

An aerial photograph of a modern architectural structure, possibly a park or a public square, featuring a large circular area with a central green space. The structure is surrounded by a road with a bus and a car, and lush green trees. The image has a green tint.

SCIENZA E SOCIETÀ

L'Ecologia è il ponte per il futuro

A cura del Consiglio Direttivo della Società Italiana di Ecologia

Questo libro è stato realizzato dal Consiglio Direttivo della Società Italiana di Ecologia in carica nel triennio 2019 – 2021: Elisa Anna Fano, Presidentessa; Antonio Pusceddu, Vicepresidente; Antonio Mazzola, Past President; Consiglieri: Edoardo Calizza, Gianluca Corno, Antonio Finizio, Luciana Migliore, Antonella Penna, Flora Angela Rutigliano, Salvatrice Vizzini.

ISBN: 9791221002539

Layout: Luciana Migliore

Immagine di copertina: Ruyi Bridge/ZZHK Architects, 30/7/18. ArchDaily. Accessed 19 Dec 2021.
<<https://www.archdaily.com/898505/ruyi-bridge-zzhk-architects>> ISSN 0719-8884

6. ECOLOGY IS EVERYWHERE! LE SUCCESSIONI ECOLOGICHE DEI BIODETERIOGENI DELLE PERGAMENE ANTICHE

Luciana Migliore

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata'

Quella che sto per raccontare è un'avventura divertente e interessante che travalica le discipline, oltrepassa gli steccati, una caratteristica fondamentale dell'Ecologia. Perché l'Ecologia è dappertutto: le dinamiche ecologiche si possono riconoscere in molti contesti e a diverse scale dimensionali, da quelle geografiche più ampie a quelle microscopiche, come accade nella colonizzazione dei beni culturali. Ma in tutti i casi rispondono sempre alle stesse 'regole'!

6.1. Le successioni ecologiche

Tra i fenomeni di base delle dinamiche ecologiche ci sono le **successioni ecologiche**: l'idea di successione ecologica nasce all'inizio del XIX Secolo (Henry Chandler) ma si consolida nel XX Secolo con due teorie totalmente contrastanti: **Clemens** nel 1916, definisce la successione una struttura organica, una sorta di organismo che nasce, cresce, matura, muore e si riproduce con fedeltà; invece **Gleason**, nel 1926, afferma che la successione rappresenta a malapena un'unità vegetazionale (perché allora la gran parte degli studi si realizzavano sulla componente vegetale), ma era solo una coincidenza.

La successione ecologica è quel processo con cui si modificano nel tempo sia le componenti strutturali sia i processi ecosistemici di un sito. Tale processo implica, nel tempo, la variazione della struttura in specie e della funzionalità delle comunità. Entrambe dipendono da modifiche dell'ambiente fisico e dalla presenza di agenti biologici responsabili del cambiamento. Il processo procede attraverso una serie di fasi intermedie (*stadi serali* o *sere*) e culmina in un ecosistema stabile detto **climax** (Figura 6.1).

Le successioni vengono classificate in base ai loro aspetti produttivi in successione **autotrofe** o **eterotrofe**, le successioni autotrofe sono quelle in cui la produzione è maggiore della respirazione, mentre quelle eterotrofe, al contrario, sono quelle in cui la respirazione è maggiore della produzione. Le successioni autotrofe nel tempo sono in grado di produrre quantità sempre maggiori di biomassa, e quindi determinano l'insediarsi di comunità sempre più complesse; le successioni eterotrofe sono sostenute dall'energia e dal materiale presente nell'ambiente in cui si origina il processo (una foglia morta, un frutto maturo caduto dall'albero, un cadavere, ecc.) e sono in grado di recuperare e rimettere in circolo la sostanza organica morta, infatti la successione termina quando la sostanza è stata completamente consumata.

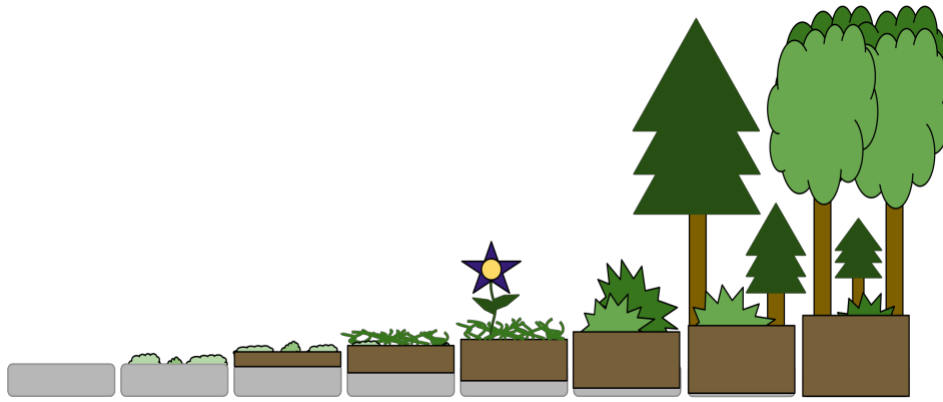


Figura 6.1 Modello di successione ecologica terrestre, nel tempo. Da sinistra verso destra ciascun blocco rappresenta una fase di colonizzazione: dalla roccia nuda, alle comunità intermedie progressivamente più complesse (sere), fino alla comunità climax finale (By Joshfn. Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32862345>)

Le successioni autotrofe (come in Figura 6.1), ci mostrano come si sviluppa la colonizzazione di un substrato mai colonizzato prima (una roccia, una spiaggia, ecc.) fino ad arrivare alla foresta, invece le successioni eterotrofe sono quelle con cui la materia organica morta (Figura 6.2) - che contiene ancora elevate quantità di nutrienti ed energia - viene rimessa in circolo nel sistema come accade per tronchi/foglie morte, frutti, cadaveri, ecc.



Figura 6.2 La degradazione di una mela caduta dall'albero è un esempio di successione eterotrofa. Gli organismi che consumano la mela, insetti, funghi, batteri, ecc., usano tutta la materia e l'energia presenti, fino a consumarla completamente. In questo tipo di successione l'energia è massima all'inizio e si riduce gradualmente, man mano che procede la successione (da: Sally V. Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=86021379>)

6.2. Le pergamene antiche, un esempio di successione?

Un esempio di successione eterotrofa è stato identificato in un sistema alquanto bizzarro e soprattutto mai previsto: le **pergamene antiche** attaccate da microrganismi. Lo studio è stato avviato per valutare il deterioramento di un rotolo di pergamena (chiamato **A.A. Arm. I-XVIII 3328**; Figura 6.3), che appartiene al fondo più antico conservato nell'Archivio Apostolico Vaticano (ex Archivio Segreto Vaticano), l'*Archivum Arcis*, che è stato conservato in Castel Sant'Angelo (Roma) fino alla fine del 1700 assieme a una serie di documenti papali molto importanti.

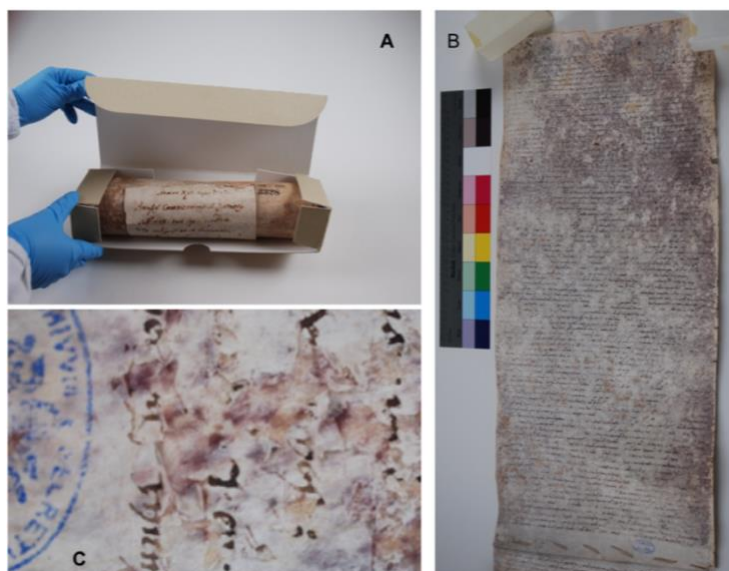


Figura 6.3 Il rotolo A.A. Arm. I-XVIII 3328 dell'Archivio Apostolico Vaticano: A) nella sua scatola, prima del restauro; B) prima pagina srotolata; C) dettaglio di un'area danneggiata da purple spot che mostra la delaminazione superficiale del 'lato carne' (da: Migliore et al., 2017).

6.3. Lorenzo Loricato

Il rotolo, redatto nel 1244 d.C., contiene gli atti del processo di canonizzazione del **Beato Lorenzo Loricato** che, avendo ucciso involontariamente un uomo, per pagare la sua colpa, nel 1209 si ritira in una grotta vicino Subiaco dove condurrà una vita di continue penitenze e digiuni, indossando una *lorica* (cioè una maglia di ferro) e anelli alle caviglie e ai polsi con punte acuminate che lo ferivano, lo facevano muovere con difficoltà e quasi non lo facevano dormire (Figura 6.4). Non contento delle pene, Lorenzo si fustigava con una certa frequenza e il Venerdì Santo si bruciava la fronte con un ferro arroventato.

Ovviamente il suo stile di vita aveva acceso la curiosità dei contemporanei e molti lo andarono a visitare nella sua grotta, tra questi anche il futuro papa Gregorio IX che gli suggerì di stemperare un po' le penitenze. Inutilmente, Lorenzo continuò questa vita per 34 anni, fino alla morte avvenuta nel 1243. Dopo la sua morte venne avviato il processo di beatificazione, per alcuni miracoli fatti nel corso della vita.

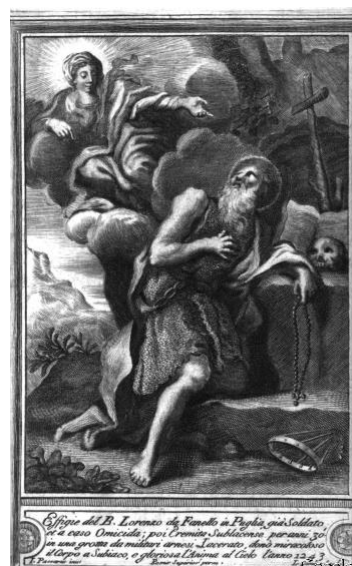


Figura 6.4 Ritratto di Lorenzo da Fanella noto come Lorenzo Loricato (incisione di G. da Capistrano, 1805), sulla destra; a sinistra, Santa Chelidonia (da: Migliore et al., 2017)

Il rotolo, lungo 5 metri e formato da otto fogli di pergamena di capra, raccoglie 'vita, morte e miracoli' di Lorenzo Loricato, in forma di deposizioni di 104 testimoni; vi sono descritti 60 miracoli, per la gran parte guarigioni, ma anche una moltiplicazione di pane e vino!

6.4. La pergamena

La pergamena è un foglio sottilissimo fatto di pelle animale; è costituito da una matrice proteica (fibre di collagene) e consiste nello strato più esterno del derma. Il processo di manifattura delle pergamene è rimasto praticamente immutato nei secoli; nelle regioni calde meridionali, dove il sale era abbondante ed economico il primo trattamento era la salatura, fatta per evitare la putrefazione della pelle appena prelevata dall'animale. La salatura poteva

essere fatta a secco, cioè spargendo elevate quantità di sale sulla pelle, oppure in salamoia, cioè in una soluzione concentrata di sale (Figura 6.5). Dopo la salatura venivano fatti altri trattamenti, con idrossido di calcio, per rimuovere i peli, con calcio, con pomice e altre sostanze per rendere bianca e levigata la superficie della pergamena e permettere all'inchiostro di attaccarsi.

Salatura a secco



Salatura in salamoia



Figura 6.5 La salatura delle pelli può essere effettuata a secco (a sin.; Foto @N. Perini) o in salamoia (a dest.; J.H.G. von Justi, Die Kunst Pergament zu machen, Berlino, 1763; da: Fuchs, 2018)

Dunque, le pergamene sono fatte di collagene e, per la loro composizione organica, sono esposte a quello che viene chiamato **biodeterioramento**, che, per definizione è la *'perdita irreversibile di valore o di informazioni di un oggetto d'arte a seguito dell'attacco di organismi viventi'*. Quindi per cominciare possiamo dire che anche gli oggetti d'arte, quando sono prodotti con materiale organico, rientrano nel ciclo dei nutrienti. Il biodeterioramento delle pergamene è praticamente sempre lo stesso, anche in documenti di età e provenienza diverse: il danno più frequente è dovuto a macchie violacee, isolate o coalescenti, chiamate in inglese *purple spot* che non solo macchiano il manufatto, rendendolo meno bello, ma determinano la degradazione della matrice di collagene e la delaminazione dello strato superficiale, specialmente dal cosiddetto *'lato carne'*, più delicato e quello su cui si scrive, con ovvia perdita di leggibilità e di informazioni.

6.5. Lo studio dei biodeteriogeni

Anche la pergamena **A.A. Arm. I-XVIII 3328** mostra segni di biodeterioramento da *purple spot* sul lato carne e in qualche zona è delaminata (Figura 6.3C). Le aree macchiate di questo rotolo (non gravemente danneggiato) sono la prima, l'ultima pagina e i bordi delle pagine interne, per uno spessore da 2 a 6 centimetri. Vedremo in seguito il perché.

Lo studio dei biodeteriogeni della pergamena A.A. Arm. I-XVIII 3328 non è stato basato su dati bibliografici, scarni e confusi, ed è stato progettato in partenza con un approccio biotecnologico molto avanzato, quello del *Next Generation Sequencing*, in grado di identificare la struttura e la composizione della comunità microbica del campione, tecnica mai stata utilizzata prima sui beni librari (vedi BOX 6.1). Questa tecnica permette di ottenere ottimi risultati anche con piccolissimi frammenti di pergamena (2-4 mm²). Sono stati utilizzati quei frammenti che con il restauro non è possibile ricollocare nel documento originale. La tecnica prevede l'estrazione del DNA dal campione, il suo sequenziamento in grandi laboratori dedicati, e poi elaborazioni e analisi bioinformatiche, con piattaforme specifiche. L'analisi bioinformatica permette di identificare tassonomicamente i microrganismi presenti (che

vengono assegnati alle cosiddette **OTU**, cioè **Operational Taxonomic Unit**) e di confrontare i diversi campioni, per valutarne eventuali somiglianze e differenze (*Unifrac distances*).

BOX 6.1 - Il Next Generation Sequencing e lo studio delle comunità microbiche

Il **Next Generation Sequencing** è una tecnica che permette di determinare contemporaneamente e in poco tempo la sequenza nucleotidica di molti filamenti di DNA. Ciascun filamento di DNA a doppia elica presente in un campione viene 'srotolato' in modo da ottenere filamenti a singola elica - accessibili all'enzima responsabile della replicazione del DNA, la **DNA polimerasi** - che faranno da stampo nel processo di sequenziamento per sintesi. Ogni volta che la DNA polimerasi inserirà un nucleotide sulla catena in allungamento, verrà immediatamente rilasciato un segnale di fluorescenza specifico per ciascuno dei nucleotidi, la sequenza dei segnali viene poi convertita nella sequenza di nucleotidi. Diverse tecniche si basano su questo stesso principio, come il **454-pyrosequencing** e l'**Illumina**, che si distinguono per il meccanismo di sintesi e per l'efficienza.

Il processo di sequenziamento per sintesi produce migliaia e migliaia di sequenze nucleotidiche, organizzate in forma di specifici file, chiamati FASTA o FASTQ, che possono poi essere elaborati da software bioinformatici dedicati come *Mothur*, *QIIME2*, *Phyloseq (R)*. Questi software "ripuliscono" le sequenze dalle sequenze non biologiche necessarie per l'amplificazione (*linker primer*) e dagli errori avvenuti durante la sintesi (*chimere*) e poi le raggruppano per similarità. Per ciascun gruppo viene scelta una sequenza rappresentativa, che sarà utilizzata nelle successive analisi tassonomiche e statistiche.

Questa tecnologia ha reso possibile lo studio contestuale di intere comunità, il cosiddetto **approccio metagenomico**, cioè lo studio del DNA di tutti i microrganismi presente in un certo ambiente, superando i limiti delle tecniche basate sulla coltura e sull'isolamento dei microbi. L'analisi bioinformatica delle sequenze di DNA microbico permette infatti di valutare **la struttura**, in termini di abbondanza relativa di ciascun gruppo di sequenze, e **la composizione di una comunità**, identificando tassonomicamente il microorganismo a cui appartiene la sequenza. L'identificazione tassonomica delle sequenze microbiche è possibile grazie ai database come *NCBI* o *GenBank* sempre più ampi e completi, perché lì vengono conservate le sequenze geniche che man mano vengono identificate nel tempo dai diversi studi. Questi *database* sono quindi il risultato dello sforzo collettivo di tutta la comunità scientifica! I software bioinformatici consultano velocemente questi enormi database, confrontando le sequenze presenti nel campione con quelle dei database, individuando la più simile.

Le prime analisi effettuate su frammenti di aree non danneggiate e di aree danneggiate viola hanno mostrato chiaramente che la struttura delle comunità dei due tipi di campioni era molto diversa (Figura 6.6A e B). Il risultato più interessante e sorprendente è stato trovare nei campioni danneggiati, elevate percentuali di **batteri marini**. In tutti i campioni erano presenti batteri ambientali oppure batteri associati all'uomo o agli animali (*Actinobacteria*), che quindi non potevano essere imputati della produzione delle *purple spot* mentre i *Proteobacteria* (in particolare γ -marini), dovevano essere in qualche modo coinvolti nella produzione delle macchie.

Ma che ci fanno i batteri marini nella pergamena? Non potevano che essere arrivati con il sale utilizzato nelle prime fasi di manifattura della pergamena, con la salatura. Questi batteri entrano fin dentro la struttura della pelle animale e, alle giuste condizioni ambientali possono rianimarsi. Provenendo da saline, i batteri che si trovano nel sale devono essere **alofili o alotolleranti**, cioè rispettivamente batteri che hanno bisogno di elevate o medie quantità di sale per vivere. I batteri di salina sono molto tolleranti, perché soggetti a variazioni sostanziali delle condizioni ambientali; una volta entrati nella pergamena rappresentano una sorta di bomba a orologeria per questi manufatti, perché sono in grado di *'rianimarsi'* anche dopo periodi di tempo molto lunghi (Mormile *et al.*, 2003).

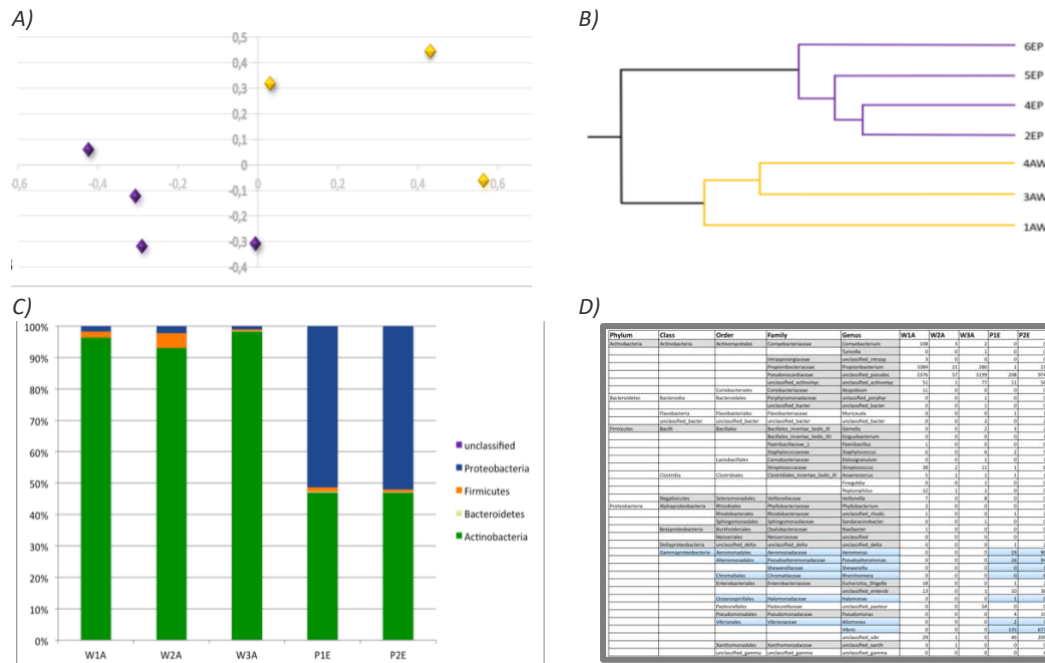


Figura 6.6 Confronto (A e B) e composizione tassonomica (C e D) delle comunità microbiche rilevate in campioni provenienti da aree non danneggiate e da aree macchiate del rotolo A.A. Arm. I-XVIII 3328. In grigio, i batteri ubiquitari, ambientali o associati a uomo/animali; in azzurro, i batteri marini (da: Migliore et al., 2016, 2017)

E allora che cosa abbiamo fatto per comprendere la dinamica della colonizzazione? Abbiamo continuato a studiare il ‘nostro’ magnifico rotolo a cui abbiamo affiancato anche lo studio di altri tre documenti estremamente danneggiati, provenienti dalla collezione del notaio Patrizi e conservati presso l’Archivio Apostolico Vaticano: atti notarili non particolarmente interessanti nei contenuti, ma scritti su pergamene veramente molto danneggiate (Figura 6.7).

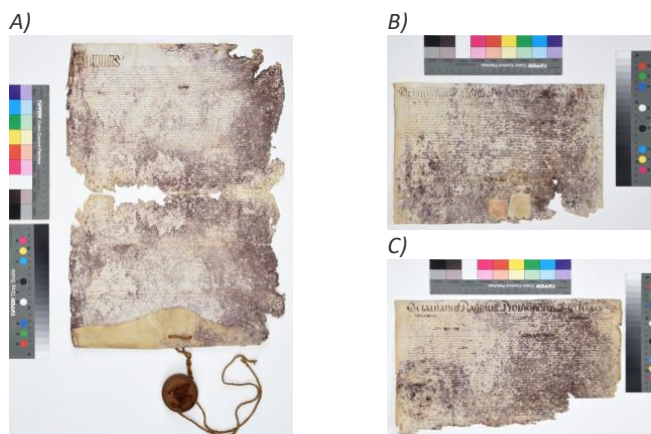


Figura 6.7 Le tre pergamene del Faldone Patrizi, in avanzato stato di degrado, dovuto alla presenza diffusa di purple spot; è evidente la perdita di parti dei documenti dovuta a biodeterioramento. A) documento denominato “Antonius ...”, datato 1510 d.C. circa; B) documento denominato “Octavianus Raggius Protonotarius Apostolicus”, datato 1640 d.C.; C) documento denominato “Octavianus Raggius Protonotarius ...”, datato 1639 d.C. (da: Migliore et al., 2019)

A tutte le quattro pergamene è stato applicato lo stesso approccio multidisciplinare: *Next Generation Sequencing* per le analisi microbiologiche, analisi chimiche in spettroscopia

Raman e analisi fisiche con una tecnica messa a punto per le pergamene, la *Light Transmission Analysis (LTA)* che valuta la degradazione del collagene.

6.5.1. NGS (Next Generation Sequencing)

Le nuove indagini microbiologiche sul rotolo poco danneggiato hanno confermato i dati precedentemente ottenuti, cioè: i) le comunità delle aree danneggiate e di quelle non danneggiate sono estremamente diverse e ii) nelle aree danneggiate sono presenti batteri marini del genere *Vibrio*, che non possono essere considerati responsabili delle *purple spot* perché non producono pigmento viola (Figura 6.8).

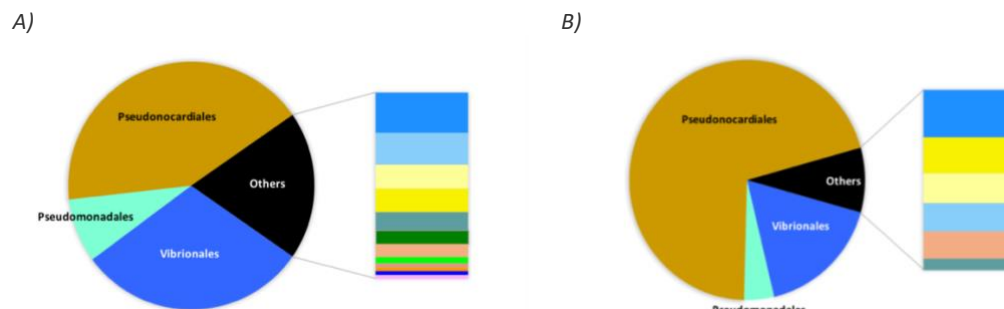


Figura 6.8 Composizione delle comunità microbiche presenti in: A) aree macchiate e B) aree non danneggiate del rotolo A.A. Arm. I-XVIII 3328 (da: Migliore et al., 2019)

Nel rotolo non abbiamo trovato tracce del DNA dei microorganismi alofili, come *Halobacterium salinarum*, un Archaea che vive ancorato ai cristalli di sale e può produrre macchie *purple* perché il suo involucro cellulare contiene elevate quantità di **batteriorodopsina**, una proteina transmembrana estremamente stabile di colore violaceo (Figura 6.9).

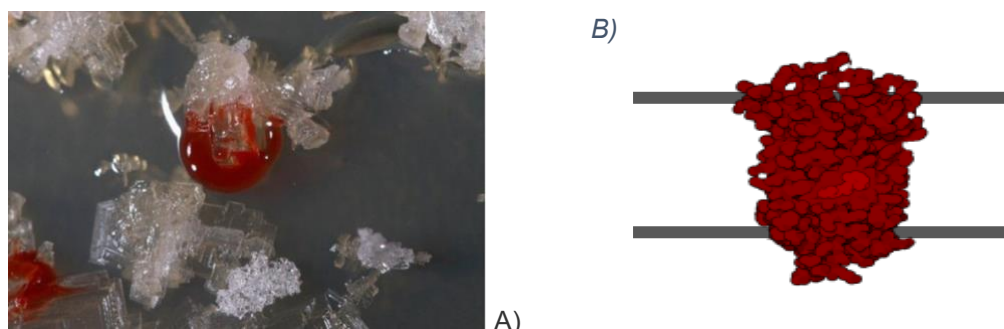


Figura 6.9 *Halobacterium salinarum*. A) crescita su terreno saturo di sale (da: <https://microbiologysociety.org/publication/past-issues/real-superheroes/article/the-immortal-halophilic-superhero-i-halobacterium-salinarum-i-a-long-lived-poly-extremophile.html>); B) batteriorodopsina 4MD1-transmembrana in 3D (da: RCSB PDB <https://pdb101.rcsb.org/motm/27>, modificata)

È stata la spettroscopia Raman, applicata ai campioni macchiati, a dimostrare la presenza di batteriorodopsina e il passaggio degli alobatteri nella pergamena. In più, le analisi con la tecnica LTA hanno dimostrato e quantificato il danno strutturale alla pergamena nelle zone macchiate, valutato come temperatura di *shrinkage*, cioè di collassamento della struttura della pergamena, che è tanto più bassa quanto maggiore è la degradazione del collagene. La pergamena mostra una temperatura di *shrinkage* più bassa nelle zone interessate dalle macchie viola che in quelle non macchiate e, poiché l'LTA permette di fare microfotografie

delle zone analizzate contemporaneamente alle misure termiche, è possibile vedere che nelle aree macchiate l'attacco batterico rimuove la matrice dispersa del collagene, lasciando integre le componenti più strutturate e difficili da attaccare (Figura 6.10).

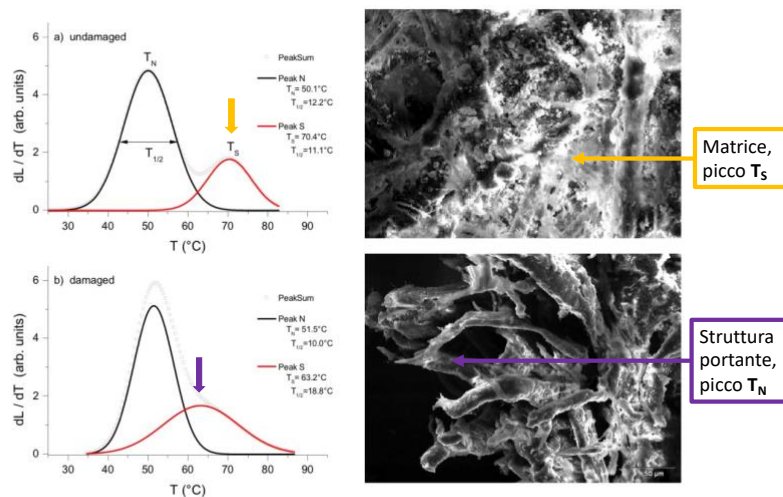


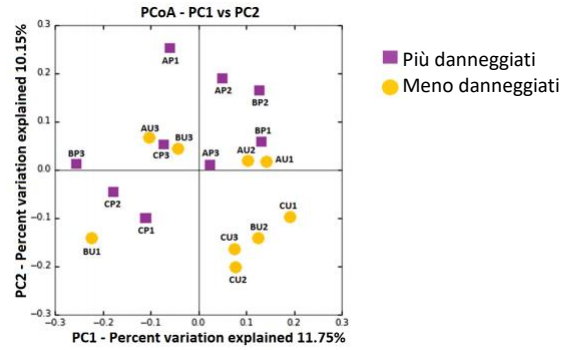
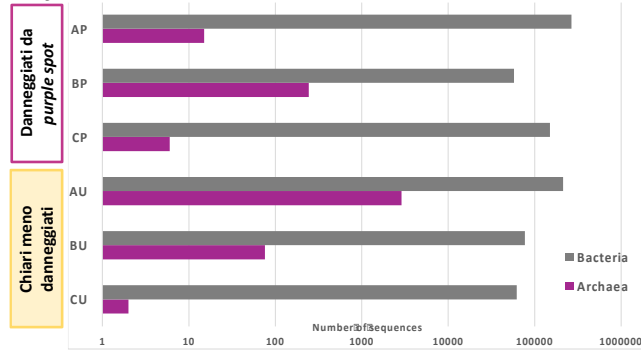
Figura 6.10 Analisi della temperatura di shrinkage di frammenti di pergamena provenienti da a) aree non danneggiate e b) aree danneggiate del rotolo A.A. Arm. I-XVIII 3328 e immagini delle stesse aree effettuate nel corso dell'analisi termica (da: Migliore et al., 2017)

Dunque, il rotolo poco danneggiato ha confermato che nelle fasi iniziali del processo di colonizzazione delle pergamene: i) i microrganismi nelle *purple spot* sono marini; ii) le macchie sono dovute alla presenza di batteriorodopsina prodotta dagli alobatteri, che dovevano aver colonizzato la pergamena prima dei batteri rilevati nelle aree macchiate; iii) i batteri sono in grado di crescere utilizzando il collagene, danneggiandolo e consumandolo.

Ma che cosa succede quando il processo di degradazione è molto più avanzato? La risposta a questa domanda ce l'hanno data i documenti del Faldone Patrizi (Figura 6.7): si tratta di documenti estremamente danneggiati, in cui è stato possibile confrontare aree mediamente danneggiate con aree molto danneggiate. L'analisi in NGS ha mostrato una situazione completamente diversa: la distribuzione dei microrganismi nelle comunità delle aree più e meno danneggiate di queste pergamene è sempre la stessa, senza differenze statisticamente significative (Figura 6.11). In entrambi i gruppi di campioni sono presenti Archaea e batteri: gli Archaea sono rappresentati da alobatteri, sempre a bassa frequenza, i batteri sono rappresentati da Actinobacteria e Firmicutes, principalmente dell'ordine Pseudonocardiales. La ragione di queste differenze quantitative la vedremo in seguito.

Il punto più importante è che le sequenze di Archaea corrispondevano ad *Halobacterium salinarum*, con una sovrapposizione del 100% alle sequenze di riferimento. Gli Archaea sono tra le forme di vita più antiche sulla Terra e sono adattati a condizioni estreme: per esempio, l'*Halobacterium salinarum*, che è un aloarchaea, per vivere ha bisogno di concentrazioni di sale molto elevate. È un organismo a *strategia r*, dunque un pioniere, e si nutre di amminoacidi (principalmente arginina e aspartato), presenti in abbondanza nel collagene delle pergamene. Caratteristica peculiare di questi organismi è la presenza di batteriorodopsina, una proteina transmembrana che contiene un retinale in grado di captare energia luminosa; l'accoppiamento funzionale della **batteriorodopsina** con una **ATP sintasi** permette la conversione dell'energia luminosa captata in energia chimica. Questo fa sì che gli aloarchaea abbiano dell'energia supplementare che permette loro di vivere in ambienti 'difficili' come le pergamene.

Confronto delle comunità



Composizione tassonomica delle comunità

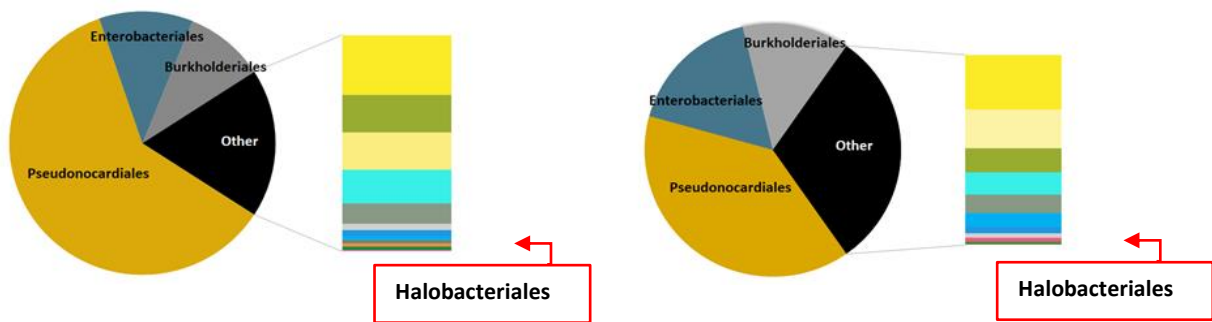


Figura 6.11 Confronto tra le comunità dei campioni di pergamena provenienti da aree diversamente danneggiate dei tre documenti del Faldone Patrizi. Confronto delle comunità: numero di batteri e Archaea (a sinistra) e ordinamento delle comunità (a destra), nei campioni provenienti rispettivamente dai documenti A, B e C (P=campioni purple, danneggiati; U=campioni non macchiati, meno danneggiati). Composizione tassonomica delle comunità: distribuzione degli ordini prevalenti nei campioni purple, danneggiati (a sinistra) e dei campioni non macchiati, meno danneggiati (a destra).

6.5.2. Spettroscopia RAMAN

Le analisi **Raman** sul rotolo A.A. Arm. I-XVIII 3328 e sulle tre pergamene del Faldone Patrizi han-no dimostrato la presenza di batteriorodopsina nelle aree macchiate ma, per ulteriore conferma, è stato analizzato anche lo spettro del ceppo di riferimento dell'*Halobacterium salinarum*, fatto crescere su piastra con metodi standard in laboratorio. Gli spettri sono riportati in Figura 6.12 e mostrano come lo spettro del rotolo, quello dei tre documenti molto danneggiati e quello del ceppo di riferimento includano le bande che caratterizzano la batteriorodopsina.

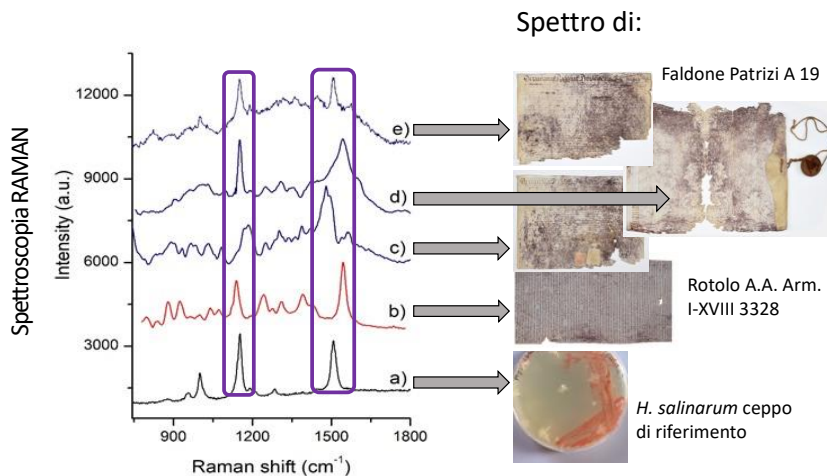


Figura 6.12 Analisi dei pigmenti purple presenti in: a) *H. salinarum* vivo, coltivato in laboratorio; b) rotolo A.A. Arm. I-XVIII 3328; c), d), e) Faldone Patrizi, rispettivamente i documenti B, A e C. In viola sono evidenziate le bande caratterizzanti della batteriorodopsina (da: Migliore et al., 2019)

6.5.3. LTA (Light Transmission Analysis)

Le analisi in **LTA** delle tre pergamene mostrano come, con l'avanzare della degradazione della pergamena, anche la temperatura di *shrinkage* continui ad abbassarsi: come era già evidente dall'osservazione, il collagene di queste pergamene è estremamente più danneggiato rispetto alla pergamena del rotolo e parti di essi mancano, in relazione all'elevata colonizzazione (Figura 6.13).

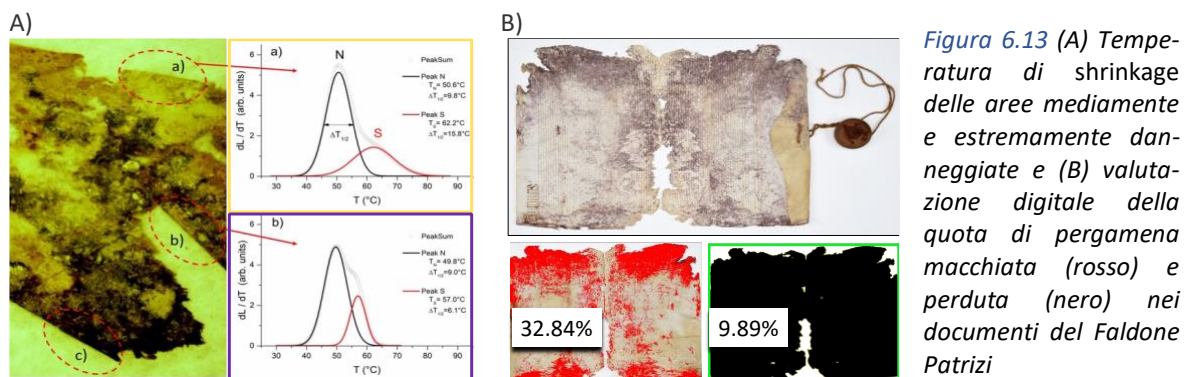


Figura 6.13 (A) Temperatura di shrinkage delle aree mediamente e estremamente danneggiate e (B) valutazione digitale della quota di pergamena macchiata (rosso) e perduta (nero) nei documenti del Faldone Patrizi

6.6. Adesso dobbiamo mettere insieme i pezzi di questo puzzle!

Il primo punto riguarda i **fattori ambientali**, e naturalmente la cosa più importante è la presenza e la concentrazione di sale, che gioca un ruolo fondamentale nel processo di biodeterioramento.

Il secondo punto è che gli alobatteri devono essere stati i **primi colonizzatori**, non solo per le loro caratteristiche ecologiche, ma perché lasciano la macchia quando vengono sostituiti dai γ -Proteobatteri marini: devono aver colonizzato la pergamena prima, visto che non abbiamo trovato traccia del loro DNA ma abbiamo trovato la loro batteriorodopsina.

Il terzo punto riguarda la **struttura della comunità**: all'inizio della colonizzazione le aree macchiate contengono comunità molto differenti da quelle delle aree non macchiate, ma con il progredire del processo dappertutto si trovano gli stessi colonizzatori.

Da ultimo, il **collagene** subisce un progressivo deterioramento sia della matrice, sia delle strutture rigide. Ovviamente la degradazione comincia dalla matrice che è più facile da attaccare.

I fattori ambientali. L'umidità, la temperatura e la luce hanno sicuramente avuto un ruolo nella storia delle pergamene. Per esempio, il rotolo (scritto nel XIII Secolo) deve essere stato esposto all'umidità con frequenza e regolarità, visto che nei monasteri le biblioteche spesso erano tenute nei cosiddetti 'armaria', degli armadi collocati all'esterno, nei chiostri. Questa collocazione fa ipotizzare che analogamente i documenti fossero esposti a regolari variazioni anche della temperatura e della luce. È interessante che il rotolo sia macchiato nella prima, nell'ultima pagina e sui margini: questo dipende da come si legge la pergamena, che deve essere srotolata e arrotolata per essere letta. Quindi certe volte finiva con avere esternamente la prima pagina, altre volte l'ultima. Quindi, oltre all'esposizione durante la lettura, forse le pergamene potevano essere esposte alla luce anche quando erano conservate, favorendo la crescita degli alobatteri nelle zone illuminate (prima, ultima pagina

e margini). Ma la salinità è il punto chiave: la salatura delle pelli appena raccolte determina l'ingresso del sale all'interno dei vari strati dell'epidermide, inclusi quelli utilizzati per fare la pergamena. Insieme al sale, il processo permette l'ingresso di tutti i microbi presenti nel sale (alofili e alotolleranti) che rimangono ben conservati nella pergamena, che non subisce trattamenti forti. Che cosa succede quando i microcristalli di sale presenti all'interno della pergamena sono esposti a un'elevata umidità ambientale? Quando l'umidità relativa arriva a circa il 75%, i cristalli di sale si sciolgono formando una salamoia liquida che ha una salinità elevatissima e **consente la crescita degli aloarchaea**. Però, quando l'umidità ambientale aumenta, la salinità si abbassa; se scende al di sotto del limite di tolleranza degli aloarchaea, i batteri collassano, la loro membrana si disintegra rilasciando il pigmento lì dov'era cresciuta la colonia: questo spiega la forma e la distribuzione delle macchie. La lisi delle cellule rilascia all'interno della struttura della pergamena grandi quantità di nutrienti, le nuove condizioni favoriscono la crescita dei microbi opportunisti, come i *Vibrio*.

6.7. Il modello di colonizzazione

Da tutti questi dati è possibile ipotizzare un **modello di colonizzazione a due fasi** (Figura 6.14).

Nella **prima fase** umidità e luce determinano le condizioni di crescita favorevoli per gli aloarchaea e, finché la salinità rimane elevata, permettono la loro crescita nella parte interna della pergamena, dove consumano il collagene. Quando la salinità scende al di sotto della soglia di tolleranza ($\text{NaCl} < 3\text{M}$) le cellule lisano, la membrana fa la macchia mentre il contenuto cellulare viene consumato dai microrganismi alotolleranti, che cancellano così le tracce dei precedenti colonizzatori, incluso il loro DNA. Rimangono solo le macchie perché la batteriorodopsina ha una struttura molto stabile che non viene attaccata da altri microrganismi.

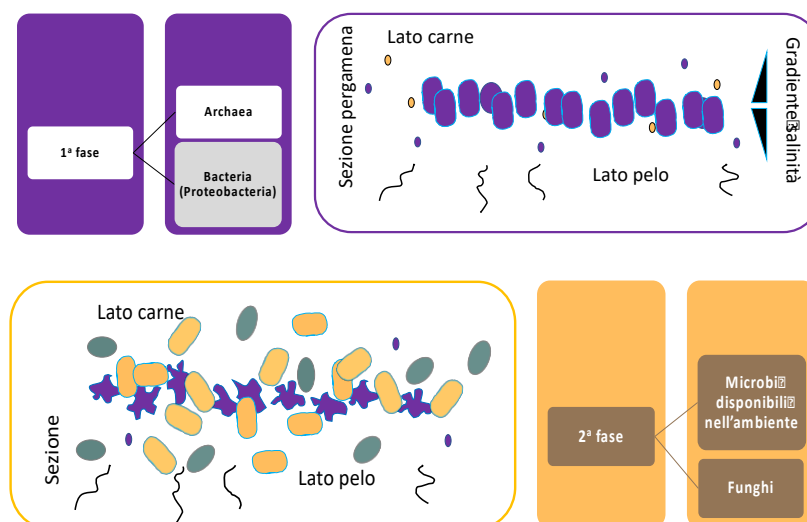


Figura 6.14 Modello di colonizzazione a due fasi delle pergamene (da: Migliore et al., 2017)

La **seconda fase** è completamente diversa: il collagene è già attaccato e danneggiato e così rappresenta cibo disponibile per tutti i microbi presenti nell'ambiente. Ovviamente, i microrganismi ambientali più comuni diventano i colonizzatori più frequenti; ciononostante, studiando specificamente diversi tipi di *Pseudonocardiales* (colonizzatori di seconda fase), abbiamo rilevato che aree a diverso grado di danneggiamento offrono ambienti diversi e

permettono la colonizzazione di specie diverse. In ogni caso, alla fine della seconda fase vengono reclutati anche i funghi, che sono provvisti di set di enzimi litici in grado di completare la degradazione della matrice proteica.

Si conclude così la degradazione della pergamena, perché l'attività di questa seconda comunità riduce il collagene e lo smantella completamente fino a farlo scomparire.

È importante fare a questo punto una considerazione generale sulla prospettiva di lettura e di interpretazione dei risultati del NGS: le diverse comunità di microrganismi che noi troviamo devono essere valutate tenendo conto che si tratta di un processo che avviene nel tempo. Poiché la prospettiva storica è 'appiattita', visto che le comunità più recenti restituiscono DNA meglio conservato e in maggiore quantità rispetto ai primi colonizzatori, la bassa frequenza con cui si ritrova *Halobacterium* non 'sminuisce' il loro ruolo!

6.8. La successione ecologica!!!!

I documenti analizzati riassumono il processo di successione responsabile della degradazione del collagene della pergamena: il rotolo, danneggiato poco e solo in alcune zone, dà conto della prima fase del processo mentre i fogli del Faldone Patrizi mostrano la seconda fase, includendo aree mediamente danneggiate, confrontabili con quelle più danneggiate del rotolo, e zone molto più danneggiate (Figura 6.15).

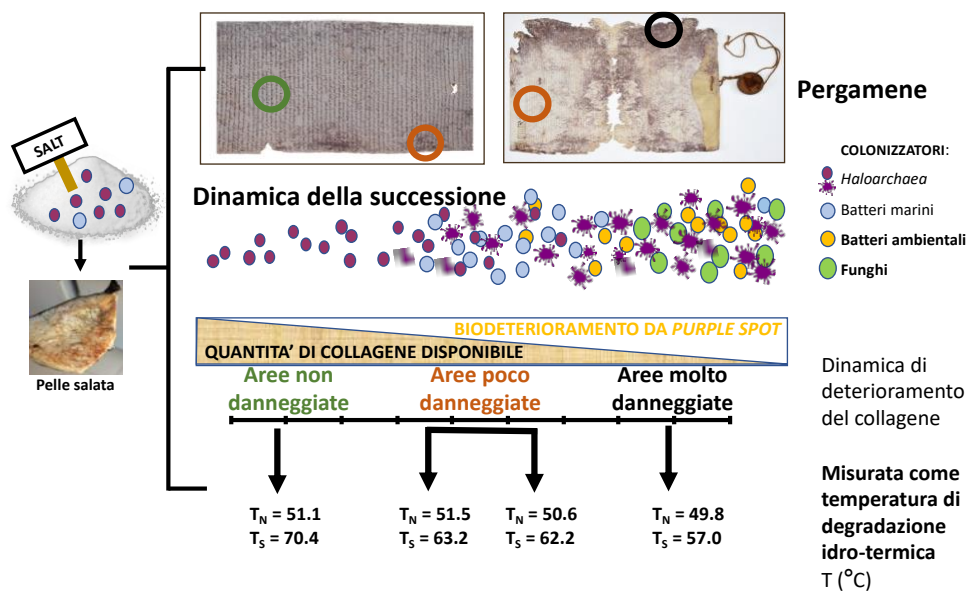


Figura 6.15 La successione ecologica delle pergamene (da: Perini et al., 2020)

La successione si determina per via dei microbi presenti nel sale marino, che entrano nella pelle appena raccolta con il processo di salatura e rimangono silenziosi all'interno della pergamena fino a che le condizioni ambientali abiotiche non permettono la crescita degli aloarchaea. Quando le condizioni ambientali cambiano gli aloarchaea collassano, vengono soppiantati prima dai γ -proteobatteri marini, poi da altri microrganismi ambientali e in ultimo dai funghi. La vita dei biodeteriogeni dipende dalla quantità di collagene disponibile, che si riduce man mano che procede il biodeterioramento; la dinamica di deterioramento del collagene si può quantificare con la progressiva riduzione della temperatura di *shrinkage*.

Possiamo affermare che il biodeterioramento delle pergamene è una **successione ecologica** perché:

1. mostra variazioni nel tempo della struttura in specie e della funzionalità della comunità;
 2. dipende da modifiche dell'ambiente fisico e da agenti biologici di cambiamento;
 3. procede attraverso comunità e fasi intermedie;
- ed è, ovviamente, una **successione eterotrofa** che consente il riutilizzo di materiale ed energia presenti in una struttura morta.

Il processo che avviene nelle pergamene dà credito a entrambe le **ipotesi classiche** di successione ecologica: la prima fase, in accordo con quanto affermato da **Clemens**, è obbligata e basata sull'attacco del collagene, prima da parte degli aloarchaea e poi dai γ -proteobatteri, come i *Vibrio*. Un processo a struttura rigida, che mostra la fedeltà di certe fasi; la dinamica della seconda fase rende ragione a **Gleason**, perché i colonizzatori (batteri ambientali e funghi) vengono reclutati dall'ambiente e saranno quelli localmente presenti, e quindi dipenderanno da dove era conservata la pergamena.

Per concludere, penso che sia importantissimo che tutti - anche gli ecologi - si occupino dello studio e della salvaguardia del nostro patrimonio culturale, non solo perché è **il nostro patrimonio culturale** (e già questo basterebbe) ma anche perché è una delle nostre risorse economiche più rilevanti.

6.9. Bibliografia

- Fuchs R., 2018. The History and Biology of Parchment. In: Karger Gazette, n. 67, Skin, pp. 13-16
- Migliore L, Vendittozzi G, Mejia AY, Mercuri F, Carbonetti C, Thaller MC, Romani M, Cicero C, Orazi N, Pasqualucci A, Marinelli M, Rubechini A, 2016. Il rotolo A.A., Arm. I-XVIII 3328 dell'Archivum Arcis: studi letterari e scientifici, interventi di restauro. *Collect Arch Vat 102*. Dall'Archivio Segreto Vaticano. Miscellanea di testi, saggi e inventari, IX:403-421
- Migliore L, Thaller MC, Vendittozzi G, Mejia AY, Mercuri F, Orlanducci S, Rubechini A (2017) - Purple spot damage dynamics investigated by an integrated approach on a 1244 A.D. parchment roll from the Secret Vatican Archive. *Sci Rep 7*:9521 DOI: 10.1038/s41598-017-05398-7
- Migliore L, Perini N, Mercuri F, Orlanducci S, Rubechini A, Thaller MC, 2019. Three ancient documents solve the jigsaw of the parchment purple spot deterioration and validate the microbial succession model. *Sci Rep 9*:1623. DOI: 10.1038/s41598-018-37651-y
- Mormile MR, Biesen MA, Gutierrez MC, Ventosa A, Pavlovich JB, Onstott TC, Fredrickson JK, 2003. Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions. *Environm Microbiol 5*(11):1094-1102 DOI:10.1046/j.1462-2920.2003.00509.x
- Perini N, Mercuri F, Thaller MC, Castiello D, Talarico V, Migliore L, 2019. The stain of the original salt: red heats on chrome tanned leathers and purple spots on ancient parchments are two sides of the same ecological coin. *Front Microb 10*:2459. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02459
- Perini N, Mercuri F, Orlanducci S, Thaller MC, Migliore L, 2020. The integration of metagenomics and chemical physical techniques biodecoded the buried traces of the biodeteriogens of parchment purple spots. *Front Microb 11*:598945. DOI: 10.3389/fmicb.2020.598945

Finito di stampare nel mese di Dicembre 2021
a cura della
Società Italiana di Ecologia