



Report Progetto ADAMO
Responsabile Prof. Daniela Uccelletti

Nell'ambito del progetto ADAMO, sono stati effettuati ed integrati due approcci microbiologici per la valutazione del biodegrado nella Basilica di S. Nicola in Carcere a Roma. È stato eseguito un protocollo consistente nel campionamento mediante nastro adesivo in zone danneggiate dal biodegrado, nell'estrazione del DNA, amplificazione PCR con primer universali [batteri (16S), funghi (ITS) e Viridiplantae (18S)] e sequenziamento degli ampliconi mediante le tecnologie Oxford Nanopore (ONT). Le sequenze sono state analizzate mediante una pipeline bioinformatica scritta ad hoc: ALISIA, "AmpLIcon SequencIng Analysis". ALISIA è in grado di effettuare un'analisi tassonomica mediante BLAST, un tool che permette di risalire, partendo da una singola sequenza di DNA sequenziato, alla specie a cui appartiene e quindi caratterizzare il microbioma presente nel campione analizzato. Questa analisi bioinformatica mostra come è possibile aumentare la conoscenza del microbioma presente su beni culturali, coinvolto in attività di biodegrado, informazione importantissima per poter adottare una corretta strategia di conservazione del sito.

In particolare, i dati ottenuti sono mostrati in Figura 1.

Fungi
ITS1-ITS4

Species	Number of reads	%
Capnobotryella sp.	310	15,48%
uncultured fungus	266	13,28%
Devriesia sp.	166	8,29%
Passalora sp.	151	7,54%
Capnodiales sp.	84	4,19%

Plants
EukA-EukB

Species	Number of reads	%
Arachis hypogaea	274	18,34%
Brassica oleracea	241	16,13%
Gossypioides kirkii	93	6,22%
Parietaria judaica	90	6,02%
Citrus aurantium	86	5,76%

Bacteria
27F-1495R

Species	Number of reads	%
uncultured bacterium	803	24,95%
Nesterenkonia sp.	516	16,03%
Nesterenkonia xinjiangensis	229	7,12%
Nesterenkonia halobia	113	3,51%
Amycolatopsis albisporea	88	2,73%



Figura 1. Identificazione di microorganismi isolati dalla zona ipogea e identificati mediante la tecnologia Oxford Nanopore (ONT).

Per convalidare i dati di sequenziamento, i risultati ottenuti sono stati integrati con le tradizionali tecniche di microbiologia che hanno permesso l'isolamento di alcuni batteri coltivabili.

In particolare, è stato effettuato un campionamento nella Basilica in cui sono stati prelevati, mediante l'uso di tamponi sterili, campioni batterici e fungini. I prelievi sono stati effettuati su pareti dell'abside sia prima che in seguito ad interventi di restauro, nelle zone prossimali all'abside stesso e nella zona ipogea. Dopo aver fatto crescere i campioni a 30°C, questi sono stati piastrati su appositi terreni agarizzati che hanno reso possibile l'isolamento in base alle diverse morfologie delle colonie batteriche e fungine (Figura 2).



Figura 2. Piastre ottenute dal campionamento nella zona ipogea della Basilica di S. Nicola in Carcere.

I microorganismi formanti tali colonie sono stati poi caratterizzati in base alla colorazione Gram e la resistenza agli antibiotici. Tra i sei isolati batterici ottenuti, cinque sono risultati essere Gram-negativi, uno Gram-positivo e hanno mostrato



avere numerose resistenze agli antibiotici. Successivamente i campioni batterici sono stati identificati mediante sequenziamento, sottolineando la presenza di specie batteriche realmente coinvolte nei processi di biodeterioramento. In particolare, le specie ottenute sono risultate appartenere a *Arthrobacter aurescens* IP1, *Achromobacter xilosoxydans* IP2, *Paenibacillus pabuli* IP3, *Kocuria rhizophila* IP5, *Bacillus licheniformis* IP7 *Stenotrophomonas maltophilia* IP9 (Figura 3).



	<i>A. aureescens</i> IP1 Gram positive	<i>A. xilosoxydans</i> IP2 Gram negative	<i>P. pabuli</i> IP3 Gram negative	<i>K. rhizophila</i> IP5 Gram negative	<i>B. licheniformis</i> IP7 Gram negative	<i>S. maltophilia</i> IP9 Gram negative
Vancomicina	- (1,0 cm)	R	- (1,3 cm)	- (0.8 cm)	- (1 cm)	- (0.5 cm)
Clindamicina	- (0,7 cm)	R	R	R	- (0.6 cm)	R
Cefalotina	- (0,7 cm)	R	R	R	- (1 cm)	R
Tobramicina	- (0,4 cm)	0,3 cm	- (0.7 cm)	- (0.5 cm)	- (0.7 cm)	- (0.5 cm)
Ampicillina	- (1,3 cm)	R	- (0.8 cm)	- (0.9 cm)	- (1.2 cm)	R
Cefotaxima	- (0,9 cm)	R	R	R	- (0.7 cm)	R
Cloramfenicolo	- (1,4 cm)	1,3 cm	- (0.6 cm)	- (1 cm)	- (1 cm)	- (1 cm)
Tetraciclina	- (1,2 cm)	0,5 cm	- (1.7 cm)	- (0.8 cm)	+	- (0.5 cm)
Eritromicina	- (1,0 cm)	R	- (1.5 cm)	R	- (0.5 cm)	R
Amikacina	- (0,6 cm)	0,5 cm	- (1.1 cm)	- (0.6 cm)	- (0.9 cm)	- (0.5 cm)
Oxacillina	- (0,5 cm)	R	R	R	- (0.5 cm)	R
Fosfomicina	R	R	R	- (1.1 cm)	R	R
Rifampicina	- (0,7 cm)	R	- (1.2 cm)	- (1.2 cm)	- (1.5 cm)	R
Gentamicina	- (0,4 cm)	R	- (0.7 cm)	- (0.7 cm)	- (0.7 cm)	- (0.4 cm)
Penicillina	- (1,4 cm)	R	- (1 cm)	R	- (1 cm)	R
Aztreonam	R	R	R	R	+	R
Carbenicillina	- (0,8 cm)	R	- (0.4 cm)	R	- (0.7 cm)	R
Mezlocillina	- (1,8 cm)	R	- (1 cm)	- (0.7 cm)	- (1.2 cm)	+
Streptomicina	- (1,9 cm)	0,5 cm	R	R	- (1 cm)	- (0.7 cm)
Cefuroxima	- (1,0 cm)	R	- (1,3 cm)	- (0.8 cm)	- (1 cm)	- (0.5 cm)

Figura 3. Analisi delle resistenze agli antibiotici nei ceppi batterici isolati.

In seguito è stata valutata la loro capacità di formare biofilm su substrati di vetro e plastica, dal momento che il processo di biodeterioramento di beni culturali è dovuto all'attività metabolica di microrganismi aggregati in biofilm. Tra i sei isolati, cinque hanno mostrato un'elevata capacità di aggregarsi in biofilm, mentre *Paenibacillus pabuli* IP3 è risultato essere poco abile ad aderire e proliferare sul substrato (Figura



4). Attraverso spettrometria FTIR, sono stati poi analizzati chimicamente i campioni di efflorescenze saline prelevate in loco. Dalle porzioni dell'abside sono stati ottenuti solfato di sodio con tracce di nitrati e ossalati, probabilmente dovuti all'azione metabolica di funghi e di alcuni batteri. I prelievi ipogei sono invece caratterizzati dalla presenza di gesso e nitrati in tracce, sostanze cioè prodotte da solfo e nitrobatteri. Infine, dai campioni prelevati da zone non restaurate è emersa una discreta quantità di solfato di sodio puro (Figura 5). I risultati sono fortemente correlati con il metabolismo dei batteri identificati, dal momento che le sei specie batteriche isolate appartengono a nitrobatteri. I nitrobatteri infatti si sviluppano in luoghi ad alto contenuto di umidità, producendo nitriti e nitrati che a loro volta danneggiano i substrati, portando alla formazione di macchie. Inoltre queste specie batteriche sono in grado di trasformare il carbonato di calcio in gesso, causando quindi il distacco di porzioni di pietra dalle mura.

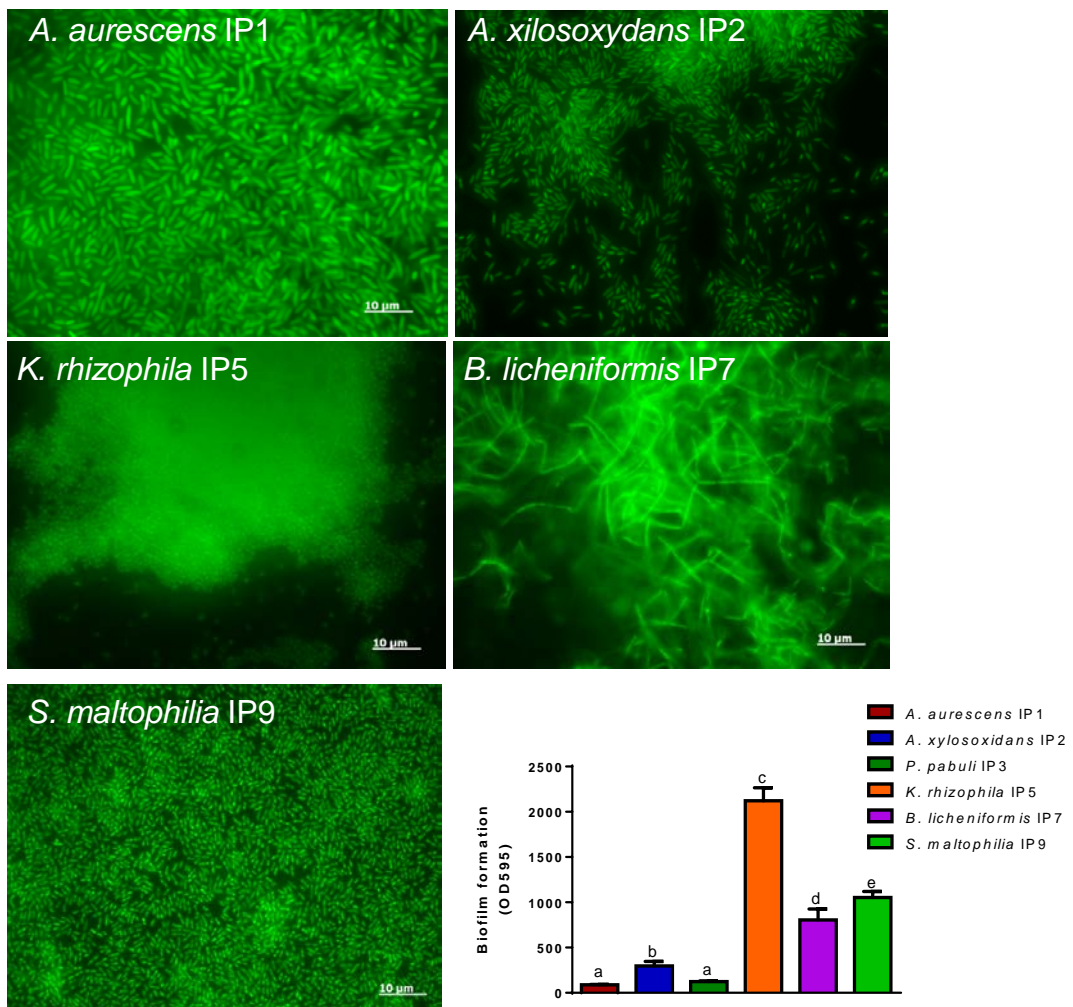




Figura 4. Analisi della formazione del biofilm su vetro (immagini al microscopio a fluorescenza) e su plastica (istogrammi).

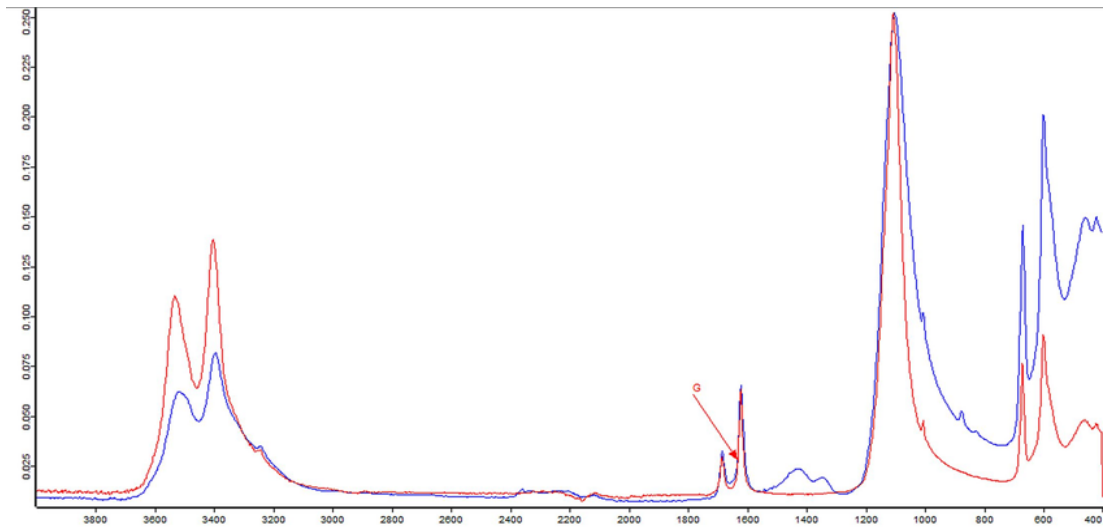


Figura 5. Analisi chimica delle efflorescenze saline mediante FTIR.