

T2.4 Analisi genetiche, biochimiche e microbiologiche. (D. Uccelletti) [RM1, D. Uccelletti].*Caratterizzazione microbiologica del cuoio*

La validazione del metodo di disinfezione mediante la sorgente di raggi X REX di ENEA Frascati (descritto nelle precedenti relazioni) e l'individuazione della *dose soglia* in grado di inibire la crescita batterica sugli stessi campioni di cuoio affetti da bio-deterioramento è stata effettuata tramite una caratterizzazione microbiologica (**Dipartimento di Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università Sapienza, Prof. D. Uccelletti**).

Sono stati effettuati campionamenti prelevando, mediante l'uso di tamponi sterili, campioni batterici su porzioni di cuoio che presentavano decorazioni di origine spagnola.

Le culture batteriche sono state fatte crescere a 30°C e sono state piastrate su appositi terreni "agarizzati" che hanno reso possibile l'isolamento in base alle diverse morfologie delle colonie batteriche. I batteri formanti tali colonie sono stati poi identificati attraverso l'amplificazione del DNA ribosomale 16s e successivamente sequenziati. Il sequenziamento ha permesso di identificare diversi microrganismi, tra cui il batterio Gram-positivo *Bacillus cereus* e il Gram-negativo *Massilia timonae*. In letteratura diversi studi descrivono come le due specie batteriche siano coinvolte nel processo di deterioramento di beni culturali (Jroundi et al., 2017; Herrera et al., 2004).

Normalmente il degrado di monumenti o altri substrati come affreschi e pergamene, è causato dalla capacità dei microorganismi di formare biofilm. In particolare un biofilm è un insieme di batteri, appartenenti alla stessa specie o a specie diverse, che si aggregano tra di loro andando ad aderire su un determinato substrato. Una volta aderite le prime cellule "pioniere", le altre cellule si aggiungono, producendo una vera e propria massa di batteri che effettuano scambi tra loro, depositando una matrice extracellulare che evita la dispersione di acqua (Dakal and Cameotra, 2012). La capacità di formare biofilm e di conseguenza la loro attività metabolica, fanno sì che i microrganismi degradino i diversi substrati a cui aderiscono, attraverso la produzione di pigmenti o acidi organici e inorganici. Per analizzare se i due isolati dai cuoi producessero biofilm, sono state effettuate crescite su substrati di plastica e dopo 24 ore analizzate al microscopio. Entrambi gli isolati mostrano capacità di formare biofilm, in modo particolare *M. timonae*, il quale mostra una formazione di biofilm dell'80% più alta rispetto a *B. cereus*.

Inoltre, da test di suscettibilità agli antibiotici, *M. timonae* risulta essere resistente a più antibiotici rispetto a *B. cereus*, sottolineando la sua minaccia nell'ambito del biodeterioramento dei beni culturali. In questi test sono stati utilizzati 20 diversi antibiotici, tra cui inibitori della sintesi della parete cellulare, sintesi proteica e di acidi nucleici.

Dopo la caratterizzazione dei due isolati batterici, è stata valutata l'attività antimicrobica dell'irraggiamento con i raggi X a dosi crescenti. In particolare, i campioni di cuoio sono stati tagliati in quadrati di 1x1 cm² e sterilizzati sotto lampada UV su entrambi i lati. Una carica batterica di 7*10³ cell/mL è

stata poi depositata sulla superficie dei campioni e successivamente irraggiata con raggi X della sorgente ENEA-REX alle dosi di 250, 500 e 750 Gy. Il controllo non irraggiato e i campioni irradiati nelle diverse condizioni sono stati poi immersi in una soluzione salina per permettere il recupero dei batteri. Un'aliquota della soluzione è stata piastrata su piastre agarizzate e incubata a 30°C per 24 h. La conta delle colonie cresciute sulle piastre ha permesso di evidenziare una riduzione della carica microbica di *B. cereus*, rispetto al controllo non trattato, del 92%, 34% e 16%, in seguito alle rispettive dosi di irraggiamento: 250 Gy, 500 Gy e 750 Gy.

L'attività antimicrobica è stata ulteriormente evidenziata dopo irraggiamento di campioni contaminati dal Gram-negativo *M. timonae*. All'aumentare della dose di irraggiamento, si assiste ad una riduzione del 44% e dell'11% in seguito alle dosi rispettive di 250 Gy e 500 Gy. Una totale assenza di colonie è stata osservata invece in seguito a trattamento con 750 Gy (figura 1).

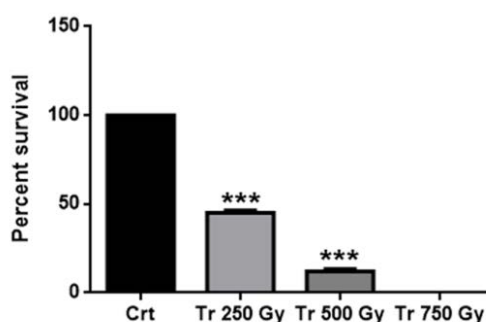


Fig. 1 sopravvivenza cellulare di *M. timonae* dopo irraggiamento. ANOVA analysis e Bonferroni post-test (* $p < 0.5$, e *** $p < 0.001$ rispetto al controllo Crt).