di efflorescenza Bianca dal soffitto, Tomba di Oserkon II, Tanis;



Figura 2.
 (b) forma dell'ago di salgemma nella stanza massimale, Tomba di Oserkon II, Tanis;
 (c) vene di salgemma all'interno dei blocchi di pietra calcarea, camera di sepoltura del re Oserkon II;
 (d) scioglimento e precipitazione di calcite, tomba del re Oserkon II

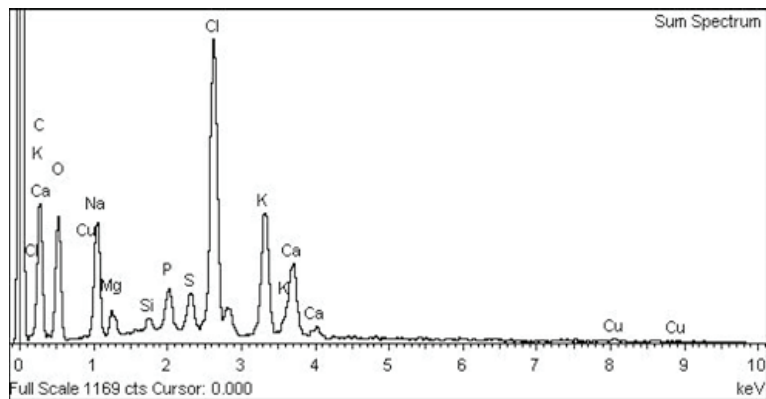


Figura 2. (e) EDX modello di crosta bianca della superficie calcarea, tomba di IHY, Tell Basta.

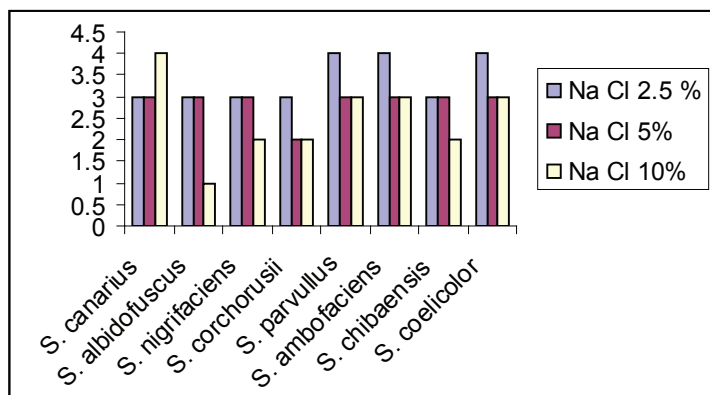


Figura 3. Effetto di differenti concentrazioni di Sali sulla crescita degli streptomiceti

Streptomyces	Salts concentrations (%)								
	NaCl			KCl			MgSO _{4,7} H ₂ O		
	2.5	5	10	2.5	5	10	2.5	5	10
<i>S. albidofuscus</i>	+++	+++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>S. ambofaciens</i>	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. albidofuscus</i>	+++	+++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>S. ambofaciens</i>	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. canarius</i>	+++	+++	++++	++	++	+++	++	++	+++
<i>S. chibaensis</i>	+++	+++	++	++++	+++	+++	++++	+++	+++
<i>S. coelicolor</i>	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++	++	+
<i>S. corchorusii</i>	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. nigrifaciens</i>	+++	+++	++	++	++	++	++++	+++	+++
<i>S. parvullus</i>	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++

(++++) very good growth (+++) good growth (++) moderate growth (+) low growth.

3.4. Effetto del cloruro di potassio

Il secondo sale più comune identificato negli affreschi deteriorati è KCl (Sylvite). Dalla Figura 5 e dalla Tabella 2, sembrava che i *S. coelicolor*, *S. chibaensis*, *S. ambofaciens*, *S. parvullus*, *S. corchorusii* avessero una crescita molto buona al 10% di KCl; Gli *S. canarius*, *S. albidofuscus* presentavano una buona crescita, ma l' *S. nigrifaciens* dimostrava una crescita moderata alla stessa concentrazione di KCl. Gli streptomiceti potevano svilupparsi fino al 10%, mentre la loro crescita al 15% era povera, e al 20% compromessa. La nostra ricerca ha indicato che KCl fino al 10% ha potenziato *S. ambofaciens* fino a produrre un pigmento rosato (Fig. 7c) e ha aumentato la formazione di spore del *S. coelicolor* dopo 14 giorni di incubazione.

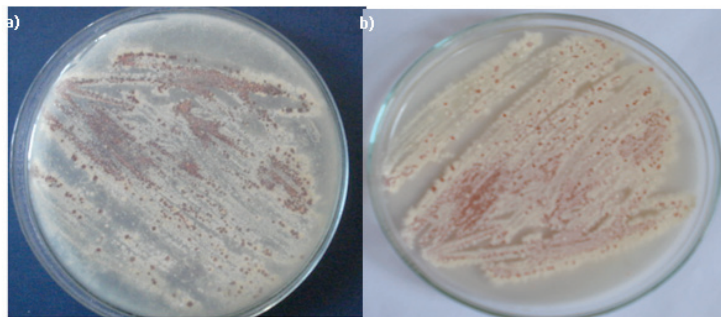


Figura 4. Coltura di laboratorio che illustra l'effetto del NaCl 10% sulla produzione di pigmento rosa da parte dello *S. canarius*.

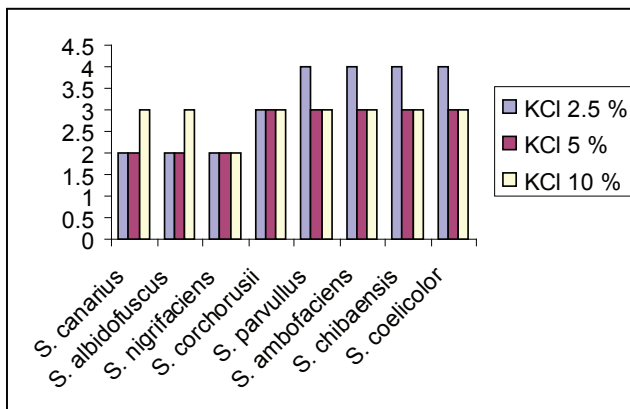


Figura 5. Effetto di diverse concentrazioni di KCl sulla crescita degli streptomiceti isolati

3.5. Effetto del solfato di magnesio

La Figura 6 mostra che *S. nigrifaciens*, *S. corchorusii*, *S. parvullus*, *S. ambofaciens* e *S. chibaensis* presentano una crescita ottimale al 10% di solfato di magnesio ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$), gli *S. canarius*, *S. albidofuscus* mostrano una buona crescita, mentre *S. coelicolor* dimostra una crescita moderata alla stessa concentrazione. I risultati attuali indicano che diverse concentrazioni al 2.5, 5 e 10% of NaCl, KCl e $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ incrementavano la formazione di spore di *S. coelicolor* e aumentavano la pigmentazione di *S. ambofaciens* (Fig. 7).

3.6. Schema IR del pigmento rosso

Il pigmento rosso è stato estratto con una miscela di *n*-esano e acetone (92/8 v/v) su piastre TLC (Figura 8 a). Da un lato, la figura 8 b mostrava che i solventi organici hanno differente dissoluzione per pigmento rosso, poiché l'acetone ha alta solubilità, mentre *n*-Hexan, cloroformio e metanolo presentano una dissoluzione moderata, ma l'etanolo ha bassa solubilità. D'altra parte, l'IR del pigmento rosso estratto indicava la presenza di Quinon (ON-OR) gruppo a 3457 centimetri-1, composti carbonilici ($R_2C=O$) a 1638 centimetri-1 e alcani (CH_2) a 957 cm^{-1} (Figura 8 c). Il pigmento rosso non è sensibile al pH, il suo colore rosso non cambia con il cambiare dei valori di pH. Infine, i dati HPLC indicano che tutti i ceppi di streptomiceti prodotte glutammico a NaCl 10% (dati non pubblicati).

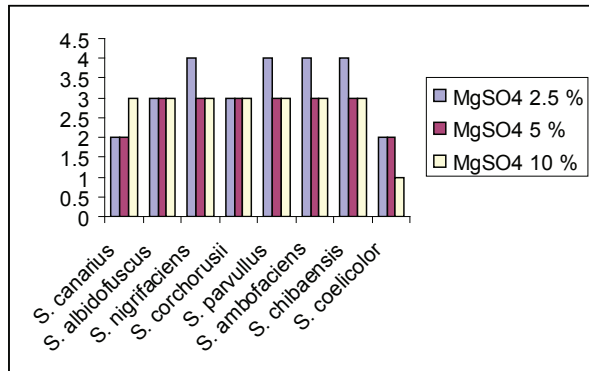


Figura 6. Effetto di differenti concentrazioni di $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ sulla crescita degli streptomiceti isolati

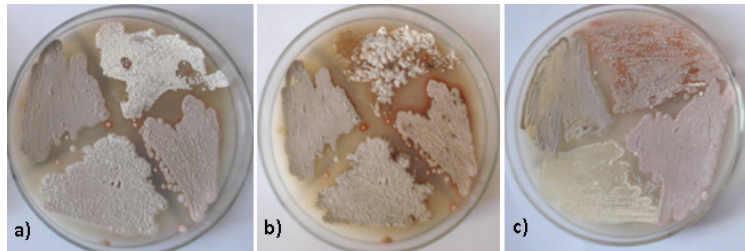


Figura 7. Effetto del KCl sulla crescita degli streptomiceti isolati: (a) Control, (b) Effetto del KCl al 2.5% sulla crescita del *Streptomyces coelicolor* (c): Pigmentazione dello *S. ambofaciens*.

3.7. Deterioramento meccanico

La figura 9 mostra miceli di streptomiceti, che allargano le fessure e le crepe causate dal sale, penetrando all'interno di spazi inter-granulari di cristalli di calcite, in dischi di calcare deteriorati.

La figura 10 mostra il livello di produzione di amminoacidi prodotti da streptomiceti isolati sotto stress di alta concentrazione di cloruro di sodio, in cui *S. albidofuscus* risulta il produttore principale, *S. Canarius*, *S. ambofaciens*, *S. nigrifaciens* e *S. chibensis* mostrano moderata produttività, e i restanti *S. coelicolor*, *S. corchorusii* e *S. parvullus* dimostrano scarsa produzione di amminoacidi.

4. Discussione

I dati selezionati mediante il sequenziamento del 16S rDNA hanno mostrato che tutti gli isolati hanno una somiglianza superiore al 98 % al genere degli streptomiceti, la specie più dominante nel biodeterioramento delle pitture murali degradate [4, 36]. D'altra parte, è stato riscontrato che gli streptomiceti sono i maggiori colonizzatori di pitture murali degradate e rappresentano un indicatore di una fase avanzata di deterioramento [28, 39]. Dalla rilevazione dei sali prelevati nelle tombe indagate, è stato riscontrato che i sali più comuni nella pittura murale deteriorata erano il cloruro di sodio, cloruro di potassio e solfato di magnesio, in accordo con i risultati di Arnold [41]. Il cloruro di sodio si verifica comunemente come impurità in precipitazioni di gesso. Questo sale, che non è prodotto da microrganismi, si può trovare comunemente negli strati di intonaco o nei supporti di calcare, in forma di venatura all'interno dei blocchi di calcare a causa di infiltrazioni di acqua sotterranea, oppure su un supporto di pietra o di dipinti [13]. Il cloruro di sodio è un sale igroscopico ad elevata solubilità, per cui si osserva solitamente nelle zone superiori dei dipinti nelle tombe, nella forma di uno strato bianco [41].

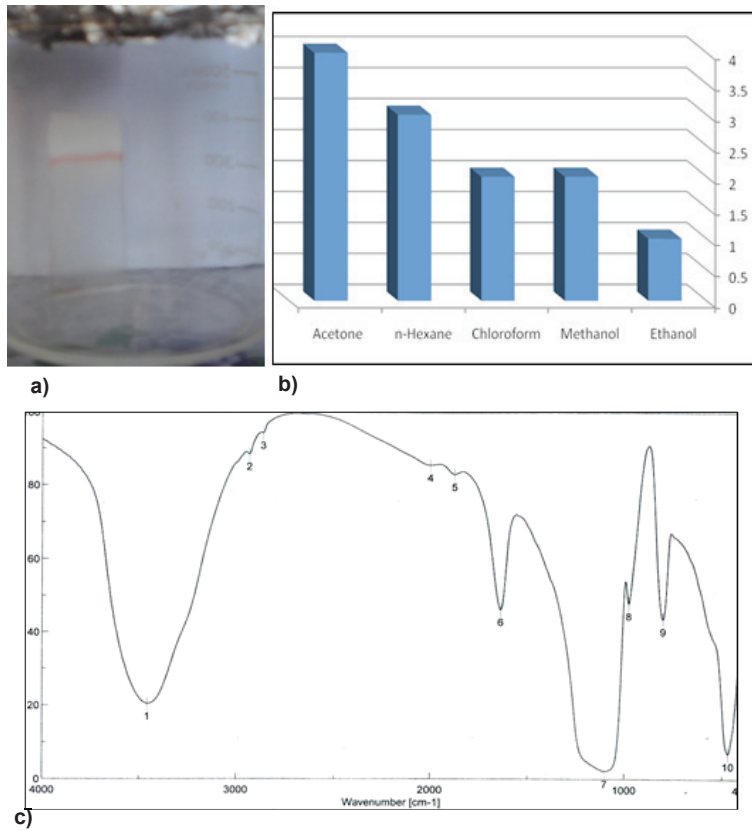


Figura 8. (a) Estrazione di pigmento rosso, (b) estraibilità del pigmento rosso con differenti solventi organici, (c) spettri IR di pigmento rosso prodotto da *S. canarini* sotto iper-salinità indotte da NaCl.

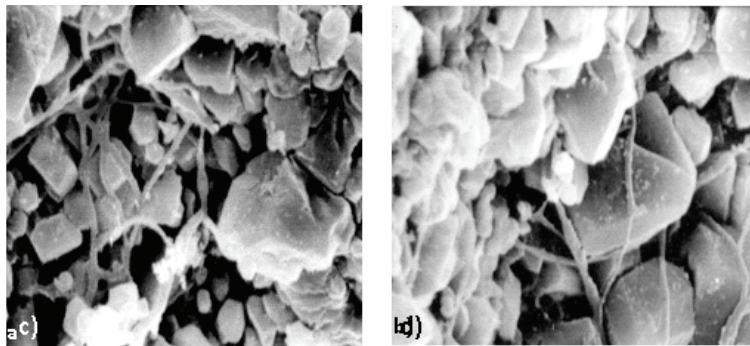


Figura 9. Micrografo SEM che illustra l'azione sinergica degli *Streptomyces* con i sali nel deterioramento dei dischi di calcare dalla tomba di Maat, a Tell Basta, X. 1500.

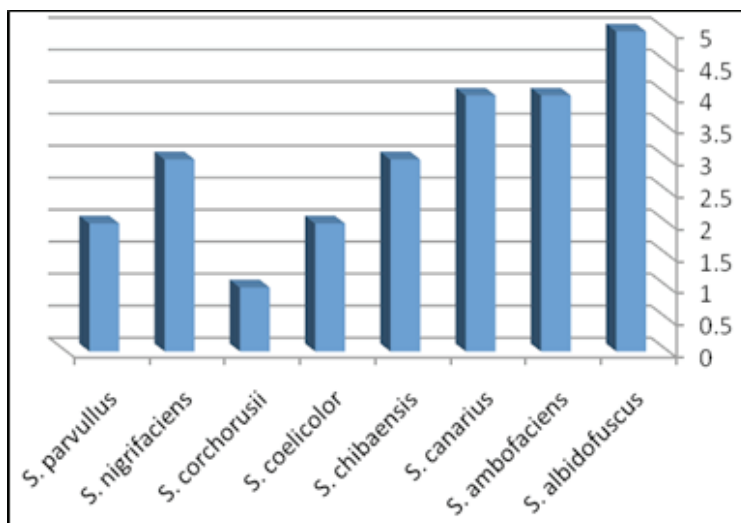


Figura 10. Produttività di aminoacidi da streptomiceti isolati

Esiste un legame molto stretto tra i sali e la colonizzazione di streptomiceti, in quanto i risultati ottenuti indicano che gli streptomiceti isolati variavano nel loro profilo di tolleranza al NaCl, in modo che diversi isolati potevano crescere e colonizzare zone specifiche di affreschi deteriorati a seconda dei sali presenti [42]. La nostra ricerca indica che la maggior parte degli streptomiceti isolati erano alotolleranti al cloruro di sodio fino ad una concentrazione del 10%, ed è stato riportato che la salinità ottimale del NaCl per innescare la colonizzazione di ceppi di streptomiceti era del 5-10 % [43,44]. Inoltre, le specie *Streptomyces* sp., *S. amctimycoticus* and *S. etfoliatus* isolate dalla tomba di Maat a Tell Basta potevano crescere in colture con l'aggiunta di NaCl fino al 13% [17]. Dall'altra parte, Milanese et al. [20] mostrarono che gli streptomiceti isolati dagli affreschi deteriorati avevano un'alta tolleranza alle concentrazioni di NaCl, sia nella realtà che sotto condizioni di laboratorio. Inoltre, Saiz-limenez e Samson [46] studiarono le efflorescenze degli affreschi del monastero di Santa Maria de la Rabida (Spagna), e identificarono gesso, cloruro di calcio, cloruro di sodio, cloruro di potassio, quarzo e silicati dove furono identificate le specie *Micrococcus luteus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*.

I risultati attuali indicano che *S. canarius* era alotollerante e poteva crescere fino ad una concentrazione del 10% di NaCl e in questa quantità questo isolato produceva un pigmento rosso di carotenoide che non era prodotto sotto colture normali. Inoltre, *S. canarius* venne isolato dalle efflorescenze, simili al cloruro di sodio puro, localizzate sul soffitto della stanza tombale del Re Oserkon II a Tanis e nella tomba di Ihy a Tell Basta. La produzione di pigmento è un meccanismo di difesa adottato dagli streptomiceti contro condizioni ambientali avverse come l'ipersalinità, e per questo tali pigmenti prodotti sono stati chiamati pigmenti protettivi [25,35].

Il secondo sale più comune rinvenuto nelle tombe analizzate era il cloruro di potassio che venne identificato nei dipinti della tomba di Ankh h3 f a Tell Basta, probabilmente grazie alla vicinanza di terre coltivate dove venivano usati fertilizzanti ad azoto [47]. Questa scoperta indicava che il cloruro di potassio (KCl Sylvite) aumentava la produzione di pigmento carotenoide e la formazione di spore come meccanismi di difesa da parte degli streptomiceti contro l'elevata salinità.

I nostri risultati hanno rilevato, nelle superfici murali pittoriche delle tombe analizzate, la presenza di solfato di magnesio, piuttosto frequente nelle pitture murali degradate [48], indicando che i ceppi isolati di streptomiceti potrebbero crescere fino ad una concentrazione del 10% di $MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$ e rilevando ibsmite presente sui dipinti di Ankh h3f a Tell Basta [47], solfato di magnesio cristallizzato in forme diverse, come Schonite ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$), keiserite ($MgSO_4 \cdot H_2O$), esaidrato ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$),

e ibsmite [40]. L'azione di cristallizzazione e di idratazione dei diversi sali è stata collegata con il biodeterioramento dei dipinti colpiti da streptomiceti nelle tombe indagate [19,40].

Le immagini al SEM mostravano che il micelio degli streptomiceti penetrava a livello intergranulare nella struttura dei cristalli di calcite a profondità considerevoli, e formava reti microbiche composte per la maggior parte da sostanze polimere espanse. Questi polimeri sono capaci di espandersi e restringersi in relazione ai cicli di umidificazione e asciugatura, in particolare in presenza di cloruro di sodio, che ha un'elevata ritenzione idrica. In accordo con i risultati di Suikko et al., [3] questa considerazione indica che la crescita degli streptomiceti che colonizzavano le superfici lapidee acceleravano il deterioramento meccanico, causato dalla penetrazione di un biofilm all'interno dei pori, relativo a cicli di sali, e dalla penetrazione che aumentava l'ampiezza e la profondità dei pori [40]. Le specie di streptomiceti che colonizzavano i dischi di calcare nella tomba di Maat a Tell Basta, aumentarono la porosità di questi ultimi fino al 7% dopo il trattamento con NaCl al 10% (50 cicli) [16].

Lo spettro IR del pigmento rosso estratto, relativo alla presenza del gruppo Quinon (ON-O) che è apparso a 3457 centimetri⁻¹, ci consente di attribuire il pigmento rosso prodotto da *S. Canarius* sotto stress di NaCl al 10% al carotenoido. I carotenoidi (C₄₀H₅₀) sono pigmenti lipofili con un colore giallo o rosso e sono di tre tipi: β -carotene, γ -carotene e rodoxantina. Questi pigmenti agiscono come stabilizzatori della membrana proteggendo le cellule microbiche da condizioni ambientali avverse come ipersalinità, irradiazione e assenza di nutrienti [36], per cui questo pigmento è definito un pigmento protettivo [26,27]. Il problema imposto dalla produttività di carotenoidi prodotti da streptomiceti nel deterioramento di affreschi, riguarda la formazione di un'alterazione cromatica su questi dipinti, sulle superfici lapidee e sugli strati di intonaco con macchie irreversibili, in particolare se il pigmento è di natura mesolitica [48,50]. Questo fenomeno è stato ben documentato negli affreschi della Cappella di San Virgilio, Vienna (Austria) da quando le specie di *Rubrobacter* isolati mostrarono un moderato comportamento alofilo al NaCl fino al 6% e causarono la decolorazione degli affreschi provocando macchie rosate [18].

Inoltre, I dati HPLC indicavano che tutti gli streptomiceti isolati identificati producevano acido glutammico a concentrazioni del 5-10% di NaCl e KCl, questo secondo Killham e Firestone, [51]. La produzione di aminoacidi da streptomiceti viene considerata un meccanismo di difesa contro l'elevata salinità. Ciò è stato attribuito alla preferenza degli streptomiceti verso gruppi di aminoacidi tra cui gli acidi glutammici, prolina e arginina per sostenere la loro crescita; di conseguenza, la produttività di aminoacidi variava anche all'interno di ceppi strettamente correlati fra loro [52].

5. Conclusioni

Possiamo concludere dicendo che gli streptomiceti costituivano la specie dominante sugli affreschi deteriorati nelle tombe di Tanis e Tell Basta e che sono risultati alotolleranti fino ad una concentrazione del 10% di NaCl, KCl e MgSO₄·7 H₂O. Inoltre, il 10% di NaCl potenziò la produzione di pigmento rosso carotenoido per la specie *S. Canarius*. L'acido glutammico e altri aminoacidi rappresentano prodotti derivativi dagli streptomiceti isolati come meccanismo di difesa contro l'ipersalinità.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare il Professore Gamal El Didamony del Dipartimento di Botanica, Facoltà di Scienze, Zagazig University per la revisione di questo articolo e per le utili discussioni.

Note biografiche

Akmal Ali Sakr possiede un PhD in conservazione dei dipinti murali con una tesi sul ruolo degli Attinomiceti nelle alterazioni cromatiche dei dipinti nelle tombe egizie. Egli lavora presso il Dipartimento di Conservazione del Museo Nazionale della civiltà egiziana, Cairo, Egitto. Egli ha pubblicato alcuni articoli sul ruolo degli streptomiceti nel biodeterioramento del patrimonio e sulle modalità dei trattamenti. Attualmente, è in corso di stampa il suo libro dal titolo "Il ruolo degli Attinomiceti nel deterioramento dei beni culturali". Egli è coinvolto in progetti internazionali quali: Progetto congiunto con l'Accademia Bulgara delle Scienze sulla modifica dei polimeri utilizzati nella conservazione dei dipinti murali dagli antibiotici prodotti da streptomiceti; progetto

finanziato dall'Università di Zagazig, "Uso di antibiotici prodotti da streptomiceti nel biocontrollo dei microrganismi che colonizzano le pitture murali", il progetto Egitto-Italia: "Applicazione di enzimi microbici e battericidi nella conservazione dei dipinti murali deteriorati"; il progetto Egitto-Francia: "Elucidazione del legame tra lipidi depositati e la produzione di antibiotici prodotti da streptomiceti " e, "Utilizzo di oli essenziali nel trattamento di microrganismi colonizzanti le pitture murali nelle antiche tombe egizie" presso la Facoltà di Scienze, Università di Zagazig, Egitto.

Mohammed Farouk Ghaly possiede un PhD in Tassonomia degli Attinomiceti ed è vicepresidente della Facoltà di Scienze, Università di Zagazig per le questioni ambientali e professore di Microbiologia presso il Dipartimento di Botanica.

Mona Fouad Ali possiede un PhD in conservazione ed è un professore di Conservazione presso il Dipartimento di conservazione della Facoltà di Archeologia, Università del Cairo, Egitto.