

## **Identificazione di taxa batterici in reperti lignei di interesse archeologico**

**Franco Palla, Giovanna Barresi, Enza Di Carlo**

Laboratorio di Biologia e Biotecnologie per i Beni Culturali,  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche  
(STEBICEF),  
Università degli Studi di Palermo, Italia

**Parole chiave:** legno archeologico sommerso, biodeterioramento, SEM, tecniche molecolari

### **1. Introduzione**

La conservazione dei reperti lignei sommersi d'interesse archeologico presenta diverse problematiche vista la particolare vulnerabilità dei materiali sia ai fattori di natura fisica e chimica, sia biologica con particolare riferimento a colonizzazioni fungine e batteriche [1 - 2].

La caratterizzazione dello stato di conservazione del legno archeologico sommerso è spesso basata sull'analisi micro-morfologica, avvalendosi della Microscopia Ottica ed Elettronica a Scansione [3 - 4]. Altre informazioni necessarie sono quelle inerenti l'ambiente in cui i reperti sono stati ritrovati (pH, temperatura, salinità dell'acqua, caratteristiche dei sedimenti) che concorrono al degrado abiotico e biotico del reperto [2].

La rivelazione e identificazione di alterazioni riconducibili a colonizzazioni biologiche è di fondamentale importanza al fine di distinguere i processi di degrado intercorsi durante il periodo di giacitura nel sito sommerso da quelli riconducibili alle fasi di manutenzione e conservazione in depositi o sale espositive museali. L'azione di alcuni microrganismi comporta notevoli cambiamenti nella struttura anatomica, nelle proprietà fisiche e nella composizione chimica del legno, con profonde implicazioni per la stabilità dimensionale dei reperti. Riguardo la colonizzazione batterica, i reperti sommersi offrono un habitat ideale per molte comunità, ma l'identificazione delle specie coinvolte è, principalmente, realizzata mediante colture in vitro o valutando le alterazioni nella struttura micromorfologica [5 - 8].

I principali colonizzatori del legno sommerso sono i cosiddetti batteri da erosione (EB), che tollerano basse concentrazioni di ossigeno e da tunnelling (TB). Le osservazioni SEM mostrano che l'effetto erosivo si manifesta con la formazione di profondi canali, paralleli alle microfibrille della parete cellulare [4] e la loro attività comporta la perdita della componente lignocellulosica della parete cellulare. I TB sono in grado di alterare gli elementi della lamella mediana, ricca in lignina, degradando tracheidi, fibre e vasi, prima di giungere al lume della parete cellulare [2, 8 - 9].

In base alla natura dei sedimenti marini e con limitata disponibilità di ossigeno, al degrado microbiologico è associato l'accumulo di composti di zolfo e ferro. Nel momento in cui il legno è recuperato dal fondale marino e sottoposto a condizioni aerobiche, con fluttuazioni nei valori di umidità, i solfuri di ferro danno origine a melanterite, rozenite, jarosite. Inoltre, la presenza di composti dell'ossidazione dello zolfo dà origine alla formazione di aggregati di colore giallo, arancione e bianco, o può indurre la formazione di pirite [10 - 12].

In ambienti con bassa concentrazione di ossigeno, i residui organici e di cellulosa prodotti dell'attività litica dei batteri da erosione (EB) favoriscono lo sviluppo di batteri solfato-riduttori (SRB) in grado di produrre idrogeno solforato ( $H_2S$ ). Gli ioni  $HS^-$  reagiscono nelle zone ricche in lignina per formare composti organici dello zolfo (in particolare tioli) oppure creano, unitamente a ioni ferro provenienti dalla corrosione degli oggetti metallici, particelle di solfuri di ferro che si depositano nelle cavità del legno [10].

In questi ultimi decenni il ricorso a tecniche molecolari ha permesso la rivelazione e identificazione di specie microbiche anche in reperti archeologici, basandosi sull'analisi di specifiche sequenze del DNA genomico microbico, estratto direttamente dai campioni, corrispondenti alle regioni 16S e ITS - Internal Transcribed Sequence del rDNA [13 - 15].

In questo studio, l'analisi SEM e il ricorso alle indagini molecolari hanno permesso di rivelare specifiche alterazioni strutturali e delle cellule del legno, attribuibili a colonizzazioni batteriche, oltre la presenza di framboidi di pirite ( $\text{FeS}_2$ ) organizzati anche in cluster. L'analisi molecolare basata sull'amplificazione in vitro (Polymerase Chain Reaction) delle sequenze di DNA 16S e ITS – rDNA [16-18] ha permesso sia la identificazione di batteri che presentano attività ligninolitica o cellulosa litica, dei generi *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Xanthomonas*, sia di batteri ferro - ossidanti e solfato - riduttori (*Marinobacter* spp., *Desulfurudis audaxviator*), altrimenti non rilevabili con le tradizionali metodiche colturali.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Campionamento

I campioni sono stati prelevati, utilizzando bisturi e anse sterili, da cinque diverse aree dei reperti lignei (Figura 1), in corrispondenza di aree bruno-nerastre o con efflorescenze. I campioni (w1, w2, w3, w4, w5) sono stati utilizzati per le analisi SEM e per l'estrazione del DNA genomico batterico, ottenuto sia direttamente dai frammenti lignei, sia dalle singole colonie isolate su terreno Nutrient agar (Difco).

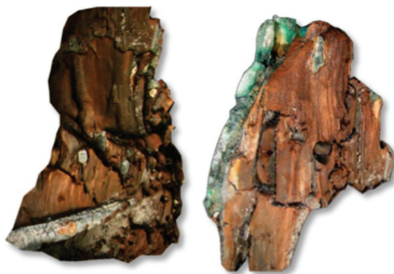


Figura 1. Reperti lignei da cui sono stati prelevati i campioni (w1-w5)

### 2.2. Analisi microscopiche

Per le osservazioni al SEM (Leica, Cambridge Leo-400) le sezioni sottili dei campioni sono state metallizzate con micro particelle d'oro (13 nanometri) mediante Agar-Auto-Sputter-Coater (B7341).

### 2.3. DNA genomico batterico e identificazione batterica

Il DNA genomico batterico è stato ottenuto da singole colonie isolate su terreno di crescita Nutrient Agar, mediante rapida lisi in 1X TE (10mM Tris-HCl pl 7.5/ 1mM EDTA) a 94°C per 3 min.

Per l'estrazione del DNA dai campioni lignei, sono stati utilizzati lo Stool mini kit (Quiagen) o il genomic DNA Purification kit (Fermentas), modificati come segue: incubazione a 65°C per 4 ore in presenza di 5 mg/ml di Proteinase K (Invitrogen).

Il DNA genomico è stato utilizzato come stampo nelle reazioni di PCR (Polymerase Chain Reaction), impiegando primer 16S specifici per *Pseudomonas*, *Cellulomonas* e *Bacillus*, o universali per la regione ITS (16S-23S, Internal Transcribed Spacer) del rDNA [19]. La miscela reazione conteneva: DNA genomico (5 µl da soluzione di estrazione mediante kit o 40 ng di DNA), 1X Reaction Buffer, 10 µM primer forward, 10 µM primer reverse, 2 µM dNTP mix, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 U/µl Taq DNA polimerasi

(Invitrogen). Il profilo di amplificazione utilizzato ha previsto: 1 ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 5 min; 30 cicli: denaturazione a 94°C per 1 min, appaiamento a 50 (16S) –58°C (ITS) per 1 min, estensione a 72°C per 2 min. Infine un ciclo di estensione (72°C per 7 min). I frammenti di DNA prodotti sono stati analizzati per elettroforesi su gel di agarosio (2%) in 1X TAE (50X TAE = 40 mM Trizma base, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.4), in 1X SYBR-safe DNA gel stain (Invitrogen). La composizione nucleotidica dei prodotti PCR è stata determinata mediante il servizio di sequenziamento Eurofins MWG Operon [20] e la ricerca dell'omologia di sequenza realizzata mediante la piattaforma BLAST [21].

### 3. Risultati

#### 3.1. Analisi microscopiche

Le indagini SEM della sezione trasversale dei campioni mostrano un'alterazione strutturale che interessa sia la lamella mediana sia le pareti cellulari (Figura 2 B). Il deterioramento della struttura è inoltre mostrato in Figura 3 A-B, dove le pareti cellulari appaiono distorte o presentano diverse fratture, in alcuni casi causate dalla presenza di aggregati cristallini interni (Figura 3C). La presenza di framboidi di pirite, singoli o in cluster, è evidente nelle Figure 4 A- B- C. Effetti di erosione, riconducibili a batteri, sono mostrati in Figura 5 A-B.

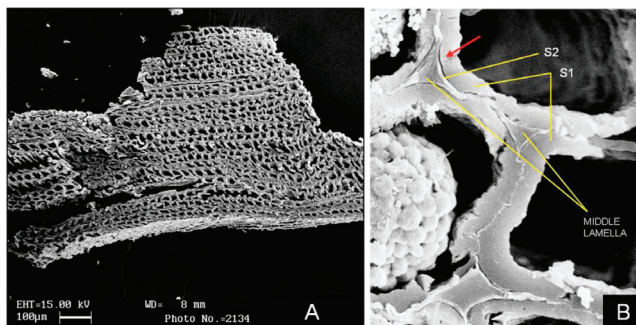


Figura 2. Micrografie SEM: A) Sezione trasversale; B) degrado dello xilema, la freccia in rosso indica il distacco della parete secondaria (S2) dalla lamella mediana.

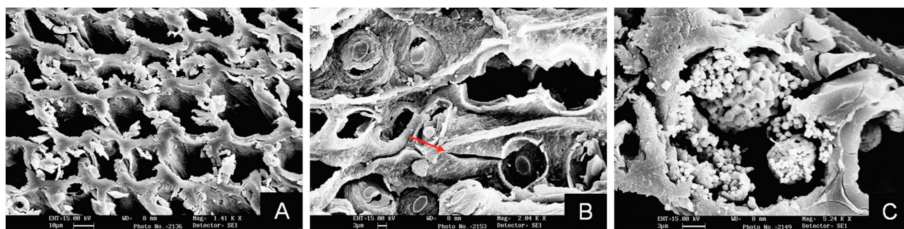


Figura 3. Micrografie SEM: A) Sezione trasversale: la struttura appare distorta a causa della perdita di resistenza meccanica; B) sezione radiale: sono presenti fratture e rotture (freccia in rosso) nella parete cellulare; C) sezione trasversale: la presenza di aggregati cristallini ha provocato la rottura della parete cellulare.

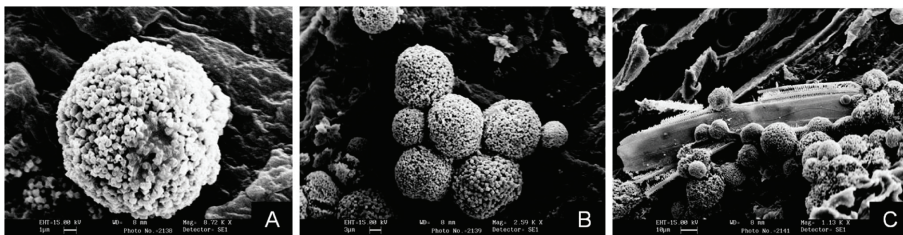


Figura 4. Micrografie SEM: Framboidi di pirite come singoli aggregati (A) o disposti in cluster (B); presenza di diatomee (C)

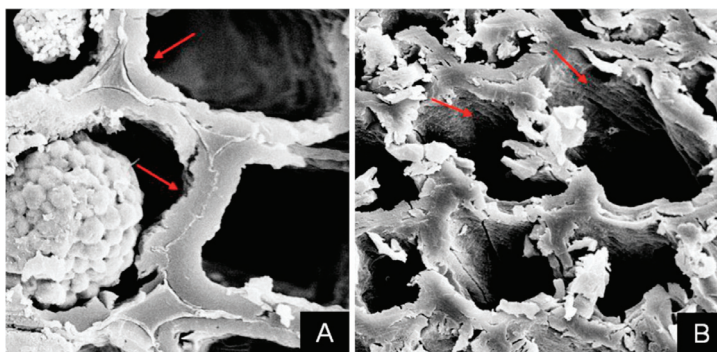


Figura 5. Micrografie SEM. A-B) Degrado da erosione delle pareti cellulari, riconducibile all'azione batterica (freccie in rosso)

### 3.2. Amplificazione delle sequenze 16S e ITS rDNA

I prodotti delle reazioni PCR sono stati risolti su gel d'agarosio al 2%, il loro sequenziamento e l'analisi mediante la piattaforma BLAST ha permesso di identificare batteri cellulosolitici appartenenti ai generi *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, la cui presenza è stata rilevata nella maggior parte dei campioni analizzati. In particolare per il campione w3 utilizzando i primer ITS sono stati ottenuti frammenti PCR di dimensioni pari a 220 bp, 750 bp, 680 bp (Figura 6A) riconducibili, dopo sequenziamento, rispettivamente a *Desulforudis audaxviator*; *Marinobacter* sp. (solfato – riduttore, ferro – ossidante), *Xanthomonas* sp. (lignino litico). L'utilizzo dei primer 16S ha rivelato la presenza di batteri del genere *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, i cui prodotti PCR sono rispettivamente di dimensioni pari a 201 bp, 181 bp e 338 bp (Figura 6B). Inoltre, batteri del genere *Sphingomonas* sono stati rivelati nel campione w2, in grado di idrolizzare mono e polisaccaridi.

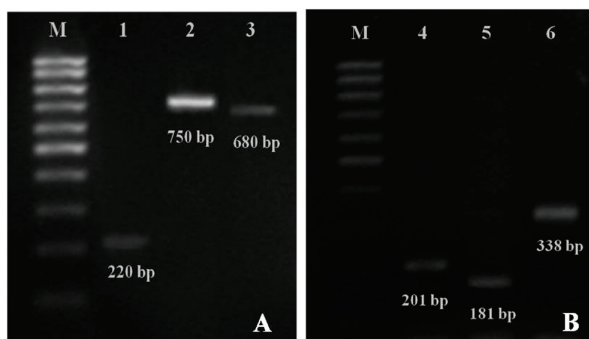


Figura 6. Gel elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. prodotti delle reazioni PCR del campione w3: A) corsie 1-3, amplificazione con primer universali ITS 16-23S rDNA; B) corsia 4-6, amplificazione con primer specifici 16S-rDNA. M= DNA marker Sharpmass (Euroclone)

Tabella 1. Batteri identificati mediante amplificazione delle porzioni 16S o ITS del rDNA

	DNA (COLONIE BATTERICHE)					DNA (FRAMMENTI LIGNEI)									
	ITS – PCR					ITS - PCR					16S - PCR				
	w1	w2	w3	w4	w5	w1	w2	w3	w4	w5	w1	w2	w3	w4	w5
<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+	+	+							+	+	+	+	
<i>Cellulomonas</i> spp.	+	+			+						+	+	+		
<i>Bacillus</i> spp.	+	+		+									+	+	+
<i>Xanthomonas</i> spp.			+												
<i>Desulforudis audaxviator</i>						+		+							
<i>Sphingomonas</i> spp.							+								
<i>Marinobacter</i> spp.								+							

#### 4. Conclusioni

Le indagini diagnostiche eseguite su manufatti d'interesse storico-artistico forniscono informazioni indispensabili per la valutazione dello stato di conservazione e in particolare per l'identificazione di colonizzazioni microbiche legate ai processi di biodeterioramento. Anche se non sempre di facile attuazione, l'identificazione dei componenti di un consorzio microbico riveste notevole importanza nella realizzazione di interventi compatibili sia con il manufatto/reperto, sia con l'operatore che con l'ambiente; questo permette di eliminare o contrastare la crescita microbica, in modo mirato. Nel presente studio sono stati utilizzati protocolli elaborati ad hoc per la caratterizzazione di taxa batterici che colonizzano il legno archeologico sommerso. In particolare, lo studio ha previsto l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione (SEM) per osservare le alterazioni strutturali dei frammenti e la messa a punto di protocolli molecolari, basati sull'analisi del DNA genomico microbico per rivelazione e identificazione di colonizzazioni batteriche.

In particolare, sono stati identificati batteri che presentano attività ligninolitica o cellulolitica, appartenenti ai generi *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, e *Xanthomonas* (oltre a *Sphingomonas*) e batteri ferro -ossidanti o solfato - riduttori, rispettivamente *Marinobacter* sp. e *Desulforudis audaxviator*, altrimenti non rilevabili con le tradizionali metodiche colturali.



*Le indagini molecolari hanno permesso di completare l'identificazione dei batteri presenti nei reperti attraverso l'analisi del DNA genomico microbico ottenuto dalle colonie isolate su terreno agarizzato o direttamente estratto dai campioni lignei. Combinando i risultati delle osservazioni al SEM e delle indagini molecolari, è possibile correlare le popolazioni microbiche con le alterazioni strutturali, al fine di redigere il protocollo di restauro conservativo più opportuno nel rispetto dell'integrità del reperto.*

### **Ringraziamenti**

Gli autori ringraziano C. Di Liberto per le analisi SEM.

### **Note biografiche**

**Franco Palla** è professore associato di Scienze Botaniche Applicate e Ambientali dell'Università di Palermo, Italia. Ricopre il ruolo di Docente e Vice-Coordinatore accademico del corso di Laurea quinquennale in Conservazione e Restauro dei Beni Culturali. Egli è un membro dell'Ordine Nazionale dei Biologi della Commissione per la Protezione dei Beni Culturali, coordinatore scientifico del UNIPA Unità di

Ricerca-Progetto PON01\_00625, IT@CHA (Tecnologia italiana per applicazioni avanzate nei Beni Culturali). Egli è uno dei membri dei gruppi di lavoro di esperti del progetto di cooperazione Italia -Cambogia in "Formazione degli esperti di Beni Culturali", Università di Palermo-Reale Università di Belle Arti e del Ministero della Cultura e delle Belle Arti, Angkor, Cambogia. Egli è Consulente scientifico nel campo di deterioramento biologico, in progetti di restauro riguardanti i siti archeologici, opere d' arte e di manufatti storico-artistici. Il Professor Palla è anche membro del comitato consultivo del Journal "Conservation Science in Cultural Heritage". Attualmente il Professor Palla è il coordinatore scientifico del Laboratorio di Biologia e Biotecnologie per i Beni Culturali presso il Dipartimento di Scienze Biologiche, Chimiche, Farmaceutiche e della Tecnologia (STEBICEF) presso l'Università degli Studi di Palermo.

**Giovanna Barresi** si è laureata in "Scienze per la Conservazione e il Restauro" presso l'Università di Firenze. Svolge attività in campo diagnostico - analitico, e di ricerca applicata per la pulitura enzimatica della superficie di manufatti d'interesse storico-artistico, presso il Laboratorio di Biologia e Biotecnologie per i Beni Culturali del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo.

**Enza Di Carlo** si è laureata in "Scienze Biologiche" presso l'Università di Palermo e ha conseguito la specializzazione in "Microbiologia e Virologia" presso la Scuola di Medicina e Chirurgia dello stesso Ateneo. È Assegnista di ricerca presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Laboratorio di Biologia e Biotecnologie per i Beni Culturali dell'Università degli Studi di Palermo, dove svolge attività di monitoraggio microbiologico degli ambienti di conservazione e fruizione dei Beni Culturali.