

UN CIMITERO RUPESTRE DI EPOCA TARDOANTICA IN SICILIA: STUDIO INTERDISCIPLINARE DELL'AMBIENTE E DEI REPERTI ARCHEOLOGICI.

F. PALLA ¹, N. BILLECINI ¹, F.P. MANCUSO ¹, L. SINEO ¹, G. CARUSO ²

¹ Università Degli Studi di Palermo, Dipartimento di Biologia Ambientale e Biodiversità, Via Archirafi 18 - 38, 90123 Palermo, Italy. franco.palla@unipa.it

² ARCHEOCLUB d'Italia sede di Licodia Eubea, Corso Umberto 232, 95040, Licodia Eubea (CT) archeoclublicodia@alice.it.

Riassunto

La Grotta dei Santi è composta da due antri adiacenti denominati rispettivamente “Antro della Crocifissione” collocato a sud-ovest e “Antro delle Sepolture”, rivolto a nord-est [1]. La denominazione della Grotta, è dovuta alla presenza di pannelli devozionali [2] che decoravano le pareti dell'antro rivolto a nord-est, adibito in epoca paleocristiana ad ambiente sepolcrale e ad un pannello raffigurante la Crocifissione di Gesù Cristo nell'antro adiacente. I parametri ambientali che caratterizzano la grotta e, in particolare quest'ultimo ambiente, hanno permesso la proliferazione di una complessa biocenosi composta da briofite e specie erbacee quali *Adiantum capillus-veneris* e *Parietaria judaica*, in associazione con cianobatteri e microalghe.

Pertanto è stato realizzato uno studio interdisciplinare finalizzato al monitoraggio dell'ambiente e alla caratterizzazione dei micro e macrosistemi che lo colonizzano e rivolto al recupero delle testimonianze storico-artistiche conservate all'interno di questo sito rupestre. Infine, in una delle tombe presenti nell'Antro delle Sepolture è stato eseguito uno scavo archeologico che ha portato al recupero di reperti scheletrici umani, i quali sono stati analizzati in relazione alle caratteristiche dell'impianto sepolcrale, ricorrendo a metodologie di analisi antropometrica ed antroposopica [3].

Parole chiave: biocenosi, grotte rupestri, CLSM, analisi molecolari, indagini antropologiche

Abstract

In the rupestrian settlement named Grotta dei Santi, which is localized in South-East of Sicily, an interdisciplinary study was carried out, in order to characterize environmental biocenosis and perform the surveys of the historic and artistic evidences [5-22]. This rupestrian dwelling is composed by a liturgical area, “Antro della Crocifissione”, and a cemeterial area, “Antro delle Sepolture”. From 2009, it has been carried out a project for the characterization of the biocenosis and the microclimatic monitoring, recovery and analyses of human skeletal finds in the site [9]. The goal is the application of a suitable protocol for the conservation and sustainable fruition of these caves. Significant climatic changes (temperature and relative humidity) were registered; an abundant percolation of water and the presence of different natural light sources, determinate favorable condition for the development of macro and microbiological systems. In particular several biofilm, differently pigmented, were identified, which almost completely covered the surfaces of the Antro delle Sepolture. This biofilms have been characterized through optical and confocal laser scanning microscopy (M.O., C.L.S.M.) and molecular biology techniques (PCR, sequencing analysis) [4]. The study allowed to identify the presence of a complex biocenosis composed by bryophytes and herbaceous species as *Adiantum capillus-veneris* and *Parietaria judaica*, in association with cyanobacteria belonging to *Cyanobium* spp. and *Oscillatoria* sp. Furthermore, were identified some insects belonging to the order Diptera (sub-order Brachycera), whose proliferation is related to the presence of organic debris. From one of the burials, several bones from at least three individuals, two adults and a sub-adult have been recovered. The results allowed to define a different use of the burial in the centuries [8] as it contains two rearranged secondary burials and a third primary burial, in discrete anatomical connection (supine position). Current anthropometric and anthroposcopic methodologies have been applied to study the skeletal finds, in order to determinate biological and pathological parameters.

Keywords: biocenosis, rupestrian settlement, CLSM, molecular analysis, anthropologic investigation

Introduzione

Al fine di attuare adeguate strategie di conservazione e fruizione, è stato realizzato uno studio in-



Fig.1 Grotta dei Santi: a) Ingressi principali; b) Antro della Crocifissione, rappresentata nel catino absidale (*).

mente le superfici dell'Antro delle Sepolture [7-8]. Inoltre, nel corso degli ultimi due anni, il sito è stato sottoposto ad alcune modifiche strutturali, come la restrizione delle aperture principali, con muretti a secco, per limitare sia l'illuminazione naturale, sia la circolazione dell'aria; questo al fine di ridurre la formazione di efflorescenze saline sulla superficie dei dipinti murali e l'effetto di erosione

terdisciplinare finalizzato alla caratterizzazione dell'ambiente e al recupero delle testimonianze storico-artistiche conservate all'interno del sito rupestre denominato "Grotta dei Santi" (Fig. 1); localizzato in Contrada Alia, nella Sicilia Sud-orientale [4-5]. Le condizioni climatiche di quest'ambiente semi-confinato hanno favorito il diffuso sviluppo di macro e microsistemi biologici. Il progetto di recupero e riqualificazione del sito ha previsto la caratterizzazione delle biocenosi presenti e il monitoraggio microclimatico, che ha evidenziato particolari valori di temperatura e umidità relativa, oltre ad una copiosa percolazione d'acqua e alla presenza d'intensa illuminazione naturale [6]. Mediante tecniche di microscopia ottica e confocale a scansione laser (M.O., C.L.S.M.) e analisi molecolare (PCR, sequenziamento, analisi delle sequenze), sono stati identificati i componenti dei biofilm (Fig. 2), che ricoprono quasi intera-



Fig.2 Biofilm, con diverse pigmentazioni, sulle pareti dell'Antro delle Sepolture (sin.). Campionamento dei biofilm (dex.)

(Fig. 3, a-e). Pertanto, l'ambiente da semi-confinato ha assunto una configurazione "indoor", con la conseguente variazione dei parametri microclimatici che influenzano lo sviluppo delle bioce-nosi presenti [9-10]. Al fine di prevedere l'impatto che potrebbe avere una tale modifica, soprat-tutto in termini di conservazione dell'ambiente rupestre e dei reperti storico-artistici in esso con-servati, è ancora in corso il monitoraggio microclimatico e microbiologico.



Fig.3 La Grotta dei Santi come appare oggi, dopo la restrizione degli ingressi principali: ingresso dell'Antro delle Sepolture (a) e dell'Antro della Crocifissione (b- c).

Inoltre, il progetto prevede il recupero e l'analisi di reperti scheletrici umani da una delle sepol-ture dell'omonimo antro. Sui campioni scheletrici sono state applicate le correnti metodologie di analisi antropometrica e antroposcopica.

Materiali e metodi

Monitoraggio microclimatico

Il monitoraggio microclimatico è stato eseguito, in maniera puntuale, mediante un termoigrome-tro digitale (Digital Instruments 46011).

Campionamento e colture in vitro

Due campagne di campionamento sono state realizzate prima e dopo la riduzione delle aperture degli antri. Sono stati prelevati biofilm, differentemente pigmentati, con l'ausilio di bisturi e di tamponi sterili. I campioni sono stati conservati in tubi sterili a 4°C, fino al loro utilizzo per le indagini di laboratorio. Il prelievo aerobiologico è stato eseguito utilizzando il campionatore *Sar-torius* MD80 equipaggiato con membrane in gelatina solubili in soluzioni acquose. Frammenti di tali membrane sono stati utilizzati sia per inoculare terreni di coltura (Nutrient agar, *Difco*) sia solubilizzati in 1xTE (10mM TRIS-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) per l'analisi molecolare. Dopo inoculo, le piastre N-agar sono state incubate a 30°C per 48 -72 ore.

Microscopia ottica e CLSM

I campioni prelevati sono stati osservati con l'ausilio di uno Stereomicroscopio Leica Zoom

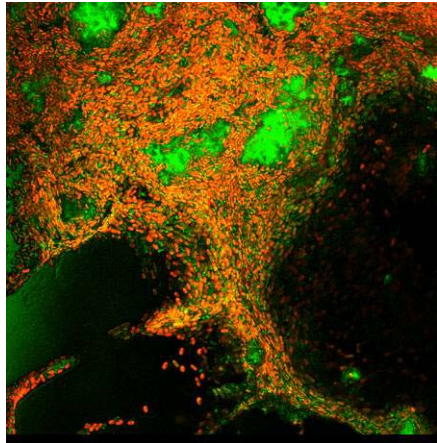


Fig.4 Micrografia CLSM, che mostra un'evidente presenza di colonie microbiche autofluorescenti

2000 (40 X). L'analisi al Microscopio Confocale a Scansione Laser (CLSM), Olympus FV-300 equipaggiato con laser Argon ($\mu=488$ nm, laser verde) e Elio/Neon ($\mu=543$ nm, laser rosso), ingrandimento 40 X [11], ha permesso l'identificazione di strutture auto fluorescenti (Fig. 4).

Estrazione del DNA e reazioni PCR.

Per la caratterizzazione microbica sono stati utilizzati protocolli molecolari che hanno previsto l'estrazione del DNA dai campioni di biofilm [12], usando il kit *Fermentas (Genomic DNA purification kit)*: a

100 mg di ciascun biofilm sono stati aggiunti a 400 μ l di *Lysis Solution* e 5 μ l di proteasi K (20 mg/ml), incubando per 16 ore a 65°C, in una *Stuart Oven /Shaker S130H*. Dopo l'estrazione con cloroformio il DNA è stato precipitato aggiungendo la *Precipitation Solution* e il pellet recuperato per centrifugazione a 14,000 rpm per 10', in *Eppendorf microfuge*. Il DNA è stato utilizzato come molecola stampo in reazioni di PCR (*Polimerase Chain Reaction*), per l'amplificazione *in vitro* di specifiche sequenze bersaglio di

DNA [13]. Le reazioni di PCR sono state eseguite usando la miscela di reazione *Ready-to-Go* della *Amersham Biosciences* e utilizzando i primer per l'amplificazione di porzioni del gene 16S ribosomale cianobatterico: Cy 408R (5'-TTC AA (CT) CCA A (AG) (AG) (AG) (AG) C CTT CCT CCC-3') and Cy 27F1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') [14]. I frammenti ottenuti e risolti per elettroforesi sono stati isolati dai gel di agarosio, purificati e sequenziati ricorrendo al servizio della *Eurofins MWG Operon*. La dimensione dei frammenti di DNA amplificati, risolti su gel di agarosio al 2%, era di circa 400 bp (Fig. 5). L'analisi delle sequenze nucleotidiche ottenute è stata eseguita ricorrendo a software *BLAST*, confrontando le sequenze nucleotidiche con quelle depositate nelle banche dati (*EMBL- Germany, NIH-USA*) [15].

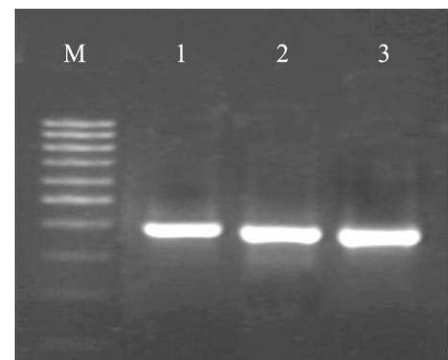


Fig.5 Prodotti delle reazioni PCR risolti su gel di agarosio al 2%. Sono presenti bande di 400 bp (M= 100bp DNA ladder).

Impianto sepolcrale: osservazioni preliminari.



Fig.6 Scavo e recupero dei reperti scheletrici di una sepoltura (Antro delle sepolture).

I reperti scheletrici (Fig. 6) sono stati estratti secondo le correnti metodologie di scavo stratigrafico. Al momento dell'intervento la sepoltura multipla, di cronologia incerta ma non cronologicamente coerente, appariva comunque compromessa da ripetuti interventi. L'analisi dell'impianto sepolcrale ha permesso di confermare un utilizzo ripetuto nel tempo, mostrando due sepolture secondarie rimaneggiate e una terza, evidentemente successiva, in cui l'inumato (in giacitura primaria) mantiene una discreta connessione anatomica.

Risultati e conclusioni

Dopo la chiusura dell'Antro della Crocifissione è stata notata la formazione di nuovi biofilm, da cui sono stati prelevati dei campioni e la cui caratterizzazione è in corso. Durante il primo periodo del progetto, 2009, sono stati misurati i valori di temperatura ed % UR, riassunti in Fig 7, in diversi momenti della giornata durante i mesi estivi (giugno-settembre). Per quanto concerne l'Antro della Crocifissione, caratterizzato da un ingresso talmente ampio da favorire la circolazione dei venti e quindi la disidratazione superficiale del substrato, sono stati rilevati valori di temperatura compresi tra 26°C e 29°C e di % UR tra 29% e 35%. La stessa misurazione effettuata negli stessi mesi dopo due anni (2011), ha evidenziato un progressivo aumento della % UR, associato a una puntuale diminuzione dei valori di

2009		
	Antro delle Sepolture	Antro della Crocifissione
% UR	29% - 36%	29% - 35%
T(°C)	27°C - 30°C	26°C - 29°C

%UR
2009
↑
2011

2011		
	Antro delle Sepolture	Antro della Crocifissione
% UR	62% - 73%	60%
T(°C)	20°C - 21°C	21°C - 23°C

T(°C)
2009
↓
2011

Fig.7 Valori di temperatura e UR%, prima (2009) e dopo (2011) la restrizione delle aperture.

temperatura. Infatti, i valori erano rispettivamente compresi tra 21°-23°C (temperatura) e 60% (% UR). L'antro delle sepolture, al contrario della camera adiacente, era caratterizzato da una più debole circolazione eolica, presentando degli ingressi maggiormente circoscritti, e da un'abbondante percolazione d'acqua. Tali caratteristiche associate alla presenza di luce naturale e di adeguati substrati, favorivano lo sviluppo di macro e microsistemi biologici. I valori della temperatura e della % UR risultavano essere rispettivamente di 27°C - 30°C e 29% - 36%. Anche in questo ambiente è stato rilevato un aumento dei valori di % UR compresi tra 62% e 73%, associato ad una diminuzione della temperatura, 20°C - 21°C (Fig.7).

I risultati ottenuti dalle analisi molecolari confermano quelli ottenuti dall'osservazione al microscopio CLS (Fig. 2), cioè la predominanza di cianobatteri delle specie *Cyanobium* spp. (*Oscillatoria* sp.). I cianobatteri, costituiscono insieme alle microalghe le specie pioniere, maggiormente presenti all'interno di ambienti ipogei e ambienti rupestri [16-17]. Tali microorganismi, presentano in associazione simbiotica con briofite, sono capaci di secernere sostanze esopolimeriche, presenti sotto forma di matrice mucillaginosa [18]. L'osservazione al microscopio ottico ha permesso inoltre di identificare insetti appartenenti all'ordine dei *Diptera Brachycera*, la cui proliferazione è legata alla presenza di fonti nutrizionali quali detriti di natura organica [19].

I risultati delle colture *in vitro*, relativi ai campioni di aerosol, mostrano la crescita di colonie fungine (Fig. 8), la cui identificazione, attualmente in corso, permetterà di definire i potenziali

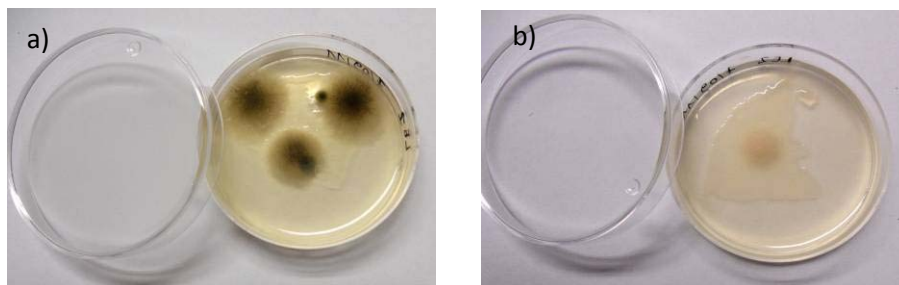


Fig.8 Colonie fungine cresciute su terreno N- agar, inoculate con frammenti di membrana in gelatina ed incubate a 30°C per 48 -72 ore. a) LE 1, Antro della Crocifissione; b) LE 2, Antro delle Sepolture.

effetti nocivi per i visitatori e gli operatori [20].

Inoltre, sono stati recuperati reperti umani in una sepoltura multipla situata nel primo antro.

Sebbene la sepoltura

presentasse una struttura alterata, lo scavo ha permesso il recupero di resti post-craniali riconducibili ad almeno tre individui (due adulti e un sub-adulto). La fossa contiene i resti di una sepoltura primaria in terra piena (valutazione avvalorata dalla resilienza delle articolazioni di alcuni reperti scheletrici); lo scheletro si estendeva dalla porzione toracica fino a quella podalica, che poggiava in parte sui resti frammentari di due precedenti sepolture molto rimaneggiate. La sepoltura primaria è supina, ma presentandosi alterata non offre evidenze stratigrafiche. In prossimità della porzione distale dell'arto inferiore sinistro è stato recuperato un frammento di vetro di un recipiente, riferibile per tipologia produttiva all'epoca imperiale romana. Inoltre, nel sito sono

stati rinvenuti due frammenti ceramici, uno di ceramica invetriata (probabilmente del XIII secolo) e uno di ceramica nera che possiamo solo definire “ellenistica”. Di questi reperti sarà eseguita la corretta datazione.

Considerazione conclusiva

La restrizione delle aperture della Grotta dei Santi risulta essere funzionale per quanto concerne il controllo della circolazione eolica, causa scatenante di fenomeni quali la formazione di efflorescenze saline e la profonda erosione delle superfici ed in particolare gli affreschi. Tuttavia, tali trasformazioni strutturali hanno causato una variazione dei parametri microclimatici, con conseguenze sullo sviluppo e diffusione di specifiche biocenosi [21]. Pertanto, è stato pianificato un piano di controllo continuo della temperatura, umidità relativa e illuminamento, per il controllo della crescita e diffusione dei sistemi biologici, identificati in questo studio. Riteniamo questo monitoraggio necessario sia per la salvaguardia del sito e dei manufatti presenti, sia per valutare il potenziale impatto di eventuali agenti patogeni sulla salute di visitatori ed operatori, in maniera tale da garantire una fruizione sostenibile dello stesso.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Parco Archeologico della Ceramica del Calatino per la disponibilità e la collaborazione mostrata in questo studio. Ringraziano, altresì, la Soprintendenza ai Beni Culturali di Catania, il Comune di Licodia Eubea e l'Archeoclub di Licodia Eubea, per aver reso possibile questo studio; B. Manachini (DAB-UNIPA) per le analisi entomologiche e G. Morici (STEMBIO-UNIPA) per le analisi CLSM.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] BILLECI N., MANCUSO F.P., PELLEGRINO L., PALLA F., 2009. *Caratterizzazione della Biodiversità nella Grotta dei Santi di Licodia Eubea (CT, Sicilia)*. In: Atti del Convegno Sistemi Biologici e Beni Culturali, Convegno nazionale AIAR , Orto Botanico Palermo, 6-7 ottobre 2009, Università degli Studi di Palermo - CRPR - Sicilia, 20
- [2] MESSINA A., 1994, *Le chiese rupestri della Val di Noto, Palermo, Istituto Siciliano di Studi Bizantini e Neoellenici*, Ed. Urso, Palermo, 104-107
- [3] SINEO L., MANACHINI B., CAROTENUTO G., PIOMBINO-MASCALI D., ZINK A.R., 2008, *The Palermo Capuchin catacombs project: a multidisciplinary approach to the study of a modern mummy collection (ca 1600-1900)*, *Conservation Science in Cultural Heritage* 8,155-165.
- [4] BILLECI N., MANCUSO F.P., PALLA F., 2011. *Characterization of biological communities colonizing rock-cut settlements*. Atti del 5th International Congress on Science and technology for the Safeguard of Cultural Heritage in the Mediterranean Basin, 22-25 Novembre 2011, Istanbul, Turkey, 247.
- [5] BILLECI N., MANCUSO F.P., PELLEGRINO L., PALLA F., 2011. *Investigation of biocenosis in a archaeological rock-cut settlements with relevant historic-artistic evidences. A case study in South-east of Sicily*. In: Atti del 15 th IBBS Vienna. International Biodeterioration and Biodegradation Society, 19-24 Settembre 2011, BOKU University, Wien, 88.
- [6] ELSE T.A., PANTLE C.R., AMY P.S., 2003, *Boundaries for biofilm formation: humidity and temperature*, *Applied Environmental Microbiology* 69, 5006-5010.
- [7] PALLA F., BILLECI N., MANCUSO F.P., PELLEGRINO L., 2010. *Microscopy and molecular biology techniques to study biocenosis diversity in semi-confined environment*. *Conservation Science in Cultural Heritage* 10, 185-194.
- [8] BILLECI N., PELLEGRINO L., CARUSO G., MANCUSO F.P., PALLA F., 2011. *Interdisciplinary study of a rupestrian site differently utilized from V-VI to XIV century (Southeast of Sicily)*. In: Atti del 15th Symposium on Mediterranean Archeology, General Association of Mediterranean Archeology, Monastero dei Benedettini, March 3-4-5th 2011, Facoltà di Lettere e filosofia, Università degli Studi di Catania.
- [9] ROLDAN M., CLAVERO & HERNANDEZ MARINE M., 2003, *Aerophytic biofilms in dim habitats*, in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse, C. Saiz-Jimenez ed. Swets & Zeitlinger, 151-162.

- [10] HOFFMANN L., 2002, *Caves and other low-light environments: aerophytic photoautotrophic microorganisms*, in G. BITTON. ED. ENCYCLOPEDIA OF ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, New York, NY., John Wiley & Sons, 171-177.
- [11] PALLA F., MORICI G., 2007, *Monitoring microbial colonization on works of art by Confocal Microscopy and molecular biology techniques*, in Conservation Science, London, Archaetype Publ.
- [12] PALLA F., 2004, *Le biotecnologie molecolari per la caratterizzazione e la valutazione del ruolo dei microrganismi nei processi di degrado dei manufatti di interesse storico artistico*, In: Conservation Science in Cultural Heritage 4/2004, Bologna, Pitagora Editrice, 183-194.
- [13] MULLIS K.B., FALOONA F.A., 1987, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, Methods Enzymol. 155, 335-350.
- [14] CRISPIN C.A., GAYLARDE C.C., GAYLARDE P.M., COPP J., NEILAN B.A., 2003, *Molecular biology for investigation of cyanobacterial populations on historic buildings in Brazil*, in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse, C. Saiz-Jimenez ed. Swets & Zeitlinger, 141-144.
- [15] VALLE G., HELMER-CITTERICH M., ATTIMONELLI M., PESOLE G., 2007, *Introduzione alla bioinformatica*, Ed. Zanichelli, Bologna.
- [16] BRUNO L., URZÌ C., BILLI D., ALBERTANO P. 2006, *Genetic characterization of epilithic cyanobacteria and their associated bacteria*, Geomicrobiol J. 23, 293-299.
- [17] ALBERTANO P., URZÌ C. 1999, *Structural interaction among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganism in Roman hypogea*, Microb. Ecol. 38, 244-252.
- [18] ALBERTANO P., MOSCONE D., PALLESCHI G., HERMOSIN B., SAIZ JIMENEZ C., SANCHEZ-MORAL S., HERNANDEZ-MARINE M., URZÌ C., GROTH I., SCHROECKH V., SAREELA M., MATTILA-SANDHOLM T., GALLON J.R., GRAZIOTTIN F., BISCONTI F., GIULIANI R., 2003, *Cyanobacteria attack rocks (CATS): control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman hypogean monuments*, in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse, C. Saiz-Jimenez ed. Swets & Zeitlinger, 151-162.
- [19] YEATES D.K., WIEGMANN B.M., COURTNEY G.W., MEIER R., LAMBKIN C., PAPE T., 2007, *Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects*, Zootaxa 1668, 565-590.
- [20] PELTOLA J., ANDERSSON M.A., HAAHTELA T., MUSSALO-RAUHAMAA H., RAINEY F.A., KROPPENSTEDT M., SAMSON R.A., SALKINOJA-SALONEN M.S., 2001,

Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment, Applied Environmental Microbiology 67, 3269-3274.

[21] STOMEIO F., LAIZ L., GONZALES J.M., SAIZ-JIMENEZ C., 2006, *Microbial diversity on paintings and engravings in Dona Trinidad Cave (Ardales, Spain)*, in Heritage, Weathering and Conservation, Fort, Alvarez de Buergo, Gomez-Heras and Vazquez- Calvo, eds. Taylor & Francis Group, 355-360.