



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e
Naturali

Dipartimento di Scienze Ambientali

Dottorato di Ricerca in Evoluzione Biologica e Biochimica
XIX CICLO

***Resistenza agli stress e sopravvivenza in ambiente
spaziale di funghi criptoendolitici antartici***

Settore scientifico-disciplinare: BIO/02

Coordinatore: Prof.ssa Lucia Mastrolia

Tutor: Prof. Silvano Onofri

Dottoranda Dott.ssa Donatella Barreca

INDICE

PREMESSA	1
1. INTRODUZIONE	6
1.1. La vita ai limiti dell'adattabilità fisiologica: gli estremofili ed estremotolleranti	6
1.1.1. Gli effetti della temperatura: i microrganismi termofili e termotolleranti, psicrofili e psicrotolleranti	10
1.1.2. L'aridità: i microrganismi alofili e alotolleranti, xerofili e xerotolleranti	13
1.1.3. Gli effetti del pH: i microrganismi acidofili, alcalofili e tolleranti	15
1.1.4. Le condizioni spaziali	16
1.2. Il continente estremo: l'Antartide	20
1.2.1. La geografia	22
1.2.2. Il clima	27
1.2.3. La biodiversità e la sua distribuzione	33
1.3. Il più grande deserto freddo libero da ghiaccio del continente Antartico: le Valli Secche di McMurdo	41
1.3.1. Macroclima, microclima e nanoclima	43
1.3.2. La roccia e la vita nelle rocce	46
1.4. La comunità microbica criptoendolitica	51
1.5. I funghi neri microcoloniali: strutture di sopravvivenza specializzate	59
1.5.1. Le melanine	67
1.5.2. Altre sostanze	68
1.6. L'esperimento LIFE	71

2. MATERIALI E METODI	86
2.1. Materiale biologico	86
2.2. Condizioni di crescita e mantenimento delle colture	92
2.3. Simulazione dei fattori di stress terrestri	93
2.3.1. Resistenza alle basse temperature	93
2.3.2. Irraggiamento ultravioletto UV-B ed UV-C	94
2.3.3. Stress osmotico	97
2.4. Simulazione di ambiente spaziale e di Marte (Experiment Verification Test, EVTs)	98
2.4.1. Preparazione dei campioni biologici e modalità sperimentali	99
2.4.2. EVT-E1	100
2.4.2.1. Vuoto	101
2.4.2.2. Oscillazioni termiche	102
2.4.2.3. Irraggiamento	102
2.4.2.3.1. Irraggiamento monocromatico	102
2.4.2.3.2. Irraggiamento policromatico	103
2.4.3. EVT-E2	106
2.4.3.1. Vuoto ed atmosfera simulata marziana con CO ₂ combinato con l'irraggiamento UV	108
2.4.4. Modalità colturali	110
2.4.4.1. Isolati degli essiccati fungini	110
2.4.4.2. Campioni di roccia colonizzata	112
2.4.5. Modalità colorimetriche per il rilevamento della vitalità e dell'attività metabolica	113
2.4.5.1. Indicatori di vitalità fluorescenti: i fluorocromi FUN 1 e SITOX Green	113

2.4.5.1.1.	FUN 1	113
2.4.5.1.2.	SITOX Green	116
2.4.5.1.3.	Procedura di colorazione per la microscopia a fluorescenza	117
2.5.	Resistenza alle alte temperature ipotizzate durante le fasi di volo e di esposizione nello spazio	122
2.6.	Osservazioni morfologiche	124
2.6.1.	Microscopia ottica in campo chiaro	124
2.6.1.1.	Preparazione del campione per l'osservazione microscopica	124
2.6.2.	Microscopia elettronica a scansione (SEM)	126
2.6.3.	Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	125
3.	RISULTATI	127
3.1.	Tolleranza degli isolati fungini a condizioni di stress terrestri	127
3.1.1.	Basse temperature	127
3.1.1.1.	Resistenza a lungo termine	128
3.1.1.2.	Cicli di congelamento e scongelamento	128
3.1.2.	Radiazione ultravioletta	132
3.1.2.1.	Test di germinazione dopo irraggiamento UV-B	132
3.1.2.2.	Test di germinazione dopo irraggiamento UV-C	135
3.1.3.	Stress osmotico	136
3.2.	Vitalità degli isolati fungini e delle rocce colonizzate sotto condizioni simulate spaziali	143
3.2.1.	EVT-E1 ed E2 su isolati fungini	144
3.2.1.1.	EVT-E1	145
3.2.1.1.1.	Il vuoto	145

3.2.1.1.2.	Effetti dei cicli di temperatura	146
3.2.1.1.3.	Effetti della radiazione UV	147
3.2.1.2.	EVT-E2	148
3.2.1.2.1.	Effetti dell'esposizione combinata del vuoto con la radiazione UV 200-400 nm e dell'atmosfera simulata marziana con la radiazione UV 200-400 nm	148
3.2.1.3.	Saggi colorimetrici	154
3.2.2.	EVT-E1 ed E2 su campioni di roccia colonizzata	173
3.3.	Resistenza alle alte temperature	177
4.	DISCUSSIONE	187
4.1.	Resistenza agli stress terrestri	188
4.1.1.	Basse temperature	188
4.1.2.	Irraggiamento UV	192
4.1.3.	Stress osmotico	198
4.2.	Resistenza a condizioni simulate spaziali e marziane	200
4.3.	Resistenza alle alte temperature	203
5.	CONCLUSIONI	205
6.	BIBLIOGRAFIA	208
ALLEGATO		

PREMESSA

Come si è originata la vita e come si è evoluta? La vita è un fenomeno generale, legato allo scenario complessivo dell'evoluzione cosmica, o è solamente un caso limitato a pochi pianeti o solo alla Terra? Esiste la vita altrove, nell'universo? Quale sarà il futuro della vita sulla Terra o su di un altro pianeta?

Per generazioni l'uomo si è posto queste domande e l'origine della vita rimane un mistero insoluto fondamentale. In questo contesto l'astrobiologia, attraverso un'analisi che coinvolge varie discipline scientifiche e nuove tecnologie, si è posta l'obiettivo di studiare le origini, l'evoluzione, la distribuzione ed il futuro della vita nell'universo nonché la ricerca di pianeti potenzialmente abitati oltre il nostro Sistema Solare, l'esplorazione di Marte e di altri pianeti e la possibilità di un trasferimento interplanetario come base dell'origine della vita.

Sebbene negli ultimi anni molte informazioni siano state acquisite dalle simulazioni spaziali e da modelli teorici (HORNECK, 1995; NICHOLSON 2000, RETTBERG *et al.*, 2004; FINSTER *et al.*, 2007), la ricerca del passato o del presente della vita nell'universo ha bisogno di una solida conoscenza dell'origine e dell'evoluzione della vita sull'unico pianeta sul quale la vita è conosciuta, la Terra.

La diversità della vita sulla Terra, oggi, è il risultato di adattamenti genetici, capacità metaboliche e sfide ambientali. Ad oggi l'esplorazione terrestre ha portato a continui ritrovamenti di vita in ambienti che in precedenza erano stati considerati inabitabili. Ne sono alcuni esempi il ritrovamento di comunità in sorgenti termali, nei deserti freddi dell'Antartide o caldi, quali l'Atacama, nell'acido solforico concentrato degli scarichi minerari, nelle zone soggette alle radiazioni ionizzanti dei reattori nucleari o il ritrovamento di organismi che crescono in ambienti ipersalini o nelle profondità degli oceani a 500-1000 bar di pressione idrostatica.

Questi organismi viventi, definiti estremofili, hanno sviluppato strategie che hanno

permesso loro di vivere anche al di là dei limiti fisici e chimici ai quali si pensava che la vita fosse possibile; si tratta di strategie che li rendono capaci di resistere al congelamento, alla completa disidratazione, alla povertà di nutrienti, all'esposizione ad alti livelli di radiazione ed altre restrizioni chimico-fisiche, o da una combinazione di questi fattori, per intervalli di tempo più o meno lunghi. Il loro studio è perciò fondamentale per indagare sull'origine e l'evoluzione della vita terrestre, sui limiti entro i quali è possibile la vita sulla Terra; essi sono anche modelli di studio per verificare l'ipotesi della possibilità di un trasferimento interplanetario di forme di vita (litopanspermia).

Gli ambienti terrestri estremi rappresentano quindi il miglior modello di studio per capire come gli organismi possano sopravvivere ed anche vivere in tali condizioni; tra questi ambienti estremi l'Antartide rappresenta il continente estremo per eccellenza.

Posizionato al Polo Sud, è rimasto isolato per milioni di anni ed è contraddistinto da condizioni di vita così rigide da renderlo il continente più inospitale al mondo.

In particolare nella Terra Vittoria del Sud esistono delle zone, note come Valli Secche di McMurdo, che rappresentano l'ambiente terrestre deglaciato estremo sulla Terra, caratterizzate da una combinazione di condizioni estreme quali basse temperature, forti escursioni termiche, bassa umidità relativa, cicli di congelamento-scongelo, alta incidenza solare stagionale (specialmente alta radiazione ultravioletta), bassa disponibilità di nutrienti ed elevata aridità dovuta alle scarse precipitazioni annuali, all'alta sublimazione e alle elevate concentrazioni saline per l'evaporazione legata ai forti venti. Tali condizioni hanno fatto ritenere le Valli Secche di McMurdo l'ambiente più vicino a quello marziano (WYNN-WILLIAMS & EDWARDS, 2000; ONOFRI *et al.*, 2004) e, fino agli anni '70, non solo sfavorevoli alla vita animale e vegetale ma praticamente sterili (HOROWITZ *et al.*, 1972).

Nonostante questo, esistono però degli organismi che vivono in questi ambienti, colonizzando gli spazi interstiziali delle porosità delle rocce (FRIEDMANN & OCAMPO, 1976): in uno spessore di circa 10 mm al di sotto della superficie della roccia formano

delle vere e proprie comunità, dette *comunità criptoendolitiche*, di cui la più studiata e diffusa è la *comunità dominata dai licheni* costituita da alghe, funghi lichenizzati e non, cianobatteri, batteri e funghi neri meristemati (FRIEDMANN, 1982).

Tra le forme di vita microbiche esistenti, i funghi neri meristemati, isolati da queste comunità, sono importanti colonizzatori, oggetto in questi anni di un numero sempre maggiore di indagini. Visto l'ambiente in cui vivono, questi organismi devono essere capaci di resistere alle intense pressioni ambientali a cui sono sottoposti e di sviluppare, nel contrastarle, adattamenti specifici; ne sono un esempio le loro caratteristiche peculiari come la formazione di colonie cerebriformi che crescono lentamente, un ciclo cellulare semplice e breve, spesse pareti melanizzate e produzione di polimeri extracellulari protettivi. Un insieme di caratteristiche che rende questi organismi estremotolleranti, presenti in molti habitat diversi fra loro, ma caratterizzati tutti dalla presenza di condizioni di stress (irraggiamento UV, stress idrico, temperature estreme).

Per questo motivo i funghi neri meristemati ritrovati in Antartide costituiscono un modello di studio unico per saggiare i limiti a cui la vita sulla Terra può essere ancora possibile (ONOFRI *et al.*, 2004). Inoltre le caratteristiche morfologiche sopraelencate, che ne hanno determinato il successo adattativo, ne hanno suggerito l'utilizzo, insieme alle comunità criptoendolitiche dominate dai licheni, come modello di studio per la valutazione della resistenza di questi microrganismi, a breve e lungo termine, a condizioni spaziali (SELBMANN *et al.*, 2002; ONOFRI *et al.*, 2004; SELBMANN *et al.*, 2005).

In questo contesto, in collaborazione con l'Agenzia Spaziale Europea (ESA), nell'ambito del programma EXPOSE-EuTEF, si colloca l'esperimento LIFE (Lichens and Fungi Experiment), in corso di attuazione, di cui è responsabile scientifico il Prof. Silvano Onofri e che si avvale di un gruppo di ricerca composto da italiani, tedeschi e spagnoli. L'esperimento si propone di valutare la resistenza a lungo termine di comunità criptoendolitiche, funghi antartici e di alcuni licheni alle condizioni spaziali,

riguardanti il vuoto spaziale, l'UV solare e le radiazioni cosmiche e a quelle simulate marziane, sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS).

Il lavoro della presente tesi è stato, in un primo tempo, quello di selezionare isolati particolarmente resistenti, tra quelli meristemati neri, isolati dalle comunità criptoendolitiche e conservati nella collezione *Culture Collection of Fungi from Extreme Environments* (CCFEE). A tal fine sono state condotte prove di resistenza riguardanti basse temperature, radiazioni ultraviolette e stress osmotico.

A questo punto, gli isolati che hanno mostrato i risultati migliori sono stati sottoposti a prove di simulazione delle condizioni spaziali e marziane presso l'Istituto di Biologia e Medicina Aerospaziale (DLR) di Colonia (Germania) a cui sono seguite le opportune verifiche di vitalità. Il successo ottenuto ha consentito la selezione degli isolati fungini idonei per la prossima spedizione sulla International Space Station.

La tesi è organizzata in una parte introduttiva, una descrizione dei metodi seguiti per saggiare le resistenze ai tre fattori di stress sopra indicati, oltre a quelli di simulazione spaziale e marziana ed i risultati ottenuti.

La parte iniziale, che introduce all'argomento di tesi, è organizzata in 5 sezioni.

La prima intitolata 'La vita ai limiti dell'adattabilità fisiologica: gli estremofili ed estremotolleranti' contiene alcune indicazioni relative agli organismi capaci di vivere in ambienti ritenuti impossibili per la vita e la cui conoscenza è importante nel tentativo di rispondere alle numerose domande che da tempo l'uomo si pone sull'origine della vita; sono anche riportate alcune principali tipologie di ambienti estremi e di organismi estremofili conosciuti.

La seconda, intitolata 'Il continente estremo: l'Antartide' si propone di descrivere alcune delle principali caratteristiche, relative alla geografia e al clima, che rendono questo ambiente il più *inabitabile* sulla Terra.

La successiva si occupa de 'Il più grande deserto freddo libero da ghiaccio del continente Antartico: le Valli Secche di McMurdo', che in Antartide rappresenta la più vasta zona deglaciata e che, malgrado sia caratterizzata da un macroclima

particolarmente estremo, dimostra come la vita si è instaurata nelle rocce con le comunità criptoendolitiche.

‘I funghi neri microcoloniali: strutture di sopravvivenza specializzate’ che segue contiene, invece, le principali informazioni riguardanti i funghi neri meristemati a cui appartengono quelli isolati dalle comunità criptoendolitiche che sono stati oggetto di studio.

Infine l’ultima sezione si propone di descrivere l’esperimento ‘LIFE – Lichens and Fungi Experiment’ per il quale sono state condotte le indagini di questo lavoro.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA VITA AI LIMITI DELL'ADATTABILITÀ FISIOLÓGICA: GLI ESTREMOFILII ED ESTREMOTOLLERANTI

Gli organismi viventi sono presenti in quasi ogni nicchia ecologica, nell'aria, sulla terra, nel mare e nella profondità degli oceani.

Da un punto di vista antropico gli ambienti ostili all'uomo sono solitamente definiti estremi ed originariamente, alcuni di loro, erano ritenuti troppo limitanti anche per sostenere la vita microbica (STETTER, 1999). Perciò molti habitat, come gli ambienti geotermali, terrestri e marini, le regioni polari, le sorgenti acide ed alcaline e le profondità ad altissima pressione degli oceani, sono considerati estremi (NICOLAUS *et al.*, 2004). Si tratta, spesso, di ambienti stabili caratterizzati da condizioni vicine ai valori limite nei quali un organismo può vivere sia fisiche (temperatura, radiazione, pressione), sia geochimiche (salinità, essiccamento, pH, specie chimiche dell'ossigeno, potenziali redox, metalli, gas) (JAVAUX, 2006). É noto oggi che gli ambienti estremi che si credevano troppo ostili per permettere la sopravvivenza degli organismi, sono invece l'habitat naturale di alcuni microrganismi conosciuti come *estremofili* (NICOLAUS *et al.*, 2004).

KRISTJÁNSSON & HREGGVIDSSON (1995) definiscono estremofilo un organismo le cui condizioni ottimali si trovano fuori dagli ambienti "normali", intendendo per normali quelli che hanno una temperatura tra 4 e 40°C, pH tra 5 e 8,5 e una salinità tra quella dell'acqua dolce (10 mM) e quella dell'acqua di mare (ca. 0,6 M). Secondo GORBUSHINA & KRUMBEIN (1999) invece i microrganismi considerati "estremofili" che abitano ambienti molto particolari, essendo organismi che sono altamente adattati a limiti molto ristretti di condizioni ambientali dovrebbero essere chiamati "normofili" proprio perchè possono vivere solamente in uno spazio veramente ristretto o in una

condizione ambientale che pone limiti ambientali estremamente ristretti. Il vero organismo estremotollerante (indicato con il termine di *poikilotrofilo* o *pecilotrofilo*), in alternativa, sarebbe il vero esperto nella sopravvivenza e in grado di svolgere attività metabolica in più ampi range di condizioni ambientali; sarà cioè in grado di sopravvivere e di essere attivo metabolicamente in qualsiasi condizione, come appunto un “vero” estremofilo. Dipende tutto dal tempo: un organismo estremofilo dovrà possedere quelle caratteristiche che lo rendono in grado di superare i periodi sfavorevoli e di riprendere la crescita quando si presenteranno le condizioni favorevoli.

Conoscere la biologia degli estremofili, ed il loro ambiente, permette di formulare delle ipotesi sulle condizioni richieste per l’origine e la primordiale diversificazione della vita sulla Terra e sugli altri pianeti. Ad oggi non si conoscono le condizioni in cui la vita si è originata sulla Terra, se sia emersa in uno stagno (possibilmente tidale) tiepido (LAZCANO & MILLER, 1996) o in una cavità bollente, su minerali di argilla, o minerali di solfuro o goccioline di acqua (BADA, 2004); è per questo motivo che tale argomento è al centro di controversie. La vita potrebbe essere un’inevitabile conseguenza della geochimica planetaria, un “imperativo cosmico” (DE DUVE, 1995) o potrebbe aver richiesto condizioni ambientali e geologiche estremamente specializzate non comuni.

Naturalmente non tutti gli ambienti estremi terrestri sono analoghi delle condizioni della vita primordiale (CLEAVES II & CHALMERS, 2004), ma una conoscenza migliore delle loro condizioni fisico chimiche può soltanto migliorare le nostre conoscenze sull’evoluzione ed i limiti della vita sulla Terra, dal momento che sono questi ambienti l’unico “campione” di vita che possiamo studiare. Così, se comparati alle condizioni terrestri attuali, gli oceani primordiali erano estremi perchè contenevano molto meno ossigeno e le superfici (anche quelle oceaniche) non erano protette dalle severe radiazioni solari per l’assenza di uno strato di ozono. Per questo gli organismi primordiali potrebbero essere gli ipertermofili degli Archaea ed i

termofili o i mesofili dei Bacteria. D'altra parte la vita si è però adattata anche a temperature veramente basse ed è sopravvissuta alle maggiori glaciazioni come in Antartide, dove i microrganismi, inclusi i procarioti ed eucarioti (funghi, alghe e protisti), si sviluppano nel ghiaccio, nell'acqua fredda ed anche all'interno delle rocce dove proteggono se stessi dall'essiccamento e dalle radiazioni ultraviolette (FELLER & GERDAY, 2003).

È molto probabile che gli organismi superiori non siano in grado di sopravvivere in condizioni estreme, a causa della loro compartimentazione e complessità cellulare. La scoperta che gli ambienti estremi ospitano differenti tipi di procarioti ha dato considerevole impeto alla ricerca sugli estremofili (BERTOLDO & ANTRANIKAN, 2002).

Lo studio della biologia e dell'ecologia degli estremofili è essenziale quindi per definire i limiti della vita come la conosciamo, per studiare la conservazione delle tracce biologiche (*biosignature*) negli ambienti estremi analoghi a quelli della Terra primordiale e/o a quella potenziale extraterrestre e per sperimentare tecnologie necessarie alla loro scoperta (JAVAUX, 2006).

Soltanto alcuni anni fa, gli estremofili erano degli organismi "esotici", esplorati soltanto nel mondo da pochi gruppi di ricerca. Ora, sebbene il loro *status* sia ritenuto ancora "eccentrico" sono spesso utilizzati anche come fonti per nuove molecole di interesse biologico. È chiaro, ad esempio, che alcuni termofili, particolarmente Archaea, possiedono vie metaboliche insolite e potrebbero servire come fonte di metaboliti dalle insolite proprietà ed applicazioni (DEMIRJIAN *et al.*, 2001; HOUGH & DANSON, 1999). Inoltre, questi organismi, che rappresentano una sorta di curiosità biologica sulla Terra, potrebbero essere le forme di vita estreme più comuni nell'Universo. Ciò che noi chiamiamo esotico e raro sul nostro pianeta potrebbe essere un fatto normale per gli ambienti planetari alieni.

Negli ultimi decenni, gli estremofili sono stati ritrovati in un'ampia gamma di ambienti sulla Terra: nei due ambienti più aridi, come le *Dry Valleys* in Antartide o il deserto di Atacama nel Cile, ogni volta ci sia acqua allo stato liquido, anche se per

breve tempo in un anno, oppure a 3 km di profondità sotto la superficie, o nei reattori nucleari, nelle sorgenti idrotermali, nei canali di scolo acidi delle miniere e nei fiumi da essi contaminati (come il rio Tinto in Spagna, AMARAL ZETTLER *et al.*, 2002), nelle aree ad alte concentrazioni di metalli pesanti, nei laghi e nel ghiaccio polare, nel vuoto e in condizioni anerobiche (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001).

Gli estremofili includono organismi provenienti dagli Archaea, Bacteria ed Eucarya (SECKBACH, 1999) (fig. 1.1) e vengono classificati secondo le specifiche nicchie ambientali necessarie per la loro crescita ottimale: la temperatura (alta o bassa), il valore di pH (acido o alcalino), la pressione (alta), la salinità (alta) e l'aridità. In letteratura microbica vengono chiamati termofili, psicrofili, acidofili, alcalofili, barofili, alofili e xerofili (LINCOLN *et al.*, 1982).

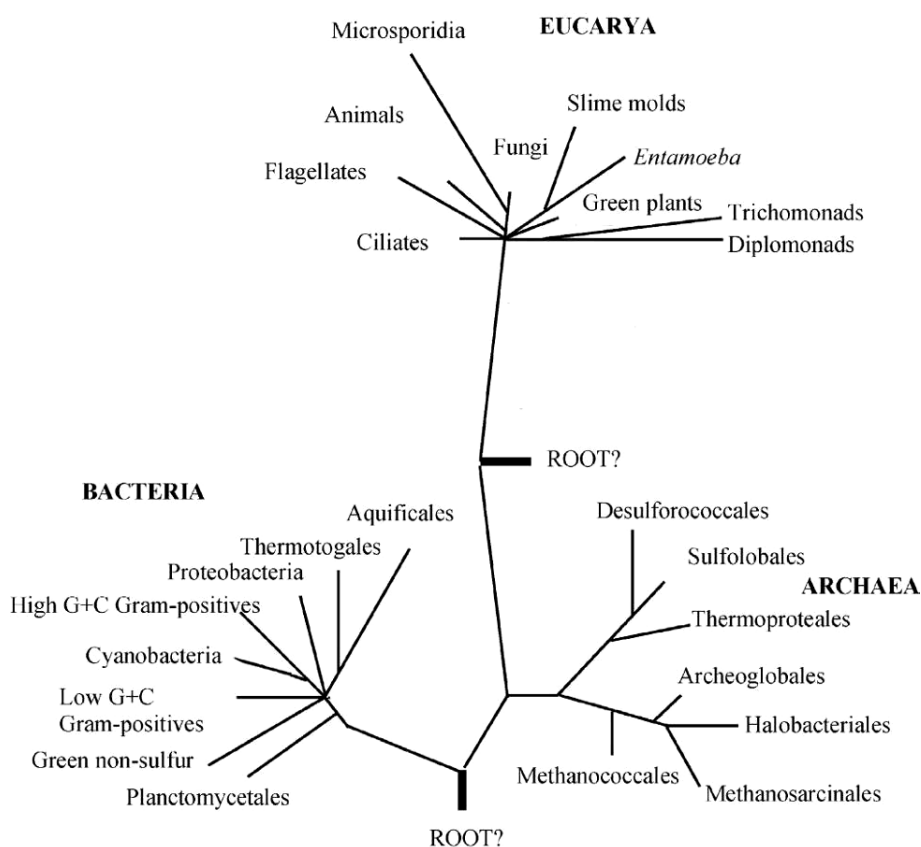


Figura 1.1 – Rappresentazione evolutiva degli Archaea, Bacteria ed Eucarya. L'albero filogenetico indica la primordiale ramificazione dei tre domini: i Bacteria si sono evoluti prima di 3.5–3.8 Ga, gli Archaea prima di 2.8 Ga e gli Eucarya prima di 2.77 Ga (Ga = bilione di anni) (JAVAUX, 2006).

1.1.1. GLI EFFETTI DELLA TEMPERATURA: I MICRORGANISMI TERMOFILI E TERMOTOLLERANTI, PSICROFILI E PSICROTOLLERANTI

La vita alle basse e alle alte temperature non sembra rappresentare una sfida per molti microrganismi, dal momento che esiste una sostanziale diversità ed abbondanza di vita a temperature vicino al punto di congelamento o di poco inferiori a quella di ebollizione.

Generalmente si dimentica che la Terra è per lo più fredda e molti degli ecosistemi sono esposti a temperature che sono permanentemente sotto i 5°C; circa il 70% della superficie terrestre è coperta dagli oceani che hanno una temperatura costante di 4-5°C sotto i 1000 m di profondità, senza tener conto della latitudine; le regioni polari occupano il 15%, e a loro bisogna aggiungere le regioni alpine ed i ghiacciai (FELLER & GERDAY, 2003).

L'acqua è il solvente per la vita e deve essere presente affinché la vita esista. Quando solidifica, la normale chimica cellulare dev'essere sospesa e *di fatto* il punto di congelamento per la crescita è il limite più basso (ROBERTS, 1999). Nonostante questo gli *psicrofili* o *criofili* sono, secondo la definizione di MORITA (1975), gli organismi in grado di crescere e riprodursi a basse temperature con un *optimum* di crescita alla temperatura di ca. 15°C, un massimo a ca. 20°C ed un minimo a 0°C o più basso. Sebbene questa definizione può risultare ambigua in quanto i limiti della temperatura sono stati selezionati arbitrariamente e non corrispondono a nessuna chiara separazione tra processi biologici e condizioni ambientali e non può essere applicata a tutti gli eucarioti (il cui limite superiore per la psicrofilia viene mantenuto a 25°C) di fatto viene frequentemente usata in letteratura. Oltre a ciò i microrganismi si comportano come unità termodinamiche, capaci, in altre parole, aumentando la temperatura di coltura, di aumentare le proprie velocità di reazione e quella di crescita.

Molti psicrofili sono batteri, archaea, lieviti, funghi e microalghe presenti nei suoli, nelle acque fredde e nel ghiaccio marino, anche se frequentemente non sono adattati soltanto a basse temperature ma anche ad altre limitazioni ambientali (p.e. baro-psicrofili, alo-psicrofili, troglo-psicrofili, etc) (SECKBACH, 1999; FELLER & GERDAY, 2003). Molti si trovano in Antartide (FRIEDMANN, 1993; ONOFRI, 1999), anche se i più grandi serbatoi sono costituiti dalle acque e dai sedimenti dei profondi oceani poichè le masse d'acqua oceaniche sono uniformemente fredde sotto il termoclino, vale a dire il sottile strato d'acqua che, come un mantello, divide la massa d'acqua sovrastante (più calda) da quella sottostante (più fredda) (HERBERT, 1986).

Molti adattamenti cellulari alle basse temperature ed i sottostanti meccanismi molecolari non sono completamente conosciuti e sono ancora studiati, come la regolazione dei lipidi della membrana plasmatica (composizione degli acidi grassi dei fosfolipidi e biosintesi degli steroli), il mantenimento della sintesi delle proteine, la produzione di proteine *anti-freeze* ed i meccanismi di tolleranza o di *avoidance* del gelo (FELLER & GERDAY, 2003).

Nei funghi adattamenti alla disidratazione e allo stress osmotico indotti dalle basse temperature risultano spesso dalla sintesi e dall'accumulo intracellulare (osmoregolazione) di uno o più specifici soluti chiamati *soluti compatibili* od *osmoliti* (BLOMBERG & ADLER, 1992). Si tratta di composti dal basso peso molecolare, i polioli (alcoli poliidrici o polidrossilici), come il glicerolo, il mannitolo, l'arabitolio ed alcuni zuccheri derivati, come il trealosio (BROWN, 1978), che operano a basso potenziale osmotico, senza che venga richiesta alla cellula alcuna modifica strutturale o enzimatica sensibile, e che, anche ad alte concentrazioni, non interferiscono né con il metabolismo intracellulare né con l'attività enzimatica.

I polioli ricoprono diversi ruoli nell'osmoregolazione dei funghi, operando come crioprotettori, in grado cioè di abbassare il punto di congelamento del fluido intracellulare (NASH, 1966), osmoregolatori (LEWIS & SMITH, 1967), nella regolazione coenzimatica, come riserve di carboidrati e composti traslocatori (JENNINGS, 1984).

Oltre a ciò alcuni funghi antartici sono in grado di produrre esopolisaccaridi in risposta a condizioni di congelamento e scongelamento proteggendo, probabilmente, le cellule dal cambiamento della permeabilità agli ioni Na^+ e K^+ ed agendo, sulla viscosità della soluzione extracellulare evitando l'eccesso di stress (SELBMANN *et al.*, 2002; 2005).

In contrasto con gli psicrofili, i *termofili* si sviluppano ad inusuali alte temperature. Questi organismi si sviluppano in ambienti caratterizzati dalle alte temperature (acque calde, suolo soggetto ad alto irraggiamento solare e aree geotermali) crescendo più velocemente sopra i 40°C (STETTER, 1999), ad una temperatura ottimale tra 60°C ed 80°C , e sono ampiamente distribuiti tra i batteri nei generi *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacter*, *Thermotoga* e *Aquifex*.

Gli *ipertermofili* sono generalmente posizionati negli Archaea e sono ipoteticamente considerati, sulla base di indagini filogenetiche, l'ultimo comun antenore "amante del calore" di tutti gli esseri viventi e anche l'origine della vita ad alte temperature (NICOLAUS *et al.*, 2004). I batteri e gli archaea ipertermofili crescono velocemente a temperature ottimali tra gli 80 ed i 106°C , intervallo al quale già alcune piccole molecole si decompongono rapidamente. Come conseguenza, i componenti cellulari come le proteine, gli acidi nucleici e le membrane devono essere stabili e funzionare al meglio a temperature intorno ai 100°C , il punto di ebollizione dell'acqua. Generalmente gli ipertermofili sono adattati non soltanto alle alte temperature ma anche ad altri distinti fattori ambientali che includono la composizione dei gas e dei minerali, il pH, il potenziale redox e la salinità. Molti di loro esibiscono una modalità di nutrizione chemolitotrofica: le reazioni inorganiche redox servono come fonte di energia (chemolitotrofico) e la CO_2 è la sola fonte di carbonio richiesta per la costruzione del materiale organico cellulare (autotrofico). Perciò questi organismi fissano la CO_2 con la chemosintesi e vengono chiamati chemolitotrofi (STETTER, 1999). La più alta temperatura di crescita osservata ad oggi è stata di 113°C per l'archaea chemolitotrofica archaea *Pyrolobus fumarii* (BLÖCHL *et al.*, 1997) la cui

temperatura di crescita rappresenta perciò il limite superiore della temperatura per la vita. Per le specie dei generi *Methanopyrus*, *Pyrodictium* e *Pyrolobus*, le temperature uguali o inferiori agli 80°C risultano ancora troppo basse per sostenerne la crescita (STETTER, 1988).

Tra li eucarioti il più studiato è probabilmente il fototrofo acidofilo *Cyanidium caldarium* (SECKBACH, 1994), la cui temperatura di crescita ottimale è di 45° C con un *maximum* a 57°C (BROCK, 1978).

Gli organismi in grado di crescere alle temperature intermedie, invece, né troppo calde né troppo fredde, tra i 25 e 40°C, sono chiamati *mesofili*.

1.1.2. L'ARIDITÀ: I MICRORGANISMI ALOFILI E ALOTOLLERANTI, XEROFILI E XEROTOLLERANTI

Molti ambienti terrestri, seppur in modo differente (deserti caldi e freddi ed ambienti ipersalini), presentano situazioni di scarsa disponibilità di acqua allo stato liquido, necessaria al metabolismo cellulare. Un modo largamente adottato per definirla è l'impiego del termine attività dell'acqua o a_w (water activity), che rappresenta semplicemente il contenuto effettivo di acqua espresso come frazione molare (l'acqua pura ha un valore di a_w pari a 1, mentre il valore per tutte le altre soluzioni è sempre minore a 1) (GRANT, 2004).

Gli organismi capaci di crescere tollerando condizioni di aridità vengono indicati come *xerotolleranti* e qualora prediligano condizioni di aridità, come *xerofili* ($a_w \leq 0,85$).

Tra questi gli *alofili* e gli *alotolleranti* sono gli organismi capaci di svilupparsi in ambienti con bassa disponibilità d'acqua, legata alla presenza di sali.

Gli alofili (dal greco *halos* che significa sale) sono definiti come quegli organismi che richiedono una quantità maggiore a 2,5 M di NaCl per una crescita ottimale.

Esistono tre gruppi di organismi procarioti alofili identificati: gli archaea aerobici alofili, gli archaea anaerobici metanogenici alofili e i batteri alofili (MADERN *et al.*, 2000).

Del primo gruppo il più studiato è *Halobacterium*, che può mantenere la concentrazione di KCl nel citoplasma cellulare vicino alla saturazione (MADERN *et al.*, 2000) e la stabilità strutturale della cellula a concentrazioni fino a 1 M di Cl^- (WELSH, 2000). L'archaea alofilo *Haloarcula marismortui* è stato isolato dal Mar Morto, il corpo d'acqua più salato della Terra.

Molti alobatteri sono aerobici, vivono sugli strati della superficie delle salamoie e hanno un colore rosso/arancio dovuto rispettivamente alla presenza di carotenoidi o strutture di membrana contenenti batteriorodopsine (JOO & KIM, 2005). Dal momento che la solubilità di O_2 in queste condizioni risulta bassa, gli alobatteri come quelli acquatici, hanno sviluppato delle vescicole di gas che sono legate alle proteine che permettono loro di galleggiare sullo strato della superficie ipersalata dove la concentrazione di O_2 è più alta e la fototrofia mediata dalla batteriorodopsina è possibile.

Generalmente gli alofili possono vivere negli habitat ipersalini essendo in grado di mantenere il bilancio osmotico, accumulando ad esempio sali, come sodio o potassio (NaCl o KCl), fino a concentrazioni che sono isotoniche con l'ambiente.

Per quanto concerne l'attività enzimatica gli enzimi si sono adattati acquisendo un numero relativamente maggiore di cariche negative sulla superficie dei propri residui aminoacidici per prevenirne la precipitazione (VAN DEN BURG, 2003).

Anche l'esistenza e la distribuzione di organismi eucariotici alofili ed alotolleranti è ben documentata (SECKBACH, 1999; GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2005a).

Alcune specie fungine xerofile ed alofile antartiche e non antartiche (URZI & REALINI, 1998; SELBMANN *et al.*, 2005), appartenenti ai funghi neri meristemati, isolate da rocce e da ambienti ipersalini (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2005a), si proteggono dai fenomeni legati all'aridità producendo polisaccaridi extracellulari

(SELBMANN *et al.*, 2002, 2005) ed osmoregolatori intracellulari dal basso peso molecolare che sono accumulati ad alte concentrazioni senza interferire con la normale attività enzimatica ed il metabolismo cellulare. Si tratta di soluti compatibili appartenenti a diverse classi di composti quali: melanina (BELL & WHEELER, 1986; BUTLER & DAY, 1998; KOGEJ *et al.*, 2004), micosporine (VOLKMANN *et al.*, 2003, KOGEJ *et al.*, 2006), polioli (glicerolo, arabitolo e mannitolo), e zuccheri o derivati degli zuccheri (trealosio) (GRANT, 2004).

1.1.3. GLI EFFETTI DEL pH: I MICRORGANISMI ACIDOFILI, ALCALOFILI E TOLLERANTI

Molti microrganismi hanno un optimum di pH ben definito per la crescita, capaci anche di far fronte ad oscillazioni di una unità inferiore o superiore al loro *optimum*. I microrganismi *acidofili* ed *alcalofili* mostrano una crescita ottimale rispettivamente a pH inferiore a 2-3 e maggiore di 9-10 (HORIKOSHI, 1998; MADIGAN *et al.*, 2003).

I batteri alcalofili, ampiamente distribuiti in natura ed isolati dal suolo, escrementi e sedimenti delle profondità marine, non crescono o lo fanno molto lentamente a valori neutri di pH o inferiori a 6,5 (HORIKOSHI, 1998).

Gli archaea acidofili *Acidianus infernus*, *Thermoplasma vulcanium* e *Metallosphaera sedula*, isolati dalle isole Eolie e da Napoli, mostrano una crescita ottimale a pH 2, mentre i microrganismi acidofili maggiormente documentati sono *Picrophilus oshimae* e *P. torridus*, che mostrano un optimum di crescita a pH 0,7.

Determinante per l'acidofilia è la stabilità della membrana cellulare; il fatto che le cellule degli acidofili possano lisarsi quando vengono sospesi in un terreno di coltura a pH neutro suggerisce che la concentrazione di H⁺ rappresenta la chiave per il mantenimento dell'integrità di membrana.

Gli alcalofili, isolati da laghi di carbonato di sodio (soda), sorgenti ricche di carbonato e suoli alcalini, richiedono invece meccanismi che garantiscono che i valori

di pH citoplasmatico vengano mantenuti almeno 2 valori sotto il valore di pH dell'ambiente circostante (ca. pH 10). Per questo sembrano utilizzare una pompa Na^+ , anzichè protonica, compatibile con l'alta concentrazione di OH^- presenti, per il mantenimento dell'integrità di membrana (PAKCHUNG *et al.*, 2006).

Dal momento che il valore di pH del citoplasma sia per gli acidofili che per gli alcalofili risulta vicino alla neutralità, gli enzimi intracellulari di questi estremofili non hanno bisogno di adattarsi al rispettivo pH estremo (VAN DEN BURG, 2003).

Tabella 1.1 – Classificazione degli organismi estremofili

Tipo	Condizioni ambientali di crescita	
	Temperatura	
Psicrofilo	Bassa	(< 15-20°C)
Termofilo	Alta	(60-80°C)
Ipertermofilo	Molto alta	(> 80°C)
pH		
Acidofilo	Basso	(< 2-3)
Alcalofilo	Alto	(≥ 9)
Salinità		
Alofilo	Alta	(2-5 M o 3-20% NaCl)

1.1.4. LE CONDIZIONI SPAZIALI

Il nostro Sistema Solare ha nove pianeti e più di 60 satelliti. Ad oggi di tutti questi mondi soltanto la Terra ospita la vita. Per questo motivo la ricerca della vita extraterrestre si basa su ciò che si conosce della vita terrestre.

Come si è detto, grazie all'avanzamento della tecnologia, nell'ultimo decennio sulla Terra sono stati scoperti organismi, gli estremofili, che vivono in condizioni considerate estreme e inadatte alla vita, limite per quanto riguarda i processi chimici vitali. Se gli organismi terrestri possono prosperare in questi ambienti, è ragionevole aspettarsi che condizioni simili su un altro pianeta possano ospitare la vita.

Mentre la biologia classica ha concentrato le sue ricerche sugli unici esempi di “vita” finora conosciuti, l’astrobiologia estende i limiti delle indagini biologiche oltre la Terra, ad altri pianeti, alle comete, ai meteoriti e allo spazio in genere (HORNECK, 1995).

L’oggetto di primaria importanza della ricerca esobiologica è conseguire una migliore conoscenza dei principi che portano alla comparsa della vita dalla materia inanimata, la sua evoluzione e la sua distribuzione sulla Terra e attraverso l’Universo (KLEIN, 1986).

Nello spazio le condizioni spaziali (vuoto, basse temperature, radiazione UV, radiazione ionizzante e microgravità), dal punto di vista di ogni organismo adattato alle condizioni terrestri, sono estreme e l’ambiente nell’orbita terrestre è caratterizzato da valori alti di vuoto, un’intensa radiazione ed estreme temperature.

Nello spazio interplanetario, infatti, dominano pressioni sotto i valori di 10^{-14} Pa e da 10^{-4} a 10^{-6} Pa quelle nell’orbita terrestre; i maggiori costituenti di quest’ambiente sono sia l’ossigeno e l’azoto molecolare che gli atomi altamente reattivi dell’ossigeno e dell’azoto.

L’ambiente radiativo del nostro Sistema Solare è governato da componenti di origine galattica e solare. La radiazione cosmica galattica è composta da protoni (85%), elettroni, particelle α (14%) e le cosiddette particelle HZE (1%), definite come ioni positivi ad alta energia di raggi cosmici; la radiazione solare emessa dai venti solari, durante le tempeste solari, è invece composta dal 90 al 95% di protoni, dal 5 al 10% di particelle α e da un numero relativamente piccolo di ioni pesanti. Nelle vicinanze della Terra i protoni e gli elettroni sono intrappolati dal campo geomagnetico e lo spettro della radiazione elettromagnetica si estende sopra diversi ordini di magnitudine, dai raggi X alla corta lunghezza d’onda delle radio frequenze; alla distanza della Terra dal Sole (1 unità astronomica), l’irradianza solare equivale a 1.360 W/m^2 , di cui il 45% attribuibile all’infrarosso, 48% al visibile e soltanto il 7% all’intervallo UV (NICHOLSON, 2000).

La temperatura di un corpo nello spazio, che è determinata dall'assorbimento e dall'emissione di energia, invece, dipende dalla sua posizione rispetto al sole, agli altri corpi orbitanti, alla sua superficie, alle sue dimensioni, alla sua massa e all'albedo (riflessione). Nell'orbita terrestre, la fonte di energia comprende la radiazione solare (1.360 W/m^2), l'albedo terrestre (480 W/m^2) e la radiazione terrestre (230 W/m^2). Periodicamente, un oggetto in orbita può essere riparato dalla luce del Sole quando passa dal lato "notturno" della Terra. Perciò, nell'orbita terrestre, la temperatura di un corpo può raggiungere sia valori estremamente alti che estremamente bassi di temperatura (NICHOLSON, 2000).

Lo spettro solare extraterrestre si estende fino alle basse lunghezze d'onda dell'UV-C (190-280 nm) e del vuoto (<190 nm). Sperimentalmente si può perciò presumere che, tra i parametri dello spazio cosmico, proprio la radiazione solare ultravioletta sia il fattore più deleterio, causa della morte di organismi terrestri altamente resistenti come le spore batteriche (RETTBERG, 2005), e che l'azione simultanea della radiazione ricca di energia con il vuoto ne incrementi anche la reattività (HORNECK *et al.*, 2001b).

I recenti sviluppi nelle tecnologie spaziali permettono oggi lo studio degli adattamenti e della sopravvivenza degli organismi terrestri a nuove categorie di condizioni estreme nello spazio (vuoto e microgravità), che includono la Stazione Spaziale Internazionale (ISS), i voli spaziali ed i laboratori di simulazione d'impatto e di condizioni spaziali.

Nonostante questo, in molti esperimenti effettuati nello spazio, a breve termine, è stata dimostrata l'abilità di virus, spore batteriche (come *Bacillus subtilis*) e fungine, archaea e cianobatteri (HORNECK, 1993; MANCINELLI *et al.*, 1998; HORNECK, 2001b) e di altri organismi come i licheni (ESA, 2005) di sopravvivere ad alte dosi di UV extraterrestre solare o in combinazione con altri parametri spaziali, come il vuoto.

Questa espansione delle attività umana verso lo spazio aumenta l'importanza della microbiologia nello sviluppo, ad esempio, di sistemi di supporto vitali per le future

stazioni planetarie e nella protezione e nello sviluppo di strategie adatte a prevenire, trovare e registrare inquinamenti terrestri di ambienti extraterrestri (JAVAUX , 2006).

Conoscere la biologia degli estremofili ed i loro rapporti con l'ambiente permette di investigare sui limiti della vita sulla Terra e di ipotizzare sia sulle condizioni richieste per l'origine e la primordiale diversificazione della vita sulla Terra sia sulla possibilità di panspermia (HORNECK *et al.*, 2001a; HORNECK *et al.*, 2001b), ovvero sia di un trasferimento ipotetico interplanetario biologico, sia sugli habitat potenziali della vita passata e presente oltre la Terra, nel Sistema solare (Marte e Europa, la luna di Giove) o anche nel sistema esoplanetario (JAVAUX , 2006).

Di fatto, gli ambienti dove i ricercatori cercano eventuali forme di vita, passata o presente, nel Sistema Solare sono ambienti freddi (p.e. i poli terrestri), o soggetti a intensa radiazione solare (p.e. la superficie di Marte), o dove sono presenti soluzioni ad elevata salinità (p.e. gli oceani di Europa), in sostanza quegli ambienti estremi dove gli estremofili potrebbero vivere e svilupparsi (HORNECK, 2000).

Le comunità criptoendolitiche ed i funghi neri meristemati criptoendolitici antartici che colonizzano ambienti le cui condizioni sono così vicine a quelle marziane (MCKAY, 1993; ONOFRI *et al.*, 2004) ne sono un esempio (ONOFRI *et al.*, 2007b; Esperimento LIFE).

1.2. IL CONTINENTE ESTREMO: L'ANTARTIDE



L'Antartide, così lontana dalle altre terre emerse, che ha raggiunto la posizione polare attuale dopo un lungo viaggio, cominciato da altre latitudini (fig. 1.2), è il continente degli estremi: sono condizioni estreme la sua inaccessibilità, il freddo, le tempeste insostenibili, l'altitudine media della superficie, l'aridità dell'atmosfera, il rivestimento di ghiaccio, e le manifestazioni elettromagnetiche della ionosfera.

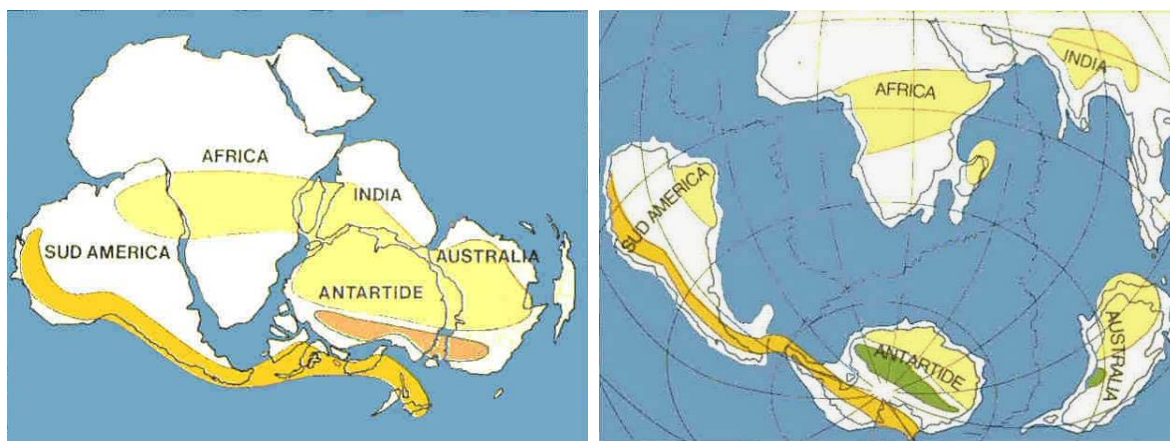


Figura 1.2 – Successione dal supercontinente Gondwana alla disposizione attuale dei continenti (MANZONI, 2001).

La vita, insediata fra i ghiacci e le rocce, ha realizzato caratteristiche strategie di adattamento al freddo e al buio, e quella che popola i mari si è organizzata in un ecosistema efficiente e singolarmente specializzato.

L'ambiente polare è estraneo ed inusuale. Il paesaggio antartico è comunemente percepito come remoto, distaccato e singolare non soltanto per gli evidenti elementi fisici e geografici (il gelo, il candore, le tempeste, la fauna e la flora uniche, l'isolamento geografico, il deserto, le luci crepuscolari, le aurore australi, la notte polare) ma soprattutto per la percezione di estraneità spaziale e temporale dei suoi paesaggi glaciali, marini e celesti.

L'infinita distesa di neve e di ghiaccio appare a molti come la sabbia dei deserti; il paesaggio antartico, con le sue grandi distanze di superfici uniformi, anche se inconsuete, non ha paragoni sulla terra (fig. 1.3).



Figura 1.3 – Distese di ghiaccio a Morris Basin e Kay Island, nella Terra Vittoria del Nord. Foto Laura Zucconi, 2004.

Lo spazio dell'interno antartico appare, oltre che discontinuo, non quantificabile: milioni di chilometri quadrati della calotta di ghiaccio non si distinguono fra loro né per regioni, né per raggruppamenti collettivi, e non solo all'immaginazione, ma neppure all'esperienza. È estremamente laborioso visualizzare mentalmente un chilometro cubo; ancora più difficile immaginare 30 milioni di chilometri cubi di ghiaccio della calotta (MANZONI, 2001).

1.2.1. LA GEOGRAFIA

La posizione dell'Antartide "in fondo al mondo" (fig. 1.4) e la distribuzione dell'illuminazione solare in due periodi di luce e di buio alternati nell'arco dell'anno sono gli elementi determinanti del suo paesaggio e del suo clima polare.



Figura 1.4 – Posizione del continente Antartide sulla Terra.

La causa dell'illuminazione solare è astronomica dal momento che l'asse intorno al quale la Terra ruota è inclinato di $23^{\circ}27'$ rispetto al piano dell'eclittica, l'orbita che la Terra percorre intorno al Sole, perciò la calotta polare antartica è rivolta verso il Sole durante la primavera e l'estate australi (21 settembre - 23 marzo), e verso lo spazio esterno durante l'autunno e l'inverno. A sud del circolo polare antartico il giorno e la notte durano più di 24 ore. Lungo l'anno si alternano così due periodi di illuminazione, uno prevalentemente diurno ed uno prevalentemente notturno.

In primavera ed in estate, procedendo con la stagione e con la latitudine verso il polo, i giorni si allungano fino a durare settimane o mesi, mentre le notti diventano sempre più brevi. In autunno ed in inverno le notti diventano progressivamente più lunghe ed i giorni più brevi; alla latitudine 90° S, in altre parole al polo sud, ci sono una sola alba ed un solo tramonto l'anno, e sei mesi di notte continua si alternano a sei mesi di giorno continuo. Il polo sud si trova al centro dell'Antartide ovverosia dove l'asse di rotazione terrestre interseca la superficie del ghiaccio, a 6357 km a sud dal centro della Terra.

La regione antartica è più ampia della calotta polare. È uno spazio geografico di circa 40 milioni di km^2 , centrato al polo sud, formato da un continente, l'Antartide, e

da un vasto oceano anulare che lo circonda, l'oceano Australe, punteggiato da rare e remote isole. Il confine della regione antartica si trova nell'oceano. Conosciuto come fronte polare o convergenza antartica è una transizione fra masse d'acqua distinte, che separa le acque superficiali fredde dell'Oceano Australe con quelle degli altri oceani.

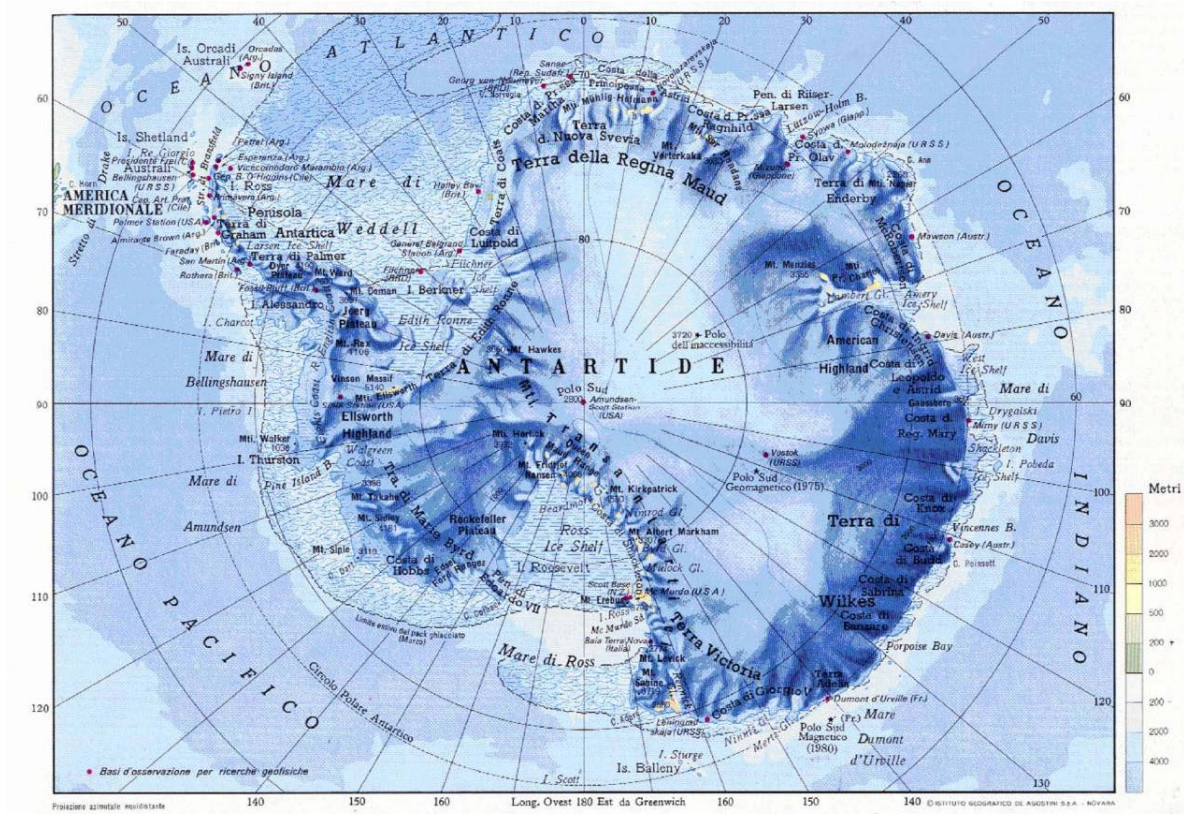


Figura 1.5 – L'Antartide.

L'Antartide (fig. 1.5), quasi completamente situata oltre il 60° parallelo, è il più isolato dei continenti tanto che le sue coste si trovano a 950 km dal Sudamerica, 2300 km dalla Tasmania, 2200 km dalla Nuova Zelanda e 3600 km dall'Africa. La superficie del continente è di 13,9 milioni di km², circa una volta e mezzo quella dell'Europa (fig. 1.6).

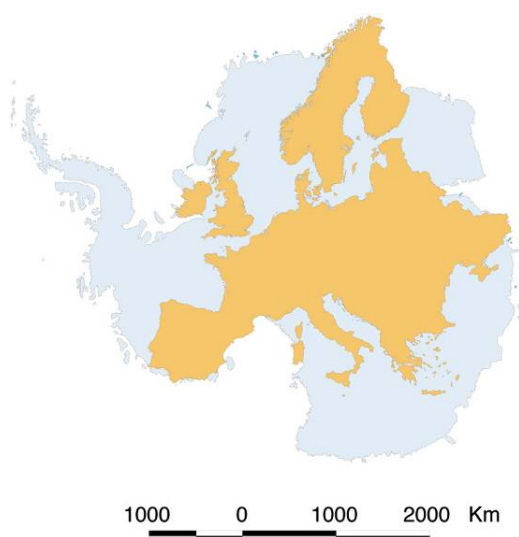


Figura 1.6 – L'Antartide con un'area totale, comprese le piattaforme di ghiaccio, di 13,8 milioni di km², equivalente a quasi 50 volte l'Italia, è più estesa dell'Europa (10,5 milioni di km²) e degli Stati Uniti d'America (9,4 milioni di km²) (www.mna.it).

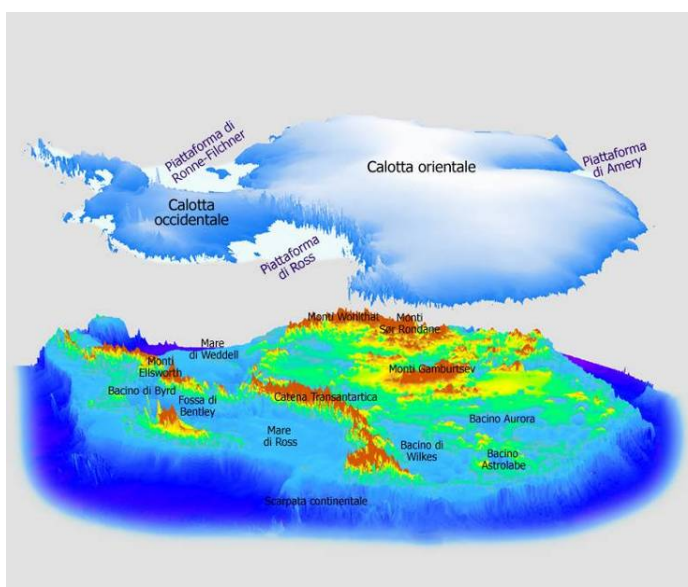
La calotta glaciale è una solida e spessa coltre di ghiacci permanenti che occupa quasi tutto il continente estendendosi nei mari marginali per 1,5 milioni di km².

Il contorno dell'Antartide è subcircolare malgrado la forma sia resa meno circolare dalla proiezione verso nord della Penisola Antartica e dalle due grandi rientranze formate dai mari di Weddell, dal settore atlantico, e di Ross, da quello pacifico. Queste ultime delimitano un largo corridoio transantartico da cui si innalza il sistema montuoso della catena Transantartica (4000 km di estensione con cime di 4500 m). Sia l'alta catena che le due depressioni che la affiancano dividono l'Antartide in due subcontinenti: l'Antartide Orientale, che occupa l'emisfero orientale rispetto al meridiano di Greenwich ed è la massa principale con oltre 10 milioni di km² di superficie pari a tre volte l'Antartide Occidentale e il cui interno è un'alta e ininterrotta distesa di altipiani glaciali, e, nell'emisfero occidentale, l'Antartide Occidentale. Quest'ultima, sotto il ghiaccio che la copre, è in realtà un complesso arcipelago che raggruppa almeno quattro maggiori frammenti di crosta terrestre continentale spezzata e deformata, di diversa età e costituzione. Il polo sud, a 2835 m di altitudine sulla calotta glaciale, è centrale rispetto alla figura complessiva dell'Antartide ma il punto più interno e più lontano dalle coste è il punto di inaccessibilità, al centro dell'Antartide Orientale.

L'Antartide è coperta da un immenso ghiacciaio, la calotta glaciale (fig. 1.7), il più vasto altipiano della Terra con uno spessore medio di 2200 m che occupa il 98% della superficie dell'Antartide; una distesa di neve e ghiaccio molto elevata sul livello del mare, che rende l'Antartide il più alto dei continenti.

La superficie rocciosa di base rimane nascosta sotto il ghiaccio profondo e forma una topografia sepolta che comprende alte montagne e vasti bacini depressi. La calotta riempie tutti i bacini e le depressioni dell'interno del continente, e solo alla periferia ne emergono, come isole dal mare, i *nunatak*, le cime e le creste più alte.

Figura 1.7 – La copertura della calotta glaciale. Al di sotto della calotta antartica sono presenti catene montuose (p.e. i Monti Gamburtsev) e bacini subglaciali (p.e. i bacini di Aurora e di Wilkes). La scala verticale è aumentata di 100 volte rispetto a quella orizzontale (www.mna.it).



L'interno dell'Antartide è uno sterminato altipiano di neve e ghiaccio, ininterrotto per migliaia di chilometri; un paesaggio piatto e uniforme all'occhio umano, non allenato a distinguere le strutture e le morfologie sottilmente accennate dai cambi di tonalità della superficie bianca.

Vari parti della calotta oltrepassano le coste e vanno a coprire i mari periferici e interni galleggiandovi sopra per decine di km, fino a 150 km dalla costa: le piattaforme glaciali fluttuanti. Le piattaforme maggiori occupano i mari interni; diverse altre invadono le baie e bordano le coste.

La Catena Transantartica è la struttura montuosa più imponente, che attraversa il continente lungo il margine dell'Antartide Orientale di fianco alle depressioni dei Weddell e di Ross: come una diga di roccia sbarra il deflusso del ghiaccio della calotta orientale verso i mari interni. Vicino al polo si immerge sotto il ghiaccio, ma ne emergono isolati il monte Thiel e poche altre cime sparse. Nella Terra Vittoria le cime della catena si profilano alte sul mare di Ross in una successione di massicci allineati.

La Penisola Antartica è tutta una dorsale montuosa di catene di varia altezza, dai 2000 ai 4000 m, intervallate da profonde depressioni colmate dalla calotta glaciale occidentale. I rilievi della Penisola costituiscono il prolungamento geologico della catena delle Ande, alla quale si raccordano in mare attraverso il doppio arco delle isole Orcadi Australi e Sandwich Australi.

I territori liberi dai ghiacci sono le eccezioni del paesaggio antartico, poco più del 2% della superficie complessiva (330.000 km²); sono liberi dai ghiacci molti tratti costieri dell'estrema Penisola, che è stretta, ha scarso spazio per l'insediamento glaciale, e si proietta verso nord dove il clima è meno rigido. Nel continente orientale rimane però scoperto meno dell'1% del territorio.

Nelle aree deglacciate il paesaggio è fatto di nude rocce modellate dal ghiaccio o di terreni detritici in cui si sviluppano embrionali strutture periglaciali. Talvolta ruscelli effimeri finiscono in modeste pozze ghiacciate. I suoli non sono evoluti; ospitano una primitiva vegetazione che solo nell'estremità della Penisola comprende due specie di piante superiori, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) e *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (ONOFRI, 1999). L'ecosistema terrestre culmina con piccoli insetti: il predatore più grande di questo continente pesa meno di un grammo.

Questi territori liberi dai ghiacci che si estendono per più di qualche decina di chilometri quadrati sono chiamati, malgrado il clima e non senza qualche ragione *oasi*, o quando si trovano fra le montagne, *valli secche*; le loro rocce assorbono stagionalmente un po' di calore solare ed il loro paesaggio è quello dei deserti rocciosi, i più freddi della Terra.

1.2.2. IL CLIMA

L'Antartide ha le condizioni climatiche tra le più inospitali del pianeta, che lo rendono l'ambiente più estremo tra quelli conosciuti.

La causa del grande freddo, caratteristico delle regioni polari, è intimamente connessa alla sua posizione geografica; la regione antartica, riceve soltanto una piccola quantità di radiazione solare diretta, a causa della forte inclinazione rispetto alla verticale con cui tale radiazione colpisce la terra alle latitudini polari. La parte inferiore dell'atmosfera, la troposfera, infatti, è esposta alla radiazione solare nel periodo semiannuo di luce, quando la radiazione la raggiunge con bassa angolazione. Per l'altra metà dell'anno prevale l'oscurità; perciò la radiazione solare integrale che raggiunge l'Antartide è inferiore, a parità di superficie, rispetto a quella delle medie e basse latitudini.

Durante il giorno polare (estate) la radiazione incidente sulla calotta di ghiaccio antartica è altissima, con una potenza superiore a 4200 MJ/m^2 , il valore più alto del globo; in un solo giorno di sole a dicembre la radiazione raggiunge $35\text{-}40 \text{ MJ/m}^2$ sugli altipiani interni e $25\text{-}30 \text{ MJ/m}^2$ sulle coste. Nella notte polare (inverno) la radiazione incidente è quasi nulla raggiungendo appena 20 MJ/m^2 in tutti e cinque i mesi che la costituiscono.

Dell'energia incidente che raggiunge la superficie antartica, circa $\frac{1}{4}$ viene assorbito e $\frac{3}{4}$ vengono riflessi indietro nello spazio dai ghiacci, dalle nubi e dalle nevi che, come tutte le superfici, perdono calore, non compensato dalla radiazione solare, emettendo verso l'atmosfera radiazione infrarossa (raffreddamento radiativo). La regione polare si comporta, così, sostanzialmente come uno specchio vasto 20 milioni di km^2 , con un albedo (effetto riflettente) del valore medio annuale di 75 (una riflessione totale del 100% della luce incidente corrisponde ad un albedo pari a 100, l'assorbimento totale (0%) ad un albedo 0) contro un valore pari a 70 dell'Artico e 22 per la fascia equatoriale (MANZONI, 2001).

La parte più calda del continente è la Penisola Antartica e le isole adiacenti, in cui la temperatura media annua può essere solo di poco più bassa di -5°C . Più a sud e intorno la costa Antartica, le temperature medie annue variano fra circa -10 e -20°C , ma già a breve distanza dalla costa, esse scendono rapidamente intorno a -40°C . Le temperature medie mensili presenti sullo sconfinato altipiano di ghiaccio (Plateau) si stabilizzano, fra aprile e settembre, attorno a -70°C e, fra dicembre e febbraio, attorno ai -30°C ; al polo sud, a 2800 m d'altitudine, la temperatura media estiva è di -25°C , quella massima mai misurata -14°C mentre oscilla attorno a 0°C per le regioni costiere. La minima temperatura rilevata è stata di $-89,2^{\circ}\text{C}$ nella stazione russa Vostok nel 1983, a 3500 m s.l.m., al centro della calotta glaciale orientale (ØVSTEDAL & LEWIS SMITH, 2001; www.mna.it). Per brevi periodi le temperature possono salire ben al di sopra delle medie mensili, specialmente nelle stazioni di rilevamento costiere.

Ciò che rende l'Antartide il più freddo dei continenti, però, non risiede soltanto nell'incidenza della radiazione solare.

Sull'oceano Australe le temperature hanno distribuzione geografica a fasce concentriche in progressiva diminuzione verso sud; la presenza della banchisa in Antartide (in inverno 17-20 milioni di km^2 sui 14 milioni di km^2 del continente stesso), che isola l'atmosfera fredda dall'oceano più tiepido, rende le temperature più basse di $8-15^{\circ}\text{C}$ rispetto a quelle sul mare aperto a pari latitudine. In questo modo la regione antartica risulta più fredda di quella artica, che con una minore copertura stagionale dei ghiacci marini, una calotta glaciale meno estesa e decentrata e una differente distribuzione delle terre emerse, presenta temperature annue superiori a quelle antartiche anche di $10-15^{\circ}\text{C}$. La situazione è aggravata anche dalle veloci e costanti correnti atmosferiche e oceaniche della fascia subantartica, che ostacolano il trasferimento di calore dalle regioni tropicali.

Un'altra delle cause che contribuisce a mantenere freddo il continente è l'elevazione sul livello del mare: il raffreddamento dovuto all'altitudine è di ca. 1°C ogni 100-150 m di dislivello. Come precedentemente detto i ghiacci rinviando nello

spazio gran parte della radiazione incidente e una persistente condizione di alta pressione isola le masse d'aria fredda antartica rispetto a quelle delle latitudini meno fredde; ciò sta a significare che, in Antartide, lo strato d'aria radente al suolo risulta più freddo determinando un fenomeno chiamato *inversione termica*. Così, sugli altipiani antartici le temperature, anziché diminuire, aumentano con l'altitudine, a volte gradualmente, altre rapidamente mentre il sottosuolo roccioso risulta perennemente gelato per molte centinaia di metri di profondità (permafrost) (MANZONI, 2001). Differente e particolare la condizione climatica delle poche aree libere dai ghiacci, quali le oasi delle aree costiere e della Penisola Antartica e le valli del deserto di Ross: in questi luoghi le rocce assorbono il calore solare delle brevi estati cedendolo lentamente all'aria permettendo l'istaurarsi, su pochi cm di altezza dal suolo, di microclimi locali meno freddi, con temperature superiori di 10-15°C a quelle circostanti (FRIEDMANN, 1982; NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

Sono da citare, a completamento delle condizioni del clima presente in Antartide, i venti e le precipitazioni.

Come si è detto nell'altipiano interno lo strato d'aria più basso, a contatto con la superficie di ghiaccio, è il più freddo e il più denso. I venti d'inversione, generati dalle differenze di densità dell'aria, caratteristici e persistenti sulla calotta antartica, soffiando radenti al suolo con grande costanza di direzione, dirigono lo strato radialmente verso la periferia. Raggiunti i versanti della periferia del continente questi venti accelerano sotto la spinta della gravità diventando venti *catabatici* (fig. 1.8).

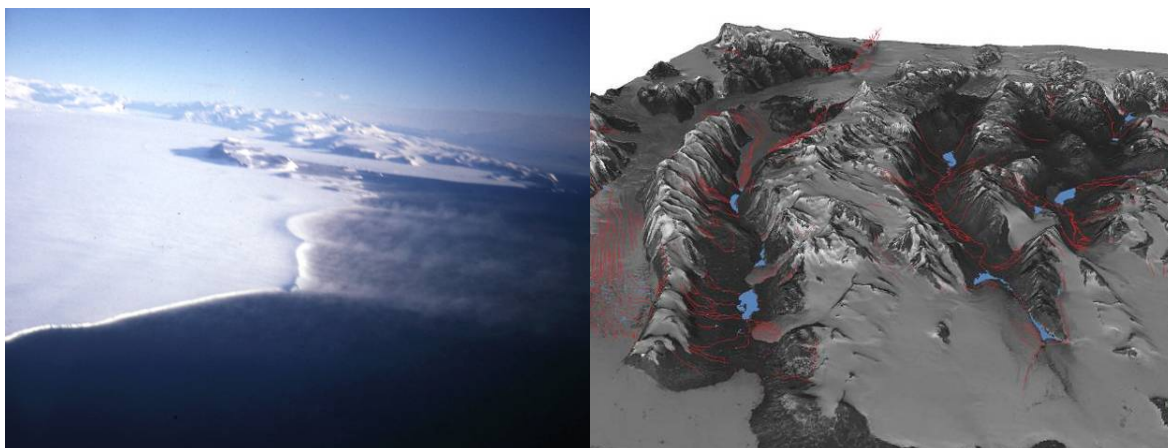


Figura 1.8 – Venti catabatici che soffiano sulla costa ed, in rosso, nelle Dry Valleys (www.mma.it).

Tipicamente incostanti, questi venti spirano incessantemente quando i bacini di raccolta sugli altipiani glaciali interni sono abbastanza vasti da raffreddare con continuità grandi masse d'aria sviluppando tempeste di neve improvvise capaci di durare molti giorni chiamate *blizzard*. La violenza di raffiche di 200-250 km/h, sulle coste dell'Antartide Orientale, è frequente. I venti catabatici, freddissimi e secchi, solitamente non trovano ostacoli sulla calotta glaciale né, sono frenati dall'attrito delle onde, come avviene sul mare; allora si incanalano nelle valli e spingono lontano, dai tratti di mare in cui sboccano, la banchisa.

Tutte le precipitazioni atmosferiche, intense nel circuito oceanico, sono nevose ma scarse. Tendono ad accumularsi e compattarsi, trasformandosi in ghiaccio e alimentando gli imponenti ghiacciai che scivolano verso la costa erodendo roccia e strati di ghiaccio più antico e proseguono anche per lunghi tratti nell'acqua; la media annua è equivalente a ca. 130 mm d'acqua sul continente. L'umidità è sempre molto bassa a causa delle basse temperature; ciò determina una bassa quantità di vapore atmosferico nell'interno antartico che assorbe pochissima radiazione contribuendo così ulteriormente al raffreddamento dell'aria. Il clima continentale dell'Antartide ha le basse quantità di precipitazioni e di umidità tipiche dei deserti; paradossalmente, quindi, malgrado contenga la maggior parte delle riserve di acqua dolce globale (ca.

90%), mai disponibile in forma liquida, risulta il più grande deserto della Terra (MANZONI, 2001).

L'estensione della regione antartica, caratterizzata dalla predominanza di elementi climatici dalle forti differenze geografiche, permette allora la distinzione di diverse zone bioclimatiche:

- ***regione subantartica***

(includere un gruppo di isole chiamate Georgia del Sud), caratterizzata da un clima oceanico con una temperatura media mensile superiore agli 0°C che raramente raggiunge i -2°C e precipitazioni fra i 1400 ed i 1800 mm annuali;

- ***regioni dell'Antartide marittima del Nord***

(inclusi Bouvetøya, le Isole Sandwich meridionali, le Isole Orkney meridionali, le Isole Shetland meridionali e la costa occidentale della Penisola), dove il clima è freddo umido marittimo, la temperatura media mensile è sopra gli 0°C per 3-4 mesi durante l'estate e raggiunge i -10/-12°C durante l'inverno ed in cui le precipitazioni sono comprese fra i 350 ed i 500 mm annuali;

- ***regioni dell'Antartide marittima del Sud***

(inclusa la costa occidentale della Penisola Antartica e le isole al largo), in cui il clima è freddo secco marittimo, la temperatura media mensile è sopra gli 0°C per 1-3 mesi durante l'estate e raggiunge i -15°C in inverno e le precipitazioni restano inferiori ai 350 mm annuali;

- ***regioni costiere dell'Antartide continentale***

(inclusa la frangia costiera est ed ovest dell'Antartide meridionale al 70° parallelo e la costa est della Penisola Antartica meridionale al 64° parallelo), dove il clima è freddo arido, la temperatura media mensile si aggira intorno gli 0°C per 0-2 mesi in estate, da -5°C a -25°C durante l'inverno e le precipitazioni sono comprese fra i 100 ed i 150 mm annuali;

- *Antartide continentale*

(comprese le zone montuose ed i ghiacciai dell'entroterra della costa intorno all'altopiano di ghiaccio, inclusi i nunataks dell'altopiano di ghiaccio e le Valli Secche), dove il clima è estremamente freddo e arido, e le temperature medie mensili mai superiori ai -5°C in estate e ai -30°C durante l'inverno, mentre le precipitazioni restano inferiori a 100 mm annuali;

- *altopiano di ghiaccio*

(la parte interna dell'Antartide continentale, generalmente sopra i 2000 m di altitudine), caratterizzato da clima estremamente continentale, temperature medie mensili mai superiori ai -15°C ed inferiori a -50°C in inverno e scarse precipitazioni (HOLDGATE, 1977; ØVSTEDAL & LEWIS SMITH, 2001).

Tabella 1.2 – Quadro riassuntivo dei fattori ecologici relativi al deserto freddo antartico (COWAN & TOW, 2004)

Evento	Condizioni favorevoli	Condizioni sfavorevoli
Orientamento delle valli	N-S (dalla parte opposta della direzione dei venti catabatici)	E-W (lungo la direzione dei venti catabatici)
Esposizione	a nord	a sud
Inclinazione delle superfici	moderata a nord	a sud o orizzontale
Radiazione solare	alta	bassa o sporadica
Microclima	sopra il punto di congelamento	sotto il punto di congelamento
Vento	assenza di vento	forti venti
Direzione del vento	venti del nord	venti del sud
Umidità	alta	bassa
Drenaggio	basso o neutralizzato	rapido
Durata di acquadisponibile	lunga	breve
Ciottoli (derivati rocciosi)	traslucidi	opachi
Composizione ionica del suolo	bilanciata (non salato)	sbilanciata (salato)
pH	approssimativamente neutro	alto o basso
Contaminazione organica	suolo ornitogenico	nessuna

1.2.3. LA BIODIVERSITÀ E LA SUA DISTRIBUZIONE

La presenza di condizioni climatiche estreme (basse temperature, bassa umidità, scarsa disponibilità d'acqua e alternanza dei periodi di alta incidenza radiativa con lunghi periodi di oscurità, forti venti, eccezionale estensione della calotta glaciale e dei ghiacci marini) contribuisce a rendere il continente antartico non solo l'ambiente più rigido sulla Terra ma anche il più inospitale allo sviluppo di comunità biologiche (COWAN & TOW, 2004). Ciononostante flora e fauna hanno saputo conquistare questo ambiente così estremo, anche se in maniera meno vistosa e articolata rispetto agli altri continenti.

I caratteri ambientali e climatici sono notevolmente diversi nelle varie zone geografiche, e le piccole comunità biologiche sono altrettanto varie.

Ciò vuol dire che le isole subantartiche hanno flore e faune più evolute, nella zona climatica marittima, lungo le coste della parte terminale della Penisola e nelle zone circostanti, si hanno piccoli tratti di tundra, mentre nell'Antartide continentale sopravvivono piante e animali inferiori, licheni o piccoli invertebrati, e comunità microbiche (MANZONI, 2001).

In netto contrasto con l'ambiente di deserto freddo, tipico della maggior parte delle aree deglacciate, in Antartide l'ambiente marino costiero è caratterizzato da una notevole stabilità delle condizioni ambientali (temperatura e salinità) e dalla presenza di molti organismi. Nel corso di milioni di anni infatti, molte specie di alghe e di animali si sono adattate alle condizioni di temperatura dell'acqua (-1.87°C) ed all'alternanza tra il periodo invernale (caratterizzato dalla presenza del ghiaccio marino, scarsa disponibilità di luce e di cibo) e quello estivo (www.mna.it).

Prima che la deriva dei continenti la posizionasse dove si trova ora, l'Antartide era una terra dal clima tropicale, con vegetazione rigogliosa, com'è testimoniato dai numerosi fossili di piante ed animali e dai giacimenti di carbone, petrolio e gas naturali. Oggi, le forme di vita animali si concentrano vicino al mare.

Nelle zone interne le condizioni sono molto ostili: la povertà del suolo e la scarsa disponibilità d'acqua allo stato liquido permettono la vita vegetale solo nei tratti costieri liberi dai ghiacci, così man mano che aumenta la latitudine e le condizioni climatiche diventano più avverse si assiste ad un declino della diversità delle specie osservabili; in alcune oasi nel mese di gennaio è possibile toccare punte di 15°C, contro i -18°C del polo.

Nella vegetazione antartica prevalgono, così, quasi esclusivamente, muschi, licheni, epatiche e funghi.

La zona subantartica, caratterizzata da un clima fresco oceanico favorevole, con temperature medie mensili sopra il punto di congelamento fino a 6 mesi durante l'anno, presenta una vegetazione dominata da piccole tundra di crittogame, a basse altitudini da piante vascolari, a formare praterie e, a maggiori altitudini, da briofite e licheni.

Spettacolari associazioni di muschi e licheni multicolori, fogliosi e fruticosi appartenenti ai generi *Himantormia*, *Umbilicaria* ed *Usnea*, altri crostosi tra cui i generi *Acarospora*, *Buellia*, *Caloplaca*, *Lecanora*, *Lecidea*, *Rizhoplaca* (fig. 1.9), sono invece prevalenti nelle aree rocciose costiere della zona marittima dove il clima freddo marittimo, umido nel versante nord e secco in quello sud, raggiunge temperature medie mensili sopra gli 0°C per circa 3 mesi durante l'anno.



Figura 1.9 – A sinistra distesa di licheni, sotto *Usnea* sp. (www.mna.it).



In particolare sulle scogliere a strapiombo sul mare e nelle distese rocciose sono ospitate molte specie di licheni appartenenti a taxa nitrofili (*Acarospora*, *Buellia*, *Caloplaca*, *Haemmatomma*, *Huea*, *Lecania*, *Physcia*, *Ramalina* e *Xanthoria* e molti altri generi) a causa dell'influenza sul territorio che hanno gli aerosol nutrienti originati dalle colonie degli uccelli marini; comuni sono anche le epatiche.

Le piante superiori sono presenti in Antartide con sole due specie *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) e *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (ONOFRI, 1999), la cui presenza è comunque confinata nell'Antartide marittima e nelle zone subantartiche (fig. 1.10).



Figura 1.10 – A sinistra *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae); a destra *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) a King Gorge Island, South Shetland Islands, Antartide marittima (barra = 10 cm). Foto Silvano Onofri, 2002.

Nell'Antartide continentale il numero delle specie si fa sempre più ristretto per via delle condizioni climatiche sempre più ostili (da -5°C a -50°C le temperature medie mensili lungo il gradiente che va dalle coste al Plateau di ghiaccio). In scala molto minore alcune specie di *Candelaria*, *Candelariella*, *Physcia* e *Xanthoria*, formano colonie coloratissime su cuscini di muschi morenti diventando, verso l'interno, insieme ai muschi, occasionalmente più discontinui finché, nella parte dell'altopiano di ghiaccio, soltanto i licheni crostosi tra cui *Acarospora gwynnii* Dodge & Rudolph, *Aspicilia glacialis* Dodge, *Buellia grisea* Dodge & Baker, *Buellia pallida* Dodge & Baker, *Lecanora fuscobrunnea* Dodge & Baker, *Lecidea cancriformis* Dodge & Baker (HALE, 1987; SEPPELT *et al.*, 1995) sono appena visibili in nicchie protette lasciando il posto alla vita microbica (ØVSTEDAL & LEWIS SMITH, 2001).



Figura 1.11 – A sinistra, una distesa di muschi a Edmonson Point e, a destra, licheni su roccia a Kay Island, Terra vittoria del Nord (barra = 10 cm). Foto Laura Zucconi, 2004.

Più che in qualunque altro continente in Antartide i microrganismi sono, negli ambienti terrestri, ecologicamente dominanti (FRIEDMANN, 1993); la colonizzazione dei microrganismi è concentrata prevalentemente nelle zone prive di ghiaccio e le rocce in tal senso costituiscono un substrato importante, anche se nel ghiaccio e lungo le rive dei laghi sono stati isolati alcuni cianobatteri ed alghe verdi insieme a lieviti, batteri, microfunghi, protozoi, rotiferi, tardigradi e nematodi (HOROWITZ *et al.*, 1972; ABYZOV, 1993; COWAN & TOW, 2004).

La colonizzazione del territorio antartico dipende dall'efficienza con la quale i microrganismi possono raggiungere il continente e quindi disperdersi ed adattarsi. Per far questo si possono avvalere di mezzi di dispersione per numero e variabilità più numerosi rispetto a quelli che hanno a disposizione gli organismi di maggiori dimensioni; la circolazione atmosferica, che opera attraverso gli scambi aerei legati al vento, quella oceanica, che dipende dalla corrente circumpolare e costiera antartica, gli animali, per la migrazione di uccelli, pesci e mammiferi marini, ed anche gli umani, la cui presenza sembra averne accelerato il tasso di trasferimento, ne sono alcuni esempi. Tali mezzi possono operare su lunghe distanze influenzando anche la ridistribuzione dei microrganismi all'interno dell'Antartide stessa.

Generalmente un propagulo microbico che arriva in un potenziale habitat, incontrando la forte pressione selettiva operata dall'ambiente antartico, può adottare tre differenti strategie di sopravvivenza:

- *crescita ottimale (specialisti)* da parte dei microrganismi con un elevata fitness all'interno del range delle condizioni ambientali polari. Questo sistema prevede l'occupazione di ristrette nicchie procurando così loro un vantaggio competitivo rispetto ad altre specie colonizzanti (p.e. psicrofili);
- *crescita sub-ottimale e sopravvivenza (generalisti)*. Tale strategia riguarda microrganismi che crescono in condizioni sub-ottimali e che sopravvivono in quanto tolleranti le condizioni ambientali estreme; le loro condizioni ottimali di crescita si riscontrano, infatti, al di fuori dai range climatici antartici. A differenza dei precedenti, questi organismi sono così capaci di occupare ampie nicchie (p.e. psicrotolleranti);
- *tolleranza dei cambiamenti delle condizioni ambientali e relativa acclimatazione*. Questa strategia consente ai microrganismi di affrontare brevi fluttuazioni delle condizioni ambientali con adattamenti temporanei (VINCENT, 2000).

In ogni caso, per alcune comunità antartiche, le interazioni biologiche (come la competizione o la predazione), che solitamente selezionano organismi caratterizzati da crescita veloci, risultano meno importanti di quanto non siano la capacità di tollerare le severe condizioni fisiche e chimiche dell'Antartide (VINCENT, 2000).

In generale, gli ambienti antartici variabili, come ad esempio i suoli dei deserti polari, gli habitat forniti dai muschi o gli stagni effimeri, sembrerebbero selezionare i microrganismi generalisti rispetto a quelli che si sono evoluti in Antartide, in risposta a condizioni ambientali specifiche; al contrario ambienti più stabili e perennemente freddi, come quello degli oceani meridionali, favorirebbero l'evoluzione di genotipi specialisti (VINCENT, 2000). Questo non è vero per quanto riguarda gli ambienti limite,

come per esempio le rocce delle Valli Secche, dove riescono a vivere solo microrganismi altamente adattati (ONOFRI, com. pers.).

La micoflora antartica è piuttosto diversificata all'interno delle differenti regioni climatiche del continente Antartico, contrariamente a quello che la conoscenza comune potrebbe suggerire.

La colonizzazione microbica è legata alla produzione di propaguli vitali, in grado di diffondere, di avere a disposizione un micro-habitat, a sua volta dipendente dal substrato e dal clima per la disponibilità d'acqua, ed un tipo di crescita efficace (ONOFRI, 1999).

La distribuzione fungina dipende prevalentemente dal substrato (roccia, suolo nelle sue diverse tipologie, ornitogenico, povero di nutrienti, associato a muschi e licheni, etc., e vegetazione, principalmente briofite e licheni) (ONOFRI, 1999) e dalle caratteristiche condizioni climatiche del continente; quindi decrementa con l'incremento di altitudine e di latitudine per l'aumentare delle avverse condizioni ambientali e per la distanza dalle sorgenti ricche di propaguli (ONOFRI *et al.*, 2007a). Ciò può rendere difficile la distinzione tra specie fungine autoctone (indigene) e alloctone (importate) che riescono a vivere attivamente, definite complessivamente come micoflora espressa, e le specie alloctone non attive, ma presenti come micoflora potenziale (ELLIS-EVANS & WALTON, 1990; ONOFRI, 1999; ONOFRI *et al.*, 2005; RUISI *et al.*, 2007) tanto che i diversi studi, indirizzati a far luce sulla biodiversità microbica del continente, vengono condotti affiancando ai classici metodi tassonomici, che non sono spesso in grado di fornire informazioni accurate sulla divergenza genetica o sulla filogenesi e sulla biodiversità di questi organismi, quelli delle analisi molecolari (VINCENT, 2000). In effetti, sono state descritte molte nuove specie endemiche di batteri, micro-alghe, funghi e protozoi, anche se la maggior parte dei microrganismi isolati in Antartide sembrano in realtà cosmopoliti (VINCENT, 1988; MARSHALL, 1997).

Nel corso degli anni è stato così possibile identificare una micoflora antartica che colonizza quasi tutti gli ambienti terrestri, composta principalmente da funghi

anamorfi (funghi filamentosi e lieviti di cui si ignora la forma sessuale), alcuni zigomiceti ed alcune specie di ascomiceti: sono stati riportate 1631 registrazioni fungine o pseudofungine, appartenenti a 155 generi, 251 specie e taxa intraspecifici. Rispetto ai veri funghi (99,4%), che includono i lieviti, soltanto una piccola percentuale (0,6%) è costituita da muffe acquatiche (*Chromista*) (ONOFRI *et al.*, 2007a).

Nell'ambito dei funghi filamentosi sono stati documentati i seguenti phyla: *Chytridiomycota* (11,1%) rappresentati dagli ordini *Blastocladales*, *Chytridiales* e *Spizellomycesales*, *Zygomycota* (6,3%) rappresentati dagli ordini *Entomophthorales*, *Mortierellales*, e *Mucorales*, *Ascomycota* (14,9%) rappresentati dagli ordini *Arthoniales*, *Dothideales*, *Mycosphaerellales*, *Pleosporales*, *Eurotiales*, *Onygenales*, *Lecanorales*, *Helotiales*, *Thelebolales*, *Pezizales*, *Hypocreales*, *Microascales*, *Sordariales* e *Xylariales*, *Basidiomycota* (1,6%) e funghi anamorfici, cioè quelli di cui non si conosce la riproduzione sessuale, che ammontano al 66,1% (ONOFRI *et al.*, 2007a).

Sebbene nell'intero continente siano presenti sia funghi capaci di crescere a basse temperature che a temperature maggiori di 35°C, molti di essi risultano essere psicrofili e, più spesso, mesofili psicrotolleranti. Gli psicrofili capaci di crescere intorno agli 0°C, con un *optimum* di temperatura intorno a 15°C ed un *maximum* inferiore od uguale a 20°C (VISHNIAC, 2006; ROBINSON, 2001), ed i mesofili psicrotolleranti capaci di crescere ad un più ampio *range* di temperatura (da 0°C a 35°C) (KERRY, 1990; ZUCCONI *et al.*, 1996; AZMI & SEPPELT, 1997; ROBINSON, 2001), indici, rispettivamente, di un adattamento a condizioni ambientali che si presentano stabilmente fredde e a condizioni instabili di forti fluttuazioni termiche (ONOFRI, 1999; ONOFRI *et al.*, 2004; SELBMANN *et al.*, 2005; RUISI *et al.*, 2007). Le condizioni aride che si creano sulla superficie delle rocce conducono, generalmente, alla dominanza di organismi xerotolleranti (ONOFRI *et al.*, 2007a; RUISI *et al.*, 2007).

Tra alcune specie di funghi, appartenenti agli *Hyphomycetes* anamorfi, sono di particolare interesse alcuni funghi neri meristemati (vedi par. 1.4.) isolati da campioni di roccia rinvenuti nella Terra Vittoria, soprattutto nelle Valli Secche

antartiche, dove la convergenza di differenti avverse condizioni climatiche e trofiche raggiunge il culmine. Si tratta di specie psicrofile in grado di crescere e riprodursi attivamente attraverso un tipo di crescita definita meristemica e le cui caratteristiche morfologiche dipendono dai molteplici adattamenti, ancora in parte sconosciuti, ai differenti fattori di stress. Malgrado molti non siano stati ancora identificati per la loro morfologia poco caratteristica, i generi *Fridmanniomyces* e *Cryomyces* e le specie *F. endoliticus* ONOFRI *et al.*, *F. simplex* SELBMANN *et al.*, *C. minteri* SELBMANN *et al.* e *C. antarcticus* SELBMANN *et al.*, sono stati descritti come nuovi e possibilmente endemici dell'Antartide (ONOFRI *et al.*, 1999; SELBMANN *et al.*, 2005; RUISI *et al.*, 2007).

1.3. IL PIÙ GRANDE DESERTO FREDDO LIBERO DA GHIACCIO DEL CONTINENTE ANTARTICO: LE VALLI SECHE DI MCMURDO

Nel cuore della catena Transantartica fra 77° e 79° S si apre all'improvviso un paesaggio nascosto di singolare bellezza: le Valli Secche di McMurdo, il più vasto territorio deglaciato del continente.

Da 8000 anni i ghiacciai si sono ritirati liberando 4800 km² di nude montagne e valli deserte, disseminate di laghi ghiacciati, di detriti rocciosi, le *morene*, massi erratici e di ventifatti, ciottoli che il vento ha sagomato finemente (FRIEDMANN, 1982; CAMPBELL & CLARIDGE, 1987).

Il calore estivo assorbito dalle rocce, ed i processi di riscaldamento latente per fusione e sublimazione del ghiaccio, sono importanti nell'assicurare microclimi favorevoli alla vita terrestre. Gli ecosistemi dei suoli, dominati dai microrganismi adattati a condizioni estreme di freddo e di aridità, sono fra i più semplici esistenti (MANZONI, 2001).

Le regioni libere dai ghiacci rappresentano meno del 2% dell'area totale del continente antartico. Le Valli Secche di McMurdo, chiamate anche Deserto di Ross, si trovano nella parte est dell'Antartide, nella Terra Vittoria del Sud, nella catena

Transantartica, a coprire una vasta area separata dal mare di Ross dalle montagne, e comprendono quasi la totalità delle terre deglaciata (fig.1.12).

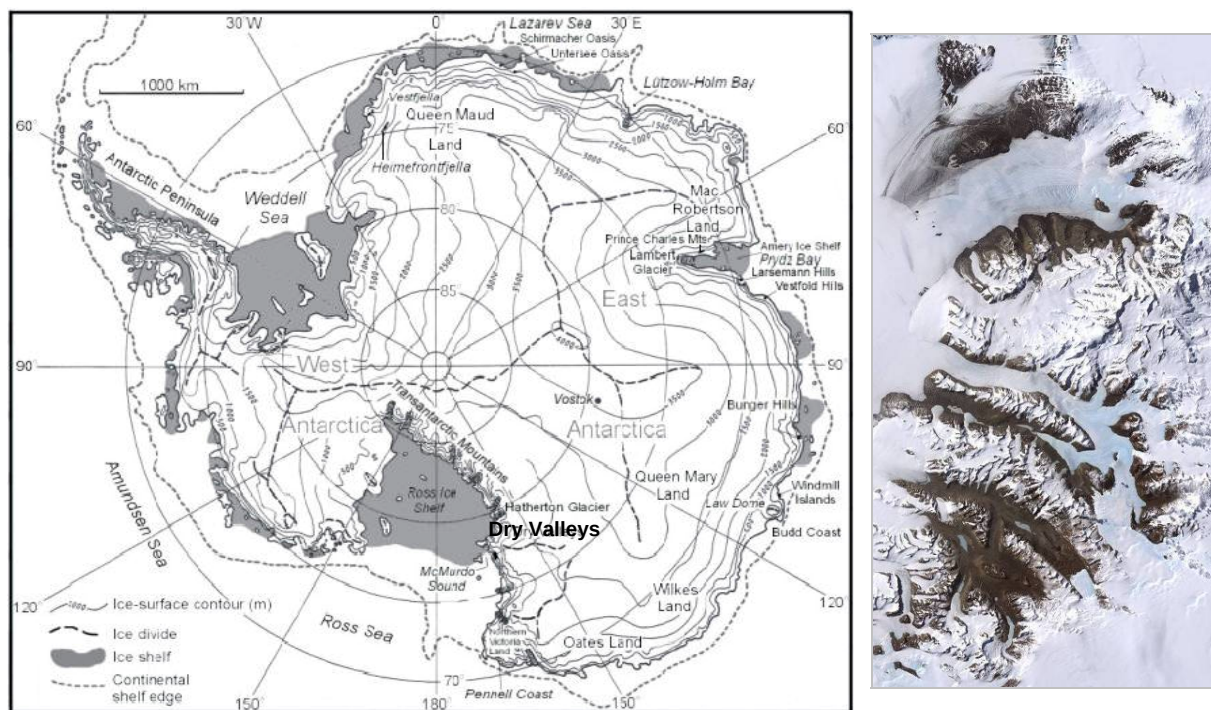


Figura 1.12 – A sinistra localizzazione delle Dry Valleys in Antartide e a destra, le Dry Valleys.

Le Valli Secche rappresentano i più freddi ed aridi deserti presenti sulla Terra caratterizzati da condizioni ambientali asperissime; le temperature estremamente basse, le scarse precipitazioni, la bassa umidità, l'alto contenuto di sali, i venti catabatici, i forti gradienti chimico-fisici che si stabiliscono negli habitat terrestri ed il basso contenuto di materia organica impongono le maggiori limitazioni per la sopravvivenza e la crescita microbica (HOROWITZ *et al.*, 1972; WYNN-WILLIAMS & EDWARDS, 2000).

La biologia antartica è caratterizzata dal ruolo prominente che assumono le rocce. Laddove il clima è relativamente mite, come nell'Antartide marittima, la superficie rocciosa offre un ambiente favorevole ed è colonizzata per lo più da licheni crostosi; dove il clima diventa più estremo, verso l'interno, come nelle Valli Secche, e le

condizioni sulle rocce meno favorevoli alla vita, le superfici rocciose appaiono abiotiche e la vita microbica si ritira sotto la superficie, dove la vita è invece possibile.

1.3.1. MACROCLIMA, MICROCLIMA E NANOClima

Il clima delle Valli Secche di McMurdo è uno dei più rigidi della Terra. L'anno presenta un inverno, definito da un periodo di notte continua da metà aprile ad agosto, con temperature dell'aria fluttuanti tra i -20 (relative ai venti, fino a 100 km/h, che si scaldano per compressione discendendo dalla calotta di ghiaccio polare) ed i -60°C (DE LA TORRE *et al.*, 2003); una primavera, che inizia con l'apparizione del sole sopra la linea d'orizzonte ai primi di settembre e procede con il sole stabilmente sopra l'orizzonte fino alla metà di novembre, con una temperatura media giornaliera che raggiunge i -15°C; un'estate, che dura da metà novembre fino a circa metà febbraio, durante la quale le condizioni climatiche divengono ottimali per lo svolgimento dei processi biologici. Il sole è sempre sopra l'orizzonte, le temperature medie giornaliere dell'aria presentano un intervallo tra i -35°C ed i +3°C, con oscillazioni anche di 15°C per alcuni minuti durante il giorno (DE LA TORRE *et al.*, 2003), ed il massimo della radiazione solare viene raggiunto alla fine di dicembre. Da metà febbraio, i picchi diurni di irradiazione solare scendono nuovamente ed il sole tramonta per poco tempo al giorno (autunno); quindi le massime diurne decrescono progressivamente mentre la lunghezza della notte continua a crescere fino ad aprile, quando il sole è nuovamente al di sotto dell'orizzonte tutto il giorno (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

La neve è l'unica forma di precipitazione: probabilmente meno di 10 cm all'anno nelle valli, corrispondenti a 15 g/cm² (THOMPSON *et al.*, 1971), e qualcosa di più a quote più alte dove si trovano le comunità endolitiche. In entrambi i casi molta neve sublima per la bassa umidità o viene trasportata via dai venti catabatici anche se, quando la temperatura superficiale è maggiore di 0°C, una piccola parte riesce a sciogliersi e penetrare nella roccia (FRIEDMANN, 1978; NIENOW *et al.*, 1988b).

Tutto si modifica al di sotto della superficie, all'interno del substrato roccioso, nel range del millimetro, dove si assiste ad importanti cambiamenti di luce, di temperatura e di umidità (*nanoclima*) tali da caratterizzare l'ambiente con differenti condizioni fisico-chimiche.

A questi livelli il flusso della luce incidente non dipende, come si è detto finora, soltanto dalla stagione e dalla durata del giorno ma anche dall'orientamento della superficie rocciosa esposta; in questo modo all'interno delle rocce tale flusso è rapidamente dissipato a causa dalla combinazione dei processi d'assorbimento e di riflessione che si vengono a creare. Così in una giornata limpida intorno al solstizio d'estate il massimo flusso di radiazione solare raggiunge i 1.050 watts/m² su una superficie esposta a Nord, i 650 watts/m² su una superficie orizzontale e 450 watts/m² su una superficie esposta a Sud; nella roccia asciutta ogni millimetro di spessore diminuisce il flusso del 70-95%, anche se granulometrie maggiori e porosità più elevate possono diminuire questo valore. Inoltre la luce che può penetrare all'interno di una roccia, oltre che dalle dimensioni dei granuli di quarzo, può venire influenzata dal materiale ferroso nella matrice e dalla colonizzazione microbica che, con la loro presenza, ne aumentano l'assorbimento (alto coefficiente di estinzione). Anche l'acqua assume un ruolo fondamentale: quando, allo sciogliersi della neve, viene assorbita dalle rocce porose è in grado di diminuire il coefficiente di estinzione della luce di circa il 25% (riflessione), rendendo la roccia più trasparente (NIENOW *et al.*, 1988a,b).

La temperatura delle rocce è strettamente legata alla radiazione solare ed alla temperatura esterna; durante l'inverno, quando non c'è luce, tutte le rocce hanno temperature di 1-2°C inferiori a quella atmosferica a causa del raffreddamento radiativo (FRIEDMANN *et al.*, 1987), mentre in estate la temperatura della superficie rocciosa dipende innanzitutto dall'orientamento: un'esposizione a nord, durante il solstizio, può far raggiungere una temperatura di 20°C superiore a quella ambientale; nelle medesime condizioni, una roccia esposta a sud avrebbe una temperatura

superiore a quella ambientale di soli 8°C, una roccia orizzontale di 12°C (KAPPEN *et al.*, 1981; NIENOW *et al.*, 1988a).

Nel Valli Secche la temperatura è il principale fattore limitante per la vita, ed il modello di colonizzazione microbica, l'unica possibile, dipende strettamente dal regime di temperatura della roccia: così le facce oblique esposte a nord e quelle orizzontali risulteranno colonizzate, e non lo saranno le facce oblique "fredde" esposte a sud. All'interno della zona colonizzata non ci sono gradienti di temperatura significativi, con oscillazioni di 1-2°C per centimetro, probabilmente non sufficienti per influenzare la stratificazione della comunità (vedi par. successivo) (NIENOW & FRIEDMANN, 1993); al contrario, la superficie della roccia, a causa delle raffiche di vento, può essere soggetta ad enormi fluttuazioni della temperatura con il conseguente instaurarsi di sequenze di rapidi cicli diurni di congelamento e scongelamento, che potrebbero avere notevoli conseguenze per gli organismi che vi fossero in contatto contribuendo così alla sterilità delle superfici più esposte (FRIEDMANN *et al.*, 1987).

Per quanto riguarda l'umidità e quindi la disponibilità di acqua, anche se i licheni ed alcune alghe terrestri (LANGE & BERTSCH, 1965; BERTSCH, 1966a,b) sono in grado di utilizzare il vapore acqueo atmosferico (PALMER & FRIEDMANN, 1990b), anche le comunità endolitiche, quelle dominate dai licheni presenti nelle porosità delle rocce, potrebbero fare altrettanto; in realtà, nel Valli Secche, non si ha mai una situazione di umidità relativa elevata e l'unica risorsa d'acqua per le comunità endolitiche è lo scioglimento della neve accumulatasi sulla superficie della roccia (FRIEDMANN, 1978). La neve, però, non si accumula allo stesso modo su tutta la superficie: su quelle oblique si accumula solo nelle deformità causate dall'esfoliazione o non si accumula affatto; persino sulle superfici orizzontali piccole depressioni possono catturare più neve.

Una volta che l'acqua è entrata nella roccia, può essere trattenuta per parecchio tempo (FRIEDMANN & WEED, 1987; FRIEDMANN *et al.*, 1988), sia per il basso potenziale

di evaporazione esistente nelle Valli Secche sia per la presenza della crosta superficiale che rallenta gli scambi gassosi (KAPPEN & FRIEDMANN, 1983). Fra l'altro le rocce porose possono assorbire, ad un'umidità relativa del 100%, fino allo 0,3% del proprio peso secco in acqua (PALMER & FRIEDMANN, 1990a). Per quanto lo scioglimento della neve non avvenga molto frequentemente, le rocce, una volta bagnate, sono in grado di trattenere un alto grado di umidità nelle loro porosità per giorni o settimane (KAPPEN *et al.*, 1981; FRIEDMANN *et al.*, 1987) e le comunità criptoendolitiche, quindi, potrebbero non essere severamente limitate dalla disponibilità d'acqua (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

1.3.2. LA ROCCIA E LA VITA NELLE ROCCE

Il paesaggio delle Valli Secche è dominato da un'alternanza di catene rocciose e valli glaciali. Queste catene sono formate da depositi sedimentari del *Beacon Supergroup* che giacciono su rocce intrusive e metamorfiche, principalmente graniti e doleriti (NIENOW & FRIEDMANN, 1993). Il panorama mostra tutte le tipiche caratteristiche geomorfologiche del deserto: scogliere, sporgenze e piattaforme di nuda roccia, ripidi pendii, suolo grossolano a coprire il pavimento del deserto ed aree di sabbia mobile.

Il substrato roccioso più importante e predominante delle Valli Secche, quello che risulterà colonizzato da microrganismi, è l'*arenaria*, una roccia terrigena che deriva dalla litificazione delle sabbie. Le arenarie porose colonizzate del *Beacon Supergroup* sono ben classificate, hanno granuli di dimensioni oscillanti fra i 0,2 ed i 0,5 mm, costituiti da quarzo (SiO₂) per più del 99% in peso (FRIEDMANN, 1982), con una porosità dell'8-15%, anche se rocce dai grani più fini e dalla porosità più bassa possono, anche se occasionalmente, essere ugualmente colonizzate (GREENFIELD, 1988; NIENOW *et al.*, 1988a). La matrice contiene ossidi ed idrossidi di ferro che conferiscono alla roccia una bassa cristallinità ed una tipica colorazione gialla, arancione, rossiccia o marrone (WEED & ACKERT, 1986; FRIEDMANN & WEED, 1987); il tipo e la quantità di

depositi di ferro sembra influenzare la colonizzazione: le rocce più scure, poiché in grado di assorbire luce e quindi calore, risulterebbero più colonizzate rispetto a quelle più chiare che, essendo maggiormente riflettenti, risulterebbero più fredde.

Altri elementi chimici della matrice includono alluminio, calcio, fosforo, magnesio, manganese, piombo, potassio, sodio, e titanio (FRIEDMANN, 1982; JOHNSTON & VESTAL, 1989), la cui presenza sarebbe legata all'alterazione di un'altra roccia di origine vulcanica, anch'essa comune in questa regione, la dolerite.

Il suolo (che non può definirsi tale in termini classici per la scarsa presenza di materia organica), così come gli stagni ed i laghi presenti nella regione (Lakes Vanda, Bonney, Hoare, Fryxell e Don Juan), sono salini e talvolta alcalini per la presenza di ioni di sodio, calcio, magnesio, cloruro, solfato e nitrato (HOROWITZ *et al.* 1972).

Di fatto anche la biologia delle Valli Secche è quella tipica dei deserti estremi: la vita epilitica è limitata ad alcuni licheni che crescono sulla nuda roccia in nicchie protette, mentre la forma di vita predominante è costituita da microrganismi endolitici.

Sulla superficie, le rocce sono coperte da una crosta silicea spessa circa un millimetro, che probabilmente facilita la colonizzazione stabilizzando la superficie stessa e limitando l'erosione per opera del vento. Questa crosta si forma per l'accumularsi di polvere portata dal vento che è gradualmente incorporata in strati, inferiori ai 100 μm di spessore, a coprire la struttura dei granuli che compongono la roccia (FRIEDMANN & WEED, 1987; NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

La nicchia endolitica è suddivisa ulteriormente ed è differentemente sfruttata da particolari comunità microbiche che mostrano singolari adattamenti; così mentre gli *euendolitici* (perlopiù licheni crostosi) penetrano attivamente perforando, i *criptoendolitici* colonizzano le cavità strutturali delle rocce porose (compresi i tunnel lasciati vuoti dagli euendolitici) e i *casmioendolitici* abitano nelle fessure e nelle spaccature già esistenti nelle rocce (GOLUBIC *et al.*, 1981; ØVSTEDAL & LEWIS SMITH, 2001) (fig. 1.13).

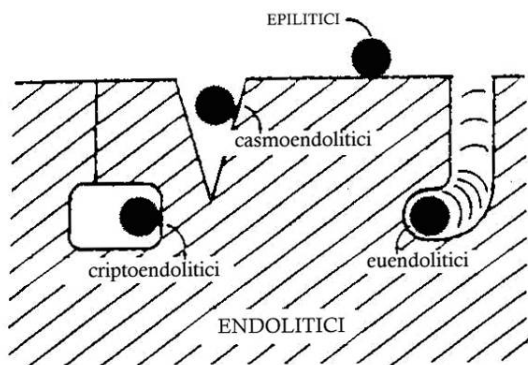


Figura 1.13 – Sopra, schema della classificazione della vita nelle rocce (GOLUBIC et al., 1981); a destra, in alto, lichene epilitico su dolerite (Convoy Range, Terra Vittoria del sud); in basso, lichene casmoendolitico che cresce in una frattura di granito (Tarn Flat, Terra Vittoria del nord) (barra = 5 mm). Foto Laura Zucconi, 2004.



La colonizzazione criptoendolitica contribuisce in maniera determinante all'erosione della superficie rocciosa, disegnando in modo inconfondibile l'intero panorama delle Valli Secche (NIENOW & FRIEDMANN, 1993) (fig. 1.14).



Figura 1.14 – A sinistra Battleship Promontory (foto Silvano Onofri, 2002) e a destra Beacon Supergroup, nelle Dry Valleys di McMurdo.



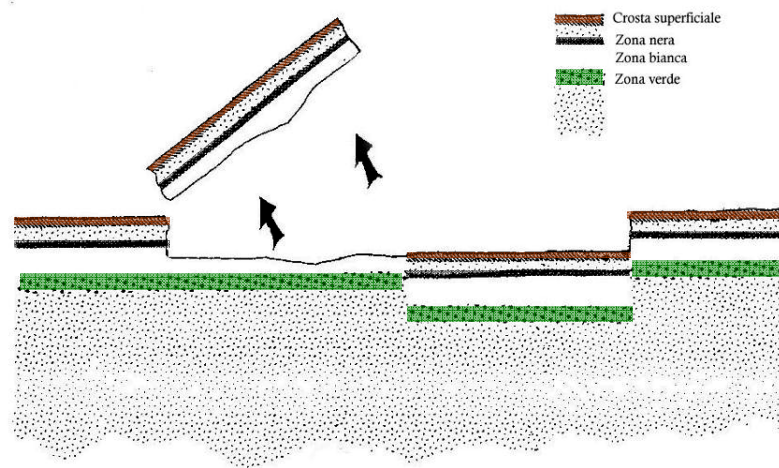
La colonizzazione microbica lascia su queste rocce segni inconfondibili sotto forma di un tipico mosaico dovuto all'erosione biogena. Nelle comunità dominate da licheni questo mosaico è formato da colori che vanno dal bianco all'arancione, al marrone, su una superficie a "scalini", dovuti all'esfoliazione della superficie crostosa per opera dell'attività microbica che riduce la coesione tra i granuli di sabbia dello strato superiore (FRIEDMANN, 1982; NIENOW & FRIEDMANN 1993).

I fattori che concorrono all'erosione biogena sono la crescita dei licheni fra i granuli della roccia, il rigonfiarsi intermittente dei licheni durante le fasi di idratazione ed espansione da congelamento e la mobilitazione del materiale della matrice (FRIEDMANN & WEED, 1987). Quest'ultimo processo, inoltre, determina la diversa colorazione della zona colonizzata: il lichene mobilita i composti del ferro nella matrice, provocando una decolorazione come conseguenza della lisciviazione dei composti ferrosi. Il meccanismo di mobilitazione sembra essere dovuto alla solubilizzazione del ferro da parte dell'acido ossalico prodotto dai funghi lichenizzati (JOHNSTON & VESTAL, 1993).

Nel ciclo di esfoliazione, quando una porzione della superficie viene esfoliata, la massa microbica che colonizza lo strato bianco si trova esposta, si secca, si sbriciola e

si disperde; alcuni frammenti fungono da propaguli mentre il resto cade al suolo. La comunità cresce quindi in uno strato più profondo della roccia, e la polvere portata dal vento, proveniente da doleriti ricche di ferro, si accumula sulla superficie conferendo alla crosta la colorazione bruno-rossastra; col tempo il colore si scurisce e si forma la nuova crosta silicizzata (fig. 1.15). La presenza di una crosta leggermente o moderatamente silicizzata favorisce la colonizzazione microbica stabilizzando, come si è detto, la superficie e contribuendo a ritenere acqua (FRIEDMANN, 1982; FRIEDMANN & WEED, 1987).

Figura 1.15 – A destra, schema dell'erosione della roccia per esfoliazione biogena (FRIEDMANN, 1982); in basso, a sinistra, roccia di arenaria esfoliata (barra = 10 cm); a destra, Battleship Promontory, Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria del Sud. Foto Laura Zucconi, 2004.



Il processo di esfoliazione erode gradualmente la roccia e spesso dà origine a bizzarre conformazioni della roccia stessa. Nonostante ciò la colonizzazione microbica non è

l'unico agente dell'esfoliazione, e meccanismi fisico-chimici giocano probabilmente un ruolo altrettanto importante.

Le comunità criptoendolitiche che colonizzano le rocce producono, infatti, una serie di sostanze soltanto parzialmente conosciute; oltre all'acido ossalico, è stata descritta anche la produzione di acidi lichenici (FRIEDMANN, 1982). Altri autori descrivono la presenza nelle rocce di amminoacidi (GREENFIELD, 1988; SIEBERT *et al.*, 1991). Anche la scoperta di anteiso-alcani ed acidi anteiso-alcanoici (MATSUMOTO *et al.*, 1992), presenti anche in rocce con resti fossili di colonizzazione microbica ma non in rocce non colonizzate, è interessante; queste sostanze sono poco frequenti in natura, e le loro fonti note sono le cere vegetali ed alcuni batteri. Tuttavia, nessuno dei batteri, alghe o funghi isolati dalle comunità, cresciuti a differenti temperature, sembra in grado di produrli, o almeno non in condizioni di laboratorio (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

L'esfoliazione abiotica legata all'azione del vento, del ghiaccio e del sale nonché ai processi geologici è anch'essa ampiamente documentata (FRIEDMANN, 1982; FRIEDMANN & WEED, 1987; CAMPBELL & CLARIDGE, 1987).

1.4. LA COMUNITÀ MICROBICA CRIPTOENDOLITICA

Quando le condizioni ambientali si fanno estreme l'esistenza anche di minime variazioni dei parametri fisici possono diventare critiche e determinanti per la sopravvivenza microbica e nei pochi millimetri sopra e sotto la superficie rocciosa si racchiude la differenza tra la vita e la morte. Questo clima *nell'arco del millimetro* è stato definito *nanoclima*, e controlla l'ambiente in cui queste comunità microbiche possono esistere (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

L'ecosistema microbico criptoendolitico delle Valli Secche di McMurdo colonizza gli spazi porosi delle rocce esposte di arenaria formando comunità microbiche stratificate (FRIEDMANN, 1982).

Dal momento che le comunità microbiche endolitiche dipendono da un produttore primario (la fotosintesi è la fonte di energia principale), soltanto le rocce trasparenti costituiscono un substrato possibile per la colonizzazione.

Sono stati descritti cinque tipi di comunità criptoendolitiche tutte su rocce arenarie, la prima dominata da alghe eucariote e funghi, la seconda solo da alghe cloroficee e le ultime tre da cianobatteri (FRIEDMANN *et al.*, 1988):

- comunità dominata dai licheni;
- comunità di *Hemichloris*;
- comunità rossa di *Gloeocapsa*;
- comunità di *Hormathonema* *Gloeocapsa*;
- comunità di *Chroococcidiopsis*.

Le comunità dominate da licheni sono le prevalenti nelle Valli Secche di McMurdo (FRIEDMANN, 1982; FRIEDMANN *et al.*, 1988; NIENOW & FRIEDMANN, 1993; DE LA TORRE *et al.*, 2003). Al contrario dei licheni epilitici che hanno un tallo compatto plectenchimatoso, i licheni criptoendolitici hanno i filamenti del micobionte liberi, mancano di strutture sessuali complete e con i gruppi di cellule algali crescono tra i cristalli della matrice rocciosa (KAPPEN, 1993). La perdita della loro morfologia distintiva, che rende difficile il loro riconoscimento su basi morfologiche, permette loro di colonizzare il substrato roccioso attraverso gli spazi interstiziali e le porosità, crescendo tra ed intorno ai cristalli, sottraendosi così alle condizioni climatiche avverse (FRIEDMANN, 1982) (fig. 1.16).

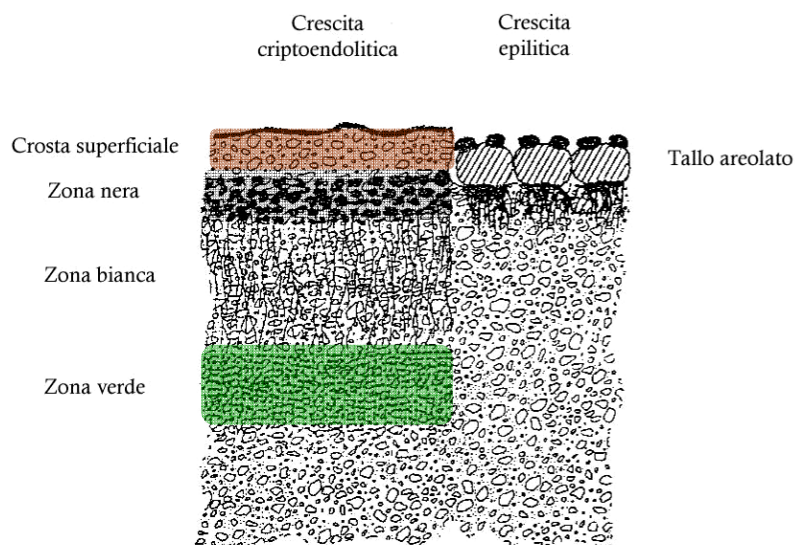


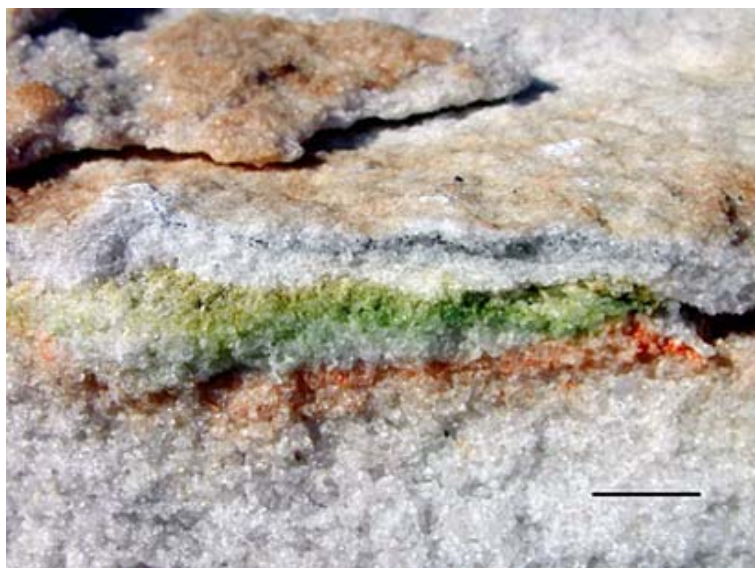
Figura 1.16 –Struttura di una crescita criptoendolitica in relazione alla forma di crescita areolata epilittica (FRIEDMANN, 1982).

Ad ogni modo questi licheni (criptoendolitici) sembrano aver conservato la potenziale capacità di formare il tallo: quando colonizzano la superficie in nicchie protette, come piccole depressioni e crepe poco profonde, formano nuovamente le strutture sessuali epilittiche, gli apoteci. Nelle Valli Secche di McMurdo, il ritrovamento di licheni epilittici (*Buellia grisea* Dodge et Baker, *B. pallida* Dodge et Baker, *Carbonea capsulata* (Dodge et Baker) Hale, *Lecanora fuscobrunnea* Dodge et Baker, *Lecidea cancriformis* Dodge et Baker e *L. siplei* Dodge et Baker) (FRIEDMANN, 1982; HALE, 1987), presenti in nicchie protette sulla superficie di rocce colonizzate da forme criptoendolitiche, sembra dimostrare una qualche connessione fisica, anche se non sempre chiara, tra la forma criptoendolitica e quella epilittica al cambiamento delle condizioni estreme.

La comunità dominata dai licheni criptoendolitici, che colonizzano rocce di arenaria, si presenta come una zona spessa circa 10 mm al di sotto della crosta della roccia, distinta da bande parallele colorate. E' formata da funghi filamentosi, alghe (*Cloroficeae*) e cianobatteri; è tipicamente stratificata mostrando, al di sotto di una crosta superficiale bruno-rossastra, una zona nera spessa circa 1 mm, quindi una zona bianca di 2-4 mm e, al di sotto, una zona verde dai confini inferiori indistinti

(FRIEDMANN, 1982) (fig. 1.17). I cristalli di quarzo nella zona che ospita la comunità appaiono decolorati poiché gli idrossidi di ferro vengono lisciviati da acidi organici prodotti dai funghi, in particolare dall'acido ossalico (JOHNSTON & VESTAL, 1993; NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

Figura 1.17 – Colonizzazione criptoendolitica di una comunità dominata dai licheni lungo una frattura di arenaria (Battleship Promontory, Convoy Range, Valli Secche di McMurdo). Dall'alto verso il basso: la crosta silicea superficiale; la zona nera colonizzata dai funghi lichenizzati e non; la zona bianca colonizzata da funghi ed alghe lichenizzate; la zona verde colonizzata da alghe non lichenizzate e cianobatteri; la zona di accumulo (FRIEDMANN, 1982) (barra = 10 mm) (ONOFRI et al., 2007a).



La zona nera e la bianca sono colonizzate da funghi filamentosi ed alghe cloroficee (*Trebouxia* sp. e *Pseudotreboouxia* sp.), dalla cui associazione si origina il lichene; nella zona nera le ife fungine si presentano pigmentate nere mentre nella bianca risultano ialine incolori. L'associazione tra le ife del partner fungino (*micobionte*) e le cellule dell'alga (*fotobionte*) avviene attraverso la formazione di appressori, che si fissano sulla superficie delle cellule fotosintetiche e penetrano in esse mediante estroflessioni specializzate, o mediante austori, ife specializzate tipiche dei funghi parassiti, in grado di penetrare la membrana cellulare delle cellule algali (FRIEDMANN, 1982). Probabilmente i funghi ialini della zona bianca e parte di quelli pigmentati della zona nera non sono altro che morfotipi diversi della stessa specie; la pigmentazione dello strato superiore potrebbe essere un adattamento in risposta all'esposizione ai raggi solari che costituisce così una protezione contro i raggi UV (AHMADJIAN & JACOBS, 1987; KAPPEN, 1993). Sempre nella zona nera sono costantemente presenti funghi neri

meristemoidi con spesse pareti cellulari, che in esperimenti di resintesi (*in vitro*) non formano associazioni licheniche (non lichenizzati) (NIENOW & FRIEDMANN, 1993); alcuni di questi sono stati isolati, identificati e descritti, come le specie *Friedmanniomyces endolithicus* Onofri (ONOFRI *et al.*, 1999), *Friedmanniomyces simplex* Selbmann *et al.*, *Cryomyces minteri* Selbmann *et al.* e *C. antarcticus* Selbmann *et al.* (SELBMANN *et al.*, 2005) all'interno di due nuovi generi *Friedmanniomyces* Onofri (ONOFRI *et al.*, 1999) e *Cryomyces* Selbmann *et al.* (2005) (vedi par. 1.4).

Nella zona verde sono presenti alghe verdi (*Hemichloris antarctica* Tschermak-Woess & Friedmann, cloroficea, e *Heterococcus endolithicus* Darling & Friedmann, xantoficea, entrambe endemiche, e l'alga verde *Stichococcus* sp.) e cianobatteri (*Gloeocapsa* sp. e *Chroococcidiopsis* sp.). I funghi ialini presenti in questa zona non formano associazioni licheniche con le alghe della zona verde (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

Occasionalmente al di sotto della zona verde *Chroococcidiopsis* forma una distinta banda blu-verde (FRIEDMANN, 1977).

Anche molte specie di batteri eterotrofi fanno parte delle comunità dominate dai licheni (*Micrococcus roseus* Flügge, *M. agilis* Ali-Cohen, *Deinococcus radiopugnans* Brooks et Murray (spesso isolata in zone soggette ad elevate dosi di radiazioni), *Brevibacterium linens* (Wolff) Breed), costituendo però solo l'1% della massa totale della comunità (GREENFIELD, 1988), così come alcune specie di attinomiceti (*Arthrobacter aureus* Phillips, *Geodermatophilus obscurus* Luedemann, *Micromonospora calcea* (Foulerton) Prskov, *Streptomyces gardneri* (Waksman) Waksman e *S. longispororuber* Waksman (HIRSH *et al.*, 1988; SIEBERT *et al.*, 1988).

La comunità di Hemichloris ha una composizione simile alla zona verde della comunità dominata dai licheni e *Hemichloris antarctica* è l'organismo dominante della comunità o l'unico presente. La comunità si trova sulla superficie più bassa di rocce sporgenti ricevendo così solamente luce riflessa dal suolo o dalla neve; la presenza esclusiva delle alghe è probabilmente riconducibile alla bassa intensità della luce incidente che risulterebbe insufficiente a sostenere la vita di un lichene. *Hemichloris*

antarctica infatti è in grado di vivere a dosi bassissime di luce. A differenza della comunità dominata dai licheni, la comunità di *Hemichloris* non produce, all'interno della roccia, una fascia priva di ferro anche se il pH delle rocce colonizzate, come per la comunità dominata dai licheni, è compreso tra 3,7 e 5,8 (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

La comunità rossa di *Gleocapsa* (FRIEDMANN *et al.*, 1988) si trova prevalentemente vicino alla comunità dominata dai licheni, anche se molto meno frequentemente, spesso su massi o affioramenti rocciosi. Riconoscibile macroscopicamente dalla presenza di una zona nera, rosso porpora al di sotto della crosta rocciosa mostra come organismo dominante *Gleocapsa* sp. n. 1 accompagnato, generalmente, da *Gleocapsa* sp. n. 7 ed inferiormente *Gleocapsa* sp. n. 8 a formare una zona piuttosto inconsistente. Analogamente alla comunità dominata dai licheni questa comunità colonizza l'arenaria con una zona marrone ed una incolore relative al ferro, anche se in maniera meno cospicua, con un valore di pH tra 3,7 e 5,5 (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

La comunità di *Hormathionema-Gleocapsa* (FRIEDMANN *et al.*, 1988) di solito si stabilisce all'interno di rocce prive di ferro e si manifesta come un'esfoliazione dovuta all'erosione sulla superficie della roccia con due zone colorate più ampie e meno definite di quelle della comunità dominata dai licheni; in quella superiore sono presenti il cianobatterio *Hormathionema* sp. e/o *Gleocapsa* sp. n. 2, talvolta associati con *Anabaena* e *Gleocapsa* sp. n. 3. La zona inferiore è occupata da *Aphanocapsa* sp. occasionalmente associata con diverse specie di *Gleocapsa*, e da un'altra specie di *Anabaena* sp., e da *Lyngbya* sp. La comunità di *Hormathionema-Gleocapsa* è limitata a zone dove la disponibilità di acqua allo stato liquido, necessaria ai cianobatteri, è costantemente garantita dallo scioglimento delle nevi. Con il decremento dell'umidità queste comunità vengono sostituite da comunità dominate dai licheni. Le rocce che ospitano le comunità di *Hormathionema-Gleocapsa* presentano un pH più elevato (tra 7,3 e 8,2) rispetto a quelle dominate da altre comunità.

La comunità di Chroococcidiopsis si presenta come una unica zona verde o marrone chiaro all'interno di rocce ferrose ed è costituita da un unico organismo fotosintetico, *Chroococcidiopsis* sp. È molto rara e sembra trovarsi in zone caratterizzate da un clima estremamente freddo e secco.

La stratificazione delle comunità (dominata dai licheni, rossa di *Gleocapsa* e di *Hormatonekton-Gleocapsa*) relativa alla distribuzione degli organismi rilevata dallo sviluppo delle tre zone è dipendente tanto da necessità fisiologiche, quali l'intensità luminosa, la disponibilità d'acqua e la temperatura, che da esigenze competitive, e per questo alcuni componenti possono non essere sempre presenti (NIENOW & FRIEDMANN, 1993); quando, ad esempio, l'intensità luminosa è bassa, può essere presente solo la zona verde, solo la nera se è alta l'intensità luminosa (e quindi anche la temperatura). Le diverse esigenze di luce tra l'alga *Hemichloris antarctica*, che risulta danneggiata da alte intensità, e le alghe lichenizzate, che necessitano di una quantità di illuminazione maggiore, tendono a mantenere la stratificazione (NIENOW *et al.*, 1988b).

Dall'altro lato la competizione in un ambiente così limitato promuove l'occupazione degli spazi, da parte dei componenti della comunità, anche con l'attivazione di processi biosintetici. Sia i micobionti che gli altri funghi producono sostanze antibiotiche attive contro i batteri eterotrofi e contro le alghe, isolate e non. Queste sostanze spingerebbero le alghe cloroficee come *Hemichloris antarctica* ed i cianobatteri come *Chroococcidiopsis* sp. negli strati più profondi. Queste sostanze si sono, inoltre, dimostrate attive anche verso il fotobionte *Trebouxia* sp. regolandone la crescita (OCAMPO-FRIEDMANN & FRIEDMANN, 1993).

Dal punto di vista dei nutrienti l'azoto di origine inorganica è sempre presente nei pochi millimetri superficiali delle rocce arenarie sotto forma di nitrati e di ammonio; i nitriti sono generalmente assenti (FRIEDMANN & KIBLER, 1980; GREENFIELD, 1988). Molto rara è la fissazione di azoto atmosferico. L'aggiunta di azoto inorganico sotto forma di ammonio, di nitrati e nitriti non aumenta la velocità di fissazione del

carbonio indicando, così, che l'azoto non è un fattore limitante per la crescita (JOHNSTON & VESTAL, 1986; VESTAL, 1988); così come avviene nei deserti caldi, a causa dei bassi tassi di crescita, la domanda di azoto è comunque più bassa dell'influsso di azoto fissato biologicamente dall'atmosfera (FRIEDMANN & KIBLER, 1980).

L'acido ossalico ed altri ossalati prodotti dagli organismi, inoltre, aumentano la mobilità del fosforo e degli ioni metallici dal substrato roccioso (JOHNSTON & VESTAL, 1993; RUSSELL *et al.*, 1998). Dunque le comunità criptoendolitiche non sono limitate nella crescita dalla disponibilità di nutrienti.

La produttività, invece, data dall'assorbimento del carbonio misurato come anidride carbonica scambiata dalla superficie della roccia, che di solito si accresce linearmente con l'apporto di energia luminosa, rivela una situazione diversa. I bassi livelli di luminosità non saturano mai le capacità metaboliche della comunità; il flusso di luce nello strato di *Hemichloris* apporta energia sufficiente per appena una o due divisioni cellulari all'anno (NIENOW *et al.*, 1988b).

La comunità è in grado di assorbire carbonio, in quantità apprezzabile, da -8°C a 30°C, con un *optimum* tra i -3°C ed i 6°C (VESTAL, 1988) ed un punto di compensazione, cioè il punto in cui la respirazione consuma tanto carbonio quanto i processi fotosintetici sono in grado di fissarne, a 15°C (FRIEDMANN & SUN, 2005; SUN & FRIEDMANN, 2005).

È stato stimato che nell'ecosistema criptoendolitico antartico più del 99,9% del guadagno fotosintetico netto è usato per compensare l'alto costo metabolico relativo alla sopravvivenza in un ambiente caratterizzato da rapide fluttuazioni termiche (bassissime temperature e cicli di congelamento/scongelo) tra le più vicine ai limiti più bassi di temperatura in cui è possibile la vita (FRIEDMANN *et al.*, 1993).

Queste comunità, quindi, costituiscono un ecosistema a sé stante estremamente semplice: mentre le alghe ed i cianobatteri sono i produttori primari, i micobionti sono i consumatori ed i batteri incolori (costituiscono meno dell'1% della massa della comunità) ed i funghi saprotrofi i decompositori (VESTAL, 1988). Non esistono

predatori né consumatori secondari. Il substrato roccioso fornisce, inoltre, i nutrienti inorganici necessari sotto forma di nitrati e composti d'ammonio.

Una semplicità, quella finora descritta, indice non di primitività ma, al contrario, di un adattamento alle condizioni di vita estreme a cui questi organismi si sono trovati a dover far fronte (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

A riprova di ciò, inaspettatamente, alcuni funghi neri antartici isolati da comunità criptoendolitiche, in condizioni di laboratorio, mostrano un *optimum* di crescita a temperature significativamente più elevate rispetto a quelle a cui sono esposti nel loro habitat naturale sebbene l'*optimum* fotosintetico delle comunità cada proprio nell'intervallo di temperature in cui la comunità vive in natura (NIENOW & FRIEDMANN, 1993). Questo suggerisce che non siano i singoli componenti della comunità ad essersi adattati all'ambiente estremo, ma piuttosto che sia tutta la comunità ad essersi adattata a condizioni ambientali proibitive (SELBMANN *et al.*, 2005).

1.5. I FUNGHI NERI MICROCOLONIALI: STRUTTURE DI SOPRAVVIVENZA SPECIALIZZATE

Tra le forme di vita microbiche esistenti isolati dalle comunità criptoendolitiche antartiche dominate dai licheni troviamo, di particolare interesse, i funghi neri meristemati.

In letteratura si assiste spesso all'utilizzo, per la classificazione morfologica di alcuni funghi, di termini, quali *lieviti neri*, *funghi meristemati* e *microcoloniali*, dal significato sovrapponibile, riconducibili a funghi il cui comportamento pleomorfo non permette una loro chiara distinzione e che per questo motivo vengono raggruppati secondo le loro caratteristiche morfologiche predominanti in un unico gruppo formale (*Dematiaceae*) (STERFLINGER, 2005).

Con il termine *funghi neri meristemati*, introdotto per la prima volta da DE HOOG & HERMANIDES-NIJHOF nel 1977, si indica un gruppo di funghi che forma aggregati che

si espandono lentamente, assumendo forma di cavolfiore (*cauliflower*) come conseguenza di un accrescimento isodiametrico. La maggior parte di questi funghi ha spesse pareti melanizzate e libera propaguli per disarticolazione di ife preformate (conidiogenesi tallica) o per conidiogenesi endogena (enteroblastica) e senza la formazione di complesse strutture (STERFLINGER *et al.*, 1999); ne sono esempi il genere *Sarcinomyces* che si riproduce per rottura dell'aggregato cellulare ed il genere *Phaeoteca* i cui propagali vengono rilasciati dopo la rottura della parete cellulare della cellula madre. Alcuni funghi meristematici possono formare, come nel caso di *Capnobotryella*, conidi blastici da cellule non completamente differenziate oppure, come in *Hortaea werneckii*, cellule gemmanti lievito-simili.

Lievito nero (o *black yeast*) è invece un termine "tecnico" che si riferisce, sia da un punto di vista tassonomico che filogenetico, ad un gruppo abbastanza eterogeneo di funghi caratterizzati da pareti cellulari melanizzate e formazione di cellule figlie, similmente ai lieviti, per gemmazione multilaterale o polare, che possono essere racchiuse in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) (STERFLINGER, 2005). Molti funghi appartenenti ai lieviti neri possono inoltre esibire una crescita miceliare e produrre conidi da ife terminanti con fialidi semplici, o con collaretto, o anellate su rachidi o su cellule conidiogene indifferenziate (DE HOOG & HERMANIDES-NIJHOF, 1977); in altri generi, invece, si assiste alla formazione di artroconidi per frammentazione delle ife (fig. 1.18).

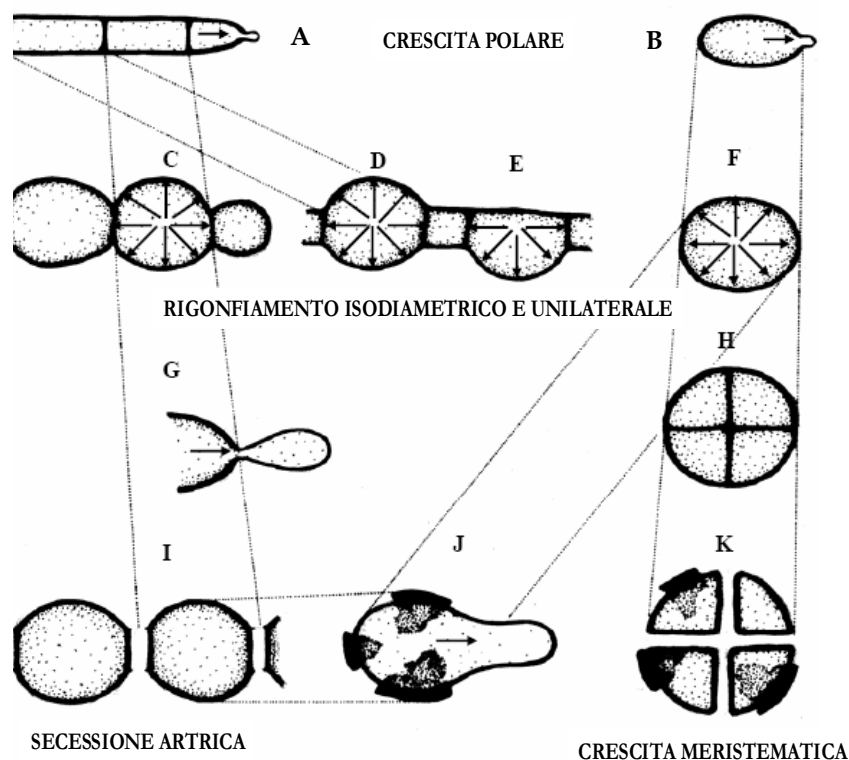


Figura 1.18 – Diagramma relativo alle possibili modalità di sviluppo osservate nei funghi meristemati; A, B. Crescita polare: ifale (A) o per gemmazione (B). C–F, espansione isodiametrica: ifale (C–D), ifale unilaterale (E) o lievitiforme (F). G–H, accrescimento: enteroblastico (G) o tallico (H). I–K, secessione: disarticolazione artrica (I), gonfiore e gemmazione (J) oppure gonfiore e disarticolazione multilaterale (K) (SELBMANN et al., 2005).

Infine il terzo termine si riferisce ad un modello di crescita *in situ*, relativo sia ai funghi meristemati che ai lieviti neri le cui colonie mostrano uno sviluppo molto lento: i *funghi microcoloniali* (MCF). Descritti per la prima volta da STALEY *et al.* nel 1982 il termine *microcoloniale* indica quei funghi che crescono su un substrato minerale, generalmente roccioso, o su vetro e metallo, che sono in grado di formare colonie compatte, nere, ben strutturate, a forma di cavolfiore, le cui cellule hanno spesse pareti melanizzate e densamente aggregate. Le colonie singole, da 60-100 μm a ca. 1 mm di diametro, crescono molto lentamente (1-2 mesi) (URZÌ *et al.*, 2000) e sono

visibili ad occhio nudo ma morfologicamente indistinguibili tra loro (STERFLINGER *et al.*, 1999).

I funghi di questo tipo, pigmentati neri con crescita meristemica e/o crescita lievito-simile (MCF, funghi meristemici e lieviti neri), sono ubiquitari e presenti in ogni ambiente caratterizzato da condizioni sfavorevoli, per carenza di nutrienti (oligotrofico), elevato irraggiamento ultravioletto, scarsa disponibilità di acqua, temperature estreme (calde o fredde) o una combinazione di questi fattori.

Originariamente isolati da materiale vegetale vivo e morto (aghi, lamine fogliari, cortecce, frutti e legno) sono stati descritti, con ampia o più ristretta distribuzione, anche come specie patogene vegetali opportuniste, in ambienti antropici come patogeni (micosi umane ed animali) su rocce ed in ambienti ipersalini (STERFLINGER, 2005).

Ne sono alcuni esempi:

- *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud, ritrovato su superfici osmotiche di tipo vegetale (p.e. fillosfera) (DE HOOG *et al.*, 1999), ambienti ipersalini (ZALAR *et al.*, 1999b) e antropizzati (p.e. umidificatori e vetri) (DE HOOG *et al.*, 1997);
- specie diverse appartenenti all'ordine *Chaetothyriales*, agenti infettivi di mucose umane ed animali (DE HOOG *et al.*, 2003; HORRÉ & DE HOOG, 1999);
- *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura & Miyaji su roccia (STERFLINGER, 2005), in ambienti ipersalini (ZALAR *et al.*, 1999b) nonché come agente patologico di una micosi della pelle, la *Tinea nigra* (GOTTLICH *et al.*, 1995);
- *Phaeosclera dematioides* Sigler, Tsuneda & Carmichael (1981), ritrovato su *Pinus* e conosciuto come agente infettivo micotico del bestiame (MCGINNIS *et al.*, 1985);
- *Phaeoteka triangularis* de Hoog & Benguin in ambienti antropizzati (DE HOOG *et al.*, 1997) e ipersalini (ZALAR *et al.*, 1999a);
- l'epifita *Trimmatostroma abietis* Butin & Pehl, ritrovato sia su corteccia di abete (*Abies*) che su superfici rocciose di arenaria (BUTIN *et al.*, 1996) e *Trimmatostroma*

salinum Zalar *et al.* (1999b), in acque ipersaline (ZALAR *et al.*, 1999b; GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2000).

Molte segnalazioni di funghi neri meristemati (GORBUSHINA *et al.*, 1993; STERFLINGER *et al.*, 1999; RUIBAL *et al.*, 2005) provengono prevalentemente dalle superfici o dall'interno delle rocce (marmo, granito, calcare o di altro tipo), come quelle del deserto dell'Arizona (STALEY *et al.*, 1982; PALMER *et al.*, 1987), dell'Antartide (NIENOW & FRIEDMANN, 1993; SELBMANN *et al.*, 2005), dei graniti della Costa d'Avorio (BÜDEL *et al.*, 2000), dei monumenti di marmo in Crimea (GORBUSHINA *et al.*, 1996) e dei marmi e graniti dei monumenti nelle regioni mediterranee (GORBUSHINA *et al.*, 1993; WOLLENZIEN *et al.*, 1995; STERFLINGER & KRUMBEIN, 1997). Sembra, infatti, che i funghi meristemati siano abbastanza comuni, sebbene per lungo tempo siano rimasti pressoché sconosciuti, dal momento che tutto il materiale nero o, in ogni caso, scuro trovato sulla roccia veniva interpretato come sporco o polvere portata dal vento (WOLLENZIEN *et al.*, 1995). Nonostante ciò troppo spesso sono sopraffatti da specie saprofite le quali, avendo la capacità di espandersi più rapidamente, posseggono nei loro confronti un inequivocabile vantaggio competitivo (STERFLINGER, 1999; SELBMANN *et al.*, 2005).

L'origine dei funghi meristemati è polifiletica. Notoriamente difficili da classificare perché spesso risulta impossibile tracciarne i limiti morfologici tra i generi, e l'identificazione viene ostacolata dalla loro plasticità morfologica da non risultare poi così differenziati, questi organismi vengono correntemente sottoposti ad indagini di tipo molecolare sulla base dell'analisi dei polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), della subunità ribosomale minore (SSU) (STERFLINGER, 2005). Fino ad ora queste analisi hanno stabilito che lieviti neri e funghi neri meristemati, sebbene molto simili dal punto di vista morfologico e fisiologico, sono genotipicamente molto più differenziati

di quanto non si credesse in passato (UIJTHOF & DE HOOG, 1995; STERFLINGER & GORBUSHINA, 1997).

Sulla base di queste analisi filogenetiche, dunque, i funghi meristemati sono geneticamente abbastanza diversi ed appartengono a tre differenti ordini di ascomiceti: *Chaetothyriales*, *Dothideales* e *Pleosporales* (STERFLINGER *et al.*, 1999):

- *Chaetothyriales*. Appartengono a questo ordine la famiglia delle *Herpotrichiellaceae* (p.e. *Sarcinomyces phaeomuriformis*) ed i generi *Capronia*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Ramichloridium*, *Rhinocladiella* ed *Exophiala*, il principale genere dei lieviti neri. Sono caratterizzati da un tallo consistentemente e regolarmente melanizzato. Molti membri di questi generi, in relazione alla forma tissutale meristemica ed alla pigmentazione (HAASE *et al.*, 1999), sono potenziali agenti di micosi umane, come la feoifomicosi, la cromoblastomicosi (la cui fase invasiva è rappresentata dalla presenza di cellule meristematiche muriformi), il micetoma ed alcuni disturbi sistemici (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Sembra infatti che alla base della loro potenziale patogenicità ci sia la differenza nel grado di melanizzazione e che proprio la melanina delle spesse pareti cellulari rappresenti un importante fattore sia di virulenza che di protezione dall'azione fagocitaria del sistema immunitario dell'ospite (SELBMANN *et al.*, 2005; STERFLINGER, 2005);
- nell'ordine delle *Dothideales* molti generi posseggono la forma meristemoide per tutta la durata del loro ciclo vitale (*Pheotheca*, *Phaeosclera*, *Hyphospora*) o sono in grado di produrre sinanamorfi meristemati (*Aureobasidium*, *Hortaea*). Anche alcuni funghi meristemati lichenicoli ed associati ai licheni come *Mycocalicium victoriae*, sono membri di quest'ordine. Al contrario delle *Chaetothyriales* la pigmentazione delle *Dothideales* è dipendente dagli stadi dello sviluppo e dalle condizioni ambientali ma la loro abilità adattativa li rende capaci di sopravvivere in ambienti particolarmente ostili (STERFLINGER *et al.*, 1999);

- nell'ordine delle *Pleosporales*, *Botryomyces caespitosus* è l'unica specie meristemica, morfologicamente molto simile ma geneticamente molto lontana da *Sarcinomyces phaeomuriformis* (STERFLINGER, 2005).

Esistono infine molti funghi, come le specie appartenenti a *Coniosporium* e *Trimmatostroma*, che, benché prossimi alla famiglia delle *Herpotrichiellaceae* i primi, e delle *Dothyeales* o *Pleosporales* i secondi, non possono ancora essere ricondotti a nessuno degli ordini conosciuti e sequenziati (STERFLINGER *et al.*, 1999; STERFLINGER, 2005).

Mentre i funghi meristemici neri trovati in Antartide sono parte di comunità endolitiche (NIENOW & FRIEDMANN, 1993), in stretta associazione con i licheni, quelli trovati sul marmo dei monumenti crescono epi- ed endoliticamente, causando seri danni dovuti alla crescita attiva delle colonie *nella* pietra. Un processo, quest'ultimo, che avviene progressivamente, attraverso l'iniziale aderenza delle colonie fungine alle zone di contatto tra i cristalli e la penetrazione dei funghi lungo le sottili fessure presenti nella pietra. La successiva ridotta coesione dei cristalli, a causa dello sviluppo coloniale fungino, determina la perdita conseguente di substrato che ne causa la distruzione, formando cavità a forma di cratere, chiamati *biopit*, visibili sulla superficie (STERFLINGER & KRUMBEIN, 1997; STERFLINGER, 2000).

Nonostante gli habitat descritti finora per i funghi meristemici possano sembrare così diversi e così lontani gli uni dagli altri, di fatto, le rocce come gli altri tipi di superficie, la fillosfera, i tessuti animali e gli ambienti definiti estremi (segnati cioè da parametri chimico-fisici al limite per l'esistenza biologica), condividono alcune essenziali somiglianze ecologiche: sono tutti caratterizzati da condizioni di condizioni sfavorevoli alla vita (STERFLINGER, 2005).

L'influenza combinata di fattori di stress come le elevate temperature, la radiazione UV, le condizioni nutritive oligotrofiche, gli stress osmotici e della matrice, esercita un'alta pressione selettiva sulla comunità microbica e, come conseguenza, i

funghi meristemati si trovano solitari o in associazioni spaziali con comparabili organismi resistenti allo stress come i licheni ed i cianobatteri e raramente in popolazioni complesse microbiche (STERFLINGER, 2005).

In questo contesto, tutti i funghi neri meristemati mostrano caratteristiche comuni che nel loro insieme si sono rivelate evidentemente fondamentali per la conquista di determinati ambienti, tanto che questi organismi vengono considerati più un gruppo ecologico piuttosto che tassonomico.

Generalmente la morfologia meristemata/microcoloniale *in situ* prevalente in molti funghi epifitici, epi- ed endolitici è da interpretare quale risposta non a singoli ma a molteplici fattori di stress (STERFLINGER, 1999) e le singole cellule (vegetative) come forme di resistenza, paragonabili alle spore o alle clamidospore degli altri funghi; per i funghi meristemati in ambiente naturale, infatti, né lo sviluppo di spore né di conidi è stato mai osservato, al contrario di colonie satellite che si formano su stoloni e di frammenti utilizzati per la propagazione (STERFLINGER, 2005).

La crescita meristemata sembra, infatti, essere correlata con la loro abilità di sopravvivere alle alte (PALMER *et al.*, 1987; STERFLINGER & KRUMBEIN, 1995; STERFLINGER, 1998) come alle basse temperature (SELBMANN *et al.*, 2005), a condizioni di scarsa disponibilità di acqua (WOLLENZIEN *et al.*, 1995), di acidità (MENDOZA *et al.*, 1993), di carenza di nutrienti (STERFLINGER *et al.*, 1999), di elevata esposizione ultravioletta (URZI *et al.*, 1995) o di alta concentrazione salina (ZALAR *et al.*, 1999b) assicurando alle colonie, almeno per una parte del loro ciclo vitale, un rapporto ottimale superficie/volume (WOLLENZIEN *et al.*, 1995), che ne mantiene la tolleranza alla temperatura e ne permette la riduzione del tasso e della velocità della disidratazione.

In laboratorio, funghi che mostrano una morfologia ifale, con conidi prodotti per conidiogenesi fialidica o simpodiale, possono essere indotti ad accrescersi isodiametricamente se posti in coltura a basso valore di pH (MENDOZA *et al.*, 1993) o se sottoposti a stress osmotico, alte temperature (STERFLINGER & KRUMBEIN, 1995) o in

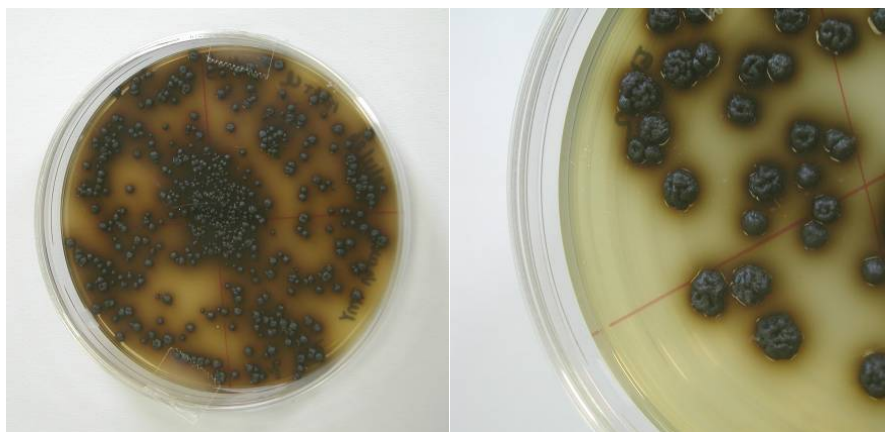
medium colturale contenente composti di difficile assimilazione (STERFLINGER *et al.*, 1999); similmente in alcune specie fungine è stata osservata la conversione inversa, da crescita meristemica a filamentosa o lievito-simile (YOSHIDA *et al.*, 1996; FIGUERAS *et al.*, 1996).

1.5.1. LE MELANINE

La spessa parete melanizzata che riveste le cellule e le intere microcolonie (GORBUSHINA, 2003) costituisce un altro elemento caratterizzante di questo gruppo di microrganismi; questo rivestimento li protegge da una parte dalla perdita d'acqua per essiccazione (STERFLINGER & KRUMBEIN, 1995; STERFLINGER, 1998) e dagli stress osmotici (STERFLINGER, 2005) e dall'altra dall'esposizione ad elevate dosi di radiazioni ultraviolette (KOGEEJ *et al.*, 2003) e da specie chimicamente reattive relative all'azoto e all'ossigeno (STERFLINGER, 2005).

Questa coesistenza di attività protettive verso fattori di stress differenti è legata prevalentemente alla sintesi nella parete cellulare di molecole dalle proprietà, allo stesso tempo, antiossidanti, osmo-, crio- e termoprotettive. Tra queste le melanine sono senza dubbio quelle sintetizzate in grande quantità dai funghi neri (DIAKUMAKU *et al.*, 1995; BUTLER & DAY, 1998), nella parete cellulare o come polimeri extracellulari formati enzimaticamente o autossidativamente nel medium (KOGEEJ *et al.*, 2004) (fig. 1.19).

Figura 1.19 –
Diffusione di
pigmenti melaninici
in coltura agarizzata
(MEA) del fungo nero
meristemico
Cryomyces minteri
CCFEE 5187. Foto
Donatella Barreca.



Le melanine sono pigmenti di alta massa molecolare responsabili della colorazione verde scuro, marrone e nera di questi funghi, sono formate dalla polimerizzazione di composti fenolici (BELL & WHEELER, 1986) di solito complessati con proteine e spesso anche con carboidrati (BUTLER & DAY, 1998). La loro funzione biologica principale (protezione delle cellule dall'effetto nocivo di vari tipi di radiazioni) è relativa alla loro specifica struttura chimica, caratterizzata dalla presenza di legami coniugati doppi, e dalla facilità nella formazione di centri paramagnetici (BUTLER & DAY, 1998), che conferiscono alle melanine l'abilità di convertire le radiazioni, dall'ultravioletto all'infrarosso, in calore e di eliminare i radicali liberi citotossici.

La produzione delle melanine nei funghi neri meristematici non si limita però soltanto alla protezione contro specie chimiche reattive e radiazioni UV (KOGĚJ *et al.*, 2003), ma conferisce alle cellule fungine protezione anche contro le temperature estreme (BELL & WHEELER, 1986), la disidratazione e lo stress osmotico (BUTLER & DAY, 1998; KOGĚJ *et al.*, 2001).

Le melanine risultano importanti anche per la penetrazione nei tessuti ospiti delle piante e degli animali (WHEELER & BELL, 1986); è stato, infatti, dimostrato che mutanti con insufficiente produzione di melanina non essendo in grado di generare pressione di turgore agli appressori perdono il loro potenziale patogeno. La melanina, ad ogni modo, da sola non è sinonimo di patogenicità, dal momento che funghi noti per la loro capacità di penetrare meccanicamente materiale inorganico duro contengono melanina ma non sono patogeni (LANGFELDER *et al.*, 2003).

1.5.2. ALTRE SOSTANZE

Insieme alle melanine anche alcune micosporine presentano funzioni cellulari multiple, svolgendo un importante ruolo come sostanze che proteggono dagli UV (tra 310 e 320 nm) (GORBUSHINA *et al.*, 2003), come soluti compatibili supplementari nella osmoprotezione (KOGĚJ *et al.*, 2006) e come antiossidanti (VOLKMANN *et al.*, 2003).

Sembra, inoltre, che la presenza universale delle micosporine negli MCF sia probabilmente connessa con la crescita ifale, l'autoinibizione e lo stato di dormienza, legato ai periodi sfavorevoli (STERFLINGER, 1998), regolando anche la divisione e aiutando, così, le cellule non sporulanti a differenziarsi come strutture vegetative specializzate (GORBUSHINA *et al.*, 2003).

La produzione e l'accumulo intracellulare di sostanze, come il disaccaride trealosio, ed i polioli, come il glicerolo, nonché la biosintesi degli steroli, sono legati, invece, alla limitazione della perdita di acqua; il trealosio contribuendo alla stabilizzazione degli enzimi e del doppio strato lipidico della membrana cellulare, i secondi come osmoliti in risposta ad alte concentrazioni saline (STERFLINGER, 1998); la regolazione della biosintesi degli steroli influenza le proprietà di membrana legate alla osmotolleranza (PETROVIC *et al.*, 1999).

Un altro importante fattore anti stress è assunto dalla produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) che contribuiscono a preservare i funghi neri mantenendone la struttura, agendo come barriere protettive, controllando la disponibilità di acqua ed intrappolando le sostanze nutritive, particelle organiche ed inorganiche (URZI & REALINI, 1998; GORBUSHINA, 2003).

In Antartide i funghi neri meristemati sono una presenza costante nelle comunità criptoendolitiche senza formare però, come dimostrato da FRIEDMANN e collaboratori, associazioni licheniche, in grado invece di produrre sostanze inibitorie capaci di limitare un'eccessiva crescita di batteri, cianobatteri ed alghe chemo-organotrofici (OCAMPO-FRIEDMANN & FRIEDMANN, 1993; NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

Questi microrganismi vivono al limite assoluto della vita in condizioni ambientali estreme tra quelle conosciute della Terra, al limite tra adattabilità e morte, sopravvivendo appena e riproducendosi raramente (FRIEDMANN & WEED, 1987).

Le condizioni ambientali del deserto freddo delle Valli Secche di McMurdo, nella Terra Vittoria del Sud, infatti, sono estremamente stressanti per la crescita microbica,

caratterizzate come sono dalla combinazione di elevate radiazioni UV, scarsa disponibilità d'acqua, basse temperature, forti escursioni termiche, straordinaria aridità e scarsità di nutrienti (vedi par. 1.3.).

Per questo motivo, tra le numerose specie fungine registrate in Antartide, i funghi melanizzati, che esibiscono crescita meristematica isolati da queste comunità (due nuovi generi, *Fridmanniomyces* e *Cryomyces* e quattro nuove specie, *F. endolithicus* Onofri, *F. simplex* Selbmann *et al.*, *C. antarcticus* Selbmann *et al.* e *C. minteri* Selbmann *et al.*) sono le specie che meglio sembrano essersi adattate ad un habitat così proibitivo (ONOFRI *et al.*, 1999; SELBMANN *et al.*, 2005). Come i funghi meristemati descritti finora, i funghi neri criptoendolitici antartici sono caratterizzati dalla tipica morfologia dei funghi che abitano le rocce, che permette loro di vincere le avverse condizioni ambientali: una spessa parete cellulare melanizzata come carattere stabile che conferisce resistenza all'aridità e all'irraggiamento UV, la produzione di EPS, possibilmente esopolisaccaridi, coinvolti soprattutto nella protezione contro la disidratazione e dai continui danni provocati dal congelamento (SELBMANN *et al.*, 2002; 2005) e un'estrema semplificazione del ciclo vitale. Molti, infatti, sono incapaci di produrre strutture riproduttive ma generano propaguli direttamente dalla disarticolazione delle ife toruloidi preesistenti, come nelle specie di *Friedmanniomyces*, o esibiscono un'organizzazione lievito-simile e possono concludere il loro ciclo vitale con la produzione di una singola cellula che viene rapidamente trasformata in un propagulo resistente, anch'esso fortemente melanizzato e con parete spessa, come in *Cryomyces*. In questo modo il ciclo vitale può essere concluso in un tempo breve e senza alti costi metabolici, quando le condizioni climatiche per l'attività vitale occupano anche solo pochi giorni l'anno. Inoltre alcuni presentano la capacità di crescere a 0°C, con un ampio intervallo di temperatura (20-25°C), con un *optimum* a 15°C, a dimostrazione del loro carattere psicrotollerante, che permetterebbe loro non solo di prosperare a bassa temperatura ma di tollerare forti fluttuazioni termiche

mantenendo una certa attività metabolica a bassa come a relativamente alta temperatura (SELBMANN *et al.*, 2005).

Sebbene questi microrganismi siano ancora poco conosciuti le informazioni raccolte fino ad oggi mostrano l'ampia versatilità e adattabilità che li contraddistingue ad un ampio range di parametri ambientali fisici e chimici, tipica degli estremofili (GORBUSHINA & KRUMBEIN, 1999).

Ciò vuol dire che i funghi neri criptoendolitici antartici, che colonizzano ambienti così simili a quello primordiale marziano, possono essere tra i candidati a rappresentare il miglior modello eucariotico stress-tollerante per lo studio non solo dei limiti per la vita terrestre, che ne spieghino l'origine, l'evoluzione e gli adattamenti (ONOFRI *et al.*, 2004; ONOFRI *et al.*, 2007), ma anche come modello spaziale da destinare a studi esobiologici sulle strategie di sopravvivenza in condizioni extraterrestri (GORBUSHINA, 2003).

1.6. LIFE – LICHENS AND FUNGI EXPERIMENT

RESISTENZA A LUNGO TERMINE DI LICHENI E FUNGHI ANTARTICI NELLO SPAZIO

Recenti esperimenti biologici condotti in orbita terrestre hanno indicato che gli organismi possono sopravvivere nelle condizioni proibitive dell'ambiente spaziale. Questo non è vero soltanto per organismi procarioti, come le spore ben caratterizzate del batterio *Bacillus subtilis*, di cui si è provata l'alta resistenza alle condizioni spaziali esterne (vuoto, radiazione ionizzante, radiazione ultravioletta ricca di energia, temperature estreme), in laboratorio come in esperimenti spaziali (NICHOLSON *et al.*, 2000; HORNECK *et al.*, 2001a,b), ma anche per altri organismi superiori come i licheni, nei quali funghi ed alghe vivono in simbiosi (ESA, 2005).

L'Agenzia Spaziale Europea (ESA) sostiene, dagli anni '80, un programma di ricerca scientifica, che vede lo sviluppo e l'utilizzo di piattaforme per l'esposizione alla radiazione sperimentale. Queste piattaforme sperimentali sono state progettate per

permettere l'esposizione alle radiazioni extraterrestri, in orbita terrestre, su campioni di molecole che sono essenziali per la vita. Esse sono state utilizzate per investigare gli effetti nocivi dell'ambiente spaziale, come la radiazione UV solare nel vuoto (VU-V), la radiazione cosmica galattica, l'aumento improvviso della radiazione solare, specialmente nell'intervallo dei raggi X durante le tempeste solari, così come la bassa gravità e gli effetti della disidratazione dovuti alle condizioni di vuoto spaziale.

A questo scopo sono state sviluppate ed utilizzate dall'ESA due piattaforme: *BIOPAN* e la nuova *facility* multi-uso *EXPOSE*.

- a. La *facility BIOPAN* è stata sviluppata quasi un decennio fa ed è stata messa in orbita con successo con il satellite russo appartenente alla classe *Foton*, con 25 esperimenti di esobiologia, biologia e dosimetria delle radiazioni, in quattro voli a breve termine, l'ultimo dei quali di circa due settimane (giugno 2005).
- b. L'*EXPOSE facility* dell'ESA appartiene alla seconda generazione di piattaforme multi-uso da esporre alla radiazione e presto sarà utilizzata per il volo sulla *Stazione Spaziale Internazionale (ISS)*. Questa *facility* sarà installata sulla struttura esterna della ISS per restare in orbita per più di un anno.

Allo scopo di studiare la risposta degli organismi all'ambiente spaziale è stato formato un consorzio scientifico (*ROSE, Response of Organisms to the Space Environments*) che si rivolge allo studio dei processi fotobiologici indotti dalle radiazioni e delle possibilità di trasferimento della vita all'interno del Sistema Solare (*RETTBERG et al., 2004*).

L'esperimento *LIFE (Lichens and Fungi Experiment)* si colloca nell'ambito del programma *EXPOSE-EuTEF (EuTEF - European Technology Exposure Facility)* che, in collaborazione con l'ESA, si propone di condurre esperimenti di eso/astrobiologia in condizioni simulate di selezionati parametri planetari e spaziali ed in condizioni di spazio aperto, attraverso l'utilizzo di una piattaforma espositiva esterna.

All'interno del programma EXPOSE-EuTEF, l'esperimento LIFE (proposta ESA-AO2004-150) si propone di saggiare la resistenza a lungo termine in ambiente spaziale di organismi criptoendolitici antartici e di licheni epilittici, esponendoli per un periodo di minimo sei mesi all'esterno della International Space Station.

Il gruppo di ricerca che si occupa dell'esperimento si compone di membri appartenenti a 3 diversi paesi europei, l'Italia, coordinatrice dell'esperimento di cui è responsabile scientifico il Prof. Silvano Onofri dell'Università della Tuscia di Viterbo, la Spagna e la Germania.

La Stazione Spaziale Internazionale (ISS) orbita intorno alla Terra (ogni 90 minuti) con una inclinazione di 51,6° all'equatore ad un'altitudine di oltre 300 km (min. 325 km; max. 405 km) ([HTTP://WWW.ESA.INT/](http://www.esa.int/)). Le condizioni esterne alla ISS sono: pressione 10^{-7} Pa (vuoto pressoché assoluto), temperatura tra -20 e +20 °C, radiazione solare totale (compresa UV-A, UV-B, UV-C), e radiazione cosmica. In tali condizioni si riteneva, fino a poco tempo fa, che nessuna cellula fosse in grado di vivere e anche di sopravvivere. Un essere umano che si trovasse esposto a quelle condizioni, si essiccerebbe così velocemente da non sentire le bruciature provocate dalle radiazioni.

I licheni invece sono, ad oggi, gli unici organismi che hanno dimostrato di poter resistere nello spazio esterno, dopo un'esposizione di 14 gg, non solo sopravvivendo, ma mantenendo inalterate le loro potenzialità vitali. Nel giugno 2005 campioni dei licheni *Xanthoria elegans* e *Rhizocarpon geographicum* sono stati inviati nello spazio, ad un'altezza di 350 Km, ed esposti al vuoto, a temperature tra -20 e +20 °C, e alla radiazione spaziale (>110 nm), per un periodo di due settimane. Allo scopo era stata utilizzata la speciale piattaforma espositiva *BIOPAN*, dotata di coperchio, che è stata aperta in orbita e chiusa prima del rientro sulla Terra del veicolo spaziale *Foton*. Per evitare la contaminazione dello spazio i campioni erano stati posti in un portacampioni, protetto da uno schermo di fluoruro di magnesio (trasparente a tutte le radiazioni >110 nm). Non solo le due specie licheniche sono sopravvissute

all'esperimento ma, nel caso di *X. elegans*, l'attività fotosintetica si è rivelata leggermente aumentata dopo il volo. Questi risultati sono assolutamente eccezionali, dato che per la prima volta un intero organismo, il fungo lichenizzato, insieme al sensibile simbionte algale, ha dimostrato di resistere intatto al di fuori della protezione dell'atmosfera terrestre. Tali capacità erano state dimostrate precedentemente solo per "spore di resistenza" prodotte da organismi come *Bacillus subtilis* (HORNECK *et al.*, 2001a,b).

Dimostrato che i licheni possono sopravvivere alle condizioni spaziali, con il programma LIFE si vuole sperimentare se sono in grado di farlo a lungo termine. In esso sono inoltre inclusi, per la prima volta, comunità criptoendolitiche e isolati di funghi neri meristemati delle rocce dell'Antartide.

Nelle comunità criptoendolitiche dominate dai licheni delle arenarie antartiche coesistono, come ho già detto (rif al paragrafo), funghi lichenizzati e alghe lichenizzate, funghi meristemati, batteri, cianobatteri e alghe non lichenizzate (FRIEDMANN, 1982; NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

È noto che molti eucarioti sono in grado di vivere o anche prosperare in ambienti estremi (estremotolleranti ed estremofili) e tra questi i funghi meristemati così come le comunità criptoendolitiche rappresentano l'esempio più interessante (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2005a; STERFLINGER, 2005). Per questo motivo i funghi neri criptoendolitici antartici che colonizzano ambienti paragonabili a quelli marziani, sebbene i loro limiti reali di sopravvivenza e di tolleranza ai differenti stress siano ancora poco conosciuti, sono già stati suggeriti come ottimi modelli per la speculazione esobiologica (ONOFRI *et al.*, 2004). Tra gli organismi delle comunità criptoendolitiche i funghi neri meristemati, considerate le loro peculiari caratteristiche morfologiche (SELBMANN *et al.*, 2005), potrebbero rivelarsi i più resistenti alle condizioni spaziali, soprattutto alla radiazione e all'assenza di acqua (STERFLINGER, 2005).

c. L'esperimento. Per l'esperimento sono stati selezionati tre isolati di funghi neri meristemati, tra quelli isolati dalle comunità criptoendolitiche dominate dai licheni, appartenenti al genere *Cryomyces*, due di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e CCFEE 534) ed una di *C. minteri* (CCFEE 5187) prelevati dalla *Culture Collection of Fungi from Extreme Environments* dell'Università della Tuscia di Viterbo e la cui potenziale utilizzazione per l'esposizione nello spazio è legata alla capacità di resistenza dimostrata, alle condizioni estreme antartiche, dovuta alle loro particolari caratteristiche morfo-fisiologiche (SELBMANN *et al.*, 2005).

L'insieme di queste caratteristiche, infatti, definisce i funghi criptoendolitici antartici delle Valli Secche di McMurdo, ed in generale i funghi microcoloniali (MCF), come una struttura di crescita unica, capace di resistere alle intense pressioni ambientali di quegli ambienti estremi a cui sono sottoposti (GORBUSHINA, 2003). Per questo motivo sono stati scelti in vista del loro impiego quale materiale biologico durante l'esposizione sulla ISS dell'esperimento LIFE.

La prima fase dell'esperimento si è svolta al *German Aerospace Center* (DLR) di Colonia (DE), dove sono stati effettuati gli *Experiment Verification Test* (EVTs). Durante tali test preliminari, i campioni sono stati sottoposti a condizioni spaziali simulate, per poi valutarne la sopravvivenza e gli effetti mediante metodi colturali e colorimetrici (con coloranti come FUN 1 e SITOX Green) per microscopia a fluorescenza.

Sono stati previsti due tipi di esperimenti di simulazione, gli EVT-E1 e gli EVT-E2, le cui condizioni sono sintetizzate di seguito.

1. Negli EVT-E1 i campioni sono stati sottoposti, in parallelo, al vuoto (10^{-5} Pa per 1 h e 1 settimana), a ripetuti cicli di temperatura (da -20 °C a $+20$ °C per due settimane), a UVC (254 nm, a 10 Jm^{-2} , 100 Jm^{-2} e 1000 Jm^{-2}) e all'intero spettro UV (200-400 nm, lampada SOL2000, a 1,5, $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$).

2. Negli EVT-E2 sono state applicate due condizioni:

- vuoto e, contemporaneamente, esposizione ad UV 200-400 nm ($1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$, con e senza filtro *cut-off* che taglia la radiazione per lunghezze d'onda $> 200 \text{ nm}$);
- esposizione ad una miscela di gas, con composizione simile all'atmosfera marziana (elevata pressione parziale di CO_2) e, contemporaneamente, ad UV 200-400 nm ($1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$, con e senza filtro *cut-off*).

Per entrambi i tipi di esperimento sono stati previsti dei controlli (*dark*) mantenuti al buio, ai quali se ne sono aggiunti altri, mantenuti sempre al buio ma in condizioni di temperatura ambiente e pressione atmosferica.

L'invio dei campioni nello spazio avverrà mediante lo Space Shuttle, con partenza prevista per il 6 dicembre 2007. Per l'esposizione nello spazio esterno è stata realizzata una speciale apparecchiatura, *EXPOSE facility*, progettata e sviluppata dalla Kaiser-Threde GmbH, Monaco (Germania) – Electronic Subsystem and System Integration and Qualification – insieme alla HTS AG, Zurigo (Svizzera) – Mechanical Subsystem presso l (fig. 1.20), su indicazione di gruppi di ricerca a progetto dell'ESA.

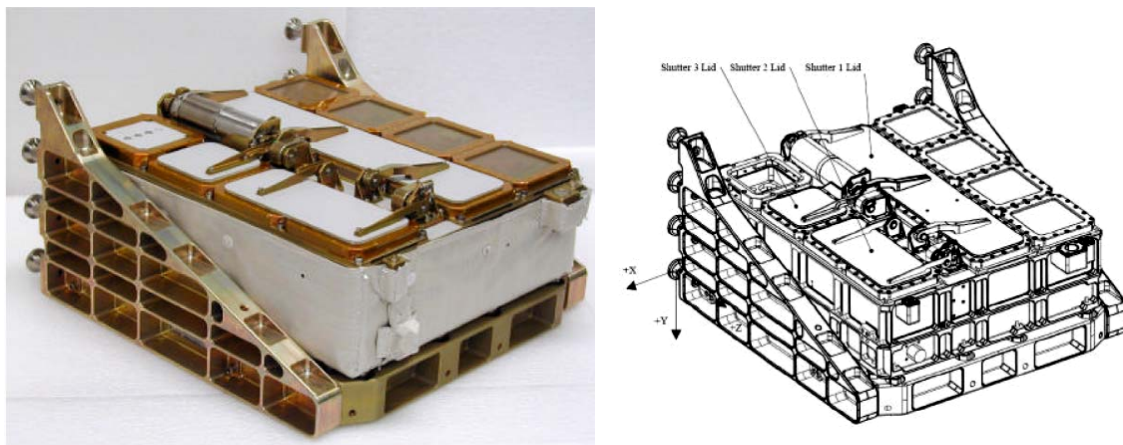


Figura 1.20 – L'apparecchiatura "EXPOSE Facility" ed il sottosistema meccanico (Kaiser-Threde, 2005)

L'apparecchiatura *EXPOSE* presenta una struttura a forma di scatola ed ha carattere multidisciplinare per la sistemazione di esperimenti di fotobiologia ed esobiologia (Kaiser-Threde).

Sarà montata sulla citata struttura, la *European Technology Exposure Facility* (EuTEF) (fig. 1.21), sul laboratorio multidisciplinare *Columbus Orbital Facility* (COF) della ISS (fig. 1.22) con una sistemazione tale da realizzare un'esposizione solare diretta ([HTTP://WWW.ESA.INT/](http://www.esa.int/)).

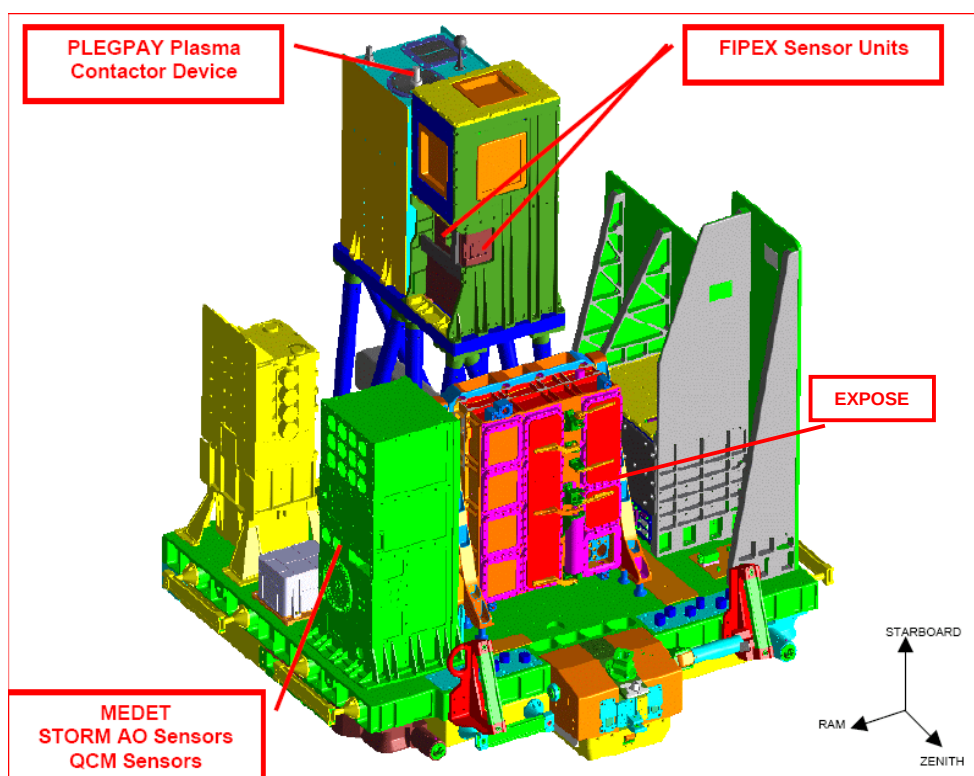


Figura 1.21 – Visione d'insieme di EuTEF (Kaiser-Threde, 2005).

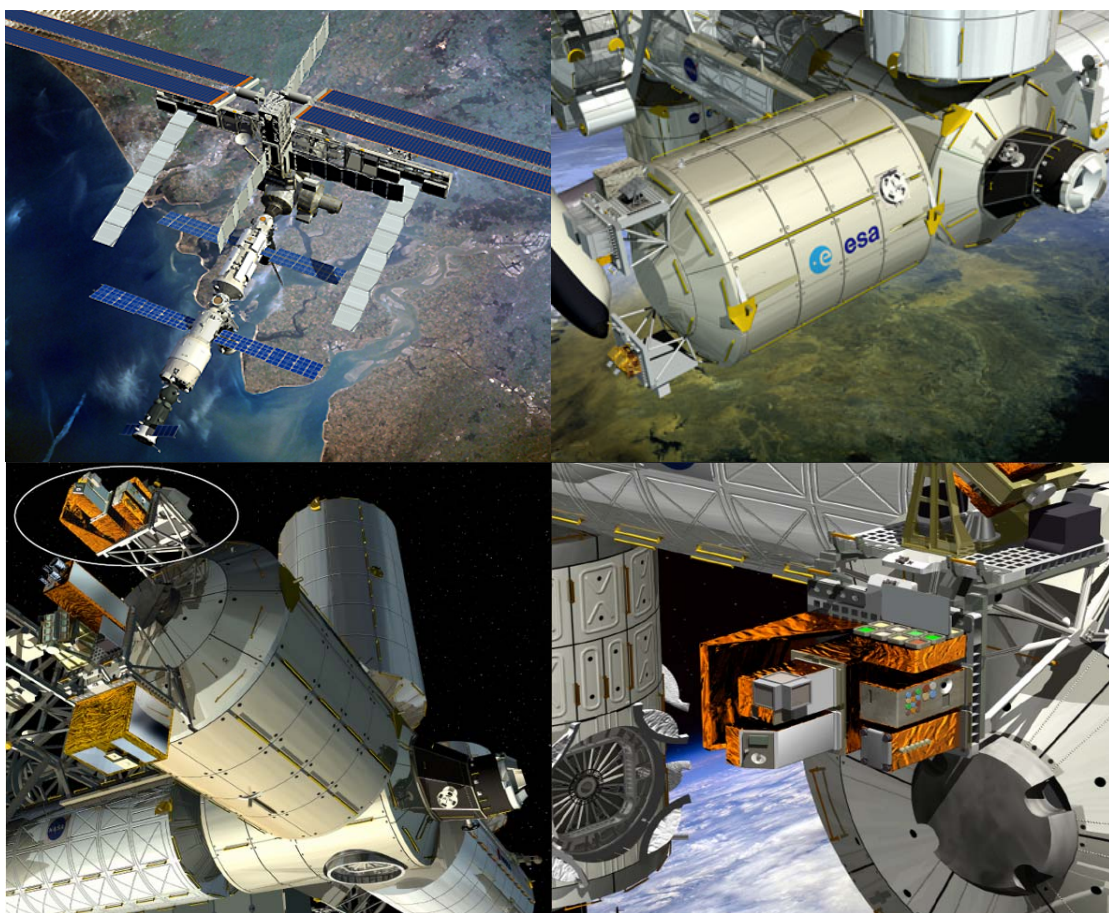


Figura 1.22 – In alto: a sinistra, una visione della configurazione attuale della ISS e, a destra, il modulo europeo Columbus attaccato alla stazione spaziale. Sotto: a sinistra, posizione e, a destra, ingrandimento di EuTEF (ESA/D. Ducros).

L'apparecchiatura *EXPOSE* è dotata di tutte le funzionalità ordinarie necessarie per la corretta manutenzione. Meccanismi di chiusura dei coperchi, sensori, etc. regoleranno perciò l'ambiente soggetto a fluttuazioni termiche, radiazioni UV solari, vuoto o atmosfera definita, che verrà controllato, a breve e lungo termine, e che è destinato ai campioni biologici. *EXPOSE* (fig. 1.23A) è divisa in due parti, una superiore ed una inferiore, e consiste di tre "vassoi" (*trays*), all'interno dei quali sono posizionati quattro portacampioni (*sample carriers*) (fig. 1.23C) costituiti, a loro volta, da 2 ripiani a 16 pozzetti (16 mm Ø, 9 mm di profondità) posti su due livelli, di cui l'inferiore destinato a contenere i campioni di controllo al buio (fig. 1.23B). Le dimensioni dei campioni biologici relativi a LIFE saranno di 12 mm di Ø e 6,95 mm di altezza.

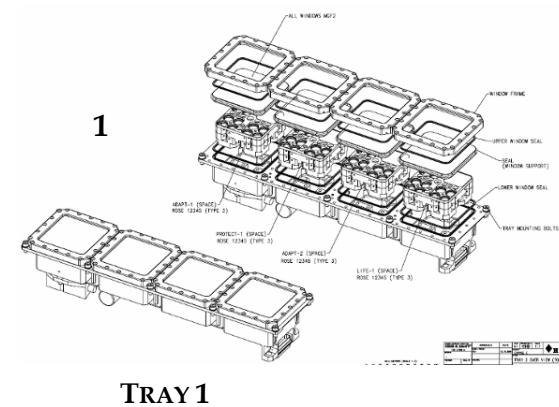
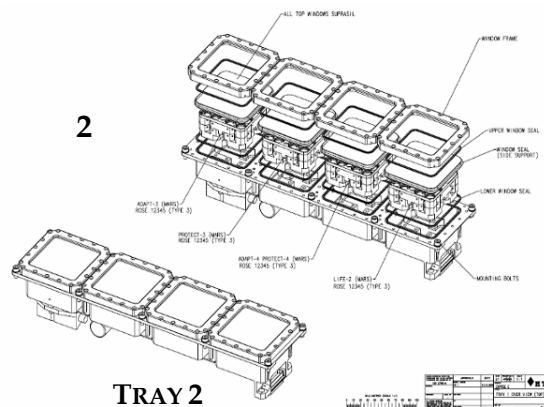
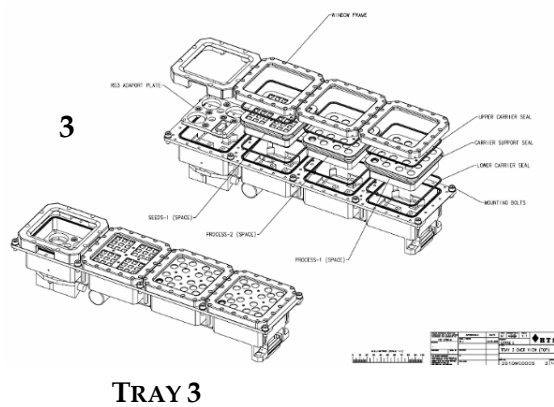
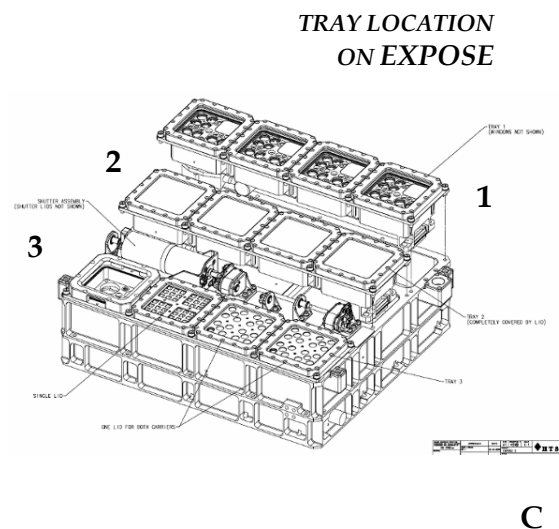
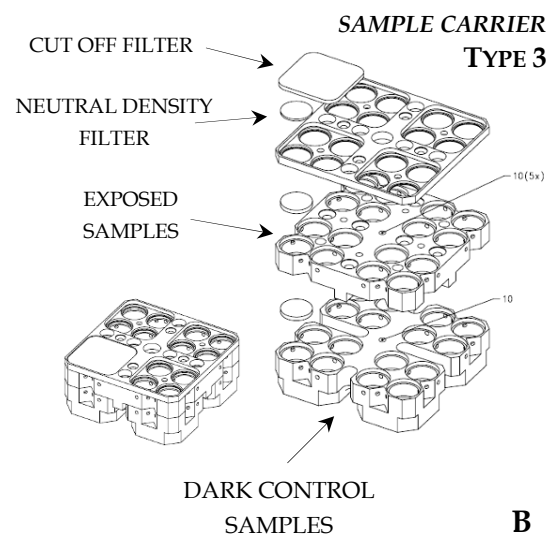
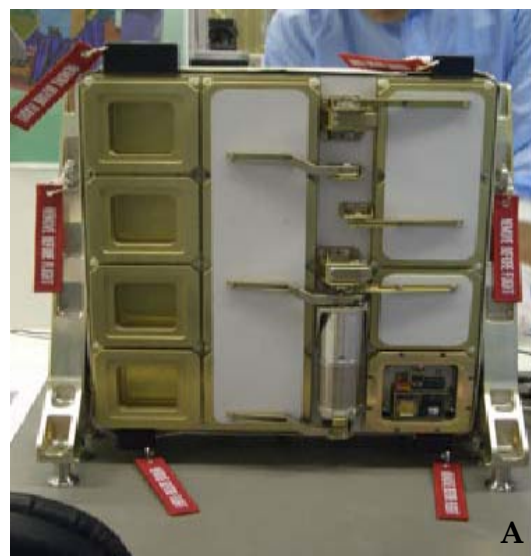


Figura 1.23 – A. EXPOSE. B. Il portacampione Type 3 per il vassoio 1 e 2 con, accanto, la scomposizione dei 2 ripiani. C. Il modello di EXPOSE con, nella riga in basso, la scomposizione nei tre vassoi (1,2,3) (Kaiser-Threde, 2005)

L'esposizione al Sole sarà controllata, per i vassoi 2 e 3, da tre differenti chiusure meccaniche motorizzate mentre il vassoio 1 è stato progettato, per l'intera durata della missione, per una continua esposizione solare (fig. 1.25).

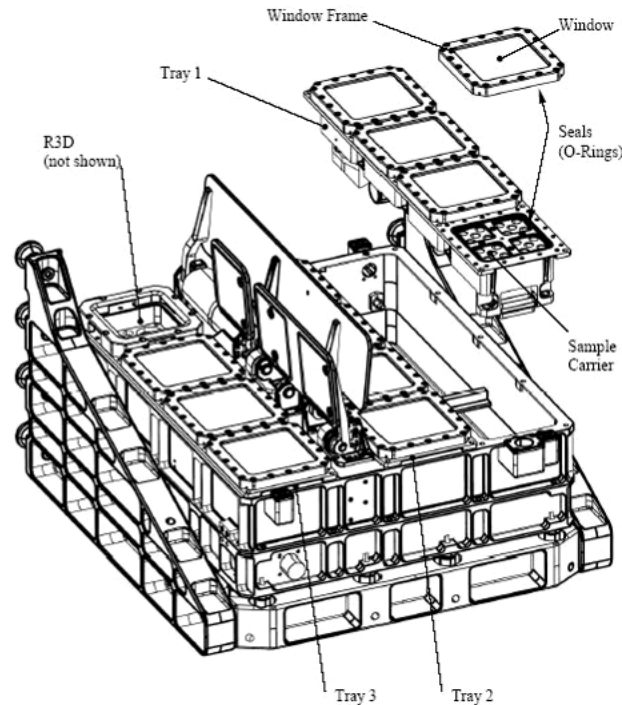


Figura 1.25 – Esploso di EXPOSE facility. Sono ben visibili i vassoi (tray) 2 e 3 che, diversamente dal vassoio 1, sono dotati di coperchio (Kaiser-Threde, 2005).

Le caratteristiche principali e le differenze dei tre vassoi, ciascuno suddiviso, come si è detto, in 4 compartimenti, sono di seguito riassunte:

tray 1 – non presenta alcun meccanismo di chiusura. Tutti i campioni biologici vengono esposti permanentemente allo spazio e alla radiazione solare e le celle saranno ventilate;

tray 2 – dove l'esposizione solare è controllata da un meccanismo di chiusura per il coperchio che copre tutti e quattro i compartimenti; il coperchio verrà chiuso al raggiungimento della temperatura limite concordata di 60°C;

tray 3 – tre dei quattro compartimenti avranno l'esposizione solare controllata da due diversi meccanismi di chiusura. Un compartimento è riservato ad alloggiare l'esperimento R3D per la misurazione permanente della radiazione solare (Kaiser-Threde) (fig. 1.26).

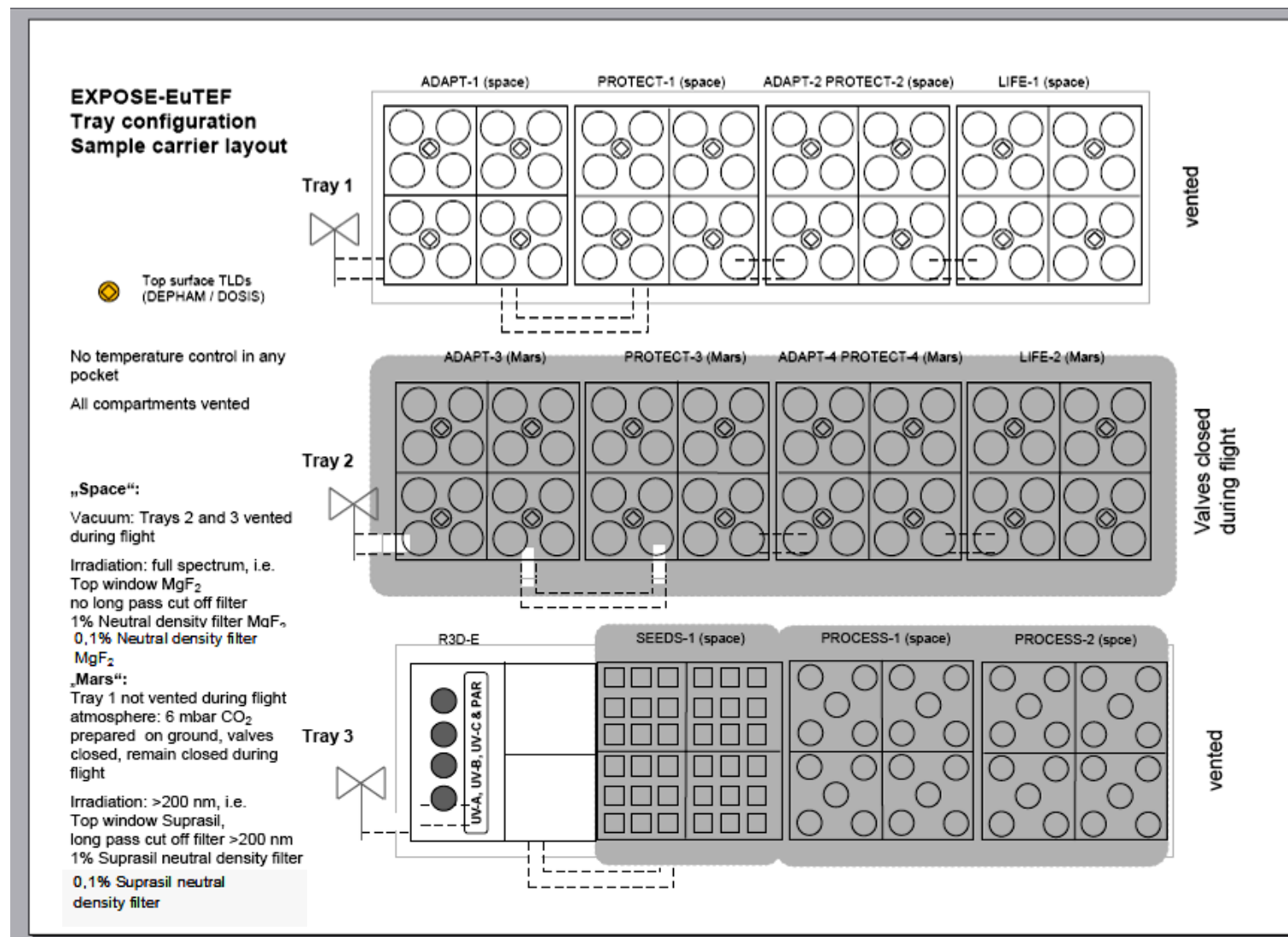


Figura 1.26 – Schema dei tre vassoi di EXPOSE con la configurazione dei portacampioni (DLR).

I campioni utilizzati nell'esperimento LIFE sono:

- campioni di *X. elegans* (raccolti nella regione alpina di Wallis, in Svizzera, tra i 2500 e 3100 m di altitudine e nelle regioni polari di Alexander Island in Antartide)
- campioni di *Rhizocarpon geographicum* (provenienti della Sierra de Gredos nella Spagna centrale),
- il micobionte di *Xanthoria elegans* in coltura pura,
- frammenti di rocce antartiche di arenaria colonizzate da comunità criptoendolitiche (provenienti da Battleship Promontory, McMurdo Dry Valleys, Victoria Land, in Antartide),
- colonie di *Cryomyces antarcticus* isolato da Linnaeus Terrace, McMurdo Dry Valleys, Victoria Land, Antartide,
- colonie di *Cryomyces minteri* isolato da Battleship Promontory, McMurdo Dry Valleys, Victoria Land, Antartide.

I campioni saranno contenuti in due vassoi differenti (1 e 2) e sottoposti a condizioni diverse (fig. 1.27).

Nel primo, le valvole di sfiato saranno mantenute aperte per creare il vuoto e i campioni saranno ricoperti con un filtro di fluoruro di Mg (UV range: >110 nm) e non sarà usato nessun tipo di filtro *cut-off*. Nel secondo le valvole saranno chiuse, per permettere il mantenimento di una miscela di gas costituita da CO₂ a 600 Pa, analoga a quella marziana, mentre la radiazione UV sarà attenuata da un filtro di Suprasil e da un filtro *cut-off* >200nm.

Entrambi i vassoi presenteranno per metà del portacampioni dei *neutral density filter* capaci di lasciar passare, per tutta la durata del volo, soltanto lo 0,1% di radiazione UV dello spazio. Sia lo spazio rimanente che quello coperto con i *neutral density filter* conterrà lo stesso numero di campioni. Parallelamente al volo spaziale un set completo di campioni di controllo *pre flight* rimarrà presso la struttura aerospaziale del DLR come controllo *Ground Based*.

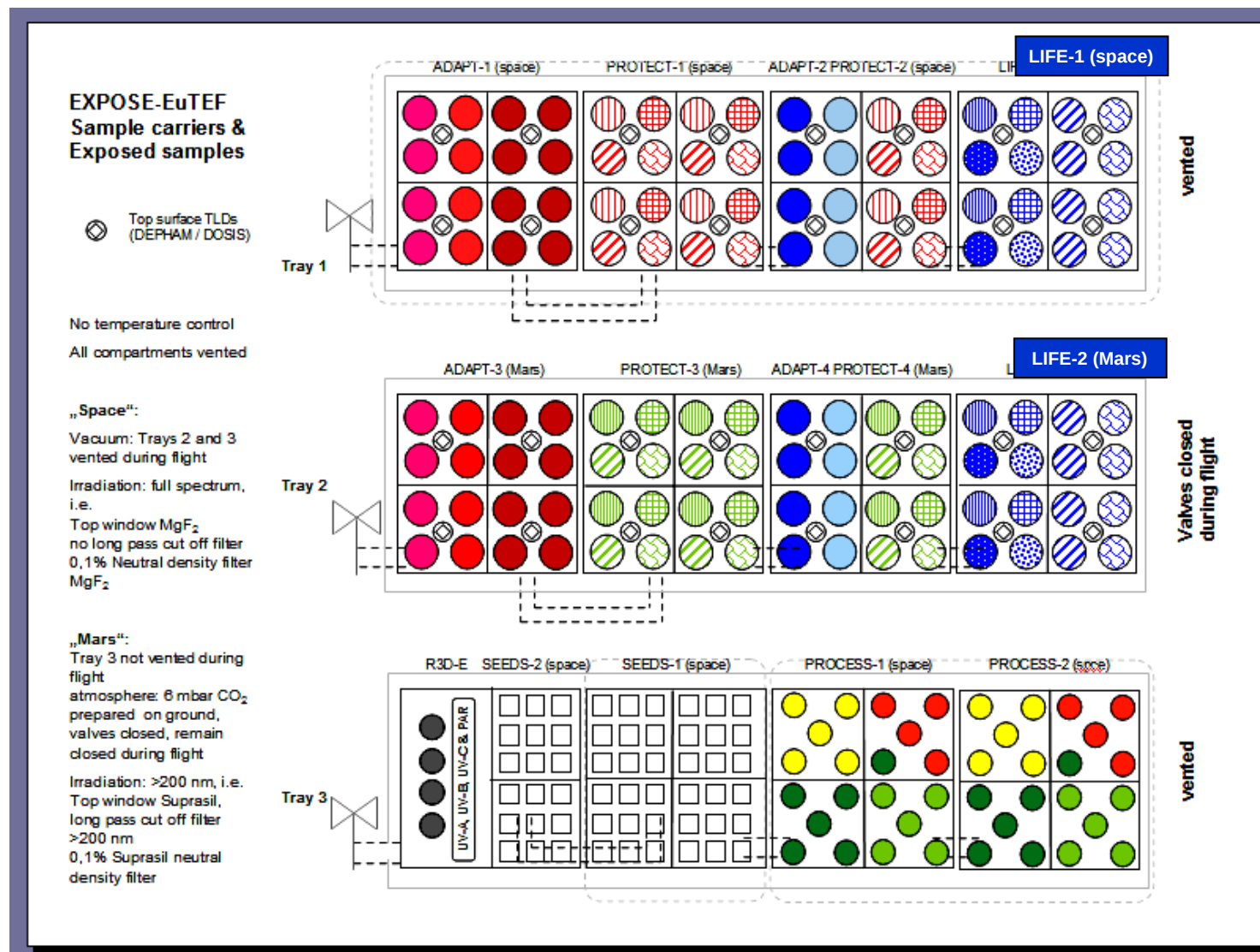


Figura 1.27 – Disposizione dei campioni nei portacampioni di EXPOSE. I campioni dell'Esperimento LIFE sono posizionati nel vassoio 1, a condizioni spaziali (LIFE-1), e nel vassoio 2 a condizioni marziane simulate (LIFE-2) (DLR).

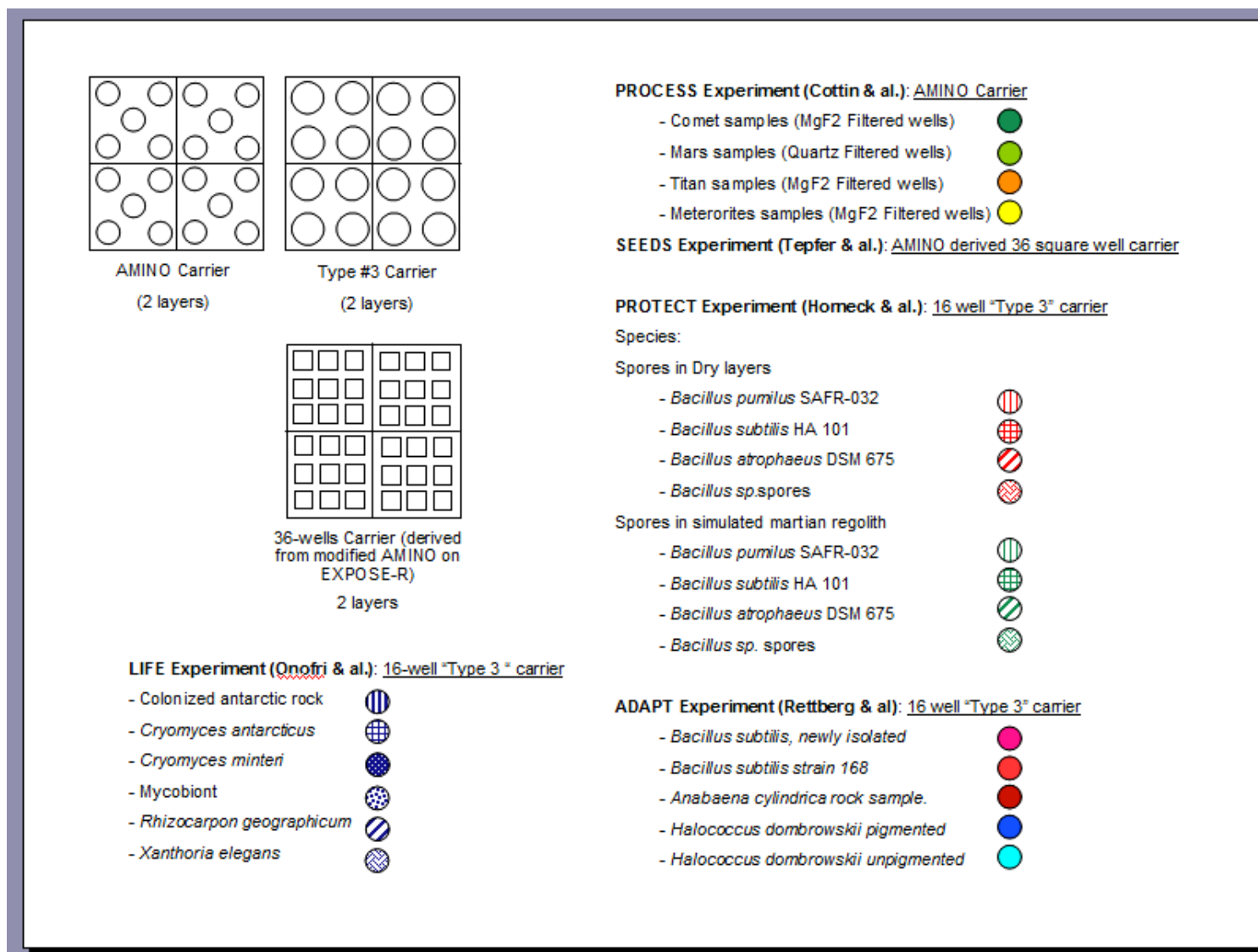


Figura 1.28 – Legenda degli esperimenti e corrispondenti campioni biologici.

Su *EXPOSE* sono previsti, in contemporanea, numerosi vari esperimenti che riguarderanno la resistenza e la sopravvivenza anche di spore batteriche e fungine, semi di piante modificate geneticamente e campioni di roccia di origine extraterrestre (tab. 1.3).

Tabella 1.3 – Quadro riassuntivo degli esperimenti del programma EXPOSE-EuTEF

THE EXPOSE-EuTEF CONSORTIUM

EXPERIMENT		PRINCIPLE INVESTIGATOR
NT		
ADAPT	Petra Rettberg	DLR, Cologne, Germany
DOBIES	Filip Vanhavere	SCK CEN, Mol, Belgium
DOSIS	Günther Reitz	DLR, Cologne, Germany
LIFE	Silvano Onofri	Tuscia University, Viterbo, Italy
PROCESS	Hervé Cottin	LISA, Paris, France
PROTECT	Gerda Horneck	DLR, Cologne, Germany
R3D	Donat-Peter Häder	Erlangen-Nürnberg University, Erlangen, Germany
SEEDS	David A. Tepfer	INRA, Versailles, France

Al rientro dalla ISS, che avverrà presumibilmente prima del 2009, il materiale biologico sarà sottoposto alle procedure di verifica della sopravvivenza e del danno al genoma già messe a punto e applicate per gli EVT. Ciò potrà dare importanti risposte sull'effetto biologico a lungo termine delle radiazioni, sull'effetto di accumulo e di resistenza allo stress radiativo e, di conseguenza, aprire nuove prospettive alla possibilità di trasferimento di forme di vita attraverso il sistema solare.

2. MATERIALI E METODI

2.1. MATERIALE BIOLOGICO

Per questa ricerca sono stati analizzati tre isolati di funghi neri meristemati criptoendolitici antartici e le comunità criptoendolitiche dominate dai licheni presenti in frammenti di roccia arenaria provenienti delle Valli Secche di McMurdo in Antartide.

GLI ISOLATI FUNGINI

Gli isolati fungini sono stati ottenuti dalla *Culture Collection of Fungi from Extreme Environments* (CCFEE), custodita presso la Sezione del Museo Nazionale dell'Antartide dell'Università della Tuscia, a Viterbo; in tabella 2.1 sono riportati gli isolati studiati, con l'indicazione del numero di accesso alla collezione, del substrato da cui sono stati isolati e della località di raccolta:

Tabella 2.1 – Elenco degli isolati studiati conservati nella *Culture Collection of Fungi from Extreme Environments* (CCFEE).

Isolati	CCFEE	Campione	Località di campionamento	Campagna antartica	Raccolta /isolamento
<i>Cryomyces antarcticus</i> Selbmann, de Hoog, Mazzaglia, Friedmann & Onofri	515	arenaria	Linnaeus Terrace, Terra Vittoria del Sud, Antartide	1980-1981	H. S. Vishniac/ R. Ocampo-Friedmann
<i>Cryomyces antarcticus</i> Selbmann, de Hoog, Mazzaglia, Friedmann & Onofri	534	sabbia di arenaria	Linnaeus Terrace, Terra Vittoria del Sud, Antartide	1981-1982	E.I. Friedmann/ R. Ocampo-Friedmann
<i>Cryomyces minteri</i> Selbmann, de Hoog, Mazzaglia, Friedmann & Onofri	5187	sabbia di arenaria	Battleship Promontory, Terra Vittoria del Sud, Antartide	1996-1997	S. Onofri /S. Pagano

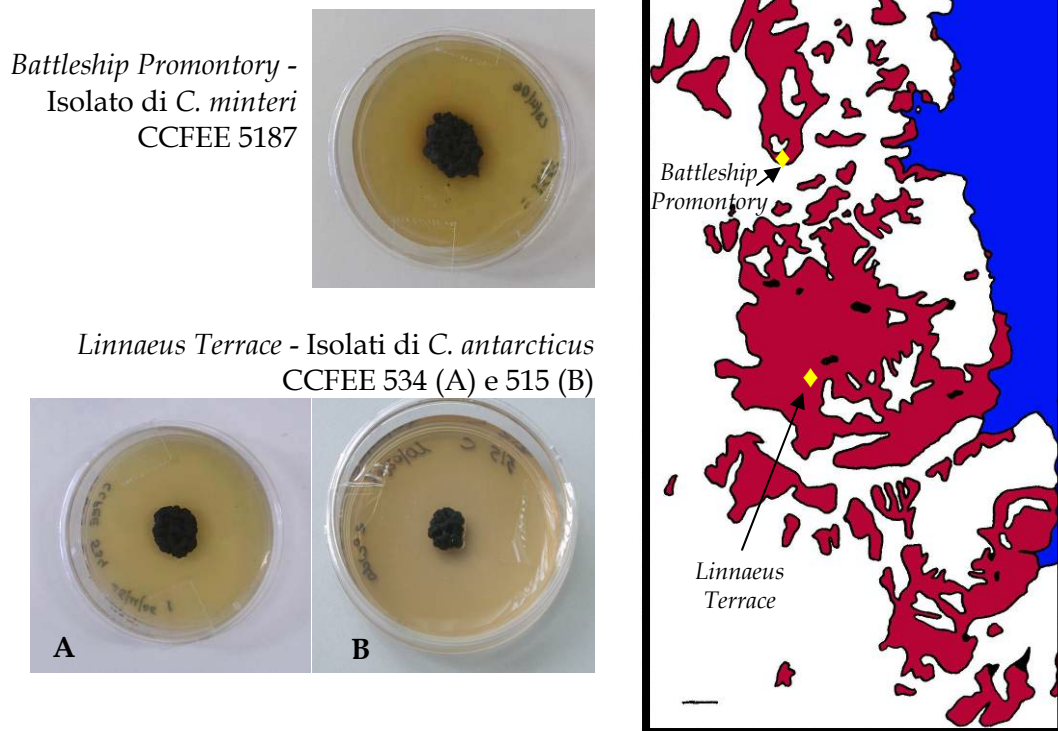


Figura 2.1 – Localizzazione degli isolati fungini d'interesse nelle regioni deglacciate (in rosso) delle Valli Secche di McMurdo (Deserto di Ross), Terra Vittoria del Sud (NIENOW & FRIEDMANN, 1993) (barra = 10 km).

La scelta degli isolati è avvenuta tra più campioni presenti in collezione. *Cryomyces minteri* CCFEE 5187, l'unico isolato della specie ad oggi esistente, è stato selezionato per la presenza di una parete particolarmente ispessita ed incrostata e la produzione di melanina particolarmente abbondante, anche nel substrato. Le caratteristiche morfologiche peculiari di *C. antarcticus*, descritte di seguito, sono state alla base della scelta anche di questa specie; l'isolato CCFEE 534 è stato scelto in quanto coltura ex tipo della specie, mentre l'isolato CCFEE 515 è stato selezionato perché presenta, rispetto al tipo, una crescita meno lieviforme e più concatenata. Si voleva quindi vedere se queste due diverse tipologie influissero sui risultati dei test.

CARATTERISTICHE COLTURALI:

Sia i due isolati di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e CCFEE 534) che quello di *C. minteri* (CCFEE 5187) presentano colonie che crescono lentamente ed in altezza su terreno MEA, raggiungendo fino a 11 mm di diametro in tre mesi, nere, compatte, cerebriformi, lobate con margini irregolari, da principio umide e burrose, diventano col tempo crostose e dure, fragili al tatto.

CARATTERISTICHE MICROSCOPICHE:

Cryomyces antarcticus SELBMANN, DE HOOG, MAZZAGLIA, FRIEDMANN & ONOFRI, *Stud. Mycol.* 51: 19, 2005.

Micelio spesso assente; quando presente, è raramente meristematico o, più frequentemente, composto da corte ife settate, raramente ramificate, marroni, con parete ispessita, torulose, larghe 4-9 μm . Le ife torulose e il micelio meristematico assumono talvolta una organizzazione lievitifforme, producendo conidi globosi unicellulari, asciutti, di colore marrone o marrone scuro, con parete molto spessa, coperti da incrostazioni frammentate, ruvide, acrogeni quando prodotti in catene torulose, 4-12 μm diam., prodotte per secessione schizolitica.

(descrizione basata sull'isolato CCFEE 534 coltivato su terreno MEA a 10°C)

Cryomyces minteri SELBMANN, DE HOOG, MAZZAGLIA, FRIEDMANN & ONOFRI, *Stud. Mycol.* 51: 21, 2005.

Micelio spesso meristematico o, più raramente, composto da corte ife larghe 6-8 μm , settate, scarsamente ramificate, leggermente pigmentate, inizialmente di colore marrone, con il passare del tempo diventano marrone scuro, con pareti spesse ed organizzazione torulosa. Il micelio meristematico e le ife torulose spesso si risolvono in conidi unicellulari, globosi, secchi, di colore marrone o marrone-scuro, a parete fortemente ispessita, rivestiti da incrostazioni frammentate, ruvidi,

7-11 μm diam., prodotti per secessione schizolitica. Sono presenti sostanze polimeriche extracellulari in grandi quantità (SELBMANN *et al.*, 2005).

(descrizione basata sull'isolato CCFEE 5187 cresciuto su MEA a 15°C)

Tra le caratteristiche morfologiche più evidenti che essi condividono e che ne hanno suggerito l'utilizzo come modello di studio vi sono certamente:

- l'abilità a crescere a 0 °C, nonché la loro euritermia, cioè la capacità di accrescersi in un range relativamente ampio di temperatura, che consente loro di svilupparsi in una più ampia diversità di ambienti o più probabilmente di sopravvivere in condizioni ambientali instabili quali quelle che caratterizzano l'ambiente dal quale sono state isolate (SELBMANN *et al.*, 2005);
- le colonie mostrano una crescita isodiametrica con una tipica organizzazione cerebriforme (fig. 2.2A), caratteristica che è stata più volte correlata alla capacità di tollerare differenti tipi di stress ambientali fornendo alla colonia un rapporto ottimale superficie/volume (STERFLINGER *et al.*, 1999).
- la capacità di formare cellule a parete molto ispessita e fortemente melanizzata; tali caratteristiche sono particolarmente accentuate a maturità raggiunta, quando le cellule appaiono racchiuse in un vero e proprio involucro rigido al punto da doversi fratturare per permettere l'accrescimento (fig. 2.2C e D). Tali cellule sembrano essere, quindi, delle vere e proprie forme di resistenza dove le caratteristiche della parete forniscono con ogni probabilità anche un'adeguata protezione verso l'esposizione alle radiazioni UV e all'aridità (SELBMANN *et al.*, 2005);
- la presenza, sulle pareti, di notevoli quantità di sostanze, probabili esopolisaccaridi, ben visibili al SEM (fig. 2.2F), particolarmente abbondanti nell'isolato CCFEE 5187 (fig. 2.2E), che proteggono il micelio dalla disidratazione e dai continui cicli di congelamento/scongelo (SELBMANN *et al.*, 2002; 2005); è provato, inoltre, che tali sostanze contribuiscono a mantenere le

caratteristiche chimico-fisiche ottimali nel nanoambiente creato dalla comunità criptoendolitica (DE LOS RÍOS *et al.*, 2003);

- la semplicità di questi organismi: essi esibiscono una organizzazione lievitiforme anche se talvolta, come nell'isolato CCFEE 515, le cellule rimangono concatenate a formare corte ife toruloidi che presentano un allungamento apicale di tipo enteroblastico, così come le singole cellule. Le ife toruloidi spesso poi si frammentano liberando propaguli (secessione artrica). Si distingue l'isolato CCFEE 5187 per una crescita essenzialmente meristemoide (accrescimento isodiametrico delle cellule accompagnato da una suddivisione delle stesse mediante setti trasversali e longitudinali) e liberazione delle singole cellule per secessione artrica. I cicli vitali risultano, quindi, molto semplificati ed i conidi vengono prodotti senza formazione di strutture complesse e quindi metabolicamente costose. Cicli vitali così semplici, che possono formalmente essere considerati conclusi anche con la formazione di una singola cellula in grado di trasformarsi in un propagulo resistente, ben si adattano a microrganismi che devono accrescersi in luoghi dove le condizioni ottimali per la vita attiva possono verificarsi anche solo per poche ore all'anno.

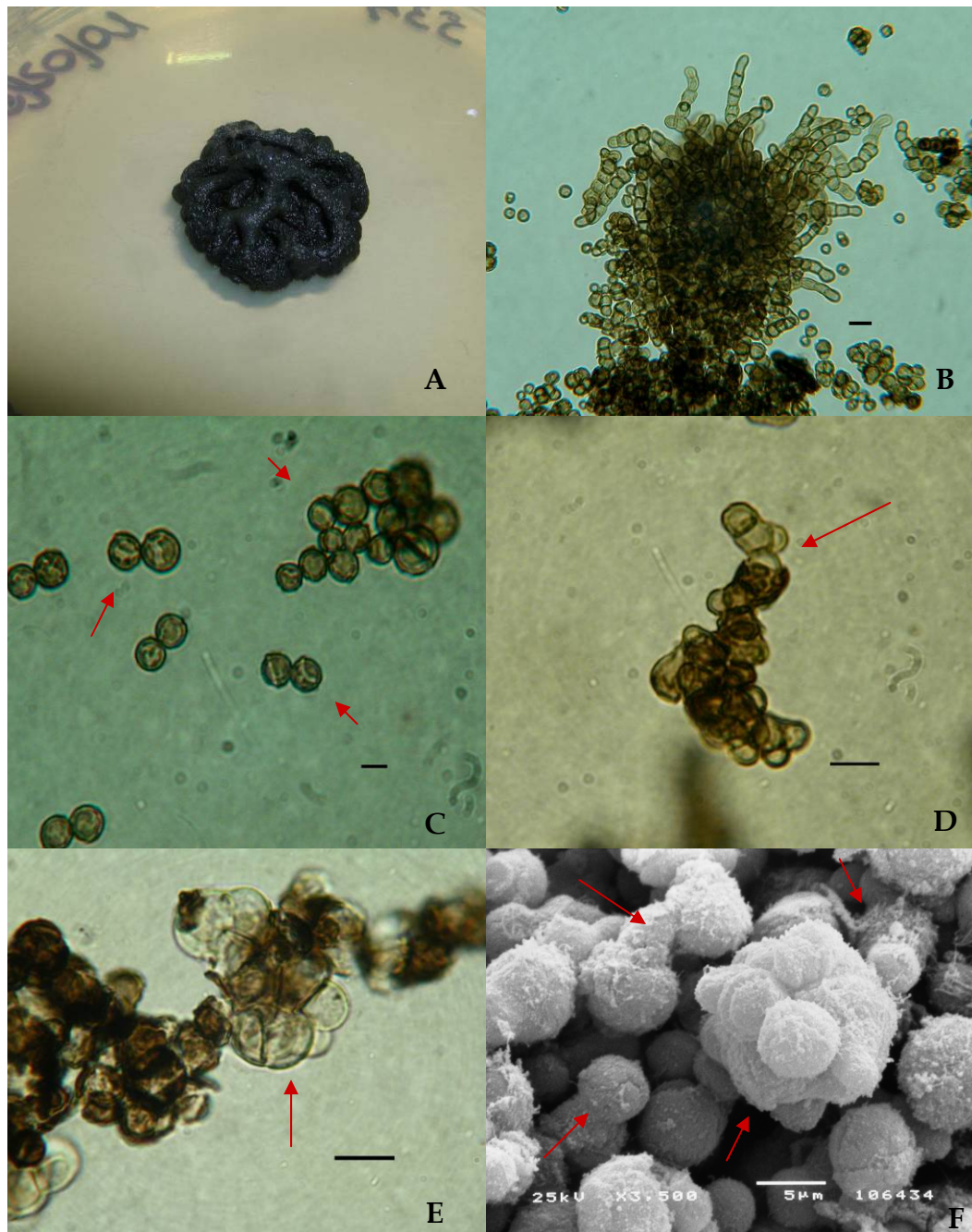
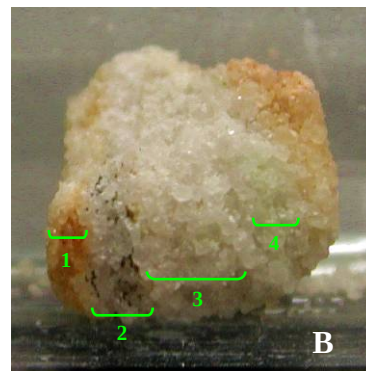


Figura 2.2 – Colture di *C. antarcticus* e *C. minteri*. (A) Crescita isodiametrica "cerebriforme" su terreno agarizzato e (B) ife toruloidi di *C. antarcticus* CCFEE 534; (C) *C. minteri* CCFEE 5187 cellule lievitiformi con parete ispessita e fessurazioni; (D) *C. antarcticus* CCFEE 515 accrescimento enteroblastico; aggregati di singole cellule, gemmazione, crescita meristemica e matrice extracellulare di *C. minteri* CCFEE 5187 (E) e *C. antarcticus* CCFEE 515 (F) (foto SEM) (barra = 10 μ m).

IL CAMPIONE DI ROCCIA

Il campione di arenaria, selezionato sulla base della presenza di una evidente colonizzazione (fig. 2.3), è stato raccolto a Battleship Promontory, Terra Vittoria del Sud ($76^{\circ}54'37.6''S$ $160^{\circ}55'27.5''E$) il 24/01/04 da L. Zucconi.

La vitalità microbica del campione è stata verificata mediante metodo colturale seminando, su terreno agarizzato MEA e DRBC (allegato), dei frammenti prelevati sterilmente. Le piastre con i frammenti sono state incubate a $15^{\circ}C$ e osservate periodicamente allo stereomicroscopio fino alla comparsa delle CFU (*colony forming units*) dei componenti algali e fungini appartenenti alla comunità.



1. Crosta superficiale
2. Zona **nera** - funghi lichenizzati e non lichenizzati
3. Zona **bianca** - funghi lichenizzati ed alghe lichenizzate
4. Zona **verde** - alghe non lichenizzate

Figura 2.3 – A. Sito di raccolta del Campione, Battleship Promontory, Valli Secche di McMurdo, Antartide (Foto Laura Zucconi, 2004); B. Frammento di arenaria ricavato dal Campione.

2.2. CONDIZIONI DI CRESCITA E MANTENIMENTO DELLE COLTURE

Le colture, coltivate su MEA, sono state sempre incubate in condizioni ottimali di crescita a $15^{\circ}C$ per almeno 1 mese. La preparazione delle subcolture, in piastre Petri, è effettuata per trasferimento, con ansa sterile, di un piccolo frammento di colonia (inoculo puntiforme). Tutti i campioni sono conservati su MEA alla temperatura di $5^{\circ}C$.

Il campione di roccia è stato conservato sterilmente a -20°C.

2.3. SIMULAZIONE DEI FATTORI DI STRESS TERRESTRI

Sono state condotte tre diverse indagini preliminari, relative dalla resistenza alle basse temperature, all'irraggiamento UV e all'aridità; tali indagini hanno avuto lo scopo di verificare l'idoneità degli isolati selezionati per le successive prove di simulazione.

2.3.1. RESISTENZA ALLE BASSE TEMPERATURE

Le difficoltà di testare la crescita a temperature inferiori a 0°C, dovute al congelamento del terreno colturale, hanno suggerito di indagare la sopravvivenza dopo prolungata incubazione a basse temperature nonché la resistenza a ripetuti cicli di congelamento/scongelo. La valutazione della vitalità cellulare, dopo il trattamento, è stata saggiata mediante l'allestimento di colture fungine su terreno agarizzato.

RESISTENZA A LUNGO TERMINE

Complessivamente sono state inoculate 45 piastre (15 per ciascun isolato), su MEA, ed incubate in condizioni ottimali di crescita a 15°C per un mese, fino al raggiungimento di un adeguato sviluppo; le colonie sono state quindi conservate, in triplicato, alle temperature di 0±1°C, -5±2°C, -10±2°C, -20±1°C e -25±2°C.

Dopo 12 mesi le colture sono state prelevate, trasferite a temperatura ambiente (ca. 25°C) e, dopo 12 ore, utilizzate per allestire nuove colture, mediante inoculo puntiforme, per verificare il mantenimento della vitalità mediante la capacità di generare nuove colonie. Le piastre ottenute sono state incubate a 15°C.

CICLI DI CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO

Le piastre precedentemente allestite e conservate a bassa temperatura ($0\pm1^{\circ}\text{C}$, $-5\pm2^{\circ}\text{C}$, $-10\pm2^{\circ}\text{C}$, $-20\pm1^{\circ}\text{C}$ e $-25\pm2^{\circ}\text{C}$) sono state utilizzate per prove di resistenza a ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

Dopo il primo scongelamento, precedente all'allestimento di nuove colture (vedi paragrafo precedente), le piastre originarie sono state nuovamente incubate alle basse temperature di conservazione. 7 cicli di congelamento e scongelamento si sono succeduti, con un intervallo di un mese tra un prelievo e l'altro; ogni mese le colture sono state trasferite a temperatura ambiente e, dopo 12 h, utilizzate per allestire nuove colture, incubate a 15°C . La valutazione della resistenza è stata effettuata mensilmente misurando il diametro delle colonie sviluppatesi. Tutte le misure sono state eseguite in triplicato.

2.3.2. IRRAGGIAMENTO ULTRAVIOLETTO UV-B ED UV-C

L'irraggiamento ha interessato piastre inoculate con sospensioni cellulari standardizzate. Per ottenere sospensioni omogenee e prive di aggregati, un frammento di colonia cresciuta su MEA per due mesi (corrispondente alla fase stazionaria di crescita) è stato frantumato meccanicamente, in soluzione fisiologica, con ansa sterile e sottoposto ad agitazione con vortex. La sospensione è stata nuovamente sottoposta ad agitazione dopo l'aggiunta, in soluzione, di sferette di vetro sterili di 0,5 mm diam. Mediante diluizioni seriali è stato ottenuto un'inoculo di ca. 100-300 cellule/piastra per 0,1 ml di sospensione (verificato mediante conta diretta con camera di Bürker), distribuito uniformemente su MEA con anse sterili.

L'irraggiamento UV-B è avvenuto dapprima per 8 tempi diversi, con incrementi di 15 minuti fino ad un totale di 120 minuti, e successivamente per ulteriori 3 tempi, pari a 4, 6 e 10 ore. Complessivamente sono state inoculate, con sospensioni cellulari, 60 piastre per isolato, 5 per ogni tempo di esposizione (12 prove totali,

controllo incluso). Dopo l'irraggiamento le piastre sono state incubate a 15 °C fino all'avvenuto sviluppo delle colonie, rilevate mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio (Nikon SMZ 800).

L'irraggiamento UV-C ha interessato invece un solo isolato essiccato di *C. antarcticus* CCFEE 515, selezionato in base all'eccezionale risposta fornita nella prova precedente. L'irraggiamento UV-C è avvenuto per 5 tempi diversi pari a 1, 5, 30, 60 e 120 minuti. Dopo l'irraggiamento le colonie, prelevate, sono state frantumate e sospese, come precedentemente descritto. Le piastre inoculate con sospensioni standardizzate sono state incubate alla temperatura ottimale di 15 °C fino all'avvenuto sviluppo delle colonie, rilevate come sopra.

Le colonie formatesi dopo entrambi gli irraggiamenti sono state contate e confrontate con i rispettivi controlli allo scopo di definire, per ciascun isolato fungino, una curva di riduzione percentuale di germinazione, espressa come riduzione percentuale rispetto al controllo.

Sono state inoltre effettuate delle osservazioni morfologiche microscopiche in campo chiaro, al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) al fine di valutare eventuali danni o alterazioni indotte dall'esposizione alla radiazione UV-B.

IRRAGGIAMENTO UV-B

L'esperimento d'irraggiamento è stato condotto sotto una cappa a flusso laminare per garantire la sterilità delle piastre che, per essere irraggiate, devono essere sprovviste di coperchio. L'irraggiamento è stato effettuato mediante 3 lampade tubulari fluorescenti al mercurio a bassa pressione (Sankyo Denki, Co, JP) (tab. 2.2), che emettono tra 280 e 360 nm (con un picco a 306 nm) (fig.2.4), collocate su di un supporto metallico (fig. 2.5), con una disposizione tale da garantire un'omogenea esposizione, alla radiazione UV, della superficie delle piastre. La temperatura interna della cappa era di 27 ± 1 °C.

Tabella 2.2 – Caratteristiche elettriche relative alle lampade fluorescenti utilizzate per l'irraggiamento UV-B.

TIPO	POTENZA	DIMENSIONE		CORRENTE	UV OUTPUT
G20T10E	20 W	(L) 588.5 mm	(D) 32.5 mm	0,360 A	4,2 W

(B) (G13) ; (L) Lunghezza; (D) Diametro

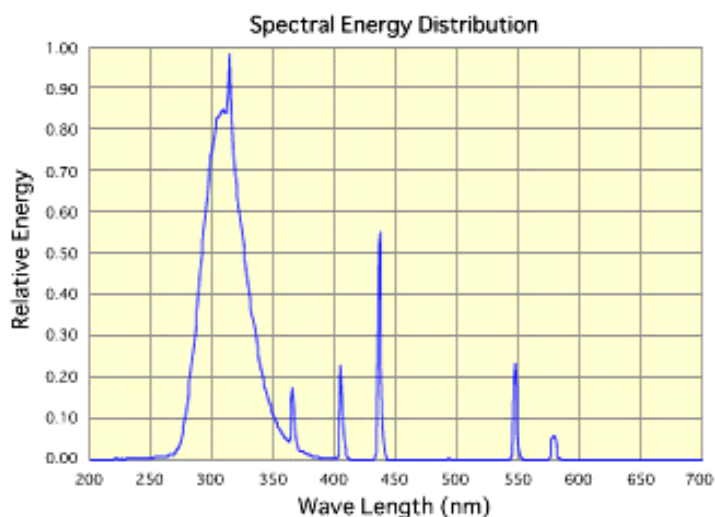
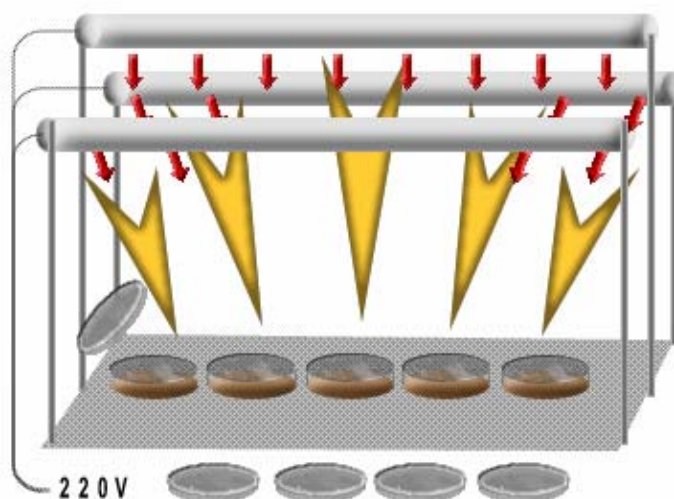


Figura 2.4 – Spettro di emissione relativo alle lampade UV-B utilizzate
http://www.sankyo-denki.co.jp/e2_09.html.

Figura 2.5 – Supporto delle lampade utilizzato per l'irraggiamento UV-B



L'irradianza totale UV-B dei campioni, disponendo di tre lampade, è stata misurata con un radiometro Broadband SKU 430 (SKYE Instruments Ltd, UK) ed è

pari a 3.0 W/m^2 , da cinque a otto volte superiore all'irradianza UV-B terrestre antartica (SKERRATT *et al.*, 1998; HUGHES *et al.*, 2003).

IRRAGGIAMENTO UV-C

L'irraggiamento è stato effettuato mediante 1 lampada tubulare fluorescente posta centralmente e perpendicolarmente al piano di lavoro (Sankyo Denki, Co, JP) (tab. 2.3), che emette radiazione ultravioletta a 253.7 nm (fig. 2.6). L'irradianza totale dalla lampada è stata rilevata con un dosimetro Spectroline DRC-100H (digital radiometer; $0\text{-}199.9 \text{ mW/cm}^2$), alla distanza di 40 cm, ed è stata di $40 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$.

Tabella 2.3 – Caratteristiche elettriche relative alla lampada fluorescente utilizzata per l'irraggiamento UV-C.

TIPO	POTENZA	DIMENSIONE		CORRENTE	UV OUTPUT
G20T10E	20 W	(L) 588.5 mm	(D) 32.5 mm	0,360 A	7,5 W

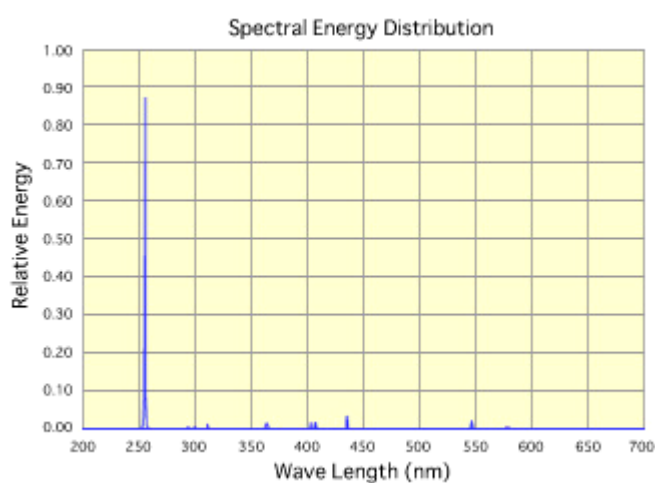


Figura 2.6 – Spettro di emissione relativo alla lampada UV-C utilizzata (http://www.sankyo-denki.co.jp/e2_09.html).

2.3.3. STRESS OSMOTICO

La resistenza allo stress osmotico, causato da un'alta concentrazione elettrolitica, è stata saggiata utilizzando MEA 2% (MEA2, allegato) come terreno di base, con l'aggiunta di NaCl seguendo il protocollo di STERFLINGER (1998).

Per ciascun isolato sono state inoculate (inoculo puntiforme) 50 piastre ($\varnothing$ 55 mm) su MEA2 a 10 concentrazioni di NaCl da 0 (controllo) al 27% (w/v), con incrementi progressivi del 2-3,5%. Le colture sono state incubate in condizioni ottimali di crescita a 15°C e la resistenza allo stress osmotico è stata valutata misurando l'accrescimento diametrico (mm) dopo 4, 7 e 10 settimane. Per ogni isolato sono state effettuate 5 ripetizioni.

2.4. SIMULAZIONI DI AMBIENTE SPAZIALE E DI MARTE (EXPERIMENT VERIFICATION TESTS, EVTs)

In collaborazione con l'Agenzia Spaziale Europea (ESA) e DLR, nell'ambito del programma EXPOSE-EuTEF, sono stati sottoposti a condizioni spaziali e marziane simulate (Experiment Verification Tests, EVTs) campioni di roccia colonizzata da comunità criptoendolitiche antartiche e isolati di *Cryomyces antarcticus* e *C. minteri* essiccati. All'interno di tale programma è collocato l'esperimento **LIFE (L**ichens and **F**ungi **E**xperiment) che, con la partecipazione di Italia, Germania e Spagna, si propone di valutare la resistenza a lungo termine di comunità criptoendolitiche, funghi antartici e alcuni licheni, alle condizioni spaziali esterne sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS).

EXPOSE è una piattaforma europea progettata per l'esposizione nello spazio, sviluppata per l'ESA dalla Kayser-Threde GmbH, Munich/Germany (SCHULTE *et al.*, 2006).

I test di verifica (EVTs, experiment verification test), necessari all'identificazione dei campioni più adatti all'esperimento LIFE, sono stati eseguiti presso i laboratori dell'Institute of Aerospace Medicine (DLR) di Colonia in Germania, unica struttura ufficialmente deputata a certificare l'idoneità delle *facility* utilizzate per i campioni biologici e alla disposizione degli adeguati protocolli sperimentali.

I campioni sono stati sottoposti a due tipi di esperimenti di simulazione, gli EVT-E1 e gli EVT-E2, le cui condizioni sono riportate successivamente.

2.4.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI E MODALITÀ SPERIMENTALI

Per l'esperimento LIFE sono state utilizzate colonie essiccate di *Cryomyces antarcticus* (CCFEE 534 e 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) e frammenti di roccia arenaria colonizzata.

Colonie cresciute su MEA (spesso ca. 5 mm) sono state mantenute per circa 1 anno a 15°C. La perdita d'acqua ha avuto così luogo lentamente e l'essiccamento è stato graduale. Dalle piastre così essiccate sono stati prodotti, mediante l'utilizzo di un foratappi metallico sterile, dei dischetti di agar di 12 mm di diam. contenenti da 1 a 3 colonie, ciascuna di circa 2-3 mm di diametro (fig. 2.7A).



Figura 2.7 –A. Piastra di *C. antarcticus* CCFEE 515 da cui sono stati ricavati i dischetti di agar; B. frammento di roccia colonizzata.



I frammenti di arenaria (ca. 11 mm per lato, spessore massimo 6 mm) sono stati ricavati dalla rottura del campione di roccia praticando fenditure longitudinali, partendo dalla superficie relativa alla crosta superiore, lungo la verticale della roccia visibilmente colonizzata, mediante l'utilizzo di un martello, piccoli scalpelli e pinze, operando in condizioni di sterilità (fig. 2.7B).

Calcolando 3 campioni in parallelo per ciascuna condizione di esposizione, sono stati preparati un totale di 168 campioni: per ogni isolato fungino (*C. antarcticus* CCFEE 515 e 534, *C. minteri* CCFEE 5187) e roccia colonizzata sono stati preparati 27 campioni destinati agli EVT-E1 (9 prove), 12 agli EVT-E2 (4 prove) e 3 al controllo di laboratorio.

I campioni utilizzati per gli EVT sono stati esposti in piastre *multiwell* biologiche standard di laboratorio, debitamente contrassegnate in relazione all'identità del campione, la sua posizione ed il tipo di esperimento da eseguire.

Per gli esperimenti di irraggiamento i campioni sono stati disposti sotto le lampade, in parallelo, aprendo le piastre *multiwell* e mantenendo le condizioni il più possibile vicine alla sterilità. Dopo l'irraggiamento e prima di ogni trasferimento tutti i contenitori dei campioni sono stati richiusi.

Sia per le oscillazioni termiche e l'esposizione al vuoto (EVT-E1) che per gli esperimenti di esposizione ad atmosfera marziana con CO₂ e vuoto al buio (EVT-E2), i *multiwell* sono stati sempre chiusi rimuovendo, dove fosse necessario, i sigilli, per poi nuovamente applicarli dopo l'esposizione.

Il vuoto, le oscillazioni di temperatura e l'irraggiamento UV policromatico sono stati eseguiti utilizzando le *Planetary and Space Simulation Facilities* PSI 6 e PSI 2 (fig. 2.8 e 2.11) dell'Istituto di medicina aerospaziale del DLR, mentre l'irraggiamento UV monocromatico è stato effettuato, a temperatura ambiente, in un laboratorio dell'Istituto, equipaggiato specificatamente per l'UV-C.

2.4.2. EVT- E1

Negli EVT-E1 i campioni selezionati sono stati sottoposti alle seguenti condizioni:, vuoto, oscillazioni di temperatura intorno al punto di congelamento dell'acqua (0°C), radiazione UV-C monocromatica standard di laboratorio e alta radiazione policromatica ultravioletta, applicate singolarmente (tab. 2.4).

Tabella 2.4 – Schema del protocollo degli EVT-E1 (EXPOSE-EuTEF) eseguiti presso il DLR di Colonia (Germania).

EVT-E1 PARAMETRO TEST				
ESPERIMENTO DI ESPOSIZIONE				
PROGRAMMATO			ESEGUITO	
		DURATA	ESPOSIZIONE	DURATA
Vacuum	10^{-5} Pa	1 ora 1 sett.	$1,3 \times 10^{-5}$ Pa $2,3 \times 10^{-6}$ Pa	1 ora 168 ore
Oscillazioni di temperatura (50 cicli) da -20°C a $+20^{\circ}\text{C}$		2 sett.		336 ore
Irraggiamento UV monocromatico 254 nm, 1 atm			$71,4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$	
Fluenza:	10 Jm^{-2} 100 Jm^{-2} 1000 Jm^{-2}		10 Jm^{-2} 100 Jm^{-2} 1000 Jm^{-2}	14'' 2' 20'' 23' 20''
Irraggiamento UV policromatico 200-400 nm, 1 atm	SOL 2000		SOL 2000 ($479 \text{ W}/\text{m}^2$)	
Fluenza:	$1,5 \text{ kJm}^{-2}$ $1,5 \times 10^3 \text{ kJm}^{-2}$ $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$		$1,44 \text{ kJm}^{-2}$ $1,5 \times 10^3 \text{ kJm}^{-2}$ $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$	3'' 52' 87 ore
Controllo	temperatura ambiente, 1 atm, al buio			2 mesi

2.4.2.1. VUOTO

La pressione selezionata, bassa almeno come quella attesa durante la missione EXPOSE-EuTEF, è stata di 10^{-5} Pa. I campioni sono stati collocati nella *facility* per il vuoto PSI 6 (fig 2.8) ed esposti al vuoto rispettivamente per 1 ora ed 1 settimana dopo il raggiungimento della pressione stabilita. Il vuoto applicato è stato monitorato da un catodo freddo Pirani inserito nella camera di vuoto.

Figura 2.8 – Space simulation facility PSI 6 per il vuoto (fonte: DLR, Colonia, Germania).



2.4.2.2. OSCILLAZIONI TERMICHE

I campioni sono stati sottoposti a 50 cicli di congelamento e scongelamento, da -20°C a $+20^{\circ}\text{C}$, sopra una piastra raffreddata a temperatura controllata, all'interno della PSI 2 (fig. 2.11), per 2 settimane. Sono state programmate rispettivamente 2 e 2,5 ore destinate al riscaldamento e al congelamento dei campioni, mantenendo i -20°C ed i $+20^{\circ}\text{C}$ per la durata di 1 ora ciascuno, per un totale di 6,5 ore per ciclo. L'oscillazione termica è stata monitorata da un sensore per la temperatura applicato al lato interno di un portacampioni.

3.4.2.3. IRRAGGIAMENTO

Lo spettro e l'irradianza delle lampade sono stati misurati con uno spettrofotometro Bentham 150 nel punto di posizionamento del campione.

2.4.2.3.1. IRRAGGIAMENTO MONOCROMATICO

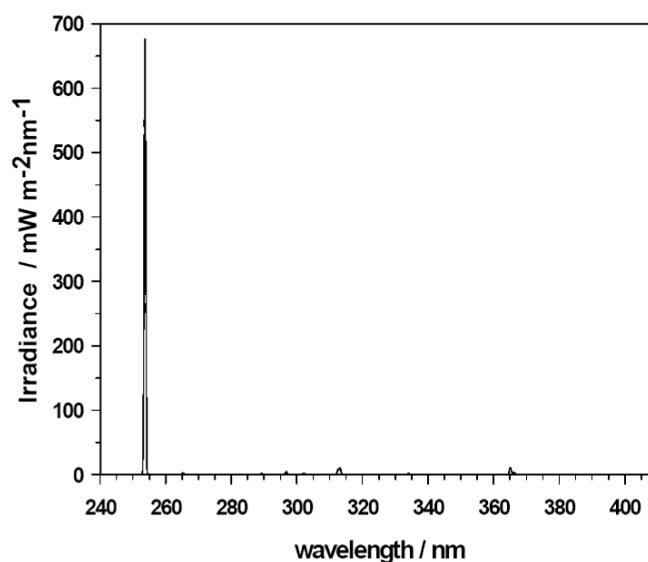
Per l'irraggiamento monocromatico è stata utilizzata una lampada al mercurio a bassa pressione il cui spettro è riportato in fig. 2.9; l'irradianza, misurata a 354 nm

nel punto di posizionamento del campione prima e dopo ciascun esperimento, è risultata pari a $71,4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (tab. 2.4). La misura è stata effettuata con un UV-Xmetro.

Le fluenze per l'irraggiamento sono state selezionate al fine di coprire un ampio intervallo definito da una procedura standard di irraggiamento, volte anche a consentire il confronto con dati bibliografici (DLR, Colonia).

Tutti i campioni sono stati sistemati sotto la lampada in un'area irraggiata in modo omogeneo; quelli destinati a ricevere fluenze più basse sono stati oscurati agli UV dopo il raggiungimento della fluenza prestabilita. Data la bassa potenza infrarossa (IR) non è stato necessario alcun raffreddamento.

Figura 2.9 – Spettro di irradianza monocromatica della lampada a bassa pressione di mercurio UV-C 254 nm (fonte: DLR, Colonia, Germania)



2.4.2.3.2. IRRAGGIAMENTO POLICROMATICO

Per l'irraggiamento policromatico è stata utilizzata una lampada SOL 2000, il cui spettro di irradianza è riportato in fig. 2.10. Le fluenze riportate in tabella sono state ottenute con irraggiamenti di 3 secondi ($1,5 \text{ kJ}/\text{m}^2$), 52 minuti ($1,5 \times 10^3 \text{ kJ}/\text{m}^2$) e 87 ore ($1,5 \times 10^5 \text{ kJ}/\text{m}^2$).

Le fluenze per l'irraggiamento con UV policromatico sono state selezionate per simulare sia l'irraggiamento complessivo, relativo all'intera durata missione, sia

quello attenuato dall'uso di filtri che sono stati previsti durante la missione sulla ISS. La *facility* EXPOSE è stata infatti progettata in modo tale che alcuni campioni nello spazio vengano protetti da *neutral density filters* (ND) all'1% e allo 0,01%, (percentuali di irraggiamento trasmesso).

Sulla base di calcoli effettuati dalla NASA, i campioni sono stati irraggiati fino ad una fluenza totale di $1,5 \times 10^5$ kJ/m² (tab. 2.4). Gli unici dati disponibili sul tempo dell'irraggiamento previsto per gli esperimenti di EXPOSE-EuTEF sono relativi ai conteggi forniti dalla Kaiser-Threde per la missione EXPOSE-R sul modulo russo Zvezda della durata di un anno, corrispondente a 251,6 ore costanti solari. In conformità a questo, utilizzando sia lo spettro solare di riferimento della NASA per l'intervallo UV 200-400 nm che la fluenza calcolata di 1×10^5 kJ/m² corrispondente all'anno di missione EXPOSE-R, sono stati previsti 377,4 ore costanti solari per EXPOSE-EuTEF pari a 1,5 anni di esposizione nello spazio ed una fluenza calcolata, per questo periodo, di $1,5 \times 10^5$ kJ/m².

Una fluenza simile è stata possibile con il simulatore solare SOL 2000 (fig. 2.11) che le ha raggiunte, come si è detto, dopo, rispettivamente, 87 ore di irraggiamento. Tutte le fluenze adottate sono in relazione alla simulazione dei filtri ND:

- $1,5$ kJ/m² per i filtri ND allo 0,01%,
- $1,5 \times 10^3$ kJ/m² per filtri ND all'1%;
- $1,5 \times 10^5$ kJ/m² corrispondente a nessuna attenuazione (tab. 2.4).

L'irradianza misurata ed integrata della lampada SOL 2000, utilizzata per l'intervallo 200-400 UV policromatico, è stata di 479,2 W/m² nel punto di posizionamento del campione.

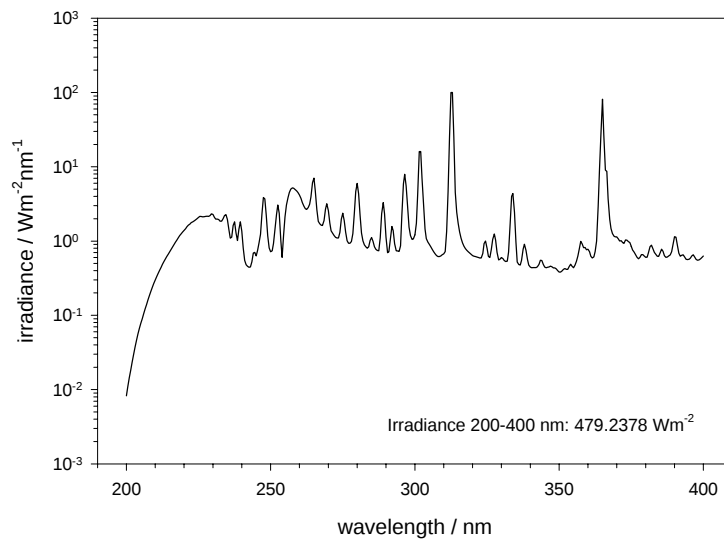


Figura 2.10 – Spettro di irradianza policromatica relativo alla SOL 2000)(fonte: DLR, Colonia, Germania)

I campioni sono stati collocati su una piastra fredda all'interno della facility PSI 2 (fig. 2.11) in un'area irradiata in modo omogeneo e mantenuti, durante l'irraggiamento, a temperature al di sotto dei 30°C mediante raffreddamento a 10°C della piastra. Il raffreddamento dei campioni si è reso necessario per non superare il valore di 37°C che veniva raggiunto con la dose di $1,5 \times 10^5$ kJ/m². I *multiwell* sono stati aperti superiormente, poiché non trasparenti agli UV. Le temperature sono state monitorate continuamente con un sensore fissato al portacampioni. I campioni destinati a ricevere dosi inferiori, a simulare i *neutral density filters*, sono stati schermati poco dopo aver raggiunto la dose prevista.



Figura 2.11 – Space simulation facility PSI 2 per le oscillazioni termiche e l'irraggiamento UV policromatico (fonte: DLR, Colonia, Germania).

2.4.3. EVT- E2

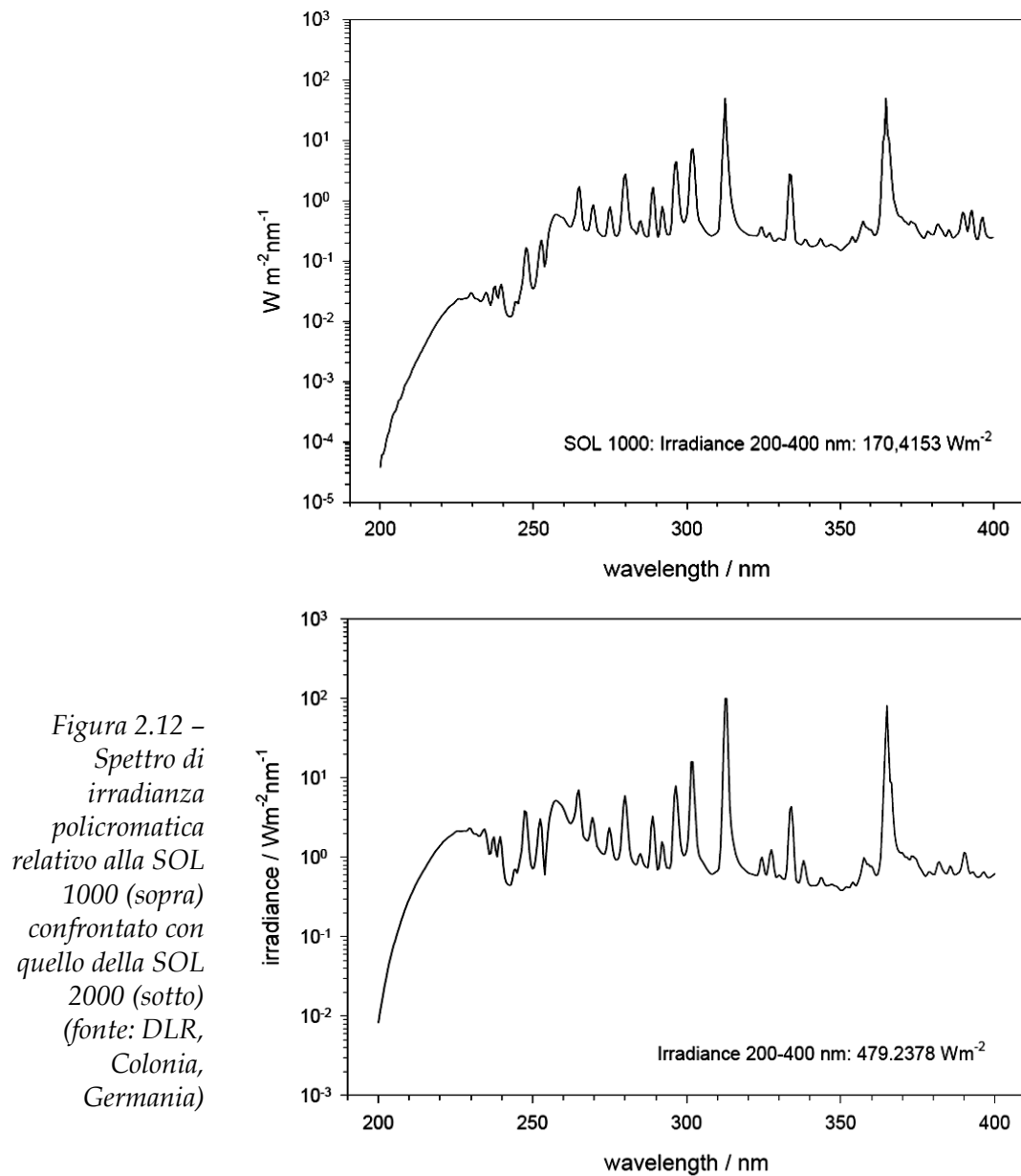
Negli EVT-E2 i campioni selezionati sono stati sottoposti alle seguenti condizioni simulate combinate:

1. vuoto e radiazioni UV policromatiche;
2. atmosfera simulata marziana con CO₂ e radiazione UV policromatica (tab. 2.5).

Tabella 2.5 – Schema del protocollo degli EVT-E2 (EXPOSE-EuTEF) eseguiti presso il DLR di Colonia (Germania).

EVT-E2 PARAMETRO TEST					
ESPERIMENTO DI ESPOSIZIONE					
PROGRAMMATO			ESEGUITO		
DURATA			ESPOSIZIONE		DURATA
Vacuum 10 ⁻⁵ Pa + Irraggiamento UV policromatico 200-400 nm Fluenza: 1,5×10 ⁵ kJm ⁻² SOL 2000			20 gg		22 gg
Controllo <i>vacuum</i> 10 ⁻⁵ Pa			SOL 1000 (170,4 W/m ²)		
Atmosfera simulata marziana con CO ₂ + Irraggiamento UV policromatico 200-400 nm Fluenza: 1,5×10 ⁵ kJm ⁻² SOL 2000			1,5×10 ⁵ kJm ⁻²		10 gg 4 h 31' 22"
Controllo <i>vacuum</i> 10 ⁻⁵ Pa			20gg		22gg
Atmosfera simulata marziana con CO ₂ + Irraggiamento UV policromatico 200-400 nm Fluenza: 1,5×10 ⁵ kJm ⁻² SOL 2000			600 Pa CO ₂ marziana		21 gg
Controllo <i>Mars</i> 600 Pa			20gg		
			SOL 2000 (479 W/m)		18'
			517 kJm ⁻²		
			+ SOL 1000 (170,4 W/m ²)		10 gg 3 h 40' 8"
			1,49483 kJm ⁻²		
			Totale:		1,5×10 ⁵ kJm ⁻²
Controllo <i>Mars</i> 600 Pa			20gg		21gg

Rispetto agli EVT-E1, in cui era stata utilizzata la lampada SOL 2000, negli EVT-E2 sono state utilizzate le lampade SOL 2000 e SOL 1000. I rispettivi spettri (fig. 2.12) sono stati misurati con un spettrofotometro Bentham 150 posto nel punto di posizionamento del campione.



L'irradianza della lampada SOL 2000, utilizzata per l'intervallo 200-400 UV policromatico, è stata, come per gli EVT-E1, di 479,2 W/m² e di 170,4 W/m² per la SOL 1000.

2.4.3.1. VUOTO ED ATMOSFERA SIMULATA MARZIANA CON CO₂ COMBINATO CON L'IRRAGGIAMENTO UV

Le prove sono state realizzate utilizzando la *facility* PSI 2 (fig. 2.11).

Per l'irraggiamento UV nel vuoto la pressione è stata di 1×10^5 Pa, per quello in atmosfera marziana di 600 Pa; quest'ultima è stata ottenuta utilizzando una miscela gassosa pronta (Linde) composta da 1,56% di Argon, 0,16% di ossigeno, 2,72% di azoto e 95,56% di CO₂ (v/v); la miscela è stata immessa nella *facility* dopo il posizionamento dei campioni, e rilasciata fino al raggiungimento del valore desiderato di 600 Pa.

Il valore della pressione finale di 10^{-5} Pa è stato monitorato da un catodo freddo Pirani inserito nella camera di vuoto.

Fluenze totali uguali ($1,5 \times 10^5$ kJ/m²) sono state ottenute negli EVT-E1 ed E2, usando simulatori solari SOL 2000 e SOL 1000, per tempi diversi di esposizione: dopo 87 ore di irraggiamento con la sola SOL 2000 negli EVT-E1 (tab. 2.5), dopo 244,5 ore con la sola SOL 1000 negli EVT-E2 (nel vuoto) e dopo ca. 18 minuti con SOL 2000 seguiti da 243,41 ore con SOL 1000 negli EVT-E2 (in atmosfera marziana) (tab. 2.5).

Per il monitoraggio della temperatura i sensori sono stati fissati ai singoli portacampioni.

I campioni per l'irraggiamento in atmosfera marziana simulata sono stati sistemati sulla piastra raffreddata all'interno della camera PSI 2 equipaggiata con il simulatore solare SOL 2000. Dopo aver riempito della miscela di gas la camera in modo da ottenere la pressione voluta di 600 Pa è stato effettuato l'irraggiamento prima per 18 minuti con la SOL 2000 e successivamente con il simulatore solare più debole, la SOL 1000, avente uno spettro simile alla SOL 2000 ma con una potenza sviluppata minore, nel tentativo di ridurre la porzione di radiazione infrarossa (IR).

Sia nel vuoto a 10^{-5} Pa che nell'atmosfera simulata marziana con CO₂ alla pressione di 600 Pa, il calore sviluppato sulla superficie non può essere rimosso

per convezione e la IR dei simulatori porta ad un riscaldamento sia della superficie che dei campioni irraggiati. Sebbene i portacampioni siano raffreddati dalla piastra fredda, in queste condizioni non è possibile rimuovere il calore risultante dal simulatore solare, a causa del continuo irraggiamento. Gli irraggiamenti, quando ciò accade, sono abitualmente suddivisi in periodi di 20 minuti in modo da non superare una temperatura di 37°C sul campione, lasciando quelli non irraggiati a raffreddarsi prima di essere nuovamente irraggiati. Questo tipo di approccio, già collaudato per un gruppo di campioni batterici monostratificati, era stato proposto anche in questo caso ma i test preliminari condotti in condizioni di vuoto ne hanno evidenziato l'inapplicabilità.

L'eccessivo riscaldamento dei campioni (fino a ca. 40°C) sotto il simulatore SOL 2000 dopo 6 minuti di irraggiamento ed il raffreddamento dimostratosi molto più lento di quello atteso, che si sono manifestati nelle condizioni di vuoto, hanno reso irrealizzabile l'utilizzo della SOL 2000 per l'intera durata programmata di esposizione (3 giorni, 14 ore, 56 minuti e 37 secondi corrispondenti alla dose totale richiesta di $1,5 \times 10^5 \text{ kJ/m}^2$ e da applicare nell'arco di 2 settimane) alle condizioni di pressione di 600 Pa.

Per questo motivo è stato scelto il simulatore SOL 1000 il cui *output* più basso ha contribuito però ad aumentare la durata di irraggiamento che è stata pari a 10 giorni, 3 ore, 40 minuti e 48 secondi. Inoltre la pressione della miscela di gas con la CO₂ marziana è stata ulteriormente aumentata, fino al raggiungimento della pressione atmosferica, per permettere l'istaurarsi di una convezione supplementare che ha evitato l'eccessivo riscaldamento. La dose totale d'irraggiamento di $1,5 \times 10^5 \text{ kJ/m}^2$ è stata così ottenuta aggiungendo ai 18 minuti della SOL 2000 il periodo d'irraggiamento relativo alla SOL 1000.

La stessa procedura è stata seguita per l'esperimento nel vuoto combinato con gli UV.

In questo caso i campioni da irraggiare mediante l'utilizzazione del solo simulatore solare SOL 1000, sono stati sistemati nella *facility* PSI 2 ed esposti al vuoto. In queste condizioni, i periodi di raffreddamento necessari, hanno

permesso l'irraggiamento della dose totale di UV in 10 giorni, 4 ore, 32 minuti e 22 secondi, eseguito nell'arco di 3 settimane dopo il raggiungimento della pressione di 10^{-4} Pa.

Il valore della pressione finale è stato di 10^{-5} Pa e come per gli EVT-E1 il vuoto è stato monitorato da un catodo freddo Pirani inserito nella camera.

Per entrambi i tipi di esperimento sono stati previsti dei campioni di controllo (*dark controls*); quelli per gli EVT-E1 sono stati maneggiati a temperatura ambiente e pressione atmosferica e trasportati con quelli esposti ma coperti dalla luce e dall'UV selezionato (tab. 2.4) mentre per gli EVT-E2 i *dark controls* sono stati esposti, in parallelo, rispettivamente al vuoto o in atmosfera marziana con CO₂ (tab. 2.5).

Al termine degli EVT i campioni sono stati sottoposti alla procedura di verifica della sopravvivenza mediante metodo colturale, per tutti gli isolati fungini e i frammenti di roccia, e colorimetrico, per il solo isolato *C. minteri*.

2.4.4. MODALITÀ COLTURALI

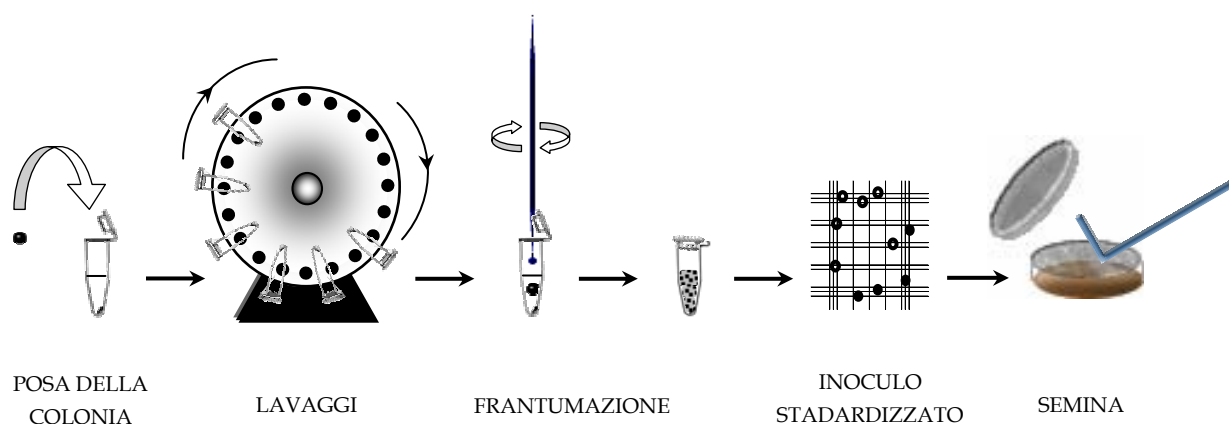
2.4.4.1. ISOLATI DEGLI ESSICCATI FUNGINI

Per i tre isolati di *Cryomyces* sono state allestite complessivamente 70 colture in piastre Petri (Ø 90 mm) contenenti MEA addizionato con cloramfenicolo (100 ppm, allegato), un antibiotico che inibisce la crescita batterica, avvalendosi di un'inoculo standardizzato (vedi par. 2.3.2). Le colonie sono state sottoposte ad un pretrattamento secondo le seguenti modalità:

- n. 1 lavaggio in 1 ml di soluzione sterile di Tween 20 0,35% (allegato) per detergere la superficie delle colonie da eventuali contaminati esterni;
- n. 4 lavaggi in 1 ml di soluzione fisiologica sterile, di 15', per rimuovere il Tween 20.

Ogni lavaggio è stato effettuato utilizzando un agitatore rotante FALC F200 (RPM: 9 giri/min).

La preparazione della sospensione fungina, in soluzione fisiologica, è avvenuta per frantumazione della colonia mediante l'utilizzo di un'ansa sterile monouso.



Della sospensione così ottenuta sono state effettuate diluizioni seriali fino ad ottenere un'inoculo di 0,15 ml di sospensione per una semina corrispondente a ca. 1500 cellule/piastra. Questo numero elevato si è reso necessario dal momento che dati (non mostrati) con stime di 150 e 600 cellule/piastra su colonie essiccate con più di un anno di età hanno avuto bassissime rese.

Per ogni isolato fungino sono state effettuate da 3 a 5 ripetizioni.

2.4.4.2. CAMPIONI DI ROCCIA COLONIZZATA

Anche per i campioni di roccia sono state allestite 13 colture cellulari per ogni test , effettuando una semina, in piastre Petri (Ø 90 mm), per sbriciolamento, dei frammenti di roccia sottoposti ai test. In tutto sono state allestite 182 colture, utilizzando 5 diversi terreni selettivi agarizzati agarizzati, MEA, TM e DRBC con cloramfenicolo, BG11, TY e nipagina, un antifungino (allegato) di seguito riportati.

Terreno di coltura		elettività/selettività
BG11		isolamento di cianobatteri
DRBC	+ cloramfenicolo	limitante la crescita rapida di muffe e lieviti
MEA	+ cloramfenicolo	isolamento fungino
TM	+ cloramfenicolo	isolamento delle alghe
TY	+ nipagina	isolamento di batteri

Le piastre sono state incubate a 15°C e osservate periodicamente allo stereomicroscopio fino alla comparsa delle CFU dei componenti appartenenti alla comunità. Sono state effettuate 3 ripetizioni per i terreni MEA, BG11 e TM e 2 per TY e DRBC.

2.4.5. MODALITÀ COLORIMETRICHE PER IL RILEVAMENTO DELLA VITALITÀ E DELL'ATTIVITÀ METABOLICA

Per ciascun test EVT una colonia del isolato fungino *C. minteri* CCFEE 5187 è stata prelevata per rilevare la vitalità e l'attività metabolica mediante tecniche colorimetriche. Ogni colonia è stata reidratata con alcune gocce (da 20 a 40 µl) di una soluzione di PBS (allegato) per 1h, posta in un mezzo di inclusione denominato Killik (allegato) e quindi posta nella camera di un criostato (Leica, CM1510 S), mantenuto alla temperatura di -20°C, per ca. 10 min, in attesa del taglio delle sezioni necessarie per la colorazione.

Le sezioni, di 25 µm di spessore, prodotte tagliando lungo l'asse perpendicolare al piano di crescita della colonia, sono state fatte aderire su vetrini copri oggetto in attesa dell'aggiunta delle soluzioni dei fluorocromi FUN 1 e SYTOX Green, per il rilevamento delle cellule vitali e attive metabolicamente il primo, e di quelle danneggiate o morte il secondo.

2.4.5.1. INDICATORI DI VITALITÀ FLUORESCENTI: I FLUOROCROMI FUN 1 E SYTOX GREEN

Lo sviluppo recente di metodiche fluorescenti per il rilevamento della vitalità cellulare ha suggerito l'utilizzazione di composti fluorescenti dall'impiego semplice, veloce, sensibile e attendibile laddove risulti difficile l'impiego delle tecniche convenzionali nella conta di cellule vitali quando non si trovano in uno stato attivo di divisione cellulare o che sono a lento accrescimento.

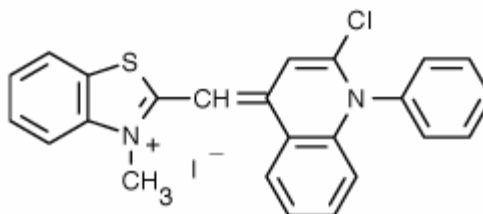
La fluorescenza è un fenomeno dovuto a molecole dette fluorocromi che, quando colpite (eccitate) da una luce di una certa lunghezza d'onda, emettono luce di lunghezza d'onda maggiore. Ciò permette di separare la luce di eccitazione da quella emessa usando dei filtri ottici. Poiché ogni fluorocromo possiede una precisa lunghezza d'onda di eccitazione ed una di emissione (colore), per poter osservare il segnale emesso il fluorimetro deve essere dotato di un gruppo di filtri di eccitazione e di emissione compatibili con le caratteristiche del fluorocromo prescelto (<http://probes.invitrogen.com/handbook/>).

2.4.5.1.1. FUN 1

Il FUN 1 (F-7030, Molecular Probes), è uno tra gli indicatori di vitalità cellulare a più alto grado di sensibilità, capace di generare colorazioni differenti nelle cellule vive e morte anche quando le cellule vive non sono in uno stato attivo di divisione cellulare.

Si tratta di un composto alogenato asimmetrico con una carica positiva fissa, il cui nome chimico è [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide] (fig 2.13), appartenente alla classe delle cianine; virtualmente non fluorescente in soluzione acquosa, è eccezionalmente membrana-permeabile e complessa con gli acidi nucleici citoplasmatici (DNA o RNA) di molte cellule di funghi filamentosi (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*) e di lieviti (*Candida albicans*, *C. pseudotropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*) producendo una diffusa fluorescenza verde in cellule vive, rossa in quelle metabolicamente attive e giallo-verde in quelle con membrana plasmatica compromessa (BRUL *et al.*, 1997; www.invitrogen.com).

Figura 2.13 – Formula chimica del FUN 1 ($C_{24}H_{18}ClIN_2S$, peso molecolare 528.84) (<http://probes.invitrogen.com/handbook/>).



Il FUN 1 inizialmente diffonde passivamente all'interno della membrana cellulare, colorando il citoplasma con una diffusa fluorescenza giallo-verde; successivamente, nelle cellule vitali, si stabilizza una fluorescenza citoplasmatica verde. Nelle cellule con sufficiente attività metabolica, a seguito dell'attività enzimatica vacuolare, il processo di colorazione determina la formazione di distinte strutture intravacuolari cilindriche (CIVS - *Cylindrical IntraVacuolar Structures*), refrattarie e compatte, che esibiscono un'evidente fluorescenza arancio-rossa (con eccitazione tra 470 nm e 590 nm) mentre si verifica la riduzione della fluorescenza verde citoplasmatica (fig. 2.14 e 2.15).

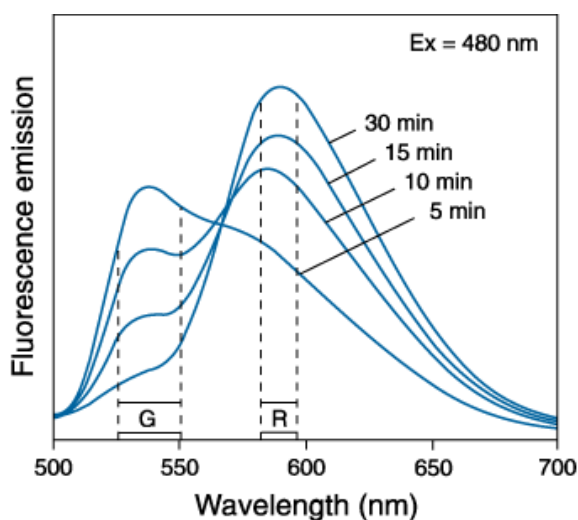


Figura 2.14 – Spettro di emissione della fluorescenza di una sospensione di *Saccharomyces cerevisiae* trattato con il colorante cellulare FUN 1 in funzione del tempo. Dopo l'aggiunta del FUN 1, lo spettro di emissione della fluorescenza (eccitazione a 480 nm), registrato da uno spettrofluorimetro durante un periodo di incubazione di 30', presenta uno spostamento della fluorescenza dal verde (G) al rosso (R) nelle cellule di lievito metabolicamente attive (<http://probes.invitrogen.com/handbook/>).

Queste strutture si osservano, frequentemente, mentre si muovono liberamente nello spazio intravacuolare dove incrementano in lunghezza finché il loro movimento non è limitato dalla membrana vacuolare. La formazione dei CIVS può avvenire in soluzione acquosa o in soluzione salina ed il loro numero e le loro dimensioni sono influenzati dal numero di cellule in soluzione e dalla concentrazione del colorante. L'uso di una quantità troppo elevata di colorante aumenta la fluorescenza verde residua che impedisce la visualizzazione delle CIVS. Al contrario una quantità non ottimale non permette la formazione di CIVS di numero e dimensioni adeguate alla loro visualizzazione. Di conseguenza la concentrazione ottimale di FUN 1 cresce al crescere del numero di cellule nel brodo di coltura.

Il tasso di conversione del FUN 1 dalla forma giallo-verde citoplasmatica alle CIVS è inoltre altamente influenzato dalla temperatura di incubazione, da cui dipendono l'attività enzimatica ed i processi fisiologici cellulari. L'assorbimento e la conversione del colorante sono ottimali tra i 10 ed i 40°C mentre diminuiscono bruscamente a 50°C (MILLARD *et al.*, 1997).

Soltanto le cellule metabolicamente attive vengono marcate chiaramente con strutture intravacuolari fluorescenti mentre le cellule morte presentano una fluorescenza giallo-verde brillante e diffusa (fig. 2.15). Cellule con membrane cellulari intatte ma con bassa o nulla attività metabolica presentano una diffusa fluorescenza verde e mancano di corpuscoli intravacuolari (BRUL *et al.*, 1997; MILLARD *et al.*, 1997; DE VERA *et al.*, 2003; DE LOS RÍOS *et al.*, 2004; WIERZCHOS *et al.*, 2004; <http://probes.invitrogen.com/handbook/>).

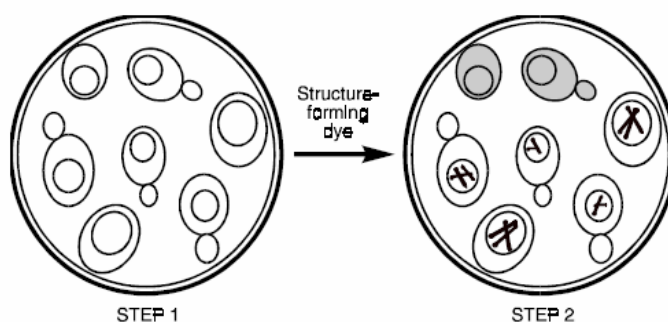


Figura 2.15 – Diagramma schematico di un saggio con FUN 1 in una sospensione di lievito. STEP 1, osservazione tipica al microscopio ottico di alcune cellule di lievito non colorate. STEP 2, le cellule del lievito sono state incubate con il colorante FUN 1 con la formazione dei CIVS; le cellule in grigio rappresentano le cellule morte che esibiscono una fluorescenza diffusa giallo-verde mentre le altre rappresentano le cellule metabolicamente attive che contengono le strutture cilindriche fluorescenti rosse nei loro vacuoli.

Le proprietà di questo composto permettono perciò di osservare direttamente le cellule fungine con integrità di membrana plasmatica metabolicamente attive (fig. 2.16 e 2.17) e di differenziare quelle metabolicamente inattive, scarsamente attive o morte.

Figura 2.16 – Cellule di *Saccharomyces cerevisiae* con FUN 1. Le cellule di lievito metabolicamente attive mostrano all'interno dei vacuoli la formazione di strutture cilindriche fluorescenti rosse (<http://probes.invitrogen.com/handbook/>).

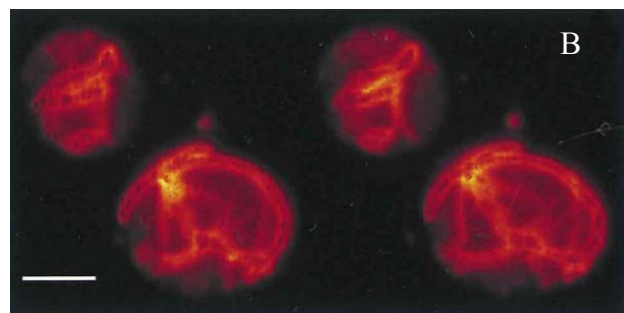
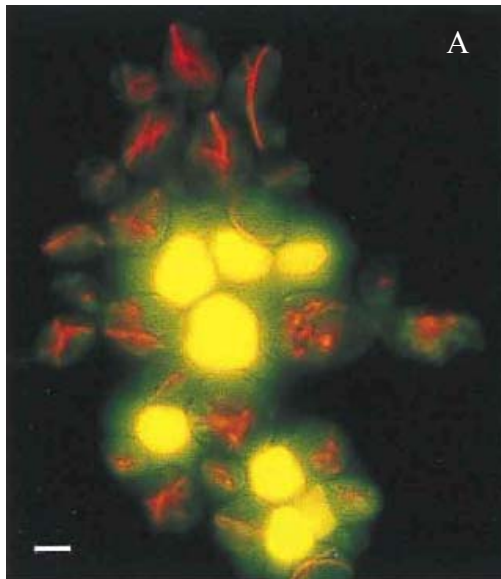
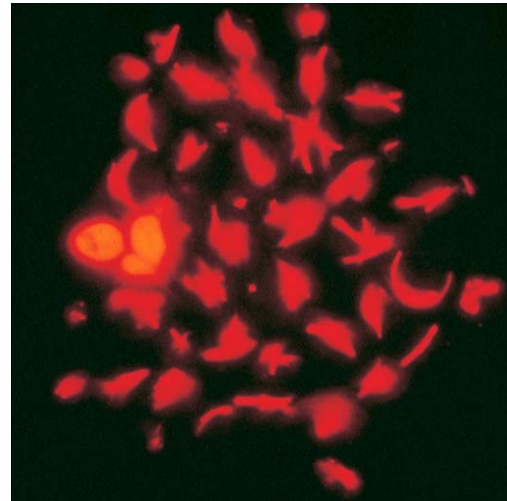


Fig. 2.17 – Colorazione con FUN 1 ed osservazione mediante microscopia ad epifluorescenza e confocale del lievito *S. cerevisiae* SF838-1Da. A. le cellule, osservate al microscopio ad epifluorescenza usando un long-pass filter set per la fluoresceina, mostrano inclusioni brillanti fluorescenti arancioni in cellule fluorescenti verdi. Un piccolo numero di cellule di lievito morte sono uniformemente colorate con una fluorescenza brillante gialla e non contengono nessuna struttura fluorescente. Barra = 5 mm; B. Immagine al confocale; sono visibili soltanto i CIVS all'interno dei vacuoli. Barra = 2,5 mm (MILLARD et al., 1997).

2.4.5.1.2. SYTOX GREEN

Il SYTOX Green (S-7020, Molecular Probes) è un composto organico, anch'esso appartenente alla classe delle cianine e che risulta fluorescente per interazione con gli acidi nucleici.

È una sonda ad alta affinità che facilmente penetra sia nelle cellule eucariote che nei batteri Gram positivi e Gram negativi con membrana plasmatica compromessa ed è completamente escluso dalle cellule vitali; per questo motivo viene utilizzato nelle indagini sulla permeabilizzazione di membrana nei funghi.

Analogamente al FUN 1, il SYTOX Green emette una fluorescenza intensa verde quando viene eccitato tra 450 e 500 nm (fig. 2.18)

(<http://probes.invitrogen.com/handbook/>).

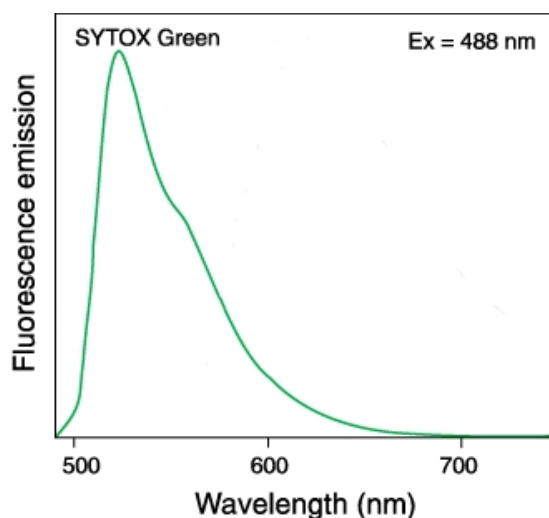


Figura 2.18 – Spettro di emissione della fluorescenza del colorante degli acidi nucleici SYTOX Green, legato al DNA, ottenuto con un'eccitazione di 488 nm (<http://probes.invitrogen.com/handbook/>).

2.4.5.1.3. PROCEDURA DI COLORAZIONE PER LA MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Una *stock solution* 10 mM di FUN 1 ed una 5 mM di SYTOX Green in DMSO (allegato) sono state utilizzate per la preparazione di una soluzione, rispettivamente, 30 μ M di FUN 1 e 10 μ M di SYTOX Green in PBS necessarie per i saggi di colorazione.

La marcatura è stata effettuata ponendo direttamente 20 μ l della soluzione di FUN 1, per il rilevamento della vitalità ed attività metabolica, e di SYTOX Green, per quello della mortalità cellulare, su sezioni fungine di 25 μ m di spessore, poste su vetrini da microscopia, preventivamente reidratate con la stessa soluzione di PBS (allegato). Per una penetrazione ottimale del colorante è stata necessaria un'incubazione della durata di 1-3 h per FUN 1 e almeno 1h e 30' per SYTOX Green, al buio e a temperatura ambiente.

L'osservazione è stata realizzata, dopo la copertura del campione con un vetrino coprioggetto 18x18, grazie all'utilizzo di un microscopio a fluorescenza Axioskop 2 plus (Zeiss), con lampada a mercurio 100 W, dotato di un set di filtri.

Per il FUN 1 sono stati utilizzati dei filtri per il rilevamento della fluoresceina isotiocianato (FITC) (verde) che, eccitata a 488 nm ha una emissione ≥ 530 nm e per il rilevamento della rodamina (rosso) che, eccitata a 546 nm emette a lunghezze d'onda ≥ 580 nm. Il fluorocromo FUN 1, infatti, quando si trova complessato con DNA o RNA ed eccitato a 488 nm diventa fluorescente a 530 nm. Il segnale relativo ai prodotti fluorescenti rossi viene raccolto a lunghezza d'onda di emissione con un filtro *long pass* a 575-640 nm.

Per il SYTOX Green è stato utilizzato il filtro attinente per la fluorescenza verde di cui il microscopio era equipaggiato (fig. 2.19).

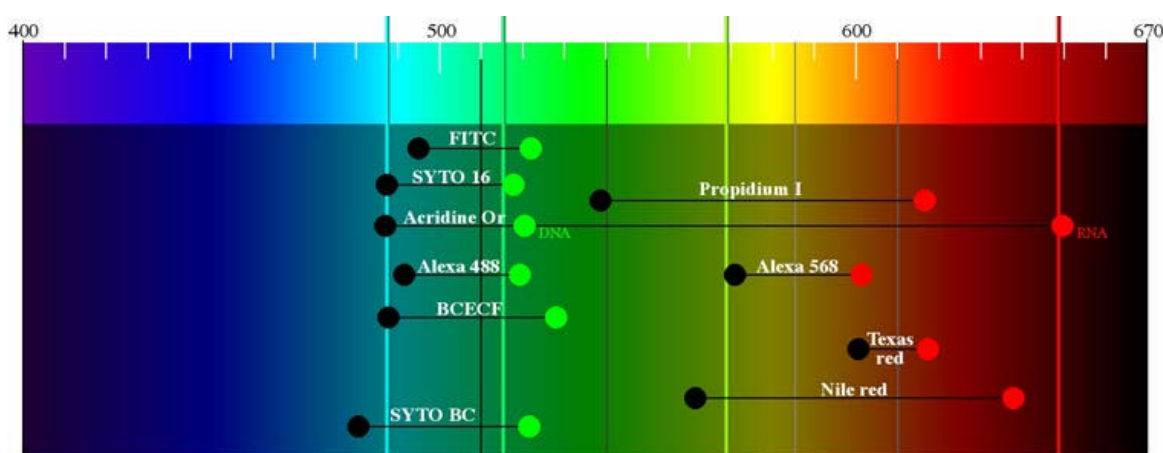


Figura 2.19 – Lunghezze d'onda (nm) di eccitazione (λ_a) e di emissione (λ_e) di alcuni fluorocromi di uso comune.

L'applicazione della metodica appena descritta si è dimostrata valida solamente sull'isolato *C. minteri* CCFEE 5187. Durante le fasi di osservazione microscopica a fluorescenza per l'ottimizzazione dei parametri riguardanti le concentrazioni del colorante ed i tempi di incubazione necessari, non è stata rilevata alcuna fluorescenza verde/arancio-rossa sugli isolati di *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534. Ciò è probabilmente legato alla difficoltà di penetrazione della sonda, e quindi ai meccanismi cellulari di diffusione coinvolti, attraverso la spessa e peculiare parete cellulare degli isolati di *C. antarcticus* rispetto a *C. minteri*.

Durante l'osservazione con il fluorocromo FUN 1, i campioni sono stati fotografati e le immagini acquisite mediante il programma di acquisizione d'immagine digitale Axiocam Vision 4, come due immagini separate corrispondenti alle emissioni nel rosso (attività metabolica, CIVS) e nel verde

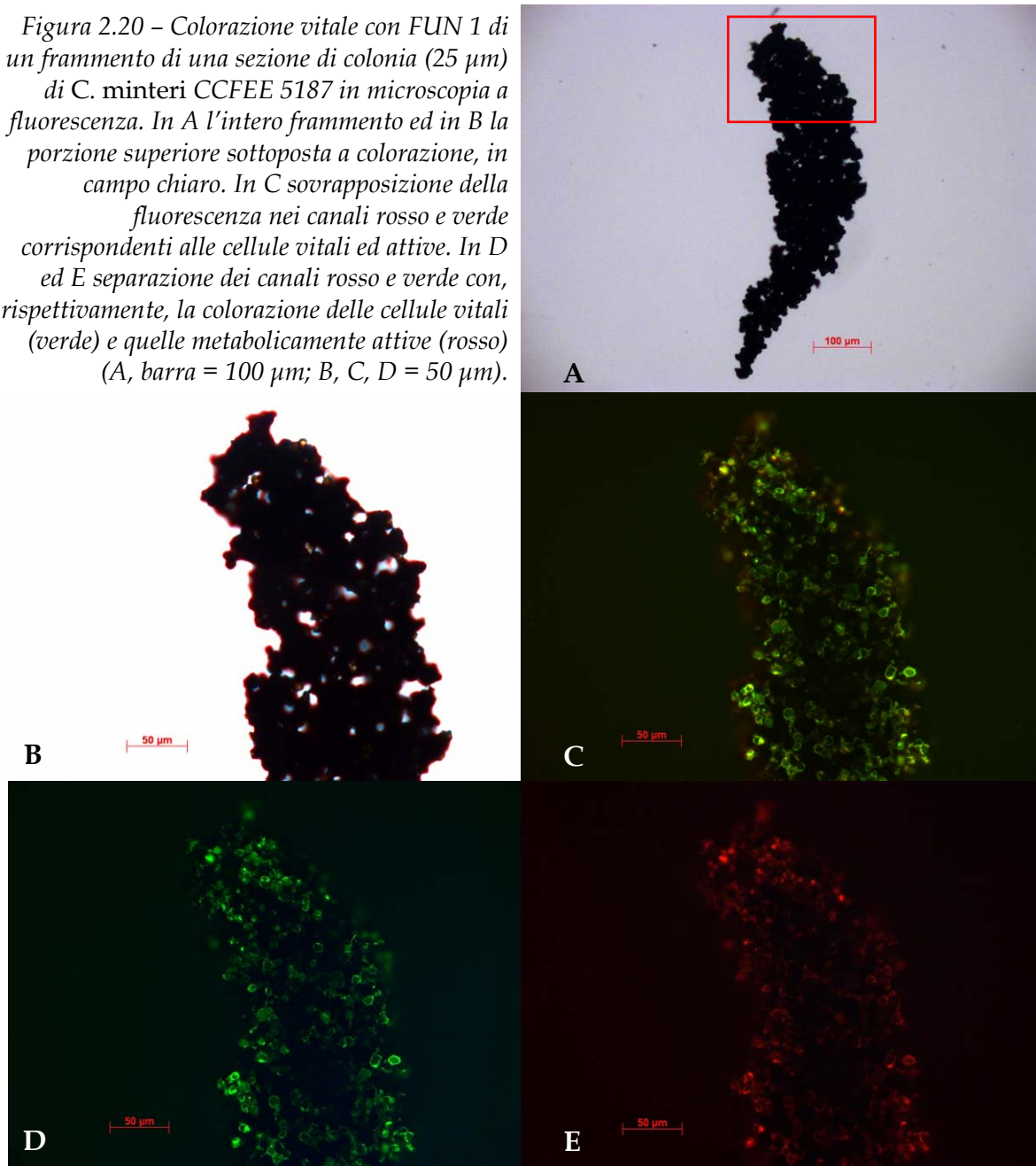
(vitalità con attività metabolica bassa o nulla) dalla cui combinazione si ottiene un'unica immagine che permette di distinguere cellule vive, metabolicamente attive e cellule inattive. Nel caso di SYTOX Green, invece, è stata ottenuta un'unica immagine corrispondente all'emissione nel verde che determina la distinzione tra cellule danneggiate o morte e cellule vitali.

Le immagini acquisite sono state elaborate con l'aiuto del software Adobe Photoshop ed infine analizzate con il programma KS300, associato allo stesso microscopio, per la stima, in percentuale, delle cellule vive o morte rispetto a quelle totali.

Nel caso del FUN 1 le sezioni di 25 μm dei campioni sono state fotografate separatamente nei canali del rosso e del verde utilizzando la lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e filtro per la fluoresceina, per il rilevamento della fluorescenza verde, e quella di 546 nm e filtro per la rodamina, per la fluorescenza rossa. Nel canale del rosso (colorazione verde) (fig. 2.20D) è stato possibile individuare le cellule vitali membrana permeabili e nel canale del verde (colorazione rossa) (fig. 2.20E) quelle in cui si assiste alla formazione delle CIVS, ossia delle strutture cilindriche intravacuolari, presenti solo in cellule metabolicamente attive.

Nella fig. 2.20 sono visibili i risultati della colorazione vitale con FUN 1 di una sezione di colonia di 25 μm di spessore di *C. minteri* CCFEE 5187. Le immagini ottenute con la fluorescenza verde (D) e rossa (E), indicative rispettivamente della presenza di cellule vitali e metabolicamente attive, e quella della sovrapposizione delle due (C), che consente di individuare le cellule sia con membrana integra che metabolicamente attive, dimostrano la validità della tecnica utilizzata (fig. 2.20C).

Figura 2.20 – Colorazione vitale con FUN 1 di un frammento di una sezione di colonia (25 μm) di *C. minteri* CCFEE 5187 in microscopia a fluorescenza. In A l'intero frammento ed in B la porzione superiore sottoposta a colorazione, in campo chiaro. In C sovrapposizione della fluorescenza nei canali rosso e verde corrispondenti alle cellule vitali ed attive. In D ed E separazione dei canali rosso e verde con, rispettivamente, la colorazione delle cellule vitali (verde) e quelle metabolicamente attive (rosso) (A, barra = 100 μm ; B, C, D = 50 μm).



Un esempio della colorazione con SYTOX Green è visibile in figura 2.21. La presenza di cellule danneggiate o morte è indicata dalla fluorescenza verde (C). La sovrapposizione tra l'immagine in campo chiaro (B) e quella in fluorescenza (C), elaborata al computer (D), consente di evidenziare quali cellule della colonia siano danneggiate o morte.

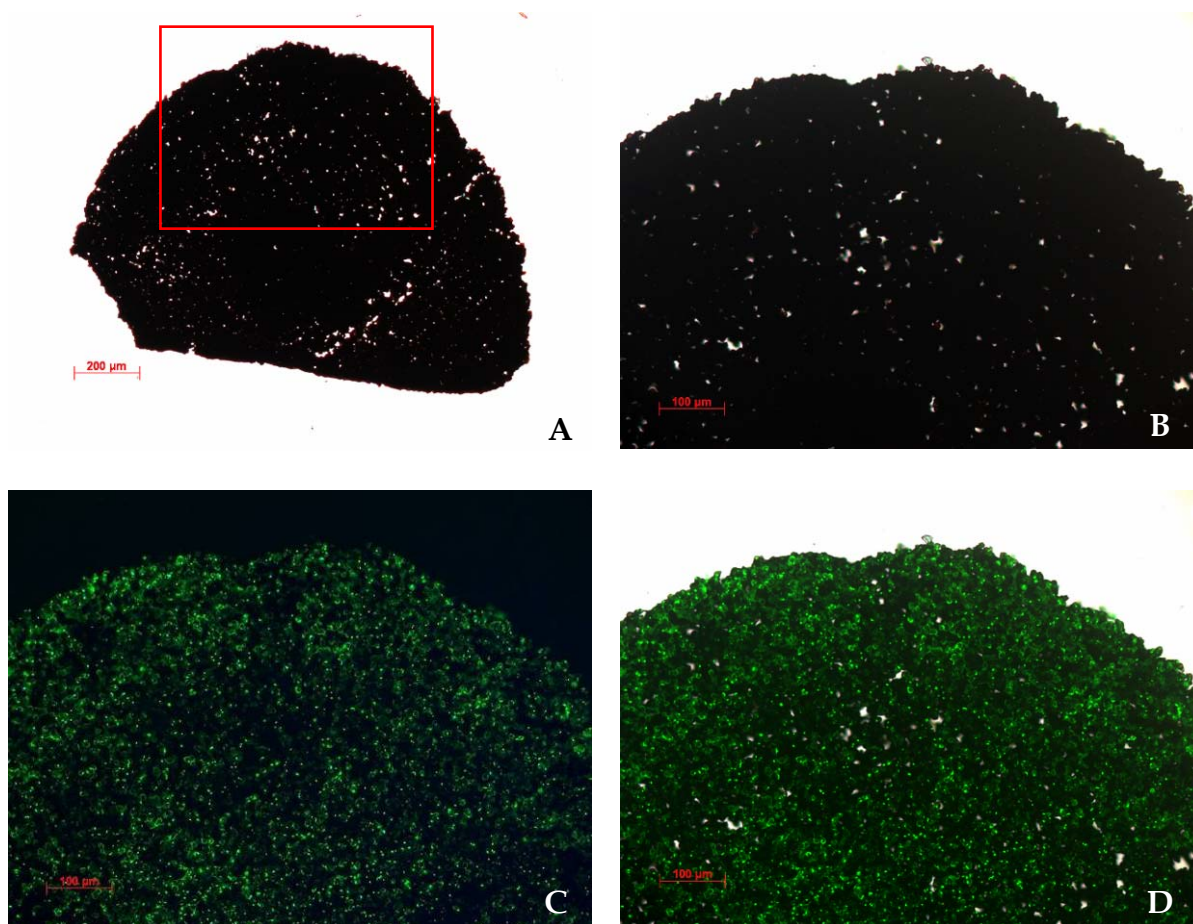


Figura 2.21 – Colorazione vitale con SYTOX Green di una sezione ($25\ \mu\text{m}$) di colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 in microscopia a fluorescenza. In A localizzazione in campo chiaro dell'area, B, sottoposta alla colorazione. In C fluorescenza verde nel canale del rosso corrispondente alle cellule danneggiate o morte. In D sovrapposizione della fluorescenza verde in campo chiaro (A, barra = $200\ \mu\text{m}$; B, C, D = $100\ \mu\text{m}$).

Le immagini acquisite, nel rosso, nel verde e mediante sovrapposizione dei due canali, sono state successivamente elaborate al computer con il programma Adobe Photoshop al fine di renderle *leggibili* al programma KS300, associato allo stesso microscopio a fluorescenza, per la conta delle cellule risultate fluorescenti, vitali con FUN 1 e morte con SYTOX Green.

Tale programma, infatti, è capace di quantificare separatamente i pixel bianchi presenti in un'immagine. Per questo motivo ogni immagine a colori relativa sia al campo chiaro che alla fluorescenza è stata convertita in bianco e nero e *fatta leggere* al programma sopra citato.

Una volta ottenuti i dati sui pixel è stato possibile risalire ad una stima percentuale di vitalità e mortalità cellulare del campione osservato data dal

rapporto tra la superficie totale (in pixel) risultata fluorescente e quella totale (in pixel) delle cellule in sezione:

$$\% \text{ vitalità (o mortalità)} = \frac{\text{pixel colorati dal fluorocromo}}{\text{pixel delle cellule sezionate}} \times 100$$

Il valore ottenuto non è assoluto; la superficie coperta dalle cellule presenti nella sezione, com'è intuibile, risulta notevolmente maggiore rispetto a quella relativa alla fluorescenza, che si limita al citoplasma ed ai vacuoli; inoltre l'intensità della fluorescenza (e quindi la superficie colorata) è dipendente dalle modalità di penetrazione e di azione del fluorocromo rispetto alla totalità delle cellule osservabili.

Per il calcolo della stima di vitalità, i pixel relativi alla fluorescenza rossa, indicativa delle cellule metabolicamente attive, non sono stati ritenuti significativi a causa della debole emissione in fluorescenza del fluorocromo che spesso ha determinato un numero di pixel difficile da rilevare. Soltanto se eccitato da una fonte come quella laser di un microscopio confocale il colorante emette maggiormente (MILLARD *et al.*, 1997; DE VERA *et al.*, 2003)

I risultati raggiunti hanno consentito di calcolare la percentuale di vitalità o mortalità dei campioni di *C. minteri* CCFEE 5187 per la quasi totalità degli EVT. Manca, infatti, il dato del test relativo alla combinazione delle condizioni marziane con la dose maggiore di UV 200-400 nm a causa del casuale danneggiamento di una parte del già limitato materiale biologico.

2.5. RESISTENZA ALLE ALTE TEMPERATURE IPOTIZZATE DURANTE LE FASI DI VOLO E DI ESPOSIZIONE NELLO SPAZIO

Ogni isolato fungino selezionato per lo stazionamento nello spazio nell'ambito dell'esperimento LIFE, è stato sottoposto a tre differenti alte temperature (60, 80 e 90°C), in previsione del rischio di esposizioni per brevi e/o lunghi periodi a tali

condizioni. Le prove sono state effettuate presso il laboratorio dell'Università di Viterbo.

La temperatura di 60°C è stata scelta sulla base del valore limite che attiverà la chiusura automatica dei coperchi dei vassoi di EXPOSE; quelle di 80 e 90°C sulla base delle indicazioni fornite dall'ESA, dovute a elaborazioni matematiche, sulle temperature massime che potrebbero essere raggiunte nel portacampioni nello spazio.

La temperatura di 60°C è stata saggiata per gli isolati *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 e *C. minteri* CCFEE 5187, le temperature di 80 e 90°C ai soli *C. antarcticus* CCFEE 515 e *C. minteri*.

15 colonie di ognuno degli isolati saggiati di almeno 6 mesi di età, prelevate sterilmente e poste in essiccatore per 10 gg fino al raggiungimento della totale disidratazione, sono state poste in stufa (WS 30-200, KW) alle temperature di 60°C per 15 e 60 minuti e di 80 e 90°C per 60 minuti.

Al termine dell'esposizione 3 colonie distinte per ogni isolato fungino, impiegate per il test a 60°C, sono state sottoposte a test colturali per il rilevamento di vitalità cellulare con modalità analoghe a quelle descritte nel paragrafo 2.4.4.1, senza pretrattamento, inoculando ca. 1000 cell/piastra. Gli isolati esposti a 80 e 90°C sono stati sottoposti a test colturali, senza l'impiego di un inoculo standardizzato; su *C. minteri* è stato effettuato il saggio colorimetrico (par. 2.4.5.1.3).

Dopo ogni esposizione le colonie sono state mantenute durante la notte in essiccatore affinché il raggiungimento all'equilibrio della temperatura ambiente avvenisse gradualmente.

Tutte le misure sono state eseguite in triplicato per la temperatura di 60°C mentre per gli 80 e 90°C sono state effettuate 5 ripetizioni.

2.6. OSSERVAZIONI MORFOLOGICHE

2.6.1. MICROSCOPIA OTTICA IN CAMPO CHIARO

2.6.1.1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

Per l'osservazione microscopica in campo chiaro sono state allestite delle microcolture in piastre Petri di vetro di 15 cm di diametro contenenti un disco di carta da filtro, due vetrini portaoggetto sorretti da due bacchette di vetro e due vetrini coprioggetto; il tutto è stato sterilizzato in stufa a 160°C per 3 h. Tra il vetrino portaoggetto e il coprioggetto è stato posto un sottile quadratino di terreno colturale (MEA) di circa 4 mm² inoculato, lateralmente, con un piccolo frammento di isolato da esaminare.

L'umidità interna alla piastra è garantita imbibendo con acqua sterile la carta da filtro sul fondo (RIDDELL, 1950). Il tutto è stato svolto in condizioni di sterilità.

In questo modo la colonia fungina aderisce alla superficie del vetro facilitando l'osservazione delle strutture cellulari intatte.

Le piastre Petri sono state poi messe ad incubare a 15°C, per circa un mese, per consentire al fungo di svilupparsi. Trascorso tale periodo, le microcolture sono state aperte ed i vetrini montati in acido lattico; si è quindi proceduto all'osservazione al microscopio in campo chiaro (Leica, Aristoplan) e alla realizzazione di fotografie utilizzando una macchina fotografica digitale Nikon 5000 ed il software Micromax Arkon (Versione 8.12.15) per la relativa acquisizione e gestione delle immagini.

2.6.2. MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Le osservazioni al SEM hanno interessato i campioni sottoposti in laboratorio a stress radiativo ed osmotico. La preparazione dei campioni ha previsto: tre fasi, di seguito descritte-

1. La **fissazione** di colonie, o frammenti di esse, di ca. 2-3 mm di diam, secondo un protocollo modificato rispetto a quello descritto da ONOFRI *et al.* (1980):

- lavaggio in glutaraldeide al 5% in tampone cacodilato 0,1M 12h
(0.1 M saccarosio; 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.2) a 4°C
- n. 3 lavaggi in tampone cacodilato 0,1M 1h ciascuno
- post-fissazione in tetrossido di osmio al 1% e rosso di 3h
rutenio allo 0,15% in tampone cacodilato 0,1M (pH 7,2)
- n.2 lavaggi in H_2OD 30' ciascuno
- block stain con acetato di uranile al 1% in H_2OD 1h
- n.2 lavaggi in H_2OD 30' ciascuno

2. La disidratazione, che ha avuto luogo con una serie di lavaggi di 15' in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti: 30%, 50%, 70% (v/v) ed un lavaggio finale con etanolo puro (soluzione al 100%) per 1h a temperatura ambiente;

3. L'essiccazione mediante il Critical Point Drier, e la metallizzazione, che consiste nel ricorire i campioni di oro per uno spessore di 60 nm.

I campioni sono stati osservati con un microscopio elettronico a scansione (JEOL, JSM-5200) e fotografati.

2.6.3. MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

Per l'osservazione al TEM la preparazione dei campioni ha previsto la stessa procedura eseguita per il SEM fino alla disidratazione dei campioni in etanolo puro seguita da:

1. **infiltrazione** ed **inclusione** in resina LR White, che ha avuto luogo con:
 - etanolo al 100% : LR White (con accelerante), 2 : 1 per 3 h, a 4°C (in rotazione);
 - etanolo al 100% : LR White (con accelerante), 1 : 1 per 3 h, a 4°C (in rotazione);
 - etanolo al 100% : LR White (con accelerante), 1 : 2 *over night*, a 4°C (in rotazione);
 - in resina pura (con accelerante) per una giornata ed una notte (in rotazione);
2. **inclusione** in resina pura in capsule gelatinose per 48 h a 48-52°C.

Al termine le sezioni ultrasottili dei campioni ottenute, montate sugli appositi reticoli, sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione JEOL, JEM-1200 EX II.

3. RISULTATI

3.1. TOLLERANZA DEGLI ISOLATI FUNGINI A CONDIZIONI DI STRESS TERRESTRI

Di seguito sono riportati i risultati degli studi, effettuati durante la prima parte di questa ricerca, che si proponevano di analizzare separatamente l'effetto delle basse temperature, dell'irraggiamento UV e dello stress osmotico sui funghi neri meristematici criptoendolitici selezionati di *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 e di *C. minteri* CCFEE 5187.

3.1.1. BASSE TEMPERATURE

3.1.1.1. RESISTENZA A LUNGO TERMINE

La velocità di crescita dei tre isolati di *Cryomyces*, *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 e *C. minteri* CCFEE 5187, dopo 12 mesi di conservazione alle temperature di 0 ± 2 , -5 ± 2 , -10 ± 2 , -20 ± 1 e $-25\pm 2^\circ\text{C}$ è riassunta nella tabella 3.1, dove si riportano i diametri medi e le deviazioni standard delle colonie cresciute a due mesi dall'inoculo.

Tabella 3.1 – Diametri medi, espressi in mm, delle colture di *C. antarcticus* CCFEE 515, 534 e *C. minteri* CCFEE 5187 dopo la conservazione per 12 mesi a basse temperature rispetto al controllo a 15°C .

	$15\pm 1^\circ\text{C}$	$0\pm 2^\circ\text{C}$	$-5\pm 2^\circ\text{C}$	$-10\pm 2^\circ\text{C}$	$-20\pm 1^\circ\text{C}$	$-25\pm 2^\circ\text{C}$
<i>Cryomyces antarcticus</i> CCFEE 515	9,67 $\pm$ 0,58	9,80 $\pm$ 2,95	9,50 $\pm$ 1,26	9,67 $\pm$ 1,25	11,17 $\pm$ 1,83	10,50 $\pm$ 0,84
<i>Cryomyces antarcticus</i> CCFEE 534	9,00 $\pm$ 0,58	12,83 $\pm$ 1,17	9,17 $\pm$ 2,25	13,00 $\pm$ 2,47	12,17 $\pm$ 1,17	13,00 $\pm$ 1,10
<i>Cryomyces minteri</i> CCFEE 5187	11,33 $\pm$ 1,53	13,17 $\pm$ 0,98	13,67 $\pm$ 1,26	13,17 $\pm$ 1,96	12,17 $\pm$ 2,40	11,67 $\pm$ 0,52

Dai dati riportati in tabella emerge come nessuno dei tre isolati sembri aver risentito dell'esposizione prolungata alle basse temperature selezionate rispetto al controllo (15°C).

Al contrario, sembra che la bassa temperatura abbia addirittura un effetto stimolante, come si può osservare dai dati relativi a *C. antarcticus* CCFEE 534 e *C. minteri* (fig. 3.1).

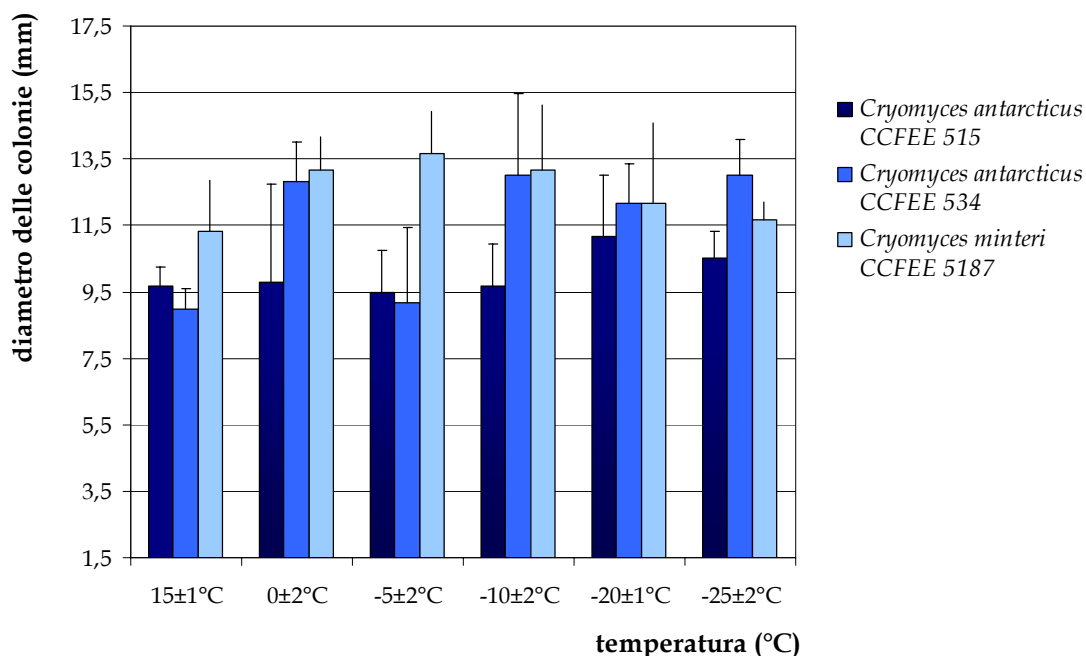


Figura 3.1 – Diametri medi, espressi in mm, delle colture di *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 e di *C. minteri* CCFEE 5187, dopo 12 mesi a 6 differenti temperature.

3.1.1.2. CICLI DI CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO

Nelle tabelle 3.2, 3.3 e 3.4 che seguono, con le relative rappresentazioni grafiche (figg. 3.2, 3.3 e 3.4), sono riportati i diametri medi, con le deviazioni standard, delle colonie rispettivamente di *Cryomyces antarcticus* CCFEE 515 e 534 e *C. minteri* CCFEE 5187, dopo 7 ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

Dal confronto con i dati relativi ai controlli, cioè alle colture dei tre isolati sviluppatasi in condizioni ottimali di crescita (15°C), non si osserva alcuna diminuzione significativa della crescita per tutti e tre gli isolati.

Tabella 3.2 – *C. antarcticus* CCFEE 515: diametri medi con deviazioni standard, espressi in mm, delle colture, conservate a 6 differenti temperature, dopo ripetuti cicli di congelamento/scongelo e relativo controllo a 15°C.

<i>Cryomyces antarcticus</i> CCFEE 515						
Ciclo	15±1°C	0±2°C	-5±2°C	-10±2°C	-20±1°C	-25±2°C
1°	9.67±0.76	9.80±2.66	9.50±1.26	9.67±1.25	11.17±1.83	10.50±0.84
2°	9.33±0.58	8.67±0.58	10.00±1.00	9.33±0.58	10.67±1.15	11.33±2.52
3°	10.00±0.00	8.67±0.58	10.00±1.00	8.33±0.58	10.00±1.53	10.33±0.58
4°	12.00±0.00	12.33±1.53	14.00±1.73	12.00±1.00	10.67±0.58	11.67±1.53
5°	13.33±1.04	13.00±2.78	13.83±1.04	12.83±0.58	12.33±1.00	13.17±0.76
6°	9.33±0.58	7.50±0.50	9.33±0.58	10.67±1.53	9.67±0.84	10.33±0.58
7°	10.00±1.00	10.33±0.58	8.67±1.15	7.67±0.58	10.00±0.84	9.67±0.76

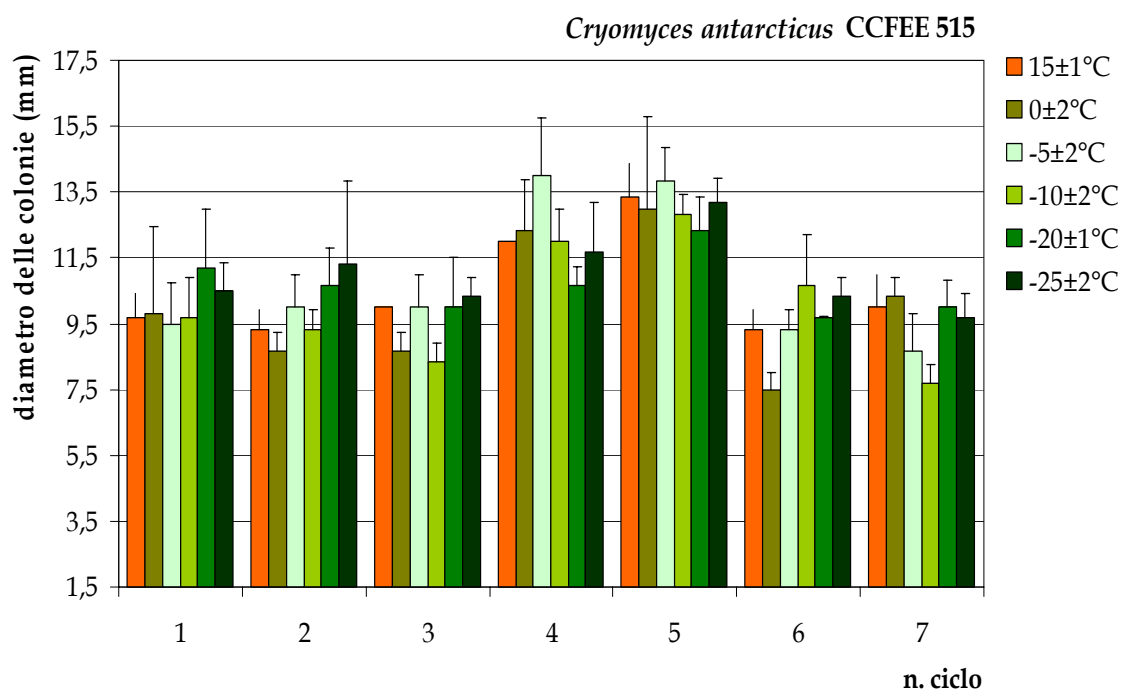


Figura 3.2 – *C. antarcticus* CCFEE 515: rappresentazione grafica dei dati riportati in tabella 3.2.

Tabella 3.3 – *C. antarcticus* CCFEE 534: diametri medi con deviazioni standard, espressi in mm, delle colture conservate a 6 differenti temperature, dopo ripetuti cicli di congelamento/scongelo e relativo controllo a 15°C.

<i>Cryomyces antarcticus</i> CCFEE 534						
Ciclo	15±1°C	0±2°C	-5±2°C	-10±2°C	-20±1°C	-25±2°C
1°	9.00±0.00	12.83±1.17	9.17±2.25	13.00±2.47	12.17±2.17	13.00±1.10
2°	12.13±0.58	11.67±0.58	10.33±1.15	12.33±1.15	13.00±0.00	12.00±0.00
3°	9.67±0.58	9.33±0.58	9.33±0.58	11.00±2.65	10.33±0.58	10.33±0.58
4°	13.33±1.15	13.33±1.15	12.83±0.76	13.33±1.15	13.00±1.00	13.33±0.58
5°	14.17±0.29	13.17±2.75	14.67±0.76	14.83±1.15	14.00±0.00	14.83±1.61
6°	10.17±1.61	10.50±1.50	9.50±0.50	10.50±0.87	10.83±0.76	10.83±0.58
7°	9.00±1.00	11.00±1.00	10.00±1.80	9.83±2.08	7.67±0.58	10.17±1.15

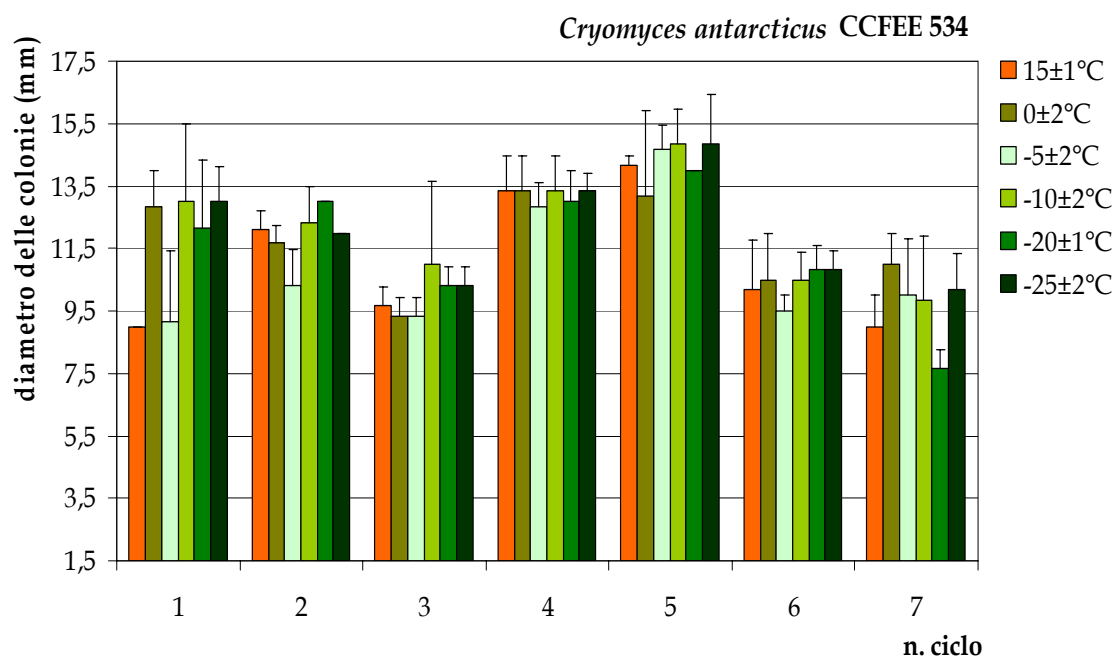


Figura 3.3 – *C. antarcticus* CCFEE 534: rappresentazione grafica dei dati riportati in tabella 3.3.

Tabella 3.4 – *C. minteri* CCFEE 5187: diametri medi con deviazioni standard, espressi in mm, delle colture conservate a 6 differenti temperature, dopo ripetuti cicli di congelamento/scongelo e relativo controllo a 15°C.

<i>Cryomyces minteri</i> CCFEE 5187						
Ciclo	15±1°C	0±2°C	-5±2°C	-10±2°C	-20±1°C	-25±2°C
1°	11.33±0.58	13.17±0.98	13.67±1.26	13.17±1.96	12.17±2.40	11.67±0.52
2°	10.67±1.53	13.67±1.53	13.67±0.58	14.67±0.58	12.33±1.53	13.00±1.00
3°	12.00±0.00	12.00±1.00	11.00±2.00	12.33±0.58	11.33±1.76	9.00±2.00
4°	15.00±0.00	13.00±1.00	12.67±1.15	15.00±0.00	15.33±0.58	13.33±2.52
5°	16.67±1.26	16.83±0.58	15.67±0.58	16.00±0.50	11.83±0.29	12.50±0.50
6°	11.17±0.58	10.67±0.76	10.00±0.00	14.83±0.76	10.83±0.29	12.13±0.58
7°	10.83±0.29	9.33±0.58	7.17±2.02	10.33±1.04	10.00±0.00	10.50±0.87

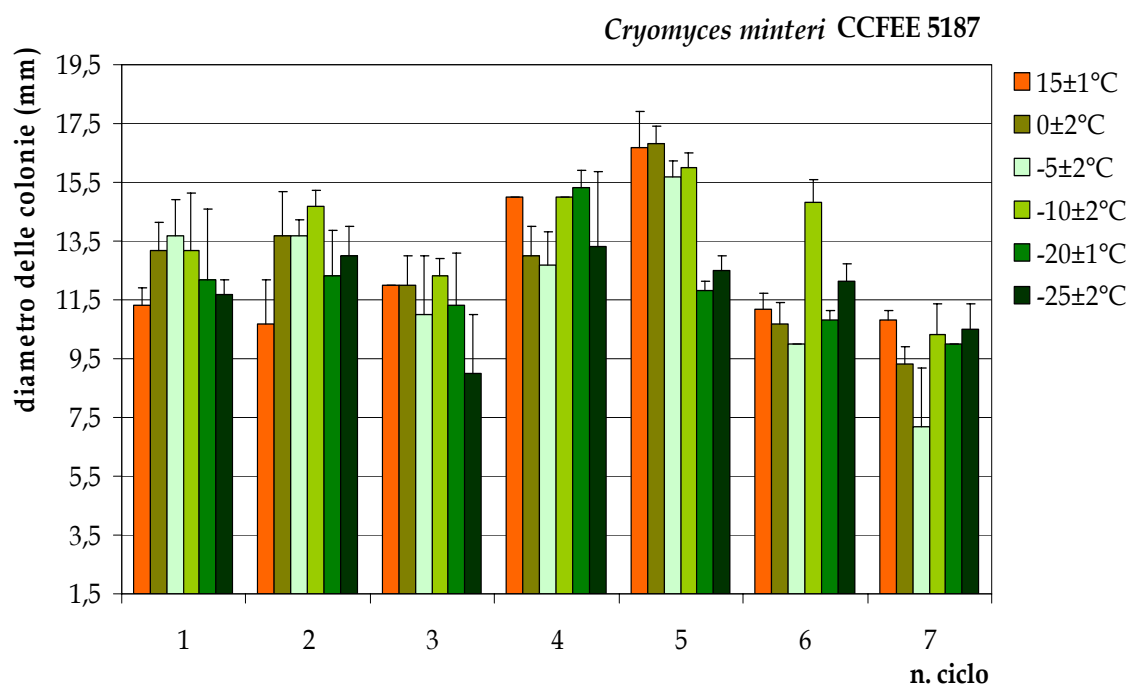


Figura 3.4 – *C. minteri* CCFEE 5187: rappresentazione grafica dei dati riportati in tabella 3.4.

3.1.2. RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA

3.1.2.1. TEST DI GERMINAZIONE DOPO IRRAGGIAMENTO UV-B

L'effetto dell'esposizione ai raggi UV-B sulla germinazione di propaguli degli isolati *C. antarcticus* (CCFEE 515 e CCFEE 534 e *C. minteri* CCFEE 5187 è riportato nelle figure 3.5 e 3.6. Complessivamente gli isolati dimostrano un'alta resistenza all'esposizione ai raggi UV-B. La figura 3.5 mostra i dati relativi ai primi 120 min. di irraggiamento (dosi da 2.7 a 21.6 kJ/m²), e la figura 3.6 quelli relativi ad irraggiamenti di 2, 4, 6 e 10 ore (dosi da 21,6 a 108 kJ/m²), con un'irradianza di 3,0 W/m², pari a 5-8 volte l'irradianza UV-B terrestre antartica (SKERRATT *et al.*, 1998; HUGHES *et al.*, 2003).

La minore riduzione percentuale di vitalità, entro le prime due ore di irraggiamento, è stata osservata per l'isolato *C. antarcticus* CCFEE 515 pari, dopo 120', al 33% (fig. 3.5); *C. antarcticus* CCFEE 534 e *C. minteri* CCFEE 5187 mostrano riduzioni maggiori, pari rispettivamente al 65% e al 63% rispetto al controllo (nessun irraggiamento al tempo 0) (figg. 3.5 e 3.6).

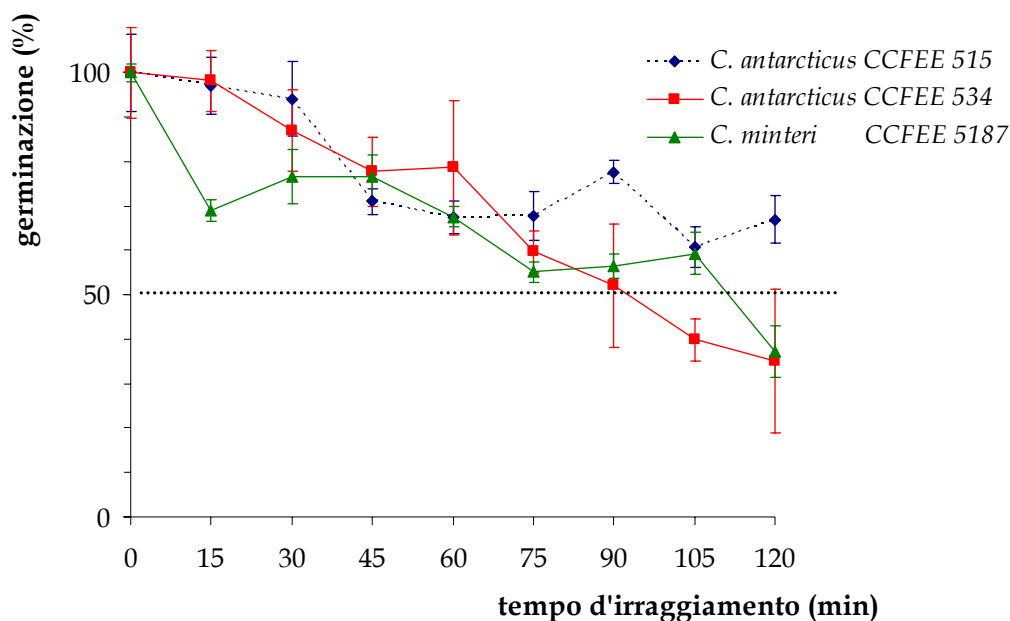


Figura 3.5 – Germinazione dei propaguli di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e CCFEE 534) e *C. minteri* (CCFEE 5187) dopo irraggiamento UV-B da 0 a 120 minuti, con incrementi di 15 minuti.

In ogni caso l'effetto letale su almeno il 50% dei propaguli si è avuto dopo 90' (16,2 kJ/m²) di irraggiamento per *C. antarcticus* CCFEE 534, tra 105 e 120' (18,9 e 43,2 kJ/m²) per *C. minteri* CCFEE 5187 e tra 120 e 240' (21,6 e 43,2 kJ/m²) per *C. antarcticus* CCFEE 515 (figg. 3.5 e 3.6).

Tutti gli isolati, come mostrato dalla figura 3.6 tendono a non germinare dopo 10 ore di UV-B (108 kJ/m²). L'isolato più resistente sembra essere *C. antarcticus* CCFEE 515, mentre il meno resistente sembra essere *C. minteri* CCFEE 5187, il quale mostra una totale perdita di vitalità dopo 4 ore (43,2 kJ/m²) di esposizione.

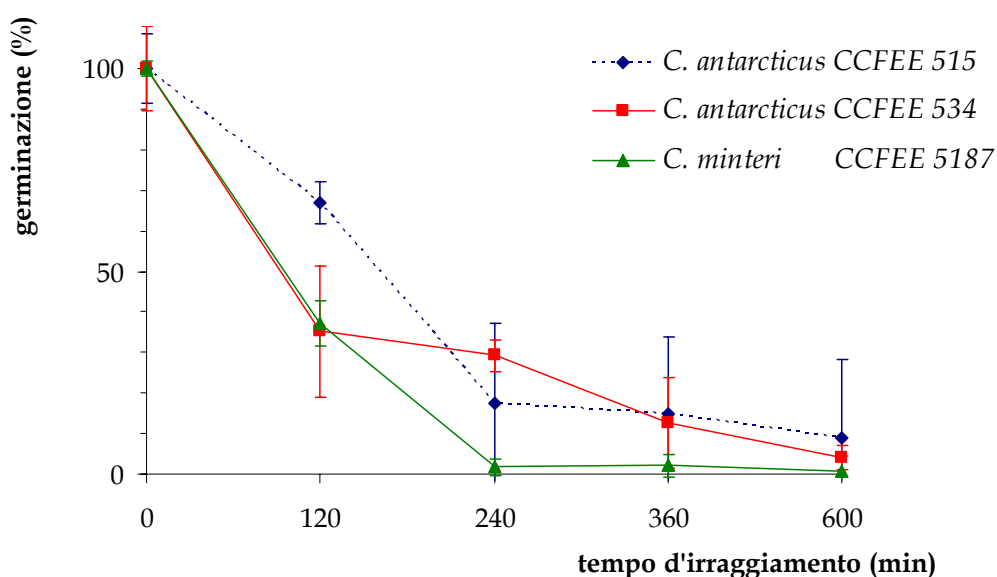


Figura 3.6 – Germinazione dei propaguli di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e CCFEE 534) e *C. minteri* (CCFEE 5187) dopo 2, 4, 6 e 10 ore di irraggiamento UV-B.

Le osservazioni al microscopio ottico e a scansione, compiute subito dopo l'esposizione, non mostrano sostanziali modificazioni morfologiche indotte dall'irraggiamento.

Le fotografie al microscopio ottico dell'isolato *C. antarcticus* CCFEE 534 riportate nella figura 3.7 (A1, A2 e A3) evidenziano come le cellule, caratterizzate da pareti ispessite e fortemente melanizzate, non sembrano mostrare alterazioni morfologiche nei campioni irraggiati rispetto al controllo; le immagini al SEM dell'isolato *C. minteri* CCFEE 5187 non mostrano apparentemente delle modificazioni morfologiche al livello cellulare nei campioni soggetti ad una esposizione di 60 e 120 minuti alle radiazioni UV-B (fig 3.7 B2 e B3) rispetto al

controllo (fig. 3.7B1); sono ben visibili, al SEM, notevoli quantità di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) sulle pareti. Le immagini mostrate sono rappresentative di una situazione che non varia anche per tempi di irraggiamento maggiori.

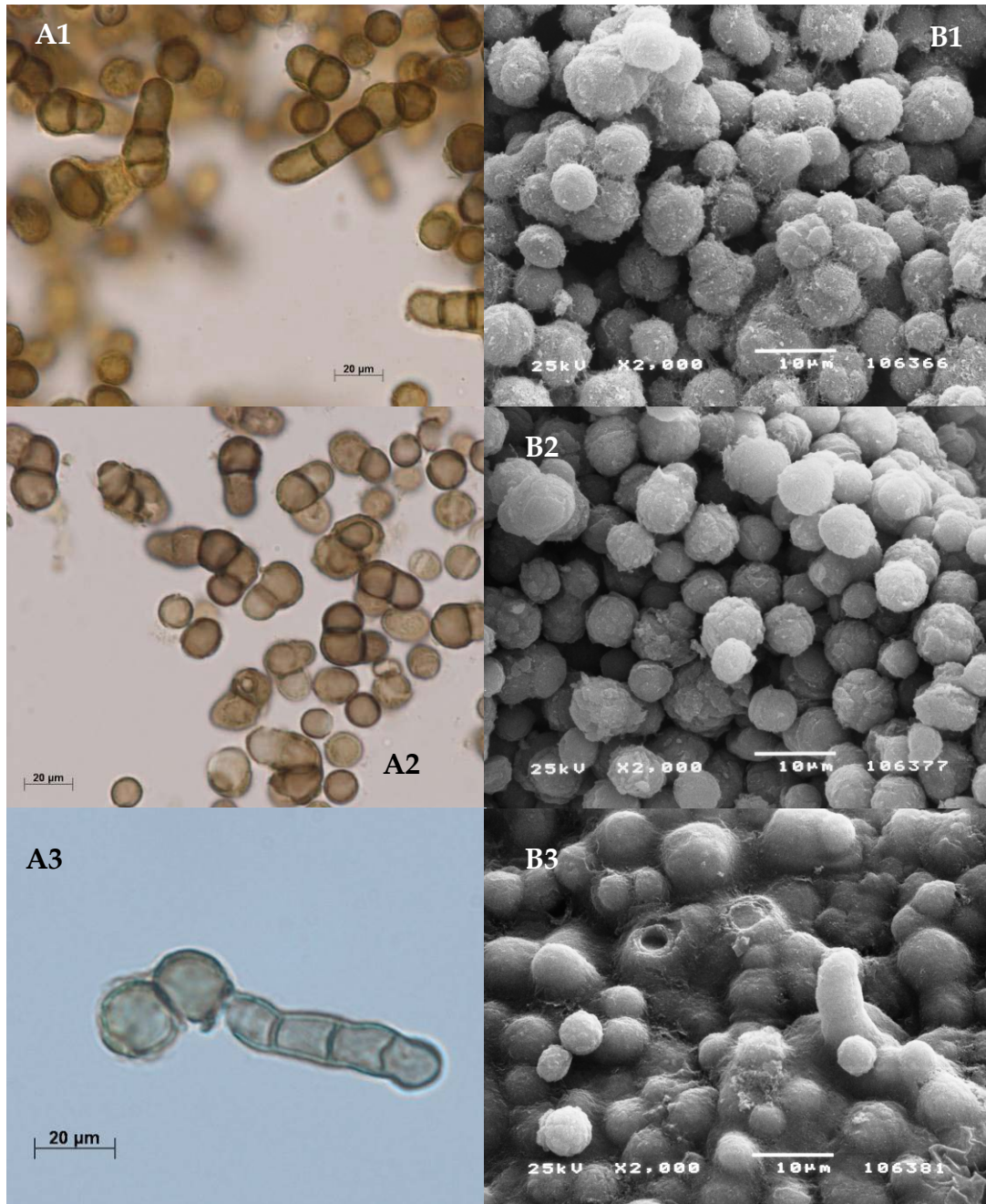


Figura 3.7 –Foto al microscopio ottico di *C. antarcticus* CCFEE 534 (A) ed al SEM di *C. minteri* CCFEE 5187 (B): controlli (A1, B1), trattato dopo 60 (A2, B2) e 120 (A3, B3) minuti di esposizione a UV-B.

La parete cellulare multistratificata è ben visibile con l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (fig. 3.8). In questo caso sembra che l'esposizione induca alcuni danni ultrastrutturali ben evidenti: l'irraggiamento, infatti, causa la contrazione della membrana plasmatica, il conseguente scollamento dalla parete, messo in evidenza da uno spazio vuoto non elettrondenso, e la formazione intracellulare di globuli ben delimitati, ben visibili nella figura 3.8B relativa all'irraggiamento di *C. minteri* CCFEE 5187 dopo 120' di esposizione UV-B.

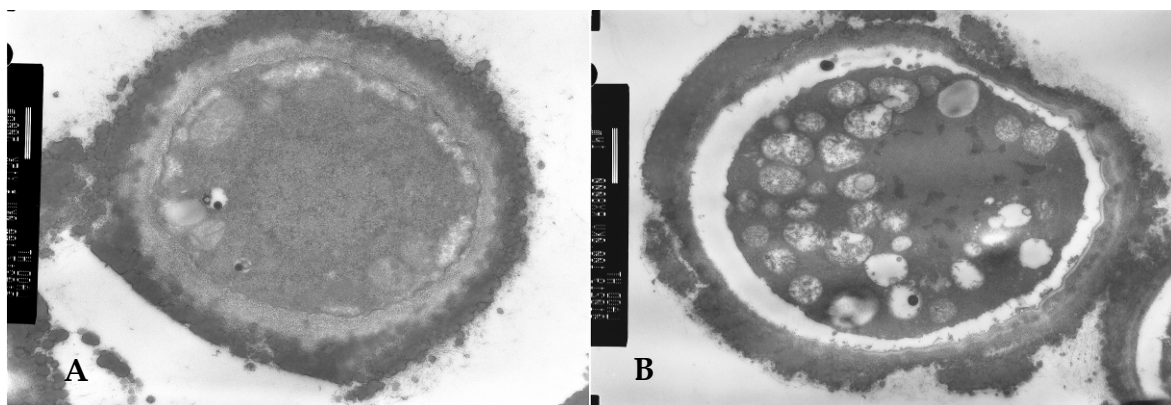


Figura 3.8 – Microfotografie di sezioni cellulari di *C. minteri* CCFEE 5187 non esposta ad irraggiamento UV-B (A) ($\times 15000$) ed esposta ad irraggiamento UV-B per 120 minuti ($\times 8000$)(B).

3.1.2.2. TEST DI GERMINAZIONE DOPO IRRAGGIAMENTO UV-C

In base ai risultati ottenuti con l'irraggiamento UV-B, l'isolato *C. antarcticus* CCFEE 515, dimostratosi più resistente, è stato esposto ad UV-C, ad un'irradianza di $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, per 5 tempi diversi pari a 1, 5, 30, 60 e 120 minuti (da 24 a $2880 \text{ J}/\text{m}^2$).

La curva di germinazione dei propaguli, provenienti dalla colonia essiccata sottoposta alla radiazione UV-C, mostra una progressiva diminuzione, all'aumentare della dose ricevuta, della percentuale di vitalità (fig. 3.9).

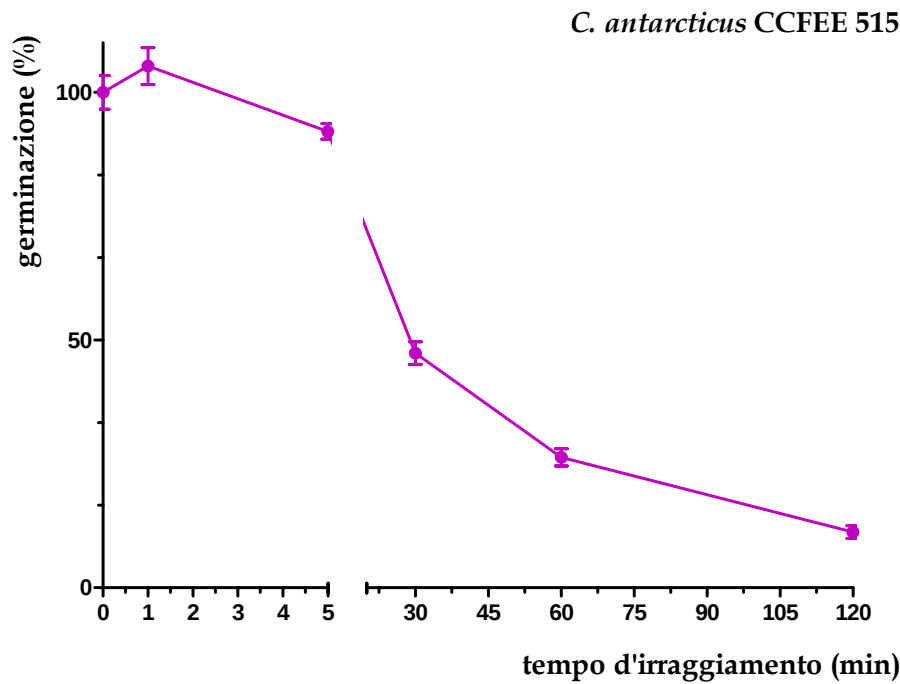


Figura 3.9 – Germinazione dei propaguli di *C. antarcticus* CCFEE 515 sottoposto ad irraggiamento UV-C (irradianza $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) per 1, 5, 30, 60 e 120 minuti.

In particolar modo, la curva mostra un brusco decremento della germinazione tra 5 ed 30 minuti di esposizione corrispondenti, rispettivamente, a 120 e 720 J/m² con un effetto letale che raggiunge il 50%; nonostante ciò, in risposta alla dose massima ricevuta di 2880 J/m², una percentuale pari all'11,2% dei propaguli mostra di essere ancora vitale.

3.1.3. STRESS OSMOTICO

Gli isolati sono stati saggiati per la resistenza allo stress osmotico coltivandoli su terreno di coltura (MEA 2%) addizionato con concentrazioni di NaCl progressive, con incrementi del 2-3,5%, fino alla concentrazione di 27% (w/v) di sale.

In tabella 3.5 sono riportate le osservazioni sulla crescita delle microcolonie di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e CCFEE 534) e *C. minteri* (CCFEE 5187) cresciute su terreno colturale addizionato con concentrazioni progressivamente maggiori di NaCl, dopo 4, 7 e 10 settimane di incubazione.

Tabella 3.5 – Valutazione della crescita delle colture di *C. antarcticus* CCFEE 515, 534 e *C. minteri* CCFEE 5187, dopo 4, 7 e 10 settimane di incubazione su MEA2 a differenti concentrazioni di NaCl (0-27%).

Isolato	tempo (sett.)	0%	3.5%	7%	10%	13%	16%	19%	22%	24%	27%
<i>Cryomyces minteri</i> CCFEE 5187	4	+++	+++ –	++ –	+	++ –	++	++	++ –	+	-
	7	+++	+++	++ –	+	++ –	++	++	++ –	+	-
	10	++++	++++	+++ –	++ –	++	+++	+++ –	++ –	+	-
<i>Cryomyces antarcticus</i> CCFEE 534	4	+++	++ – –	++ – –	++ – –	+	+	++ –	+ –	++ – –	-
	7	+++	++	++	++	++	++	++	+++ – –	++	-
	10	+++	++	++	++	++ –	++ –	+++ –	++ –	++	-
<i>Cryomyces antarcticus</i> CCFEE 515	4	+++	+++ –	++	++	+	++	++	+	++	-
	7	+++	+++ –	+++ –	++	+++ –	+++ –	++	++	++	-
	10	+++	+++	++	++	++	+++	+++ – –	++	+++ – –	-

Legenda: ++++ molto buona; +++ buona; ++ sufficiente (moderata); + bassa; - nessuna.

Tutti gli isolati sono in grado di crescere nell'intervallo di concentrazione 0-24%, mostrando sempre colonie compatte, umide e burrose, senza diventare mai crostose, come testimoniato dalle immagini relative riportate nelle figg. 3.10, 3.11 e 3.12; le colonie raggiungono, anche nei casi limite, dimensioni sufficienti, diverse dall'inoculo, per essere misurate. Soltanto *C. minteri* CCFEE 5187, che risente maggiormente dell'alta concentrazione salina, manifesta una bassa crescita alla concentrazione pari al 24% di NaCl (tab. 3.5).

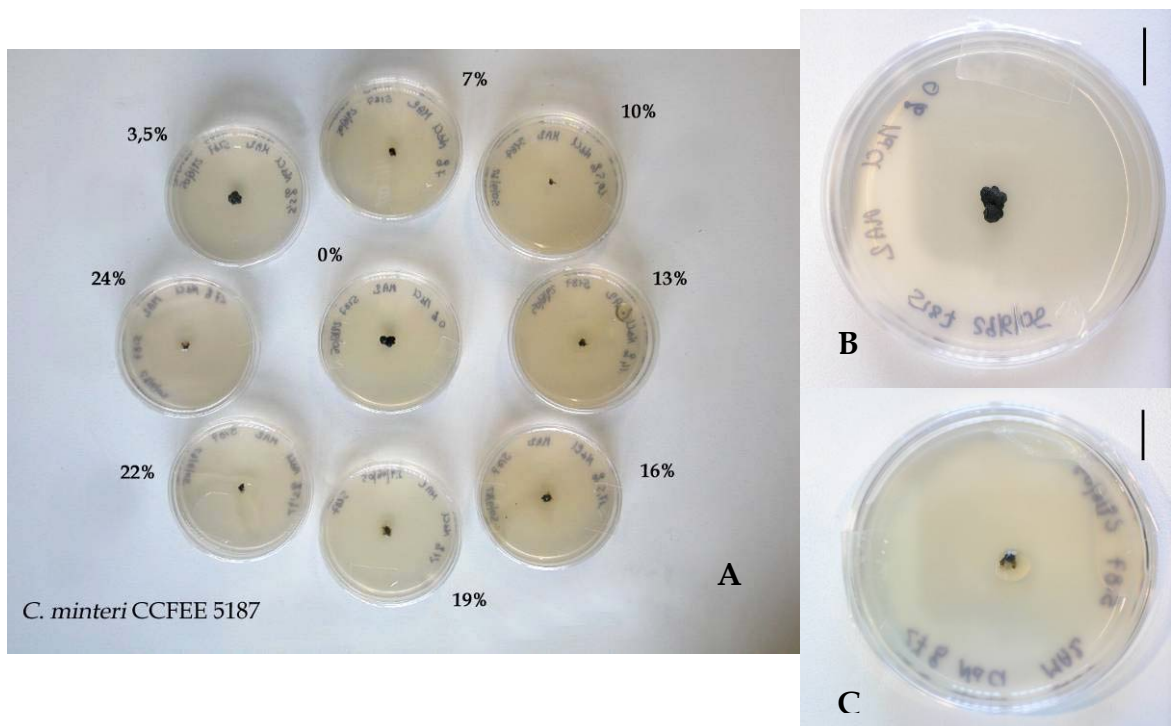


Figura 3.10 – (A) Colture di *C. minteri* CCFEE 5187 coltivate su MEA2 senza e con NaCl. (B) *C. minteri* CCFEE 5187 con 0% di NaCl e (C) con il 24% di NaCl (barra = 10 mm).

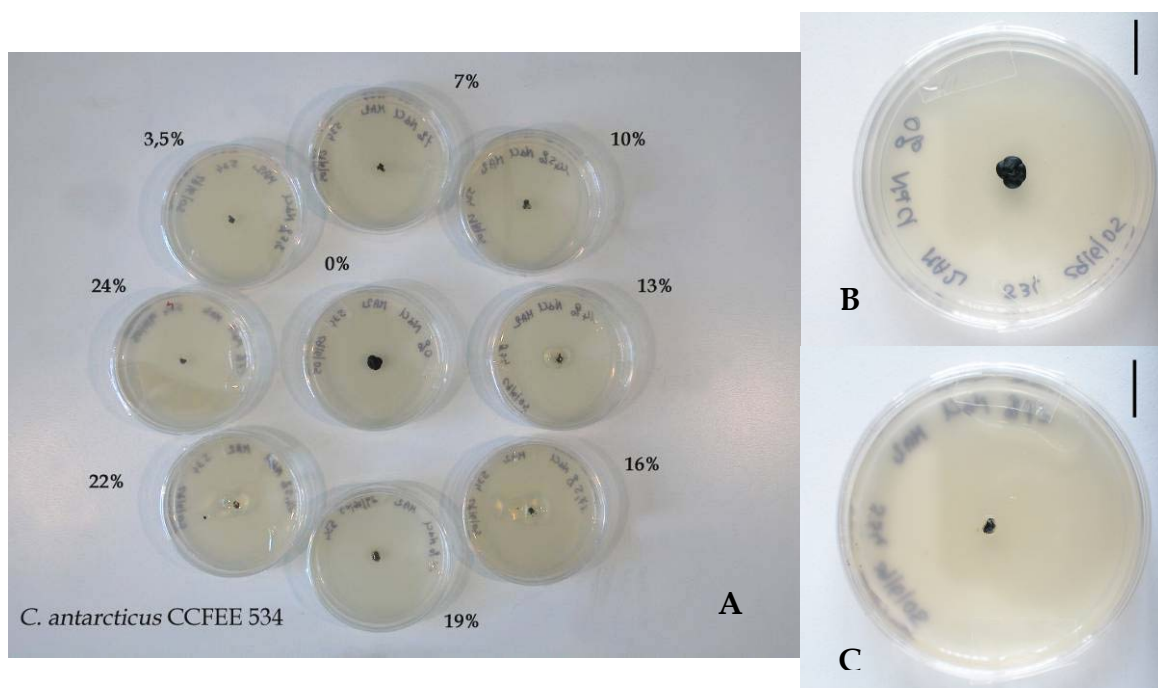


Figura 3.11 – (A) Colture di *C. antarcticus* CCFEE 534 coltivate su MEA2 senza e con NaCl. (B) *C. antarcticus* CCFEE 534 con 0% di NaCl e (C) con il 24% di NaCl (barra = 10 mm).

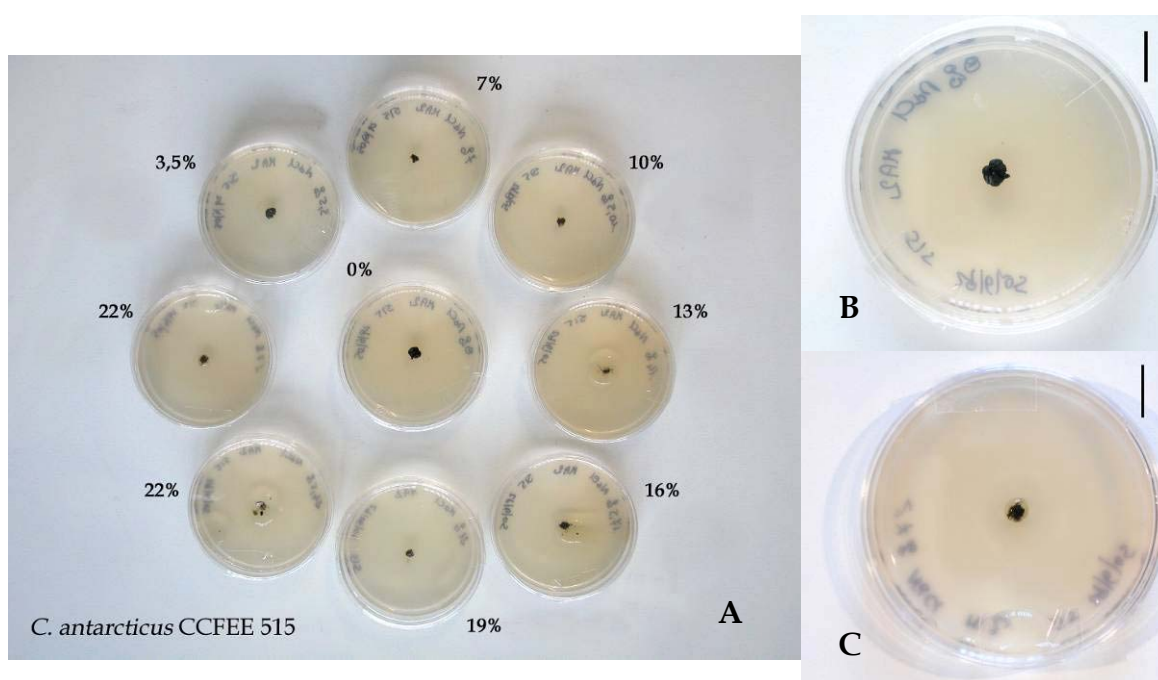


Figura 3.12 – (A) Colture di *C. antarcticus* CCFEE 515 coltivate su MEA2 senza e con NaCl. (B) *C. antarcticus* CCFEE 515 con 0% di NaCl e (C) con il 24% di NaCl (barra = 10 mm).

Dalla tabella 3.5 emerge come la presenza del sale inibisca la crescita di tutti gli isolati, in maniera più marcata a partire dal 7% di NaCl addizionato; nonostante ciò, tutti gli isolati mostrano comunque una buona tolleranza allo stress osmotico,

riuscendo a crescere, sebbene con difficoltà, anche con il 24% di NaCl (fig. 3.13). Nessuna crescita è invece stata osservata a concentrazioni superiori al 24% di NaCl.

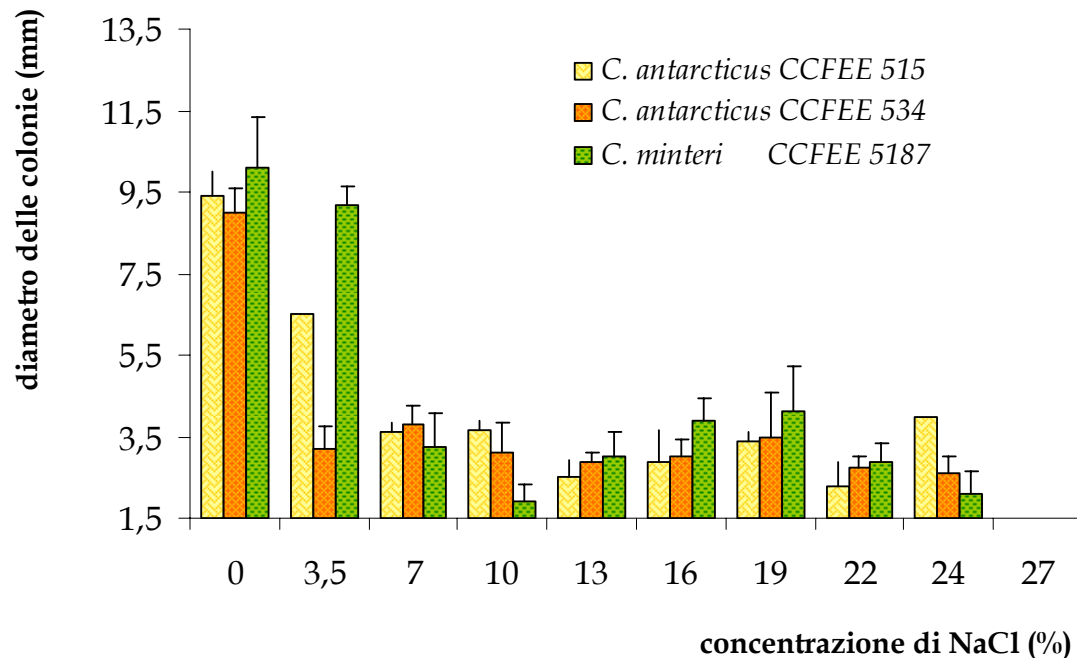


Figura 3.13 – Crescita di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) (diam delle colonie in mm) su MEA 2%, dopo 10 settimane di incubazione a 15°C con (3,5-27%) e senza NaCl (0%).

Le osservazioni microscopiche effettuate al SEM (fig. 3.14) hanno evidenziato la presenza, negli isolati cresciuti con il 24% di NaCl addizionato, di notevoli strati di EPS (Extra-cellular Polymeric Substance) a ricoprire la superficie delle pareti cellulari e dell'intera colonia. La presenza di EPS è però una costante nei funghi meristemati, dal momento che queste sostanze vengono prodotte dai funghi anche quando non sottoposti a condizioni di stress (SELBMANN *et al.*, 2005).

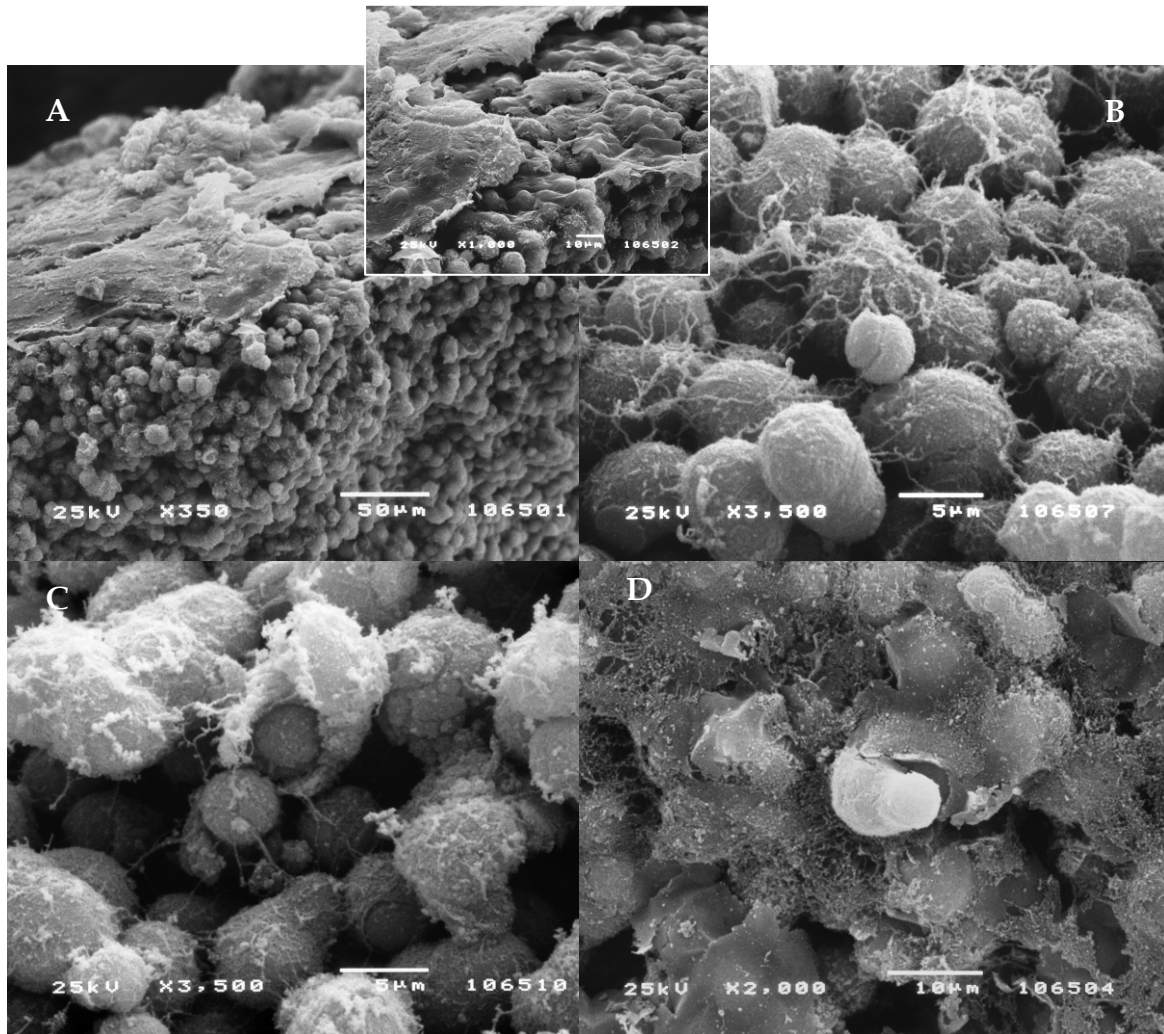


Figura 3.14 – Osservazioni al SEM di *C. minteri* CCFEE 5187 e *C. antarcticus* CCFEE 534 su MEA2 addizionato con il 24% di NaCl. Produzione di sostanze extracellulari di un frammento di colonia di *C. minteri* CCFEE 5187, con ingrandimento relativo alla multistratificazione delle EPS (A) e sulla superficie di *C. antarcticus* CCFEE 534 (B). Cellule di *C. antarcticus* CCFEE 534 (C) e cellula gemmante di *C. minteri* CCFEE 5187 (D) circondate da uno strato compatto di matrice extracellulare.

Nel contempo le immagini al TEM (fig. 3.15) hanno mostrato, in isolati cresciuti con NaCl addizionato, rispetto al controllo, la presenza di una contrazione della membrana plasmatica, dovuta allo squilibrio osmotico, senza la formazione, però, di alcun scollamento dalla parete cellulare, contrariamente a ciò che si verificava in seguito all'esposizione UV-B, come indicato dallo spazio ben delimitato ed elettrondenso che la circonda (fig. 3.15-A2, B2, C2). All'interno della cellula, inoltre, si assiste, questa volta analogamente all'esposizione alla radiazione

ultravioletta, alla formazione intracellulare di globuli, ben delimitati, che giungono, a volte, ad occupare quasi l'intero spazio intracellulare (fig. 3.15 C2).

È di notevole interesse la presenza di una elevata quantità di melanina nei trattati e nel controllo, che copre la spessa parete cellulare multistratificata.

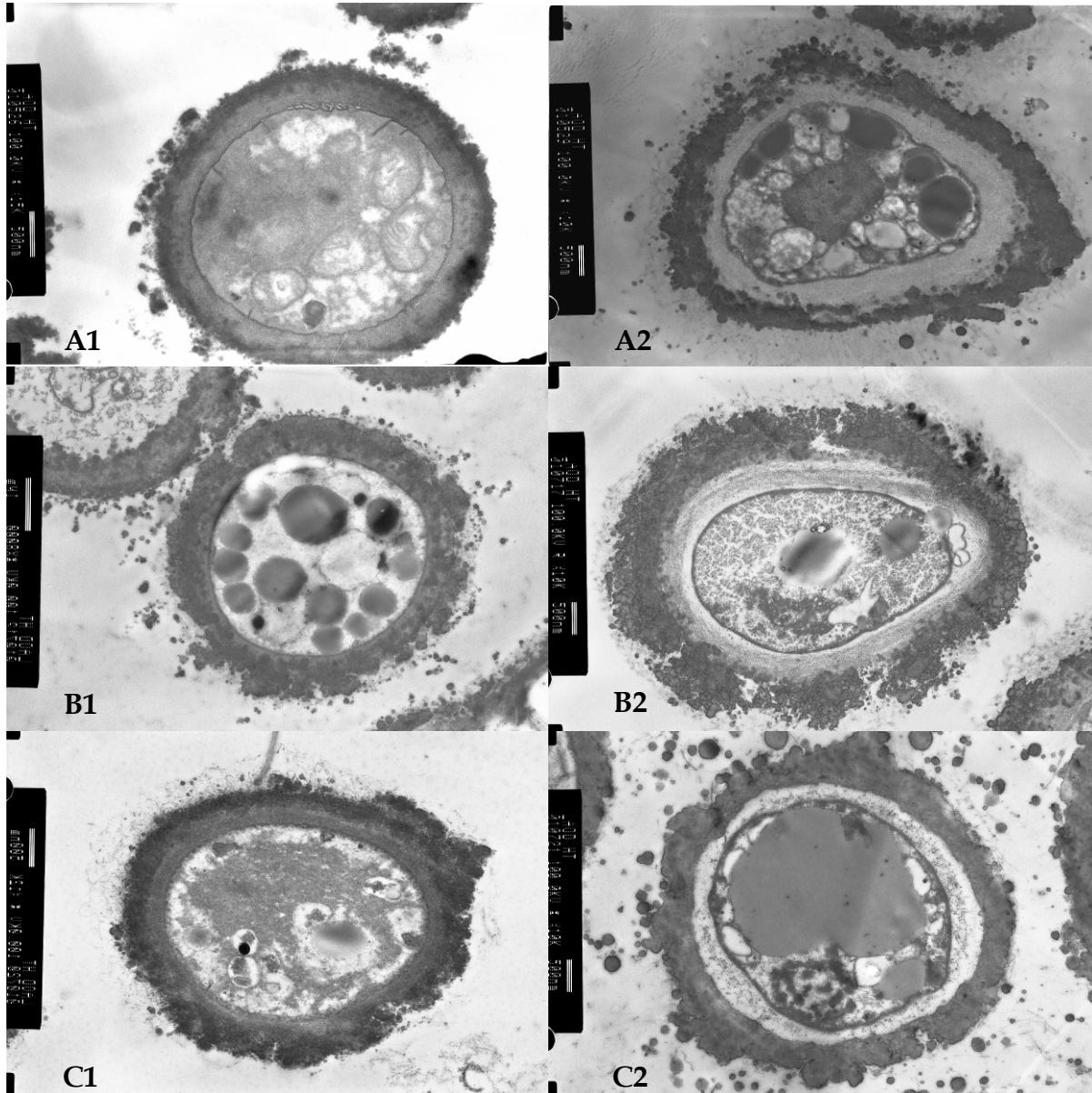


Figura 3.15 - Microfotografie al TEM di sezioni di microcolonia fungina cresciuta su MEA2 senza (A1, B1, C1) e con il 24% (A2, B2) e 22% (C2) di NaCl. (A1, A2) *C. antarcticus* CCFEE 534 ($\times 10000$); (B1, B2) *C. antarcticus* CCFEE 515 ($\times 8000$ in B1, $\times 10000$ in B2); (C1, C2) *C. minteri* CCFEE 5187 ($\times 12000$ in C1, $\times 10000$ in C2).

3.2. VITALITÀ DEGLI ISOLATI FUNGINI E DELLE ROCCE COLONIZZATE SOTTO CONDIZIONI SIMULATE SPAZIALI

Successivamente alle prove di resistenza alle basse temperature, allo stress osmotico e alla radiazione ultravioletta cui sono stati sottoposti alcuni campioni dei tre isolati di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e 534) e *C. minteri* (CCFEE 5187), cui si sono aggiunti campioni di roccia arenaria colonizzata, sono stati raccolti per selezionarne i più idonei all'esperimento LIFE (vedi par. 1.6). A questo scopo 39 campioni di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187), in stato essiccato, ed altrettanti di roccia colonizzata essiccata sono stati impiegati per la simulazione delle condizioni spaziali e marziane negli EVTs (*Experiment Verification Test*) compiuti, durante l'arco di due mesi, presso il DLR di Colonia (Germania).

Durante tali test preliminari, sono stati sottoposti a condizioni spaziali e marziane simulate riguardanti:

3. negli EVT-E1, in parallelo, vuoto (10^{-5} Pa per 1 ora ed 1 settimana), ripetuti cicli di temperatura (da -20°C a $+20^{\circ}\text{C}$ per due settimane), UV-C (254 nm a 10 Jm^{-2} , 100 Jm^{-2} e 1000 Jm^{-2}) e intero spettro UV (200-400 nm, lampada SOL 2000, a 1,5, $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^5\text{ kJm}^{-2}$);
4. negli EVT-E2, vuoto e, contemporaneamente, esposizione ad UV 200-400 nm (dose $1,5 \times 10^5\text{ kJm}^{-2}$) ed esposizione ad una miscela di gas, con composizione simile all'atmosfera marziana (elevata pressione parziale di CO_2) contemporaneamente ad UV 200-400 nm (dose $1,5 \times 10^5\text{ kJm}^{-2}$).

Vengono di seguito riportati i risultati delle prove di sopravvivenza agli EVT-E1 e EVT-E2, 13 in totale, valutata mediante metodi colturali per tutti gli isolati, e anche colorimetrici per *C. minteri* CCFEE 5187, in microscopia a fluorescenza.

3.2.1. EVT-E1 ED E2 SU ISOLATI FUNGINI

Per quanto i risultati siano migliori di qualunque aspettativa, nessun isolato fungino ha mostrato di poter sopravvivere e resistere a tutti i test di verifica effettuati al DLR. Su 13 test effettuati, rispetto ai controlli mantenuti in laboratorio, sono stati rilevati, mediante metodica colturale, 9 esiti positivi per i propaguli fungini di *C. antarcticus* CCFEE 515, 6 per quelli di *C. antarcticus* CCFEE 534 e 12 per quelli di *C. minteri* CCFEE 5187 (tab. 3.6).

Tabella 3.6 – Schema riassuntivo degli esiti di sopravvivenza dei campioni appartenenti ai tre isolati fungini d'interesse sottoposti ai 13 test di verifica presso il DLR di Colonia (EVT-E1 in rosso; EVT-E2 in nero).

	<i>C. antarcticus</i> CCFEE 515	<i>C. antarcticus</i> CCFEE 534	<i>C. minteri</i> CCFEE 5187
Controllo di laboratorio	+	+	+
UV-C (254 nm) 10 Jm ⁻²	+	+	+
UV-C (254 nm) 100 Jm ⁻²	+	+	+
UV-C (254 nm) 1000 Jm ⁻²	+	+	+
UV (200-400 nm) 1.5 kJm ⁻²	+	+	+
UV (200-400 nm) 1,5×10 ³ kJm ⁻²	-	-	+
UV (200-400 nm) 1,5×10 ⁵ kJm ⁻²	-	-	+
Vacuum 10 ⁻⁵ Pa/1 ora	+	+	+
Vacuum 10 ⁻⁵ Pa/1 sett.	+	-	+
50 cicli -20/+20°C /2 sett.	+	+	+
(Dark) Mars CO ₂ /20 gg	-	-	+
Mars CO ₂ + UV (200-400 nm) 1,5×10 ⁵ kJm ⁻²	+	-	+
(Dark) Vacuum/20 gg	+	-	+
Vacuum+UV (200-400 nm) 1,5×10 ⁵ kJm ⁻²	-	-	-

3.2.1.1. EVT-E1

3.2.1.1.1. IL VUOTO

I risultati della sopravvivenza, dei tre isolati saggiati, a condizioni simulate di vuoto totale per 1 ora ed 1 settimana, sono riportati in figura 3.16. Dopo due mesi di incubazione su MEA a 15°C, se i due isolati di *C. antarcticus* mostrano una marcata scarsa capacità di accrescersi (*C. antarcticus* CCFEE 534 non cresce dopo 1 settimana di vuoto), *C. minteri* CCFEE 5187 invece non solo si accresce, ma sembra essere addirittura stimolato; la figura 3.16 indica infatti la presenza di un maggior numero di colonie sviluppatesi nei trattati rispetto al controllo.

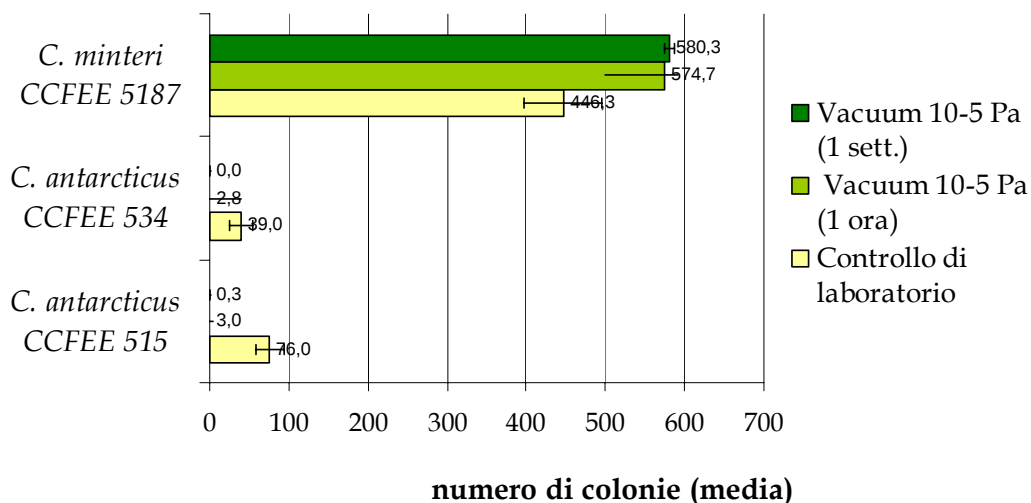


Figura 3.16 – Numero di colonie di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) accresciutesi su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, sottoposti in stato essiccato, in controlli e trattati dopo simulazione delle condizioni di vuoto per 1 ora ed 1 settimana.

3.2.1.1.2. EFFETTI DEI CICLI DI TEMPERATURA

I risultati della sopravvivenza dei tre isolati saggiati a 50 ripetuti cicli di congelamento a -20°C e scongelamento a $+20^{\circ}\text{C}$ nell'arco di due settimane sono riportati in figura 3.17. Dopo due mesi di incubazione su MEA a 15°C i tre isolati mostrano risposte diverse. *C. antarcticus* CCFEE 515 perde quasi la capacità di accrescersi, *C. minteri* CCFEE 5187 risulta fortemente indebolito e, pur crescendo, produce un numero di colonie pari al 48% del controllo, mentre *C. antarcticus* CCFEE 534, pur producendo un basso numero di colonie, mostra un incremento numerico medio, rispetto al controllo, del 22% circa.

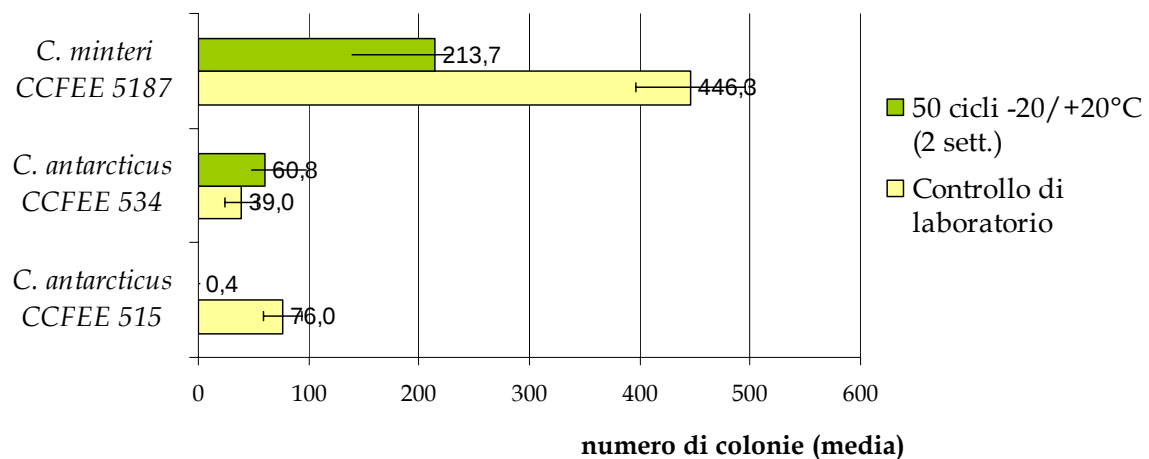


Figura 3.17 – Numero di colonie di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C , sottoposti in stato essiccato, dopo 50 cicli di temperatura da -20°C a $+20^{\circ}\text{C}$, effettuati per due settimane, rispetto ai controlli di laboratorio.

3.2.1.1.3. EFFETTI DELLA RADIAZIONE UV

Nelle figure 3.18 e 3.19 vengono riportati i risultati della sopravvivenza dei tre isolati saggiati a dosi progressivamente maggiori sia di irraggiamento dell'intero spettro solare (SOL 2000) (fig. 3.18) che UV-C (fig. 3.19). Dopo due mesi di incubazione su MEA a 15°C i tre isolati mostrano risposte diverse. L'isolato *C. antarcticus* CCFEE 515 fornisce le risposte peggiori, mostrando sempre una diminuzione nel numero di colonie totali rispetto al controllo, seppur leggermente diversa tra i due tipi di irraggiamento e tra le diverse dosi. L'isolato *C. antarcticus* CCFEE 534 non fornisce una risposta lineare; perde la capacità di accrescersi quando irraggiato con l'intero spettro solare alle dosi di $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^5$ kJm⁻², mentre è stimolato dalla dose più bassa; è leggermente inibito dalle dosi di 10 e 100 Jm⁻² di UV-C mentre è fortemente stimolato dalla dose maggiore pari a 1000 Jm⁻². L'isolato *C. minteri* CCFEE 5187 infine, producendo un numero di colonie medio quasi sempre superiore al controllo, mostra di essere addirittura stimolato da entrambi gli irraggiamenti.

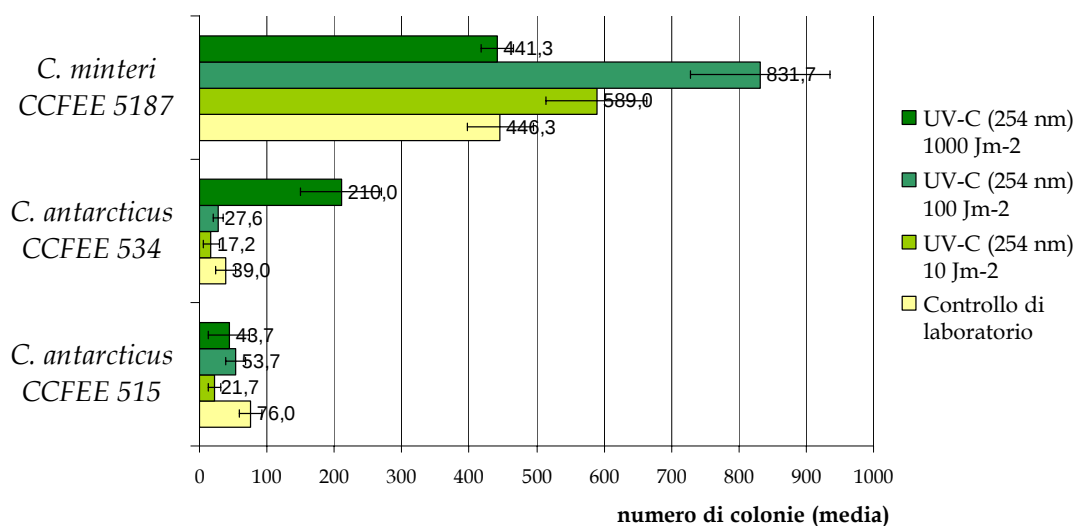


Figura 3.18 – Numero di colonie di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, sottoposti in stato essiccato, alle dosi UV-C di 10, 100 e 1000 Jm⁻² rispetto ai controlli di laboratorio.

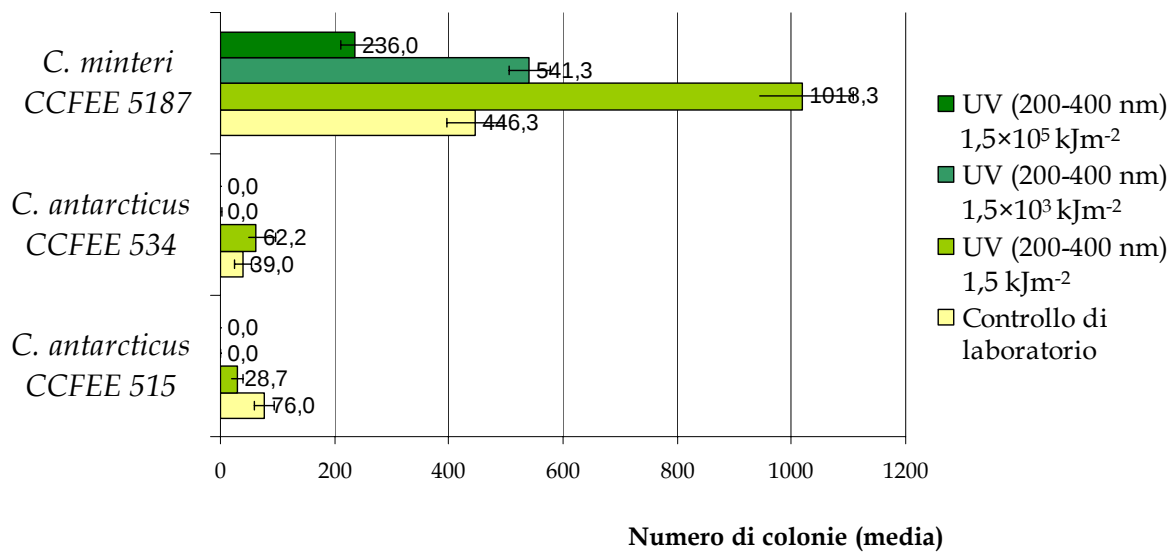


Figura 3.19 – Numero di colonie di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, sottoposti in stato essiccato, alle dosi UV 200-400 nm di 1,5, $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ rispetto ai controlli di laboratorio.

3.2.1.2. EVT-E2

3.2.1.2.1. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE COMBINATA DEL VUOTO CON LA RADIAZIONE UV 200-400 nm E DELL'ATMOSFERA SIMULATA MARZIANA CON LA RADIAZIONE UV 200-400 nm

Notevoli sono stati i risultati relativi alla combinazione dei parametri test vuoto e atmosfera marziana simulata (Mars CO₂) con l'intera radiazione UV 200-400 nm di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$. Soltanto *C. minteri* CCFEE 5187 ha risposto positivamente sia ai controlli al buio, dark vacuum e Mars CO₂, sia alla combinazione della condizione simulata marziana con la dose massima di UV 200-400 nm, mentre i dati positivi per *C. antarcticus* CCFEE 515 si sono limitati alla combinazione dell'atmosfera marziana simulata con la radiazione ultravioletta 200-400 nm ed infine nessuna vitalità è stata riscontrata per i trattati di *C. antarcticus* CCFEE 534 (fig. 3.20).

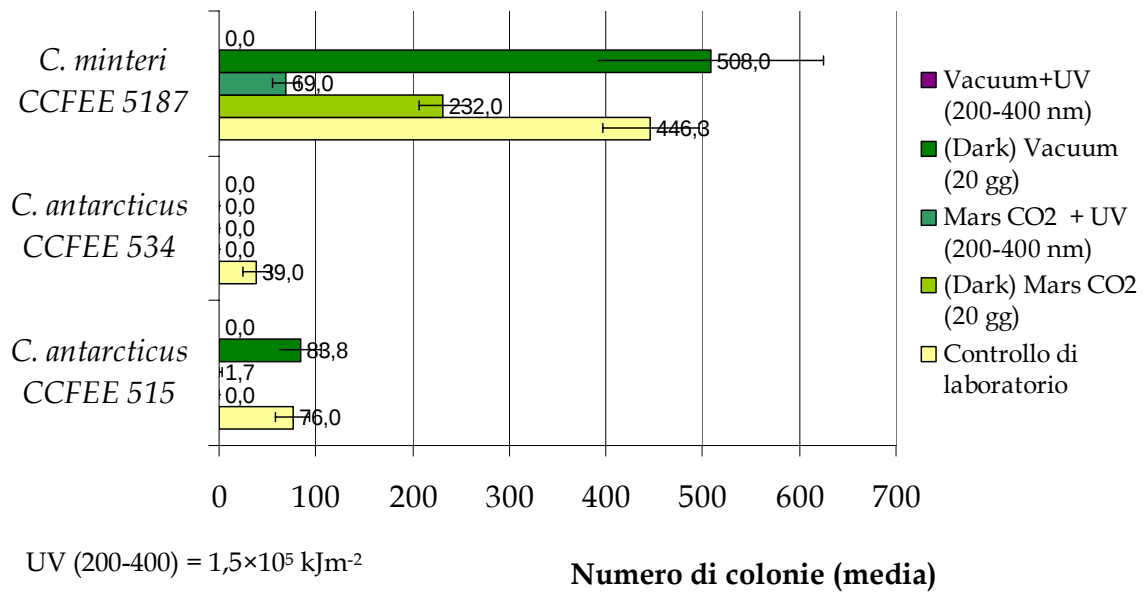


Figura 3.20 – Numero di colonie di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, sottoposti in stato essiccato, alle condizioni combinate di vuoto (10^{-5} Pa) e dosi UV 200-400 nm di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ e a condizioni marziane e dosi UV 200-400 nm di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$, rispetto ai controlli al buio e di laboratorio.

Riassumendo, i dati relativi finora riportati hanno rivelato che soltanto l'isolato *C. minteri* CCFEE 5187 ha dimostrato di poter fronteggiare la quasi totalità dei 13 test in programma. L'isolato ben resiste sia ai singoli test (EVT-E1), come a quelli combinati (EVT-E2), sebbene nel test di esposizione al vuoto e alla massima dose di UV (200-400 nm) non si sia avuta apparentemente alcuna sopravvivenza (fig. 3.21, 3.22 e 3.23).

EVT - E1

*C. minteri* CCFEE 5187

Controllo di laboratorio

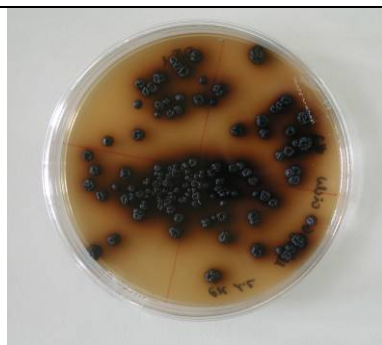
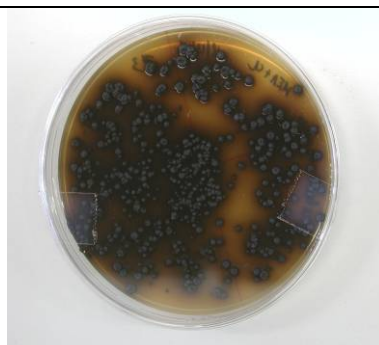
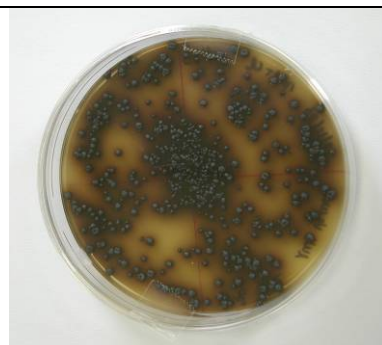
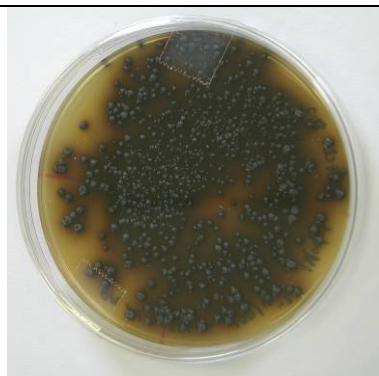
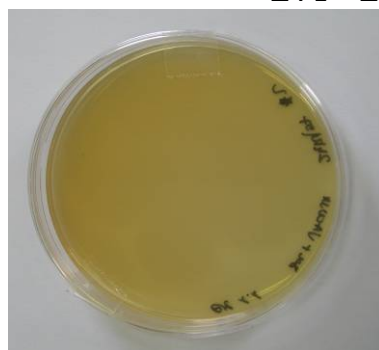
50 cicli di temperatura
-20/+20°CVuoto (10^{-5} Pa) - 1 hVuoto (10^{-5} Pa) - 1 sett.UV-C 10 Jm^{-2} UV-C 100 Jm^{-2} UV-C 1000 Jm^{-2} UV 200-400 1,5 kJm^{-2} UV 200-400 1,5 $\times 10^3$ kJm^{-2} UV 200-400 1,5 $\times 10^5$ kJm^{-2}

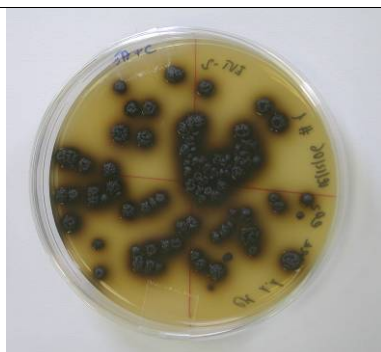
Figura 3.21 – Verifiche colturali su MEA a 15°C agli EVT-E1 di *C. minteri* CCFEEE 5187 rispetto al controllo di laboratorio.

EVT - E2

Vuoto (10^{-5} Pa) – 20 gg



*Vuoto (10^{-5} Pa) – 20 gg
+ UV 200-400 $1,5 \times 10^5$ kJm⁻²*



Mars CO₂ – 20 gg



*Mars CO₂ – 20 gg +
UV 200-400 $1,5 \times 10^5$ kJm⁻²*

*Figura 3.22 – Verifiche colturali su MEA a 15°C agli EVT-E2 di
C. minteri CCFEEE 5187 rispetto al controllo di laboratorio*

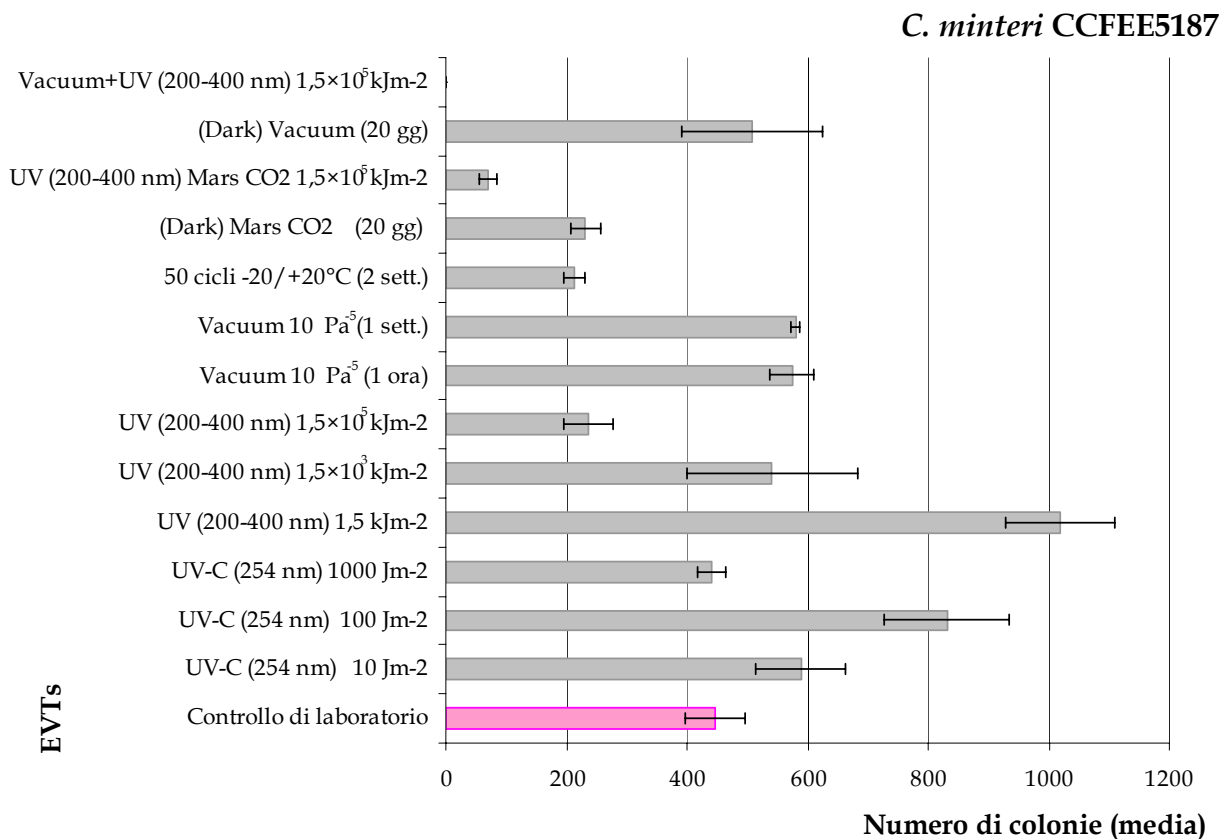


Figura 3.23 – Quadro riassuntivo della crescita in percentuale rispetto al numero di propaguli seminati di *C. minteri* (CCFEE 5187) su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, sottoposto essiccato, alle condizioni degli EVT's rispetto al controllo di laboratorio.

Diversamente sia *C. antarcticus* CCFEE 515 che *C. antarcticus* CCFEE 534 mostrano di saper resistere ad un numero inferiore di test di verifica. *C. antarcticus* CCFEE 515 a 9 su 13 test: UV-C (254 nm) con dosi di 10 Jm^{-2} , 100 Jm^{-2} e 1000 Jm^{-2} , l'intero spettro UV (200-400 nm) alla dose di $1,5 \text{ kJm}^{-2}$, i 50 cicli di temperatura (-20/+20°C), il vuoto (10^{-5} Pa) per 1 ora, 1 settimana e 20 giorni e la combinazione della dose $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ con l'atmosfera marziana simulata.

Mentre *C. antarcticus* CCFEE 534 resiste a 7 su 13 test: UV-C (254 nm) con dose 10 Jm^{-2} , 100 Jm^{-2} e 1000 Jm^{-2} , intero spettro UV (200-400 nm) alla dose di $1,5 \text{ kJm}^{-2}$, 50 cicli di temperatura (-20/+20°C) e vuoto (10^{-5} Pa) per 1 ora. Anche per questo isolato i test risultati positivi a cicli, vuoto e dose di UV 200-400 nm sembrano stimolarne la crescita rispetto al controllo (fig. 3.24).

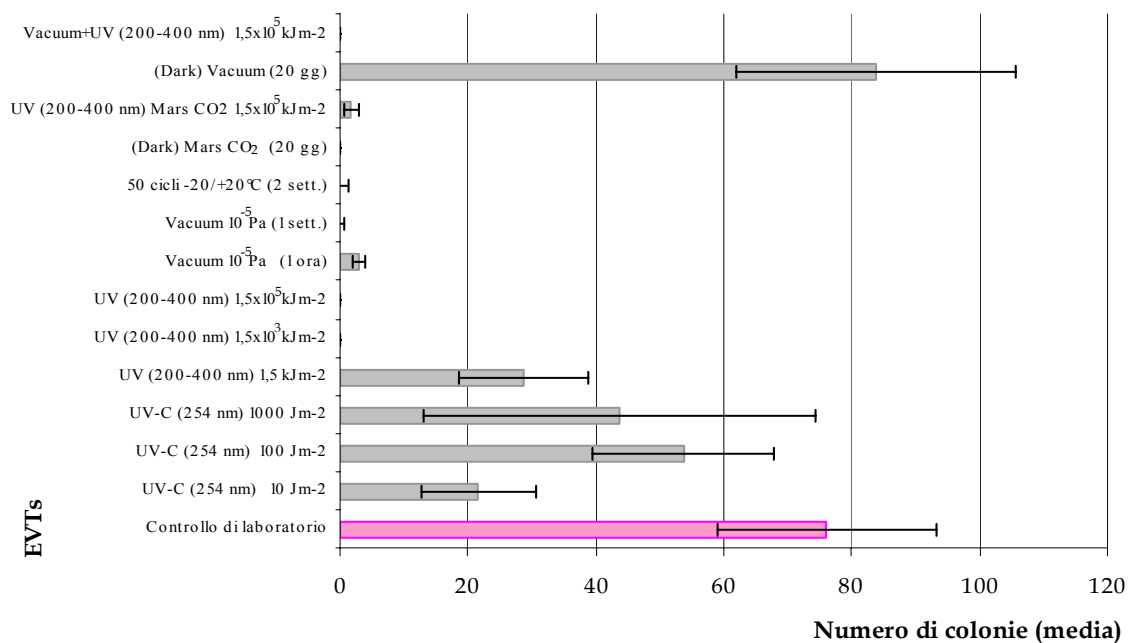
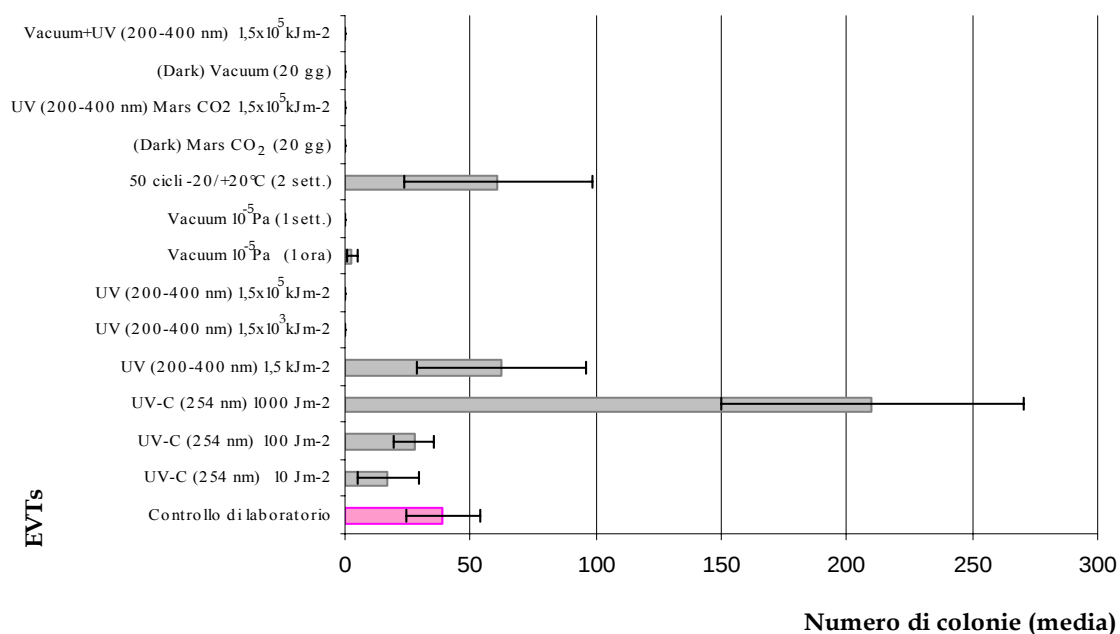
C. antarcticus CCFEE 515*C. antarcticus* CCFEE 534

Figura 3.24 – I risultati di sopravvivenza su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, rispetto al controllo di laboratorio, ai test EVT di *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 messi a confronto.

3.2.1.3. SAGGI COLORIMETRICI

La possibilità di poter applicare metodiche colorimetriche, in microscopia a fluorescenza, all'isolato *C. minteri*, mediante L'utilizzo dei fluorocromi FUN 1 e SYTOX Green che si legano agli acidi nucleici, ha permesso di verificare *in vivo* l'attendibilità dei dati ottenuti con le prove colturali.

SAGGI COLORIMETRICI DI VITALITÀ DI *C. MINTERI* CCFEE 5187

In figura 3.25 sono riportati i risultati di vitalità ricavati dall'elaborazione delle immagini delle colorazioni con FUN 1. Le buone percentuali di vitalità misurate in tutti i test confermano le risposte positive ottenute con le prove colturali e quindi l'ottima resistenza dell'isolato ad entrambi gli EVT. E' inoltre osservabile un effetto stimolante di alcuni trattamenti (UV 254 nm 100 Jm⁻², UV 200-400 nm 1,5, 1,5×10³ e 1,5×10⁵ kJm⁻², vuoto 10⁻⁵ Pa per 1 ora e 1 settimana, cicli a -20/+20°C), come evidenziato dalle maggiori percentuali di vitalità dei trattati rispetto al controllo, anche se non sempre tali risultati sono sovrapponibili con i test colturali precedenti.

Particolarmente rilevante è il dato ottenuto per il test combinato di vuoto e massima radiazione UV 200-400 nm, che con le tecniche colturali non aveva dato esito positivo. La vitalità dimostrata per tale test sembra essere, in questo caso, comparabile con quella del controllo.

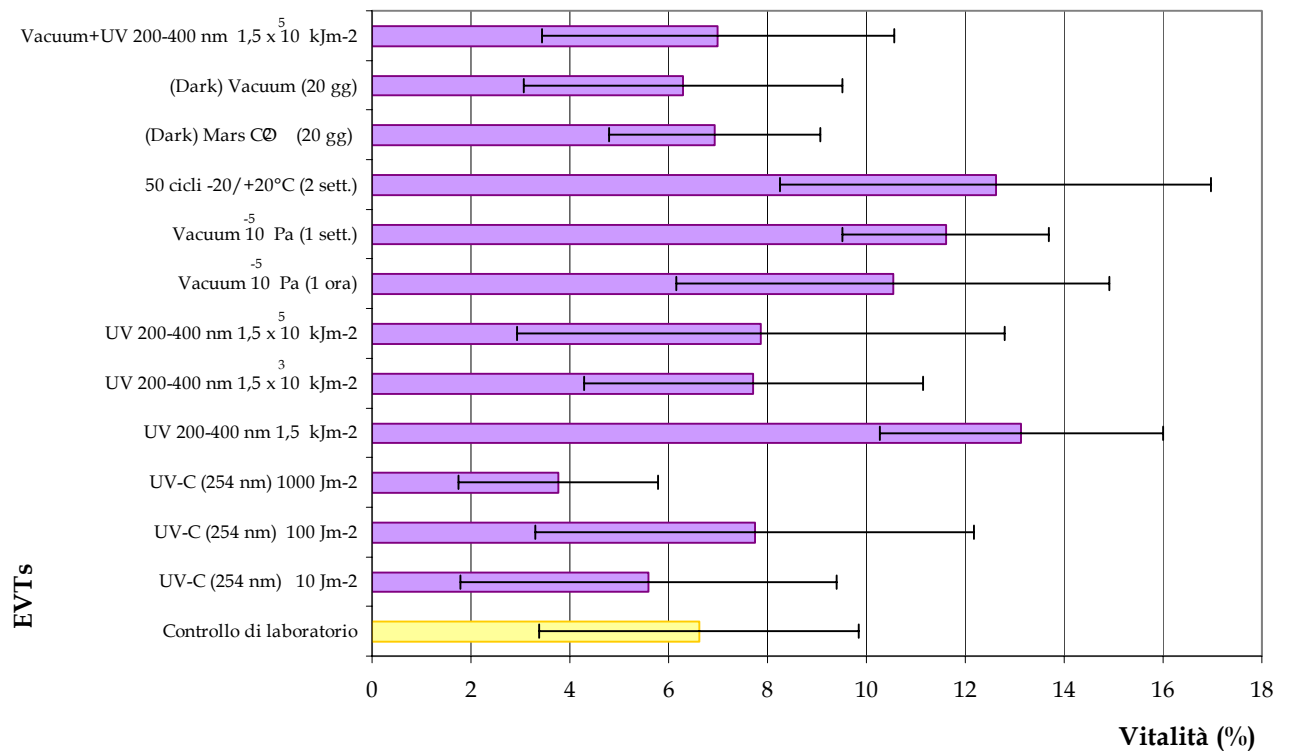


Figura 3.25 – Stima della vitalità cellulare di *C. minteri* CCFEE 5187 relativa agli EVT mediante l'utilizzo del colorante fluorescente FUN 1 in vivo.

Si riporta di seguito un esempio rappresentativo di analisi d'immagine relativo alla colorazione vitale con FUN 1 di una sezione di un campione di *C. minteri* trattato con UV-C alla dose di 100 Jm⁻² (EVT-E1) (figg. 3.26-30).

In figura 3.26 è riportata la sezione della colonia fotografata in campo chiaro, suddivisa in più immagini relative a diverse porzioni della stessa. In figura 3.27 è riportata la stessa sezione nel canale del rosso che mostra l'emissione della fluorescenza verde delle cellule vitali. In figura 3.28 è riportata la sezione fotografata nel canale del verde che mostra l'emissione della fluorescenza rossa delle cellule metabolicamente attive.

In figura 3.29 è mostrata la sovrapposizione dei due canali verde e rosso ed infine in figura 3.30 la sovrapposizione in campo chiaro della fluorescenza verde e rossa per l'osservazione della percentuale di cellule fluorescenti sulle totali.

Se le figure relative alle emissioni mostrano una fluorescenza diffusa dell'intero campione, una stima approssimativa della vitalità ed attività metabolica cellulare può essere ottenuta dall'osservazione della sovrapposizione delle due

fluorescenze, meglio visibile in campo chiaro. Si tratta però di una valutazione soggettiva e difficilmente quantificabile. I risultati effettivamente validi sono quelli forniti dalla elaborazione al computer delle immagini ottenute.

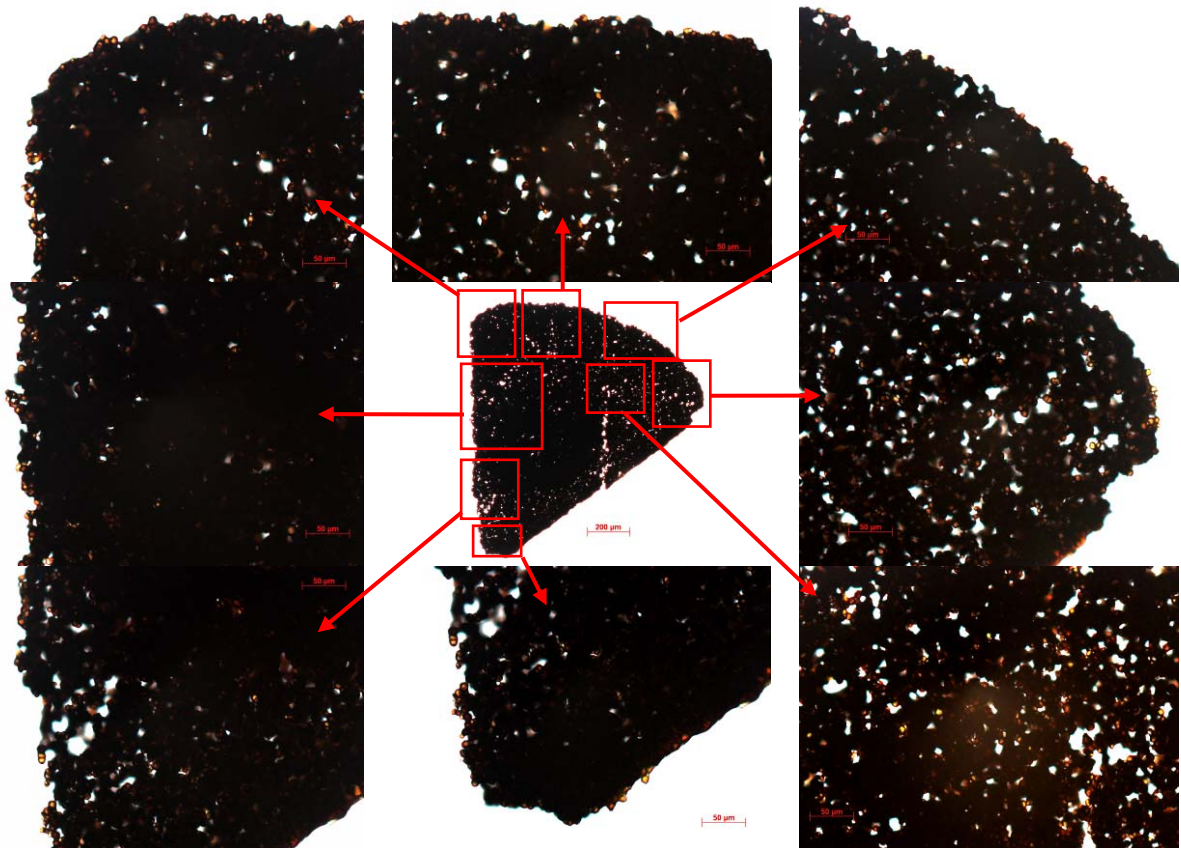


Figura 3.26 – Mappatura di una sezione di 25 μm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV-C alla dose di 100 Jm^{-2} in microscopia in campo chiaro (barra = 50 μm e 200 μm per quella centrale).

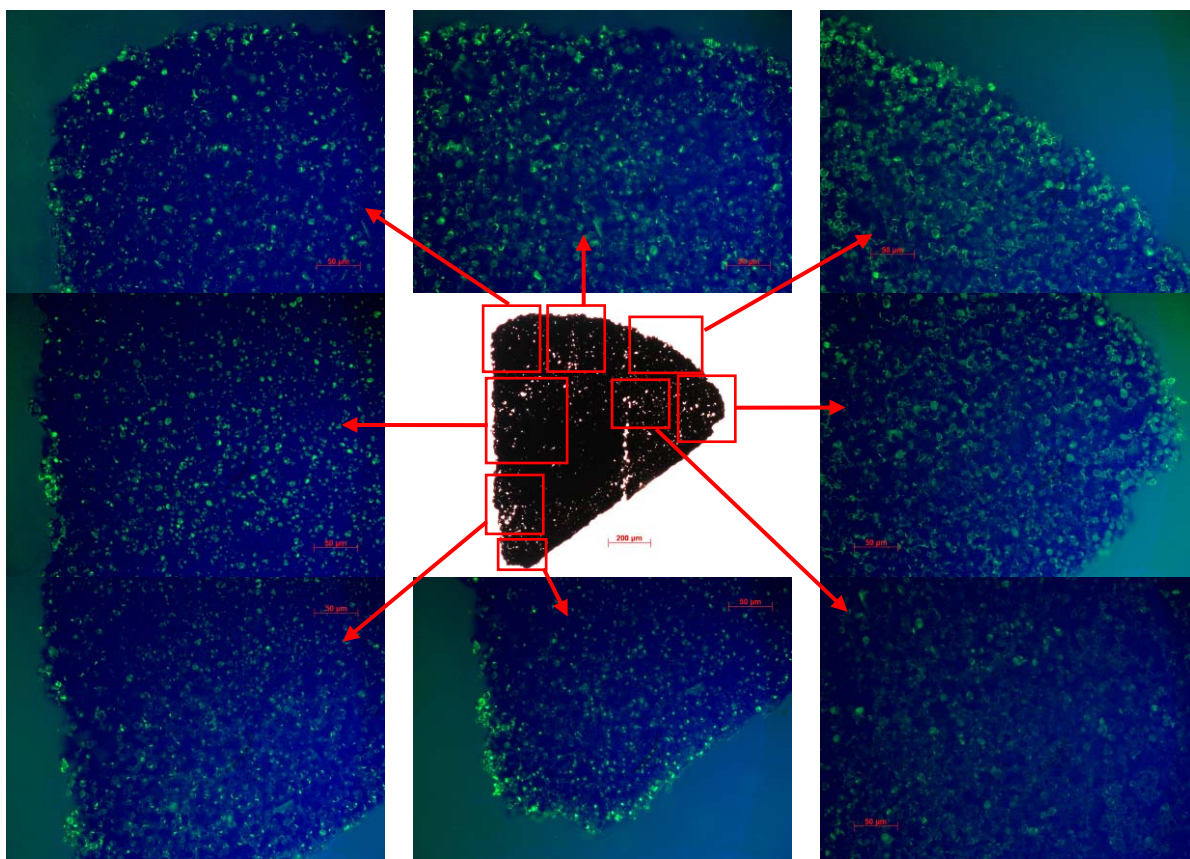


Figura 3.27 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV-C alla dose di 100 Jm⁻² in microscopia a fluorescenza nel canale del rosso (emissione verde) con eccitazione a 488 e filtro per la fluoresceina per il rilevamento delle cellule vitali (barra = 50 µm e 200 µm per quella centrale).

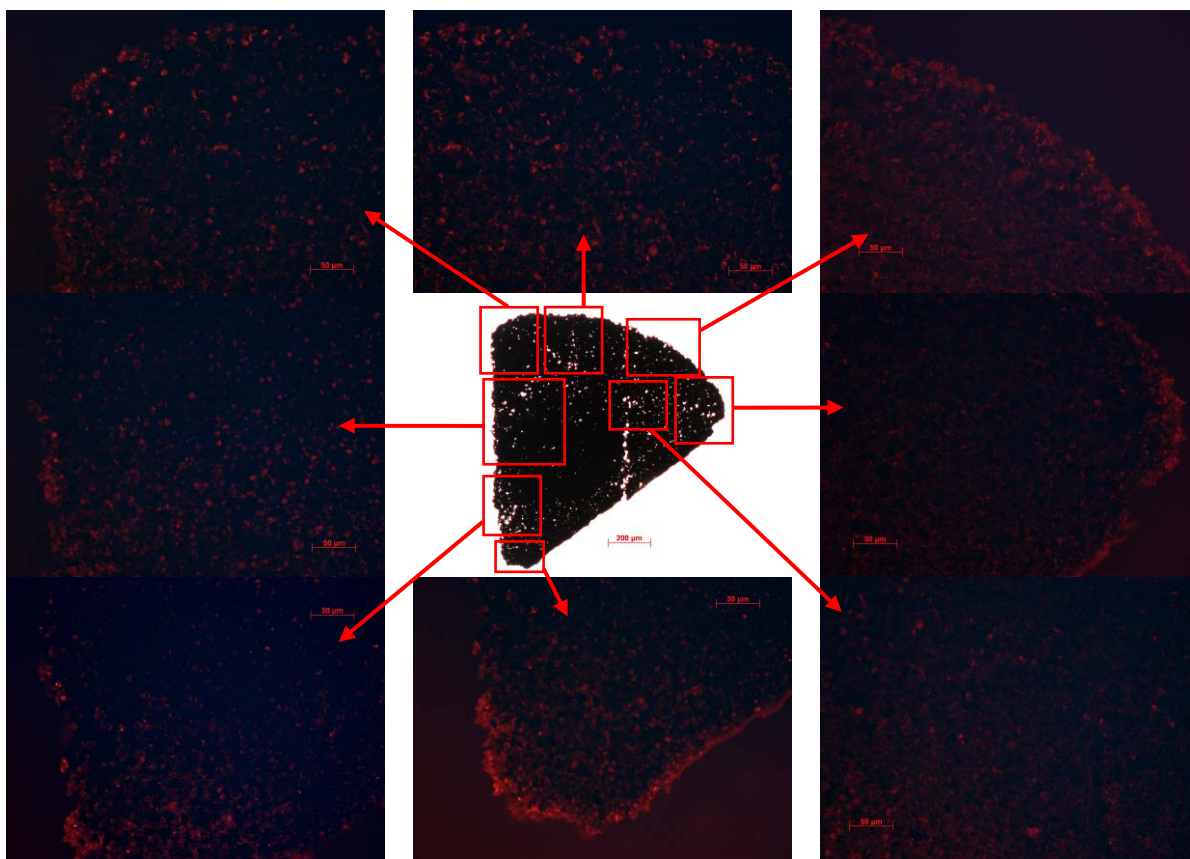


Figura 3.28 – Porzioni di sezione di 25 μm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV-C alla dose di 100 Jm^{-2} in microscopia a fluorescenza nel canale del verde (emissione rossa) eccitazione a 546 nm e filtro per la rodamina per il rilevamento delle cellule metabolicamente attive (barra = 50 μm e 200 μm per quella centrale).

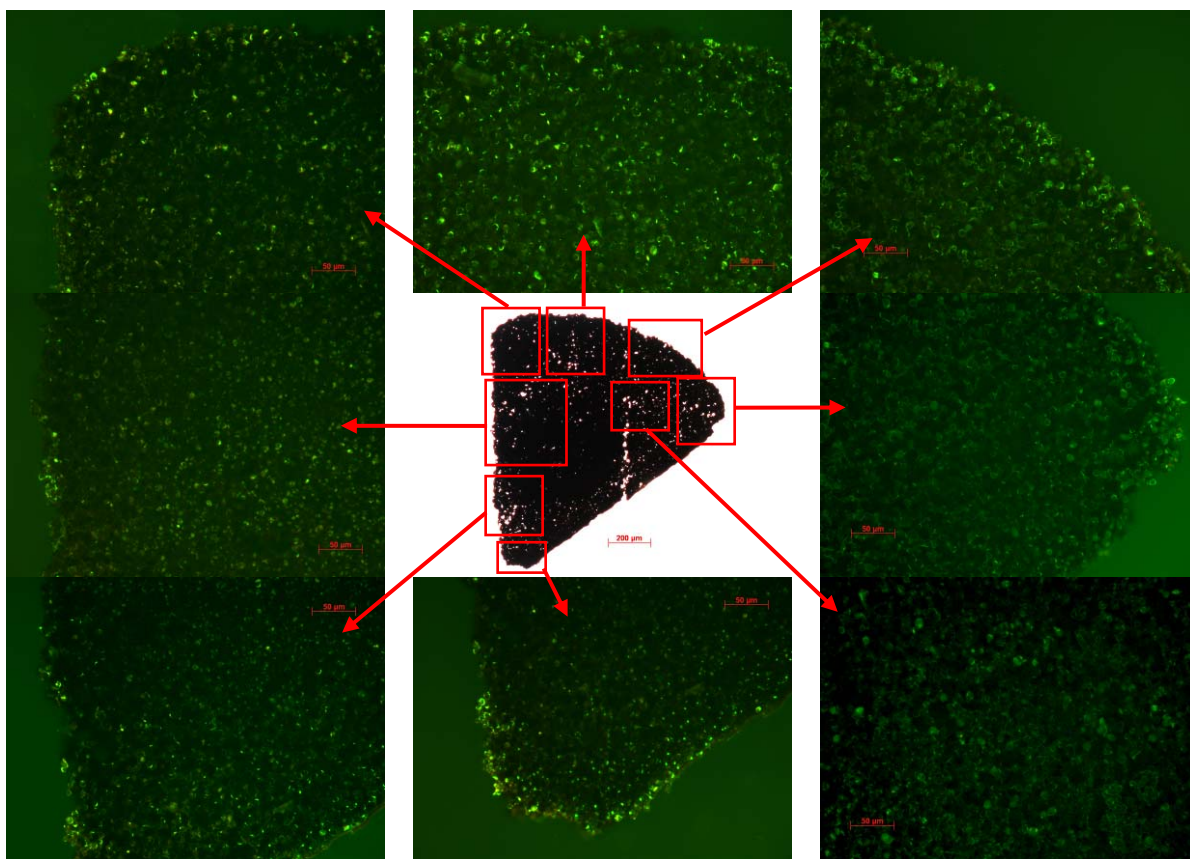


Figura 3.29 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV-C alla dose di 100 Jm⁻² in microscopia a fluorescenza con sovrapposizione delle emissioni nel verde e nel rosso, di cellule vitali ed attive (barra = 50 µm e 200 µm per quella centrale).

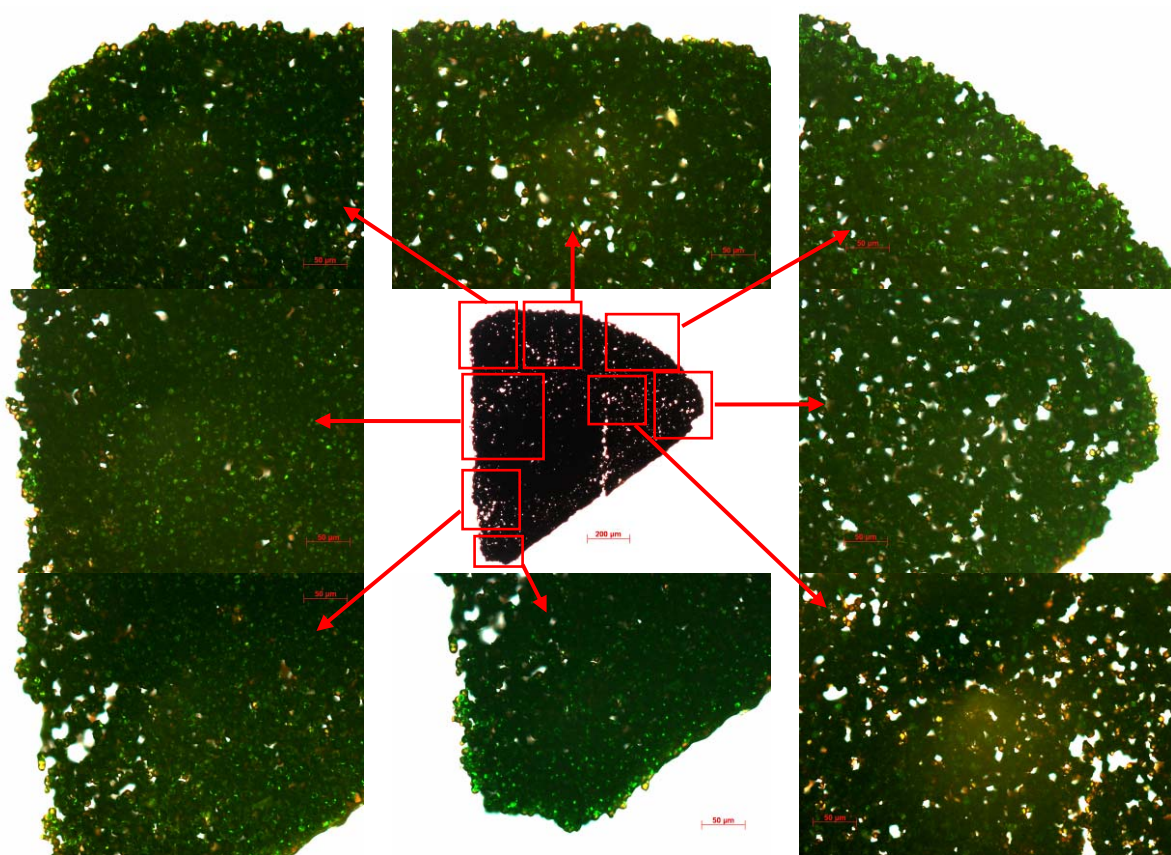


Figura 3.30 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV-C alla dose di 100 Jm⁻² con sovrapposizione delle emissioni verde e rossa, di cellule vitali ed attive, con la totalità delle cellule presenti (barra = 50 µm e 200 µm per quella centrale).

Come ulteriore esempio della possibilità che il colorante vitale FUN 1 fornisca dati significativi non sempre rilevabili con le tecniche colturali, si riporta il caso del test combinato di vuoto e massima radiazione UV 200-400 nm. L'ipotesi che il trattamento avesse avuto un effetto negativo sull'isolato, vista l'assenza di colonie accresciutesi su terreno colturale, è stata confutata dai risultati ottenuti con la somministrazione di questo colorante, che hanno mostrato percentuali di cellule vitali comparabili al controllo (fig. 3.25). Le immagini relative a questo test sono riportate di seguito.

In figura 3.31 è riportata la sezione della colonia fotografata in campo chiaro, suddivisa in più immagini relative a diverse porzioni della stessa. In figura 3.32 è riportata la stessa sezione nel canale del rosso, che mostra l'emissione della fluorescenza verde delle cellule vitali. In figura 3.33 è riportata la sezione fotografata nel canale del verde che mostra l'emissione della fluorescenza rossa delle cellule metabolicamente attive.

In figura 3.34 è mostrata la sovrapposizione dei due canali verde e rosso ed infine in figura 3.35 la sovrapposizione in campo chiaro della fluorescenza verde e rossa per l'osservazione della percentuale di cellule fluorescenti sulle totali.

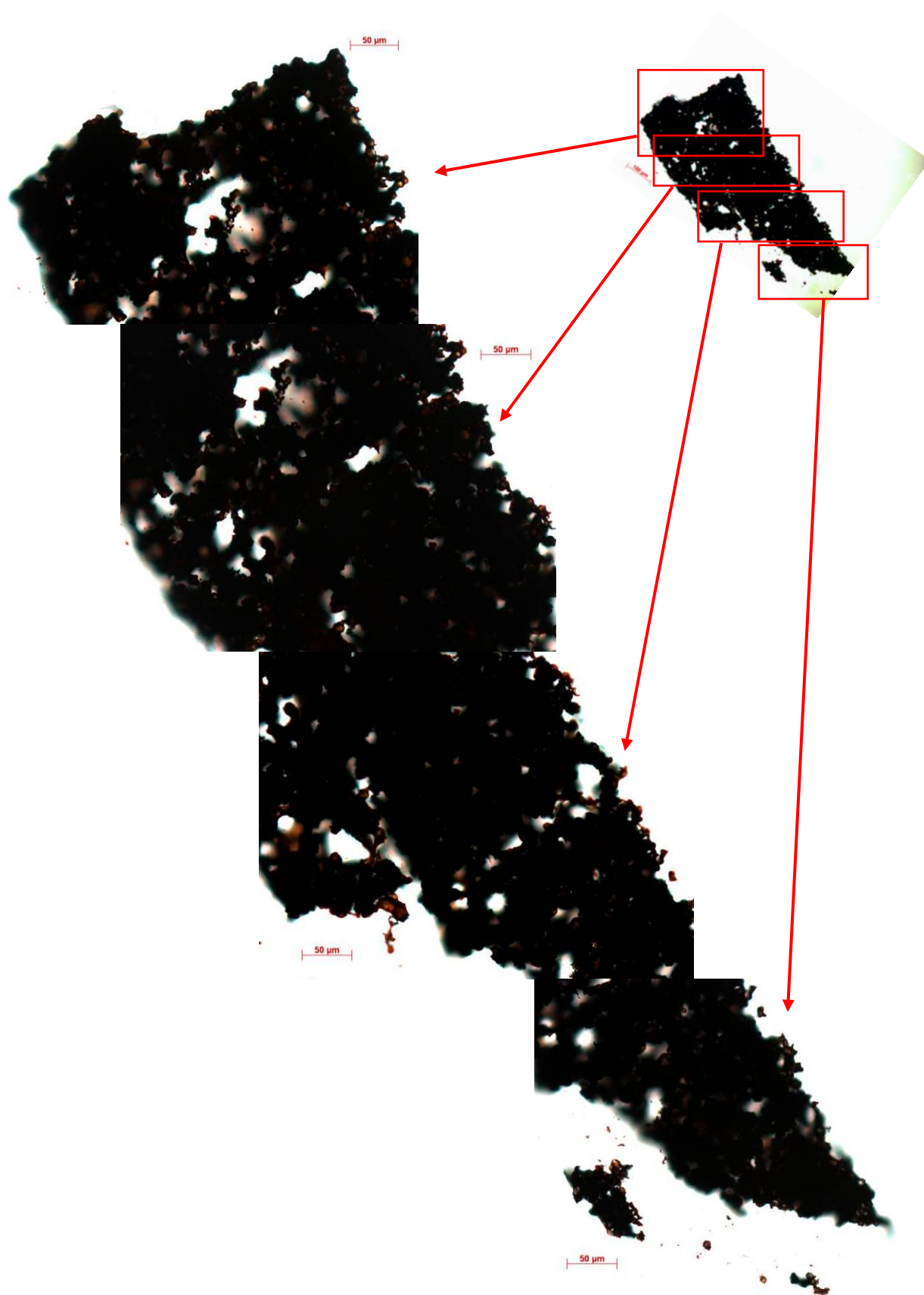


Figura 3.31 – Mappatura di una sezione di 25 μm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta a vuoto+UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ in microscopia in campo chiaro (barra = 50 μm e 100 μm).

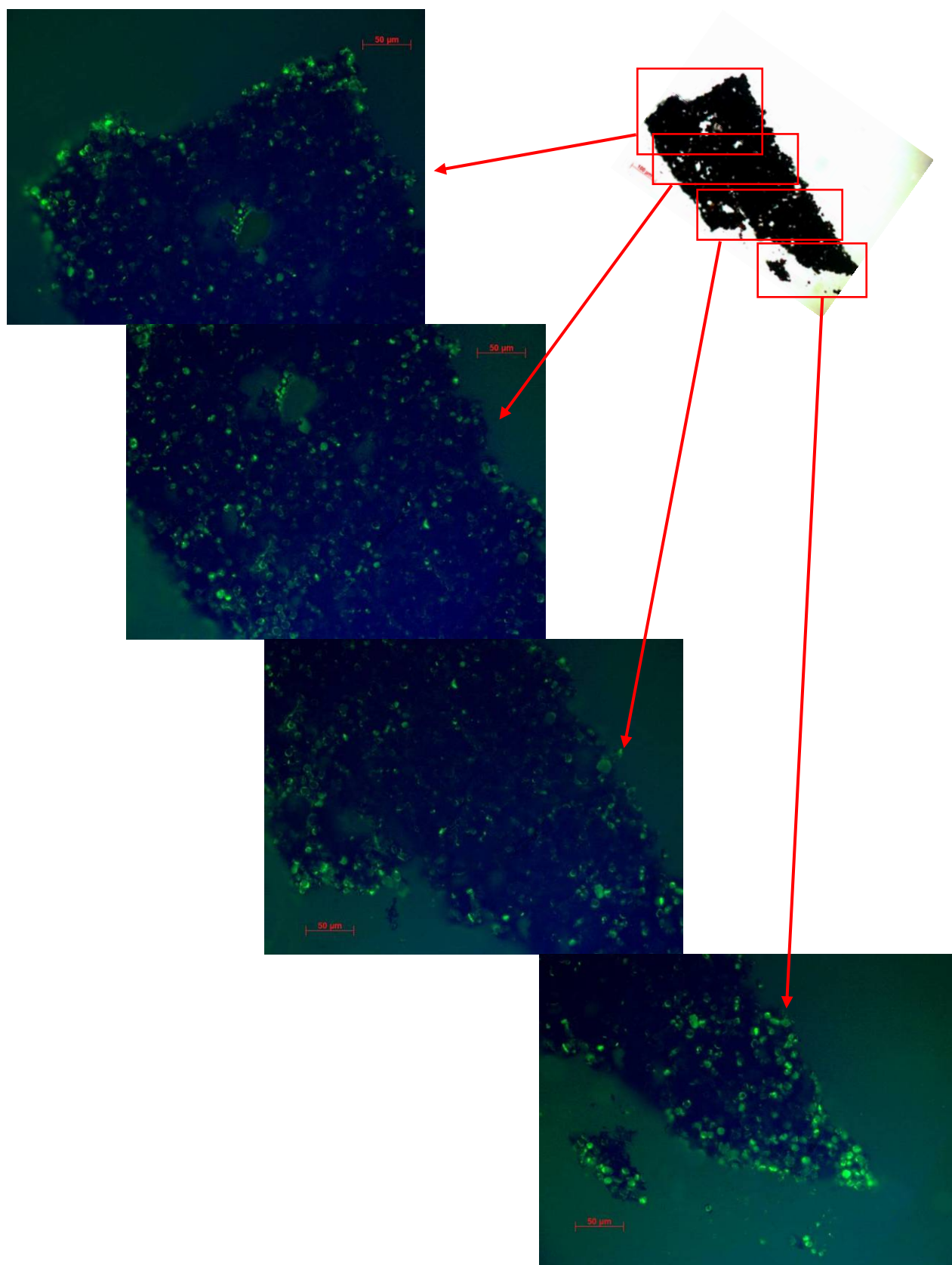


Figura 3.32 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta a vuoto+UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^5$ kJm⁻² in microscopia a fluorescenza nel canale del rosso (em. verde) con eccitazione a 488 e filtro per la fluoresceina per il rilevamento delle cellule vitali (barra = 50 µm e 100 µm).

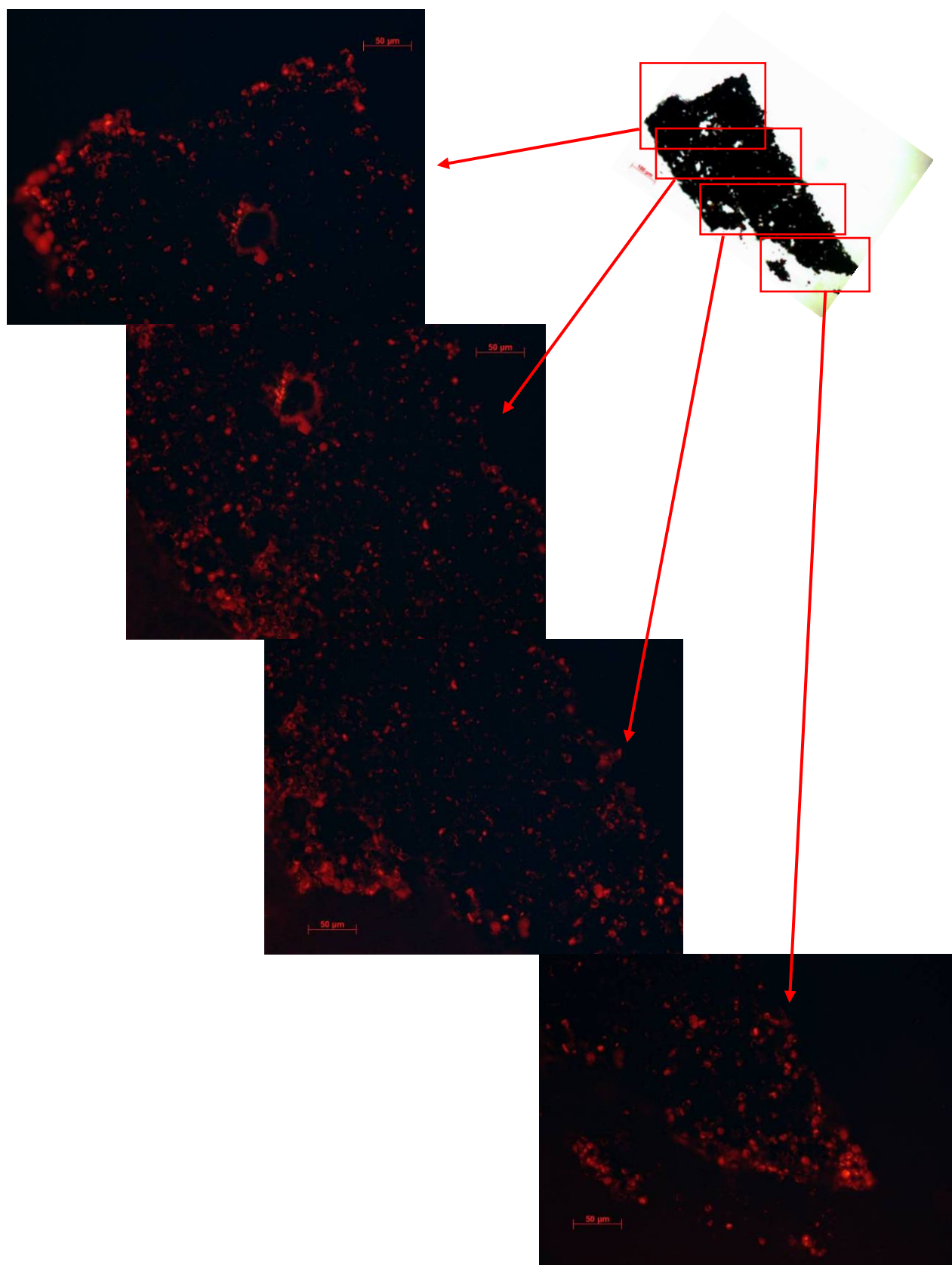


Figura 3.33 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta a vuoto+UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^5$ kJm⁻² in microscopia a fluorescenza nel canale del verde (em. rossa) eccitazione a 546 nm e filtro per la rodamina per il rilevamento delle cellule metabolicamente attive (barra = 50 µm e 100 µm).

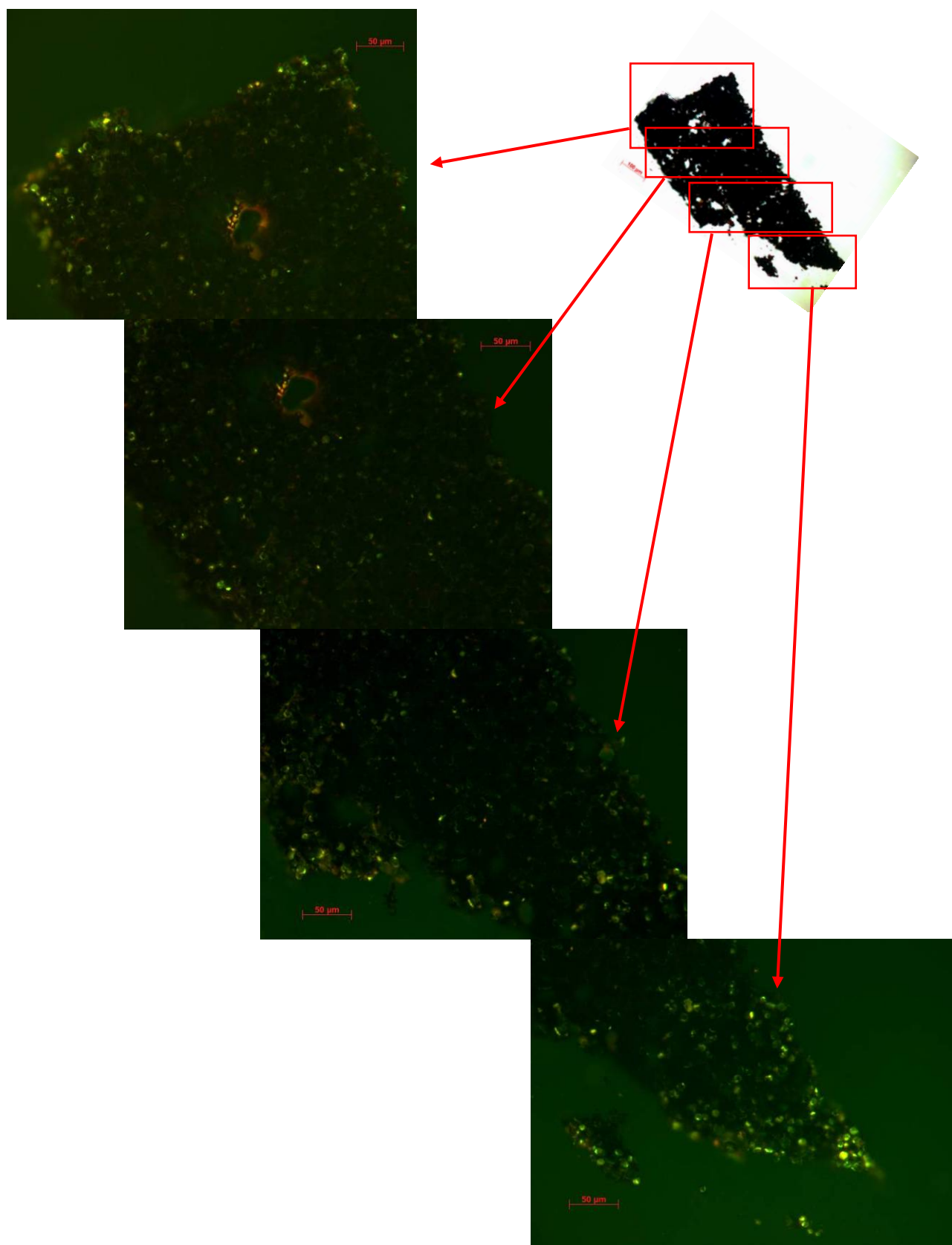


Figura 3.34 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187) sottoposta a vuoto+UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ in microscopia a fluorescenza con sovrapposizione delle emissioni nel verde e nel rosso, di cellule vitali ed attive (barra = 50 µm e 100 µm).



Figura 3.35 – Porzioni di sezione di 25 μm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta a vuoto+UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ con sovrapposizione delle em. verde e rossa, di cellule vitali ed attive, con la totalità delle cellule presenti (barra = 50 μm e 100 μm).

MORTALITÀ

Il procedimento adottato per il colorante FUN 1 è stato utilizzato per calcolare anche la percentuale di mortalità cellulare rilevata con il fluorocromo SITOX Green (fig. 3.36).

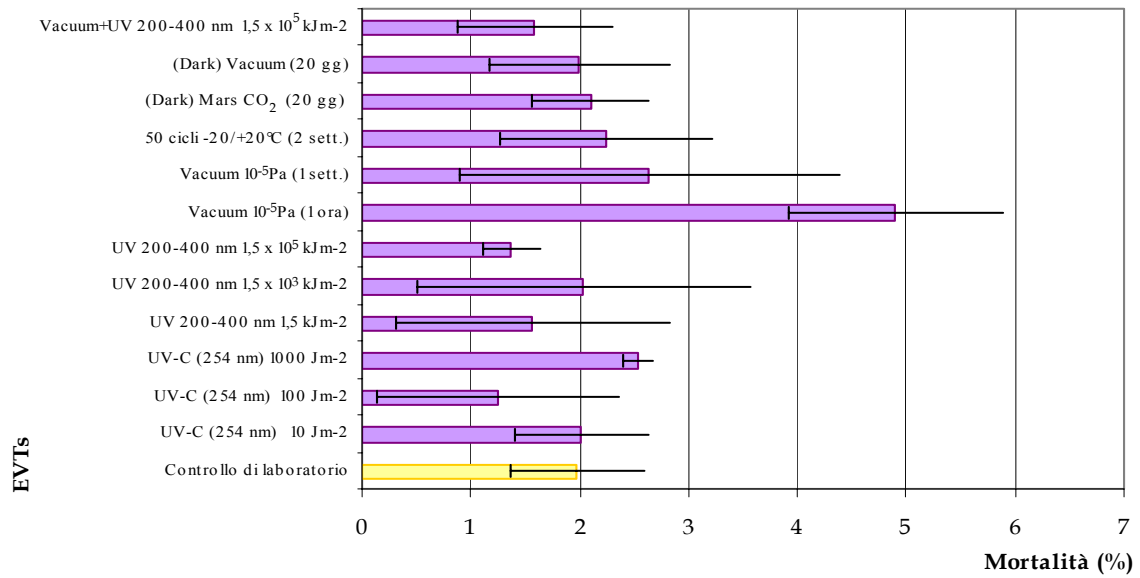


Figura 3.36 – Stima della percentuale di mortalità cellulare di *C. minteri* CCFEE 5187 relativa agli EVT s mediante l'utilizzo del colorante fluorescente SITOX Green in vivo.

In questo caso basse percentuali di mortalità ottenute sono indicative di un danno limitato a carico delle cellule trattate di *C. minteri* rispetto al controllo; questa situazione si verifica nella maggior parte dei test effettuati, con l'eccezione dei campioni trattati con i cicli di congelamento e scongelamento, il vuoto dopo 1 ora e dopo 1 settimana e l'alta massima dose di UV-C (1000 Jm⁻²). Tra queste, il danno maggiore sembra essere determinato dal vuoto, vista l'altissima percentuale di cellule morte registrata dopo 1 h.

Si riporta un esempio rappresentativo di analisi d'immagine relativo alla colorazione con il colorante fluorescente SYTOX Green di una sezione di 25 µm di spessore di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^3$ kJm⁻² (EVT-E1) (figg. 3.37-3.41).

La sezione della colonia di *C. minteri* è stata fotografata prima in campo chiaro (fig. 3.37) poi nel canale del rosso per l'emissione della fluorescenza verde delle cellule danneggiate o morte (fig. 3.38 e 3.39).

Nelle figure 3.40 e 3.41 è mostrata la sovrapposizione in campo chiaro dell'immagine relativa alla fluorescenza verde con quella della totalità delle cellule presenti.

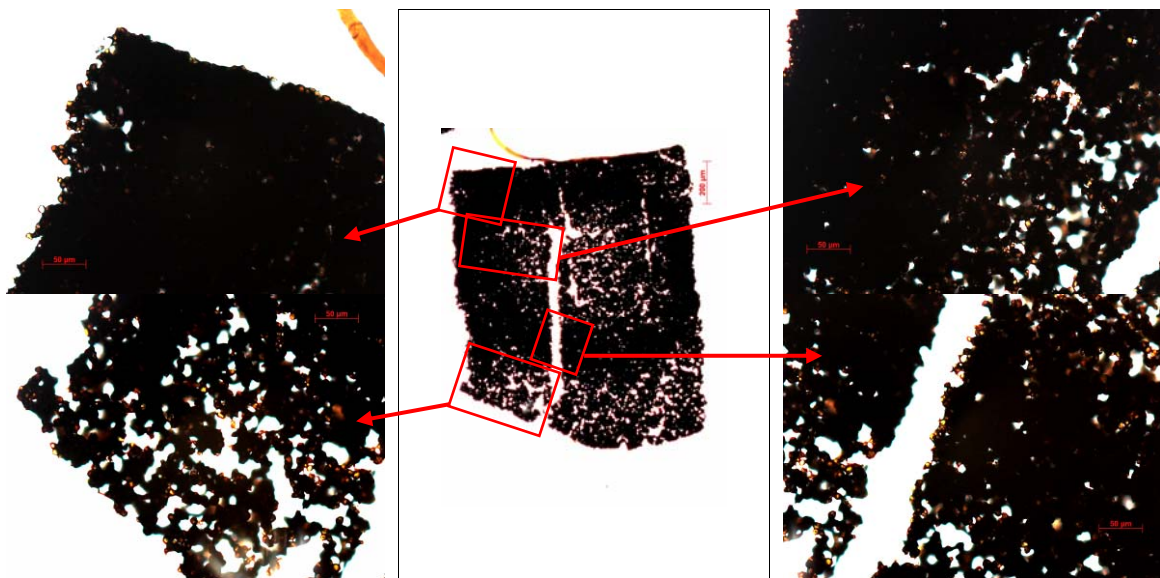


Figura 3.37 – Mappatura di una sezione 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^3 \text{ kJm}^{-2}$ in microscopia in campo chiaro (barra = 50 µm e 200 µm per quella centrale).

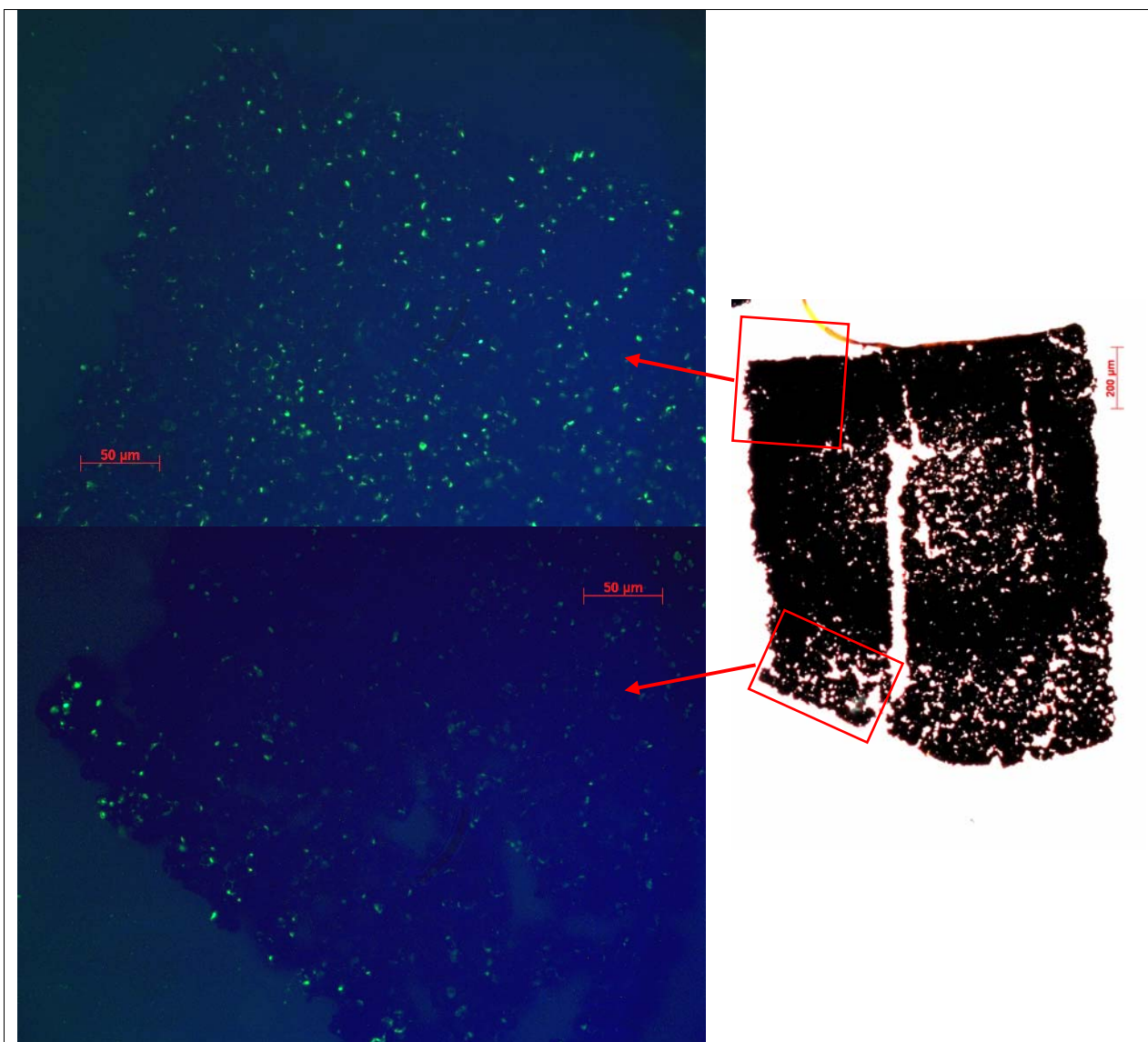


Figura. 3.38 – Porzioni di sezione di 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^3 \text{ kJm}^{-2}$ in microscopia a fluorescenza nel canale del rosso (emissione verde) per il rilevamento delle cellule danneggiate o morte (barra = 50 µm e 200 µm per quella laterale).

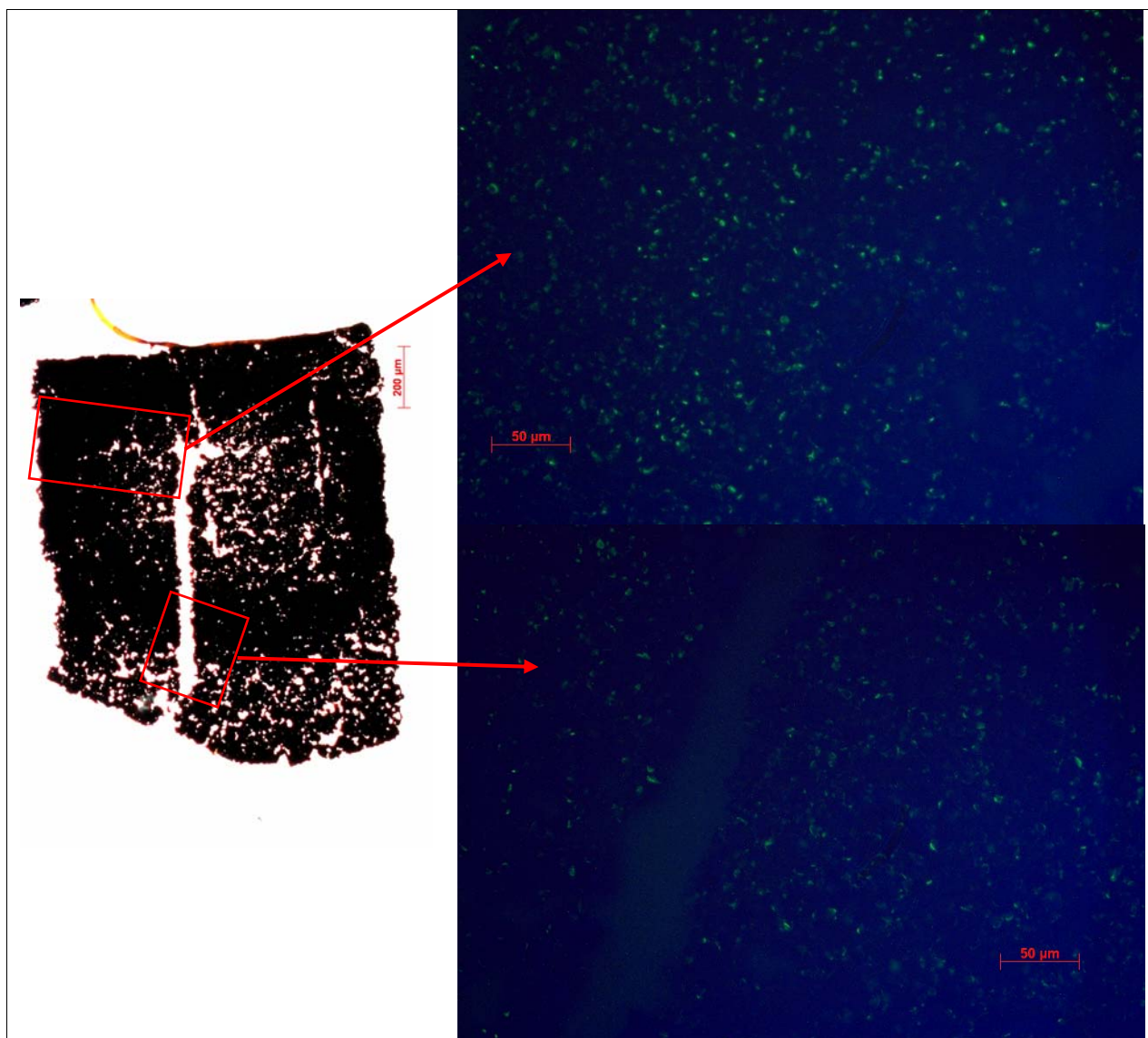
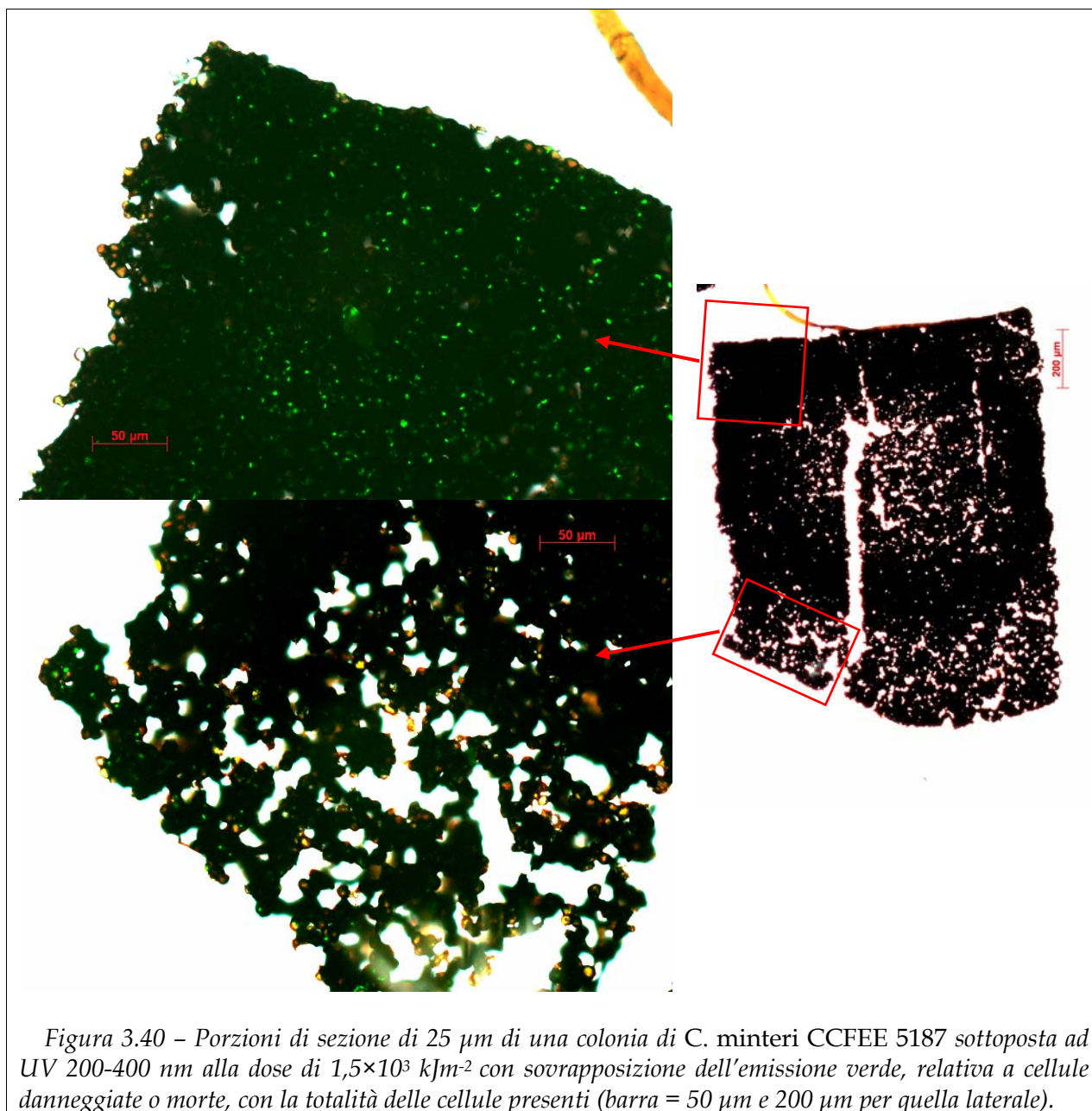


Figura 3.39 – Porzioni di sezione 25 µm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^3 \text{ kJm}^{-2}$ in microscopia a fluorescenza nel canale del rosso (emissione verde) per il rilevamento delle cellule danneggiate o morte (barra = 50 µm e 200 µm per quella laterale).



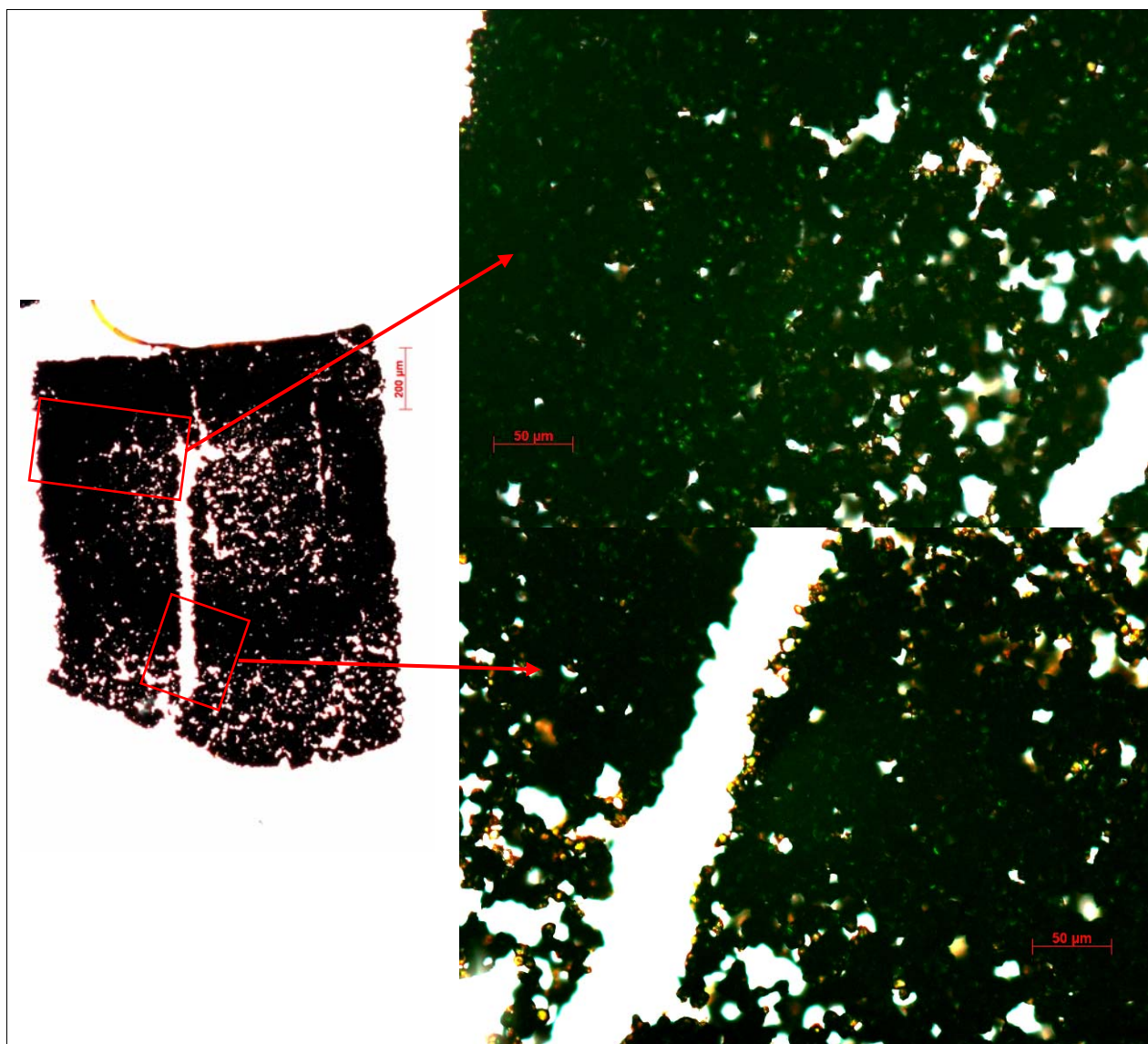


Figura 3.41 – Porzioni di sezione di 25 μm di una colonia di *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta ad UV 200-400 nm alla dose di $1,5 \times 10^3 \text{ kJm}^{-2}$ con sovrapposizione dell'emissione verde, relativa a cellule danneggiate o morte, con la totalità delle cellule presenti (barra = 50 μm e 200 μm per quella laterale).

3.2.2. EVT-E1 ED E2 SUI CAMPIONI DI ROCCIA COLONIZZATA

I risultati relativi ai frammenti di roccia sottoposti agli EVT's riguardano le osservazioni allo stereomicroscopio degli isolati cresciuti su 5 terreni selettivi diversi (BG11 per i cianobatteri, DRBC, MEA per i funghi, TM per le alghe e TY per batteri). Vista l'esiguità del materiale biologico e l'impossibilità immediata di un isolamento e quindi di distinguere tra cianobatteri e batteri, la conta delle CFU relativa a questi due componenti è stata fatta risalire ai soli batteri.

Per lo stesso motivo anche per i funghi non è stata compiuta alcuna distinzione particolare, se non l'appartenenza ai due gruppi morfologici principali: filamentosi e neri meristemati.

Nella tabella 3.7 è indicato il numero delle CFU ottenute da ogni test di verifica (EVT-E1 e E2) suddivisi tra alghe, funghi (inclusi i lieviti) e batteri (inclusi i cianobatteri).

Tabella 3.7.- Numero di CFU ottenute dai campioni esaminati dei frammenti di roccia

EVT-E1 E E2						
TEST		DURATA	CFU			
EVT-E1						
Vacuum	10 ⁻⁵ Pa	1 ora	0	0	705	705
		1 sett.	455	0	138	593
Oscillazioni di temperatura		2 sett.	56	1	489	546
Irraggiamento UV (254 nm), 1 atm						
Fluenza:	10 Jm ⁻²		2	60	0	62
	100 Jm ⁻²		68	230 + 7 lieviti	314	619
	1000 Jm ⁻²		303	15	223	541
Irraggiamento UV (200-400 nm), 1 atm						
Fluenza:	1,5 kJm ⁻²		0	633	0	633
	1,5×10 ³ kJm ⁻²		0	0	0	0
	1,5×10 ⁵ kJm ⁻²		0	0	0	0
EVT-E2						
Vacuum +	10 ⁻⁵ Pa	20 gg				
Irraggiamento UV 200-400 nm						
Fluenza:	1,5×10 ⁵ kJm ⁻²		0	0	0	0
Vacuum	10 ⁻⁵ Pa	20 gg	638	136	0	774
CONTROLLO, TEMPERATURA AMBIENTE	AL BUIO,	2 mesi	634	311	247	1192
			ALGHE	FUNGHI	BATTERI	TOTALI

Vengono di seguito riportate, seppur in maniera superficiale, alcune caratteristiche macro-morfologiche delle colonie ottenute, riconducibili alla componente coltivabile della comunità criptoendolitica presente nel campione di roccia. Tali caratteristiche sono state osservate in coltura, dopo 3 mesi di incubazione al buio per le colonie fungine e batteriche, e alla luce per quelle algali e per i cianobatteri.

Tra i funghi filamentosi il colore delle colonie varia dal bianco al rosa, dal rosso al marrone e al grigio, talvolta con colonie che si presentano parzialmente immerse nel terreno di coltura (fig. 3.42).

Sono stati osservati pochi lieviti, perlopiù bianchi rosati ed opachi.

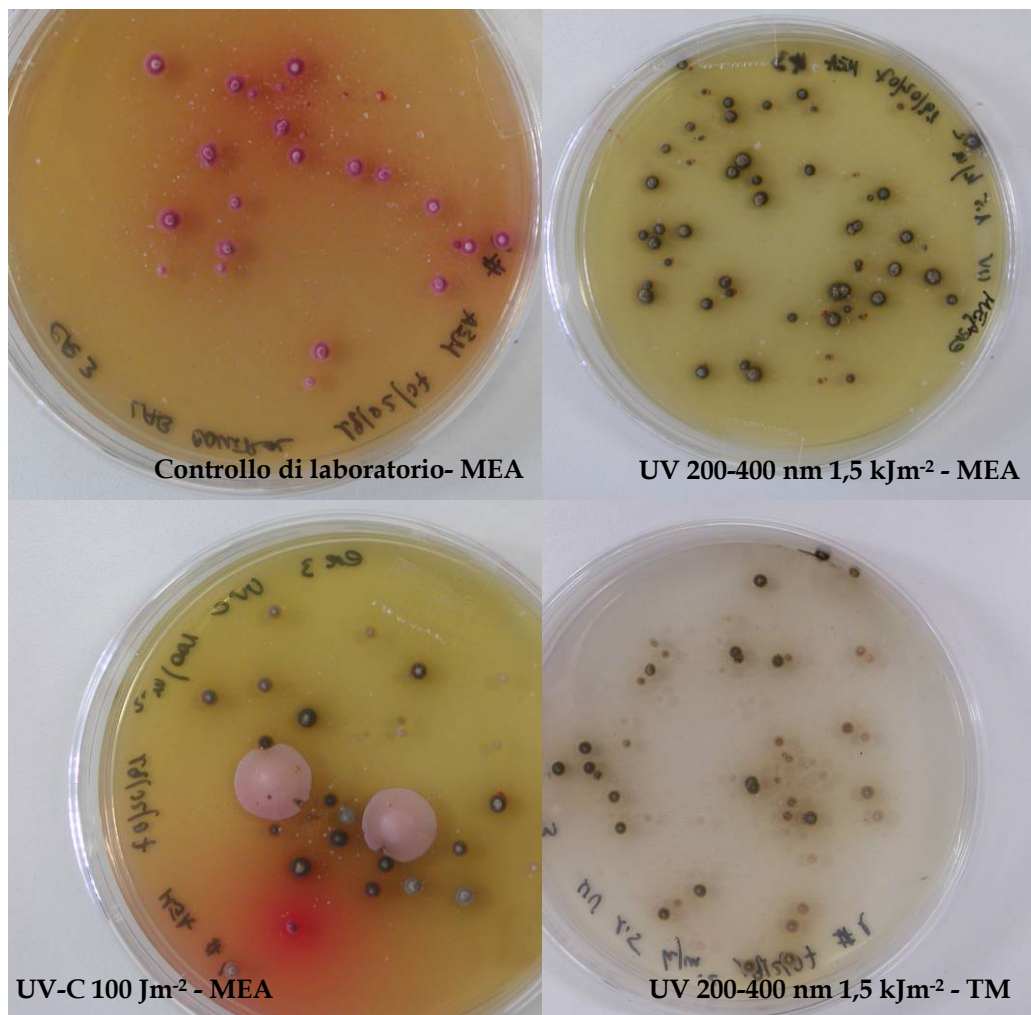


Fig. 3.42 – Alcuni esempi di crescita microbica dai frammenti di roccia colonizzata sottoposta agli EVT_s, osservati dopo 3 mesi di incubazione a 15°C.

Per i batteri il colore osservato è stato molto variabile, con colonie piuttosto traslucide, bianche, fino a colorazioni giallo ocra e miste rosa-arancio; l'aspetto delle colonie varia da quelle con accrescimento uniforme a quelle di forma piuttosto irregolare, più o meno lucide.

Le alghe, cresciute sia su TM che su BG11, di colore da verde intenso a verde pallido, crescono numerose a contatto dei granuli di quarzo dei frammenti di roccia; rare sono le colonie cresciute soltanto su agar.

Di seguito si riportano foto rappresentative di alcuni dei microrganismi osservati in coltura allo scopo di evidenziare la biodiversità (fig. 3.43).

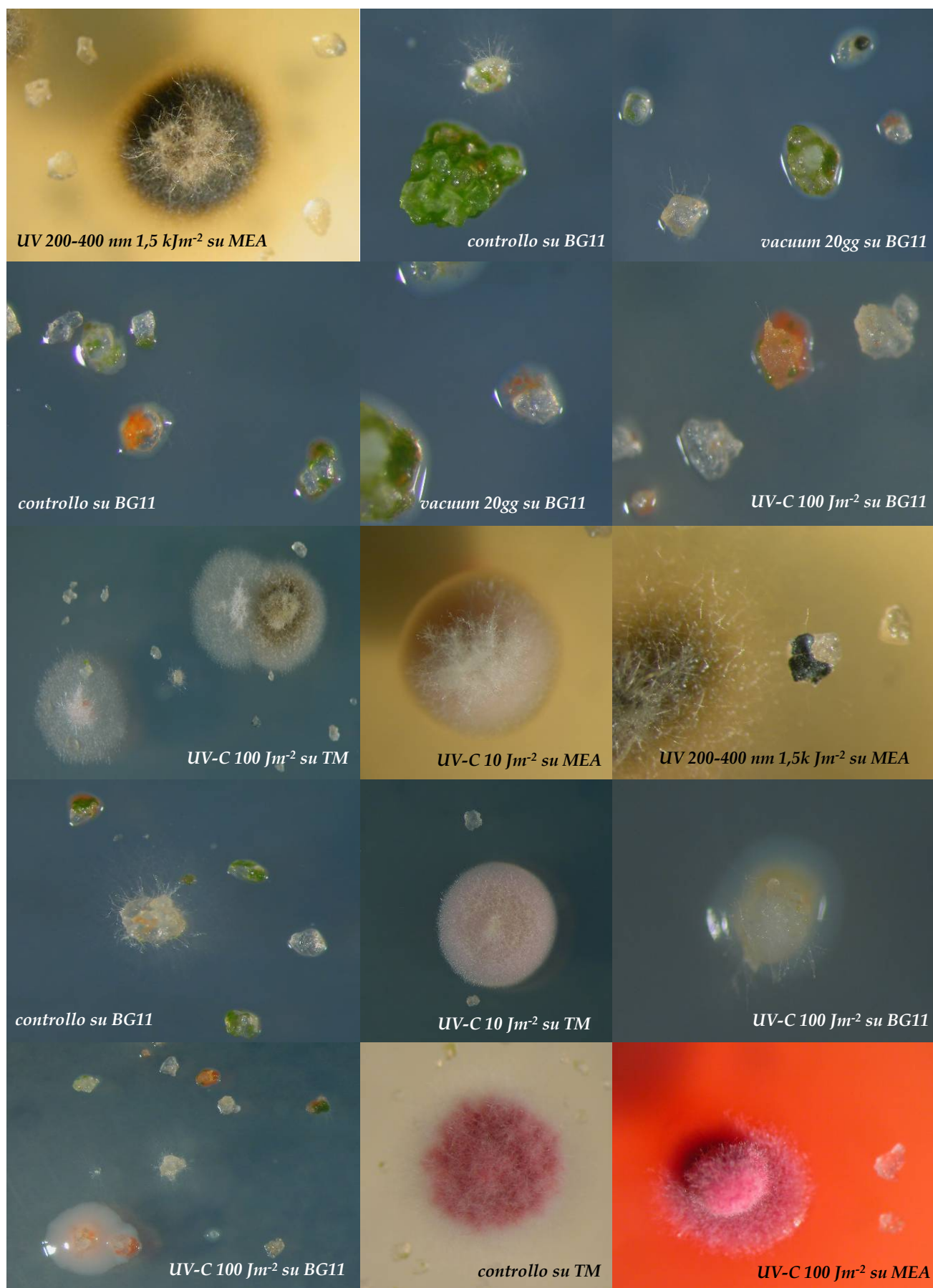


Figura 3.43– Immagine rappresentativa della biodiversità di microrganismi isolati dai frammenti di roccia contrassegnati dal test EVT cui sono stati sottoposti (controllo = frammento non trattato ad alcun test).

4.3 RESISTENZA ALLE ALTE TEMPERATURE

In relazione ad eventuali fenomeni di shock termico che potrebbero verificarsi durante le fasi di volo e di stazionamento nello spazio, gli isolati fungini selezionati per l'esperimento LIFE, *C. antarcticus* CCFEE 515, 534 e *C. minteri* CCFEE 5187, sono stati sottoposti ad alcuni trattamenti termici prevedendo le temperature di 60°C in relazione al valore limite per la chiusura automatica di coperchi della facility EXPOSE e di 80 e 90°C in relazione ai valori massimi raggiungibili ipotizzati, comunicati dall'ESA.

RESISTENZA ALLA TEMPERATURA DI 60°C

Vengono di seguito riportati i risultati relativi agli isolati di *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 e *C. minteri* CCFEE trattati a 60°C per 15' e 60' e successivamente incubati 2 mesi a 15°C.

La presenza di *C. antarcticus* CCFEE 534, escluso tra gli isolati che verranno inviati nello spazio, è dovuta ad un fattore puramente cronologico. In effetti, i test alla temperatura di 60°C sono stati eseguiti prima che si ottenessero i risultati dagli EVTs e perciò prima che venissero selezionati gli isolati più idonei alle fasi successive dell'esperimento LIFE.

I dati hanno mostrato, per tutti gli isolati d'interesse, un'alta resistenza alla temperatura seppur in misura diversa (fig. 3.44).

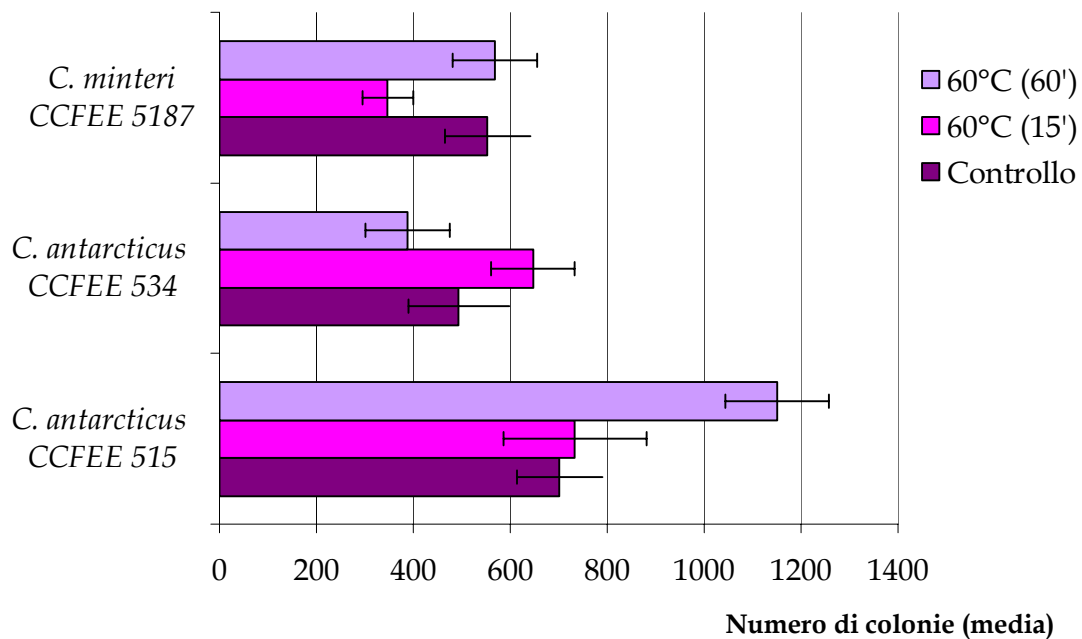


Figura 3.44 – Crescita di *C. antarcticus* (CCFEE 534 e CCFEE 515) e *C. minteri* (CCFEE 5187) su MEA, dopo 2 mesi di incubazione a 15°C, sottoposti per 15 e 60 minuti di esposizione alla temperatura di 60°C, rispetto ai controlli.

In alcuni casi, infatti, il trattamento sembra essere influente, come in *C. antarcticus* CCFEE 515 dopo 15' e *C. minteri* CCFEE 5187 dopo 60', dove la percentuale del numero delle colonie sviluppatesi indica una vitalità comparabile a quella del controllo. Un'inibizione significativa è riscontrabile in *C. minteri* CCFEE 5187 e *C. antarcticus* CCFEE 534 per esposizioni rispettivamente di 15' e 60'. In altri casi, invece, la temperatura di 60°C sembra aver stimolato lo sviluppo delle colonie. Le percentuali di *C. antarcticus* CCFEE 534 e di *C. antarcticus* CCFEE 515 risultano maggiori rispetto al controllo dopo rispettivamente 15' e 60' di esposizione.

La colorazione osservata in alcuni terreni colturali, particolarmente evidente intorno alle colonie di *C. minteri* (fig. 3.45), è da collegare al rilascio di pigmenti melaninici tipicamente prodotti dai fughi meristemati neri.

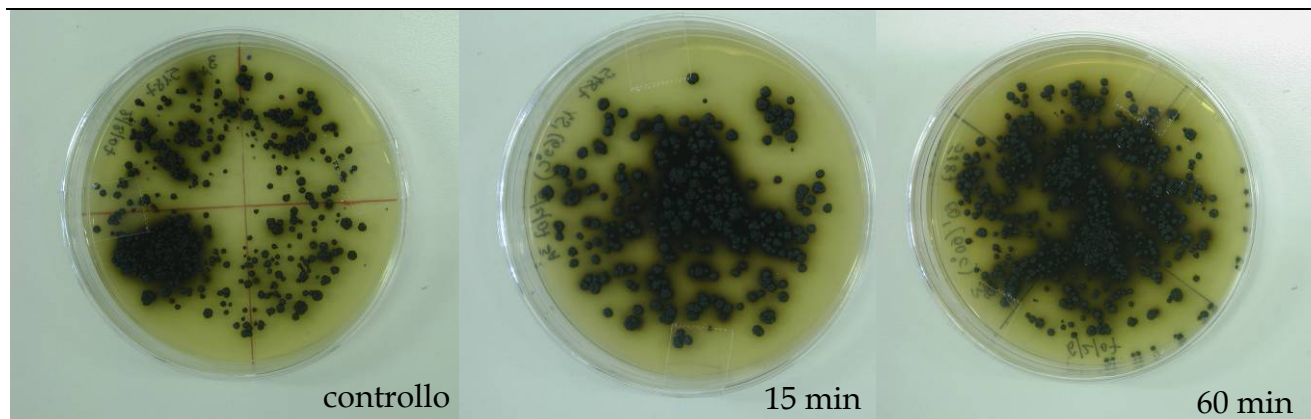
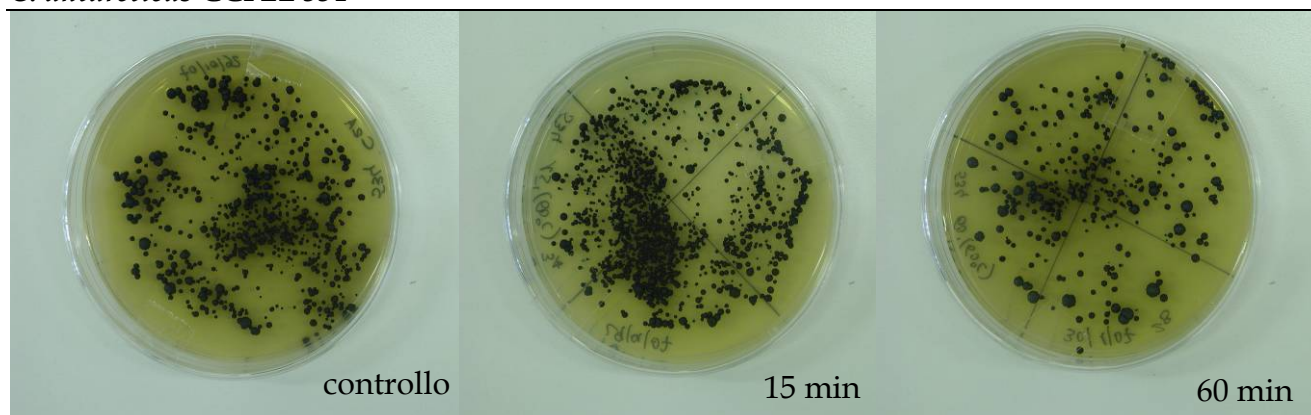
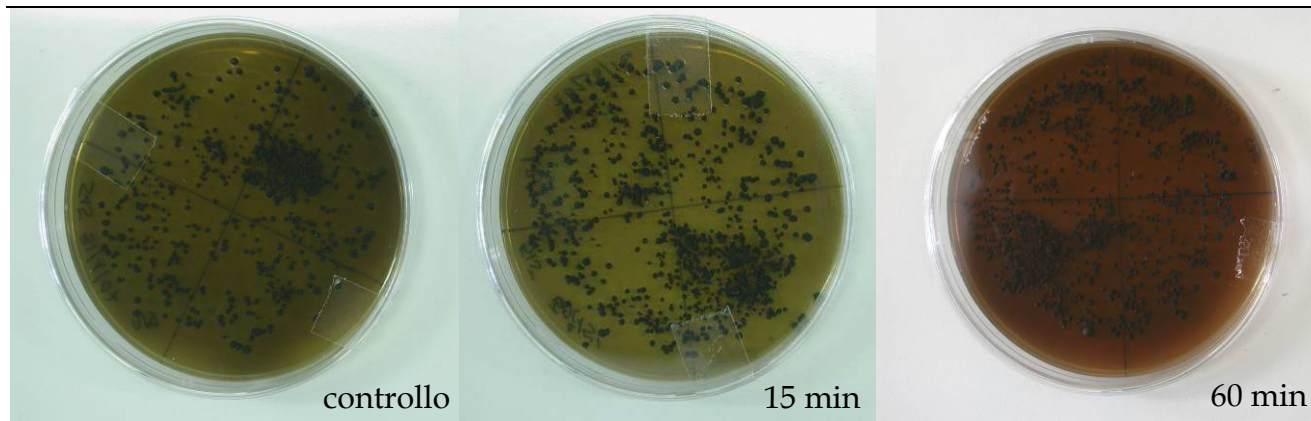
C. minteri* CCFEE 5187**C. antarcticus* CCFEE 534*****C. antarcticus* CCFEE 515**

Figura 3.45 – Colture su MEA di *C. minteri* CCFEE 5187 e di *C. antarcticus* CCFEE 515 e 534 sottoposti a 15 e 60 minuti di esposizione alla temperatura di 60°C rispetto al controllo.

RESISTENZA ALLE TEMPERATURE DI 80 E 90°C

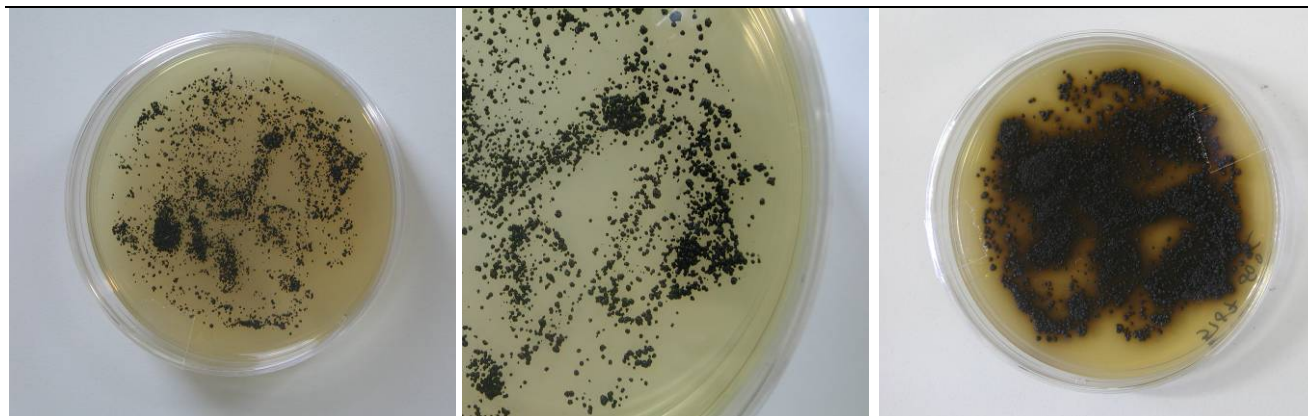
Per i test di verifica della vitalità cellulare dopo trattamento a 80 e 90°C per 1 h è stata rilevata la sola presenza/assenza di colonie fungine senza effettuare conte cellulari .

I dati relativi alla resistenza a tali temperature risultano quindi dalla crescita su terreno agarizzato di una semina *random* di sospensione cellulare ottenuta da colonie trattate e dal confronto con quelle del controllo.

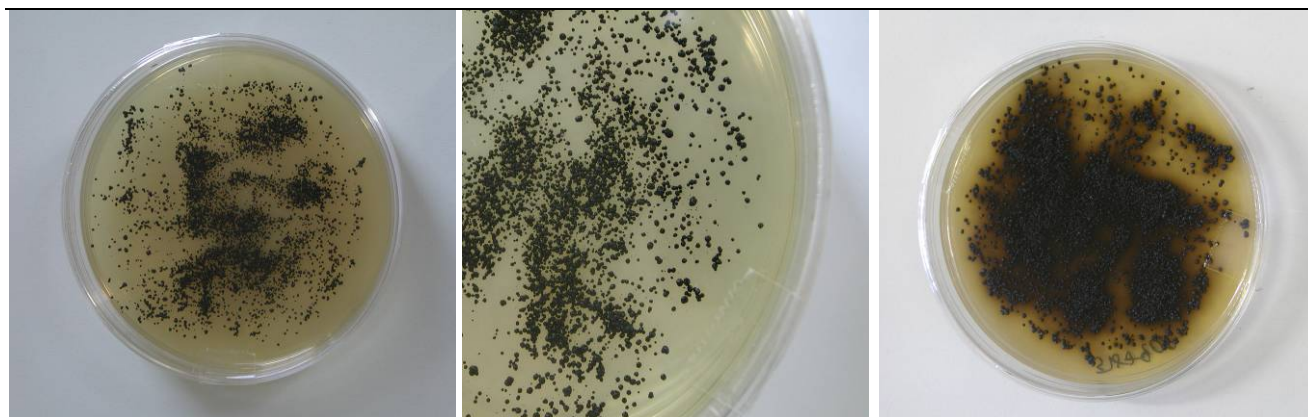
Entrambi gli isolati si sono dimostrati eccezionalmente vitali, già ad un mese dalla semina (fig. 3.46 e 3.47).

C. minteri CCFEE 5187

NESSUN TRATTAMENTO



ESPOSIZIONE A 80°C



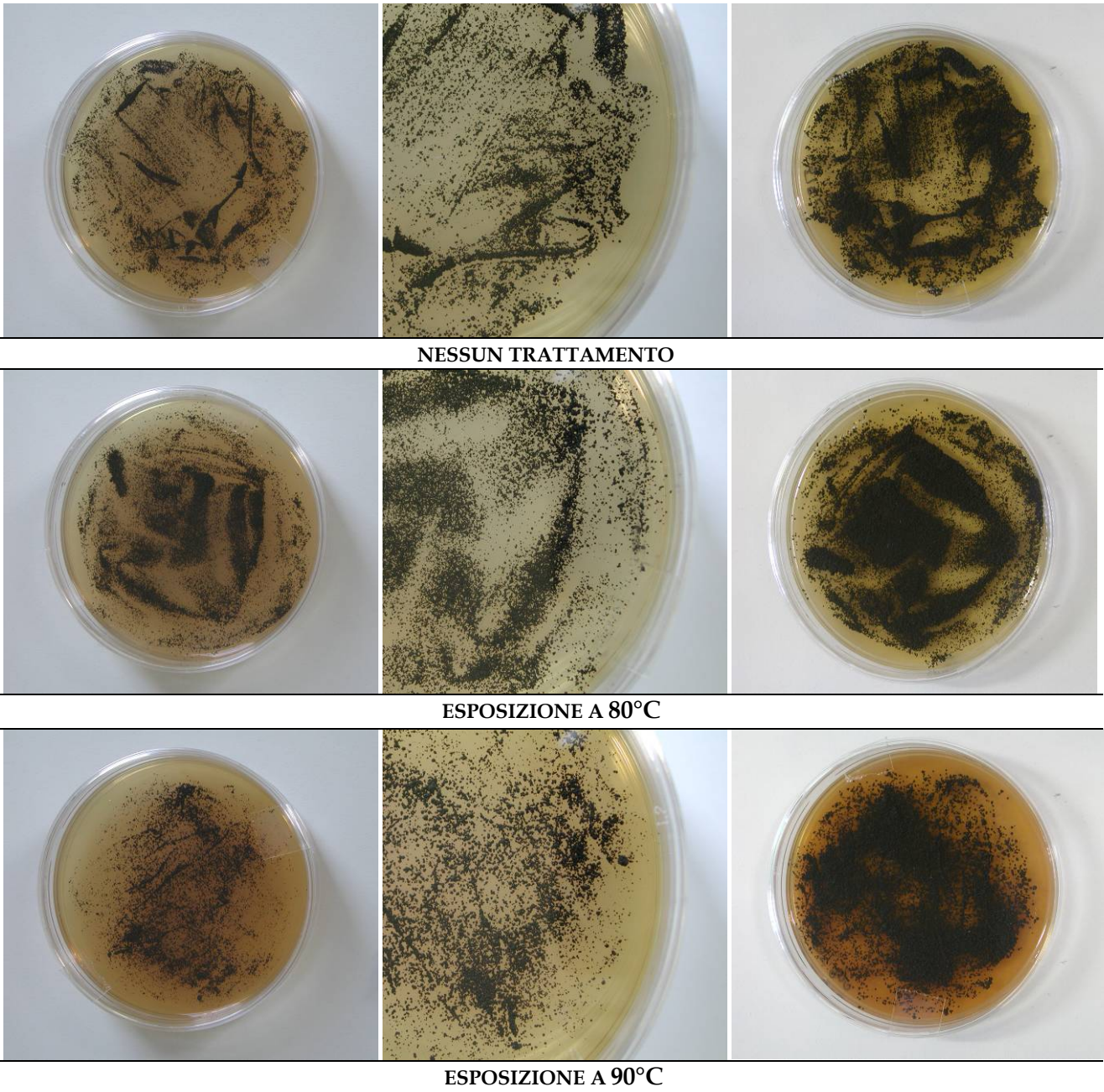
ESPOSIZIONE A 90°C

1 MESE

2 MESI

Figura 3.46 – Colture su MEA di *C. minteri* CCFEE 5187 dopo 60 minuti di esposizione alle temperature di 80 e 90°C e relativo controllo, a 1 e 2 mesi dopo la semina.

C. antarcticus CCFEE 515



1 MESE	2 mesi
<i>Figura 3.47 - Colture su MEA di C. antarcticus CCFEE 515 dopo 60 minuti di esposizione alle temperature di 80 e 90°C e relativo controllo, a 1 e 2 mesi dopo la semina.</i>	

Le prove di colorazione con il fluorocromo vitale FUN 1 utilizzato sull'isolato *C. minteri* CCFEE 5187 (figg. 3.48) hanno confermato il dato qualitativo precedente.

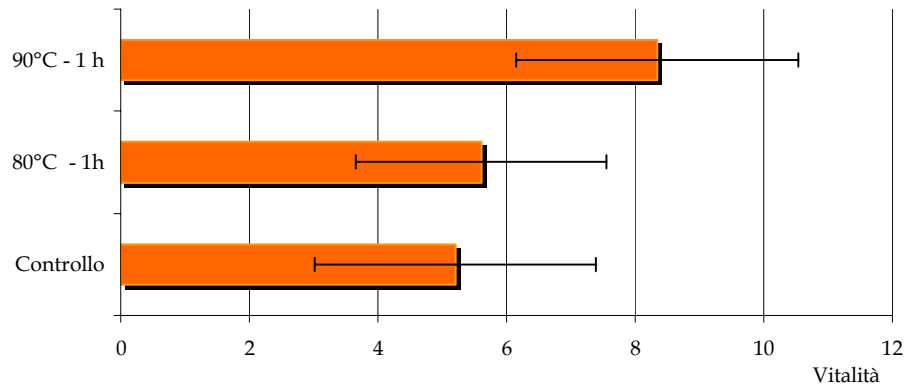


Figura 3.48 - Stima della percentuale di vitalità cellulare di *C. minteri* CCFEE 5187 relativa alla resistenza dopo 60 minuti alle temperature di 80 e 90°C, rispetto al controllo, mediante l'utilizzo del colorante fluorescente FUN 1 in vivo.

Se la vitalità dell'isolato fungino dopo 1 h di esposizione alla temperatura di 80°C è comparabile con quella del controllo, quella relativa al trattato a 90°C sembra essere addirittura stimolata. L'elevata vitalità dei trattati a 80 e 90°C rispetto al controllo (fig. 3.49) è osservabile anche nelle figure 3.50 e 3.51 relative al trattamento di sezioni dell'isolato con il fluorocromo FUN 1.

C. minteri CCFEE 5187

controllo

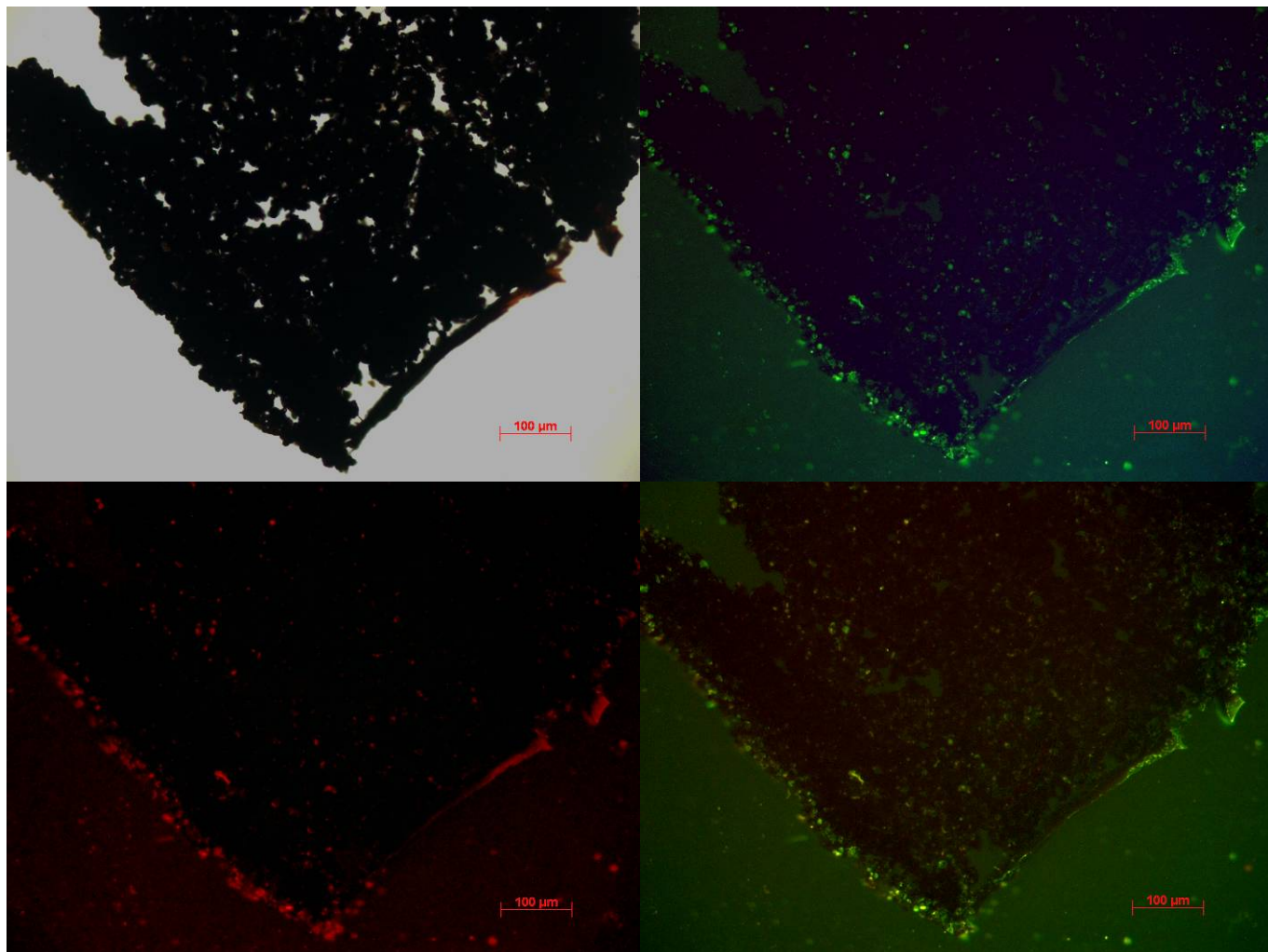


Figura 3.49– Immagini in fluorescenza di una sezione *C. minteri* CCFEE 5187 di controllo utilizzando il colorante FUN 1. Le cellule vitali sono marcate verdi, in rosso quelle metabolicamente attive. L'ultima immagine mostra le cellule vitali più quelle attive (barra=100 µm).

C. minteri CCFEE 5187

80°C

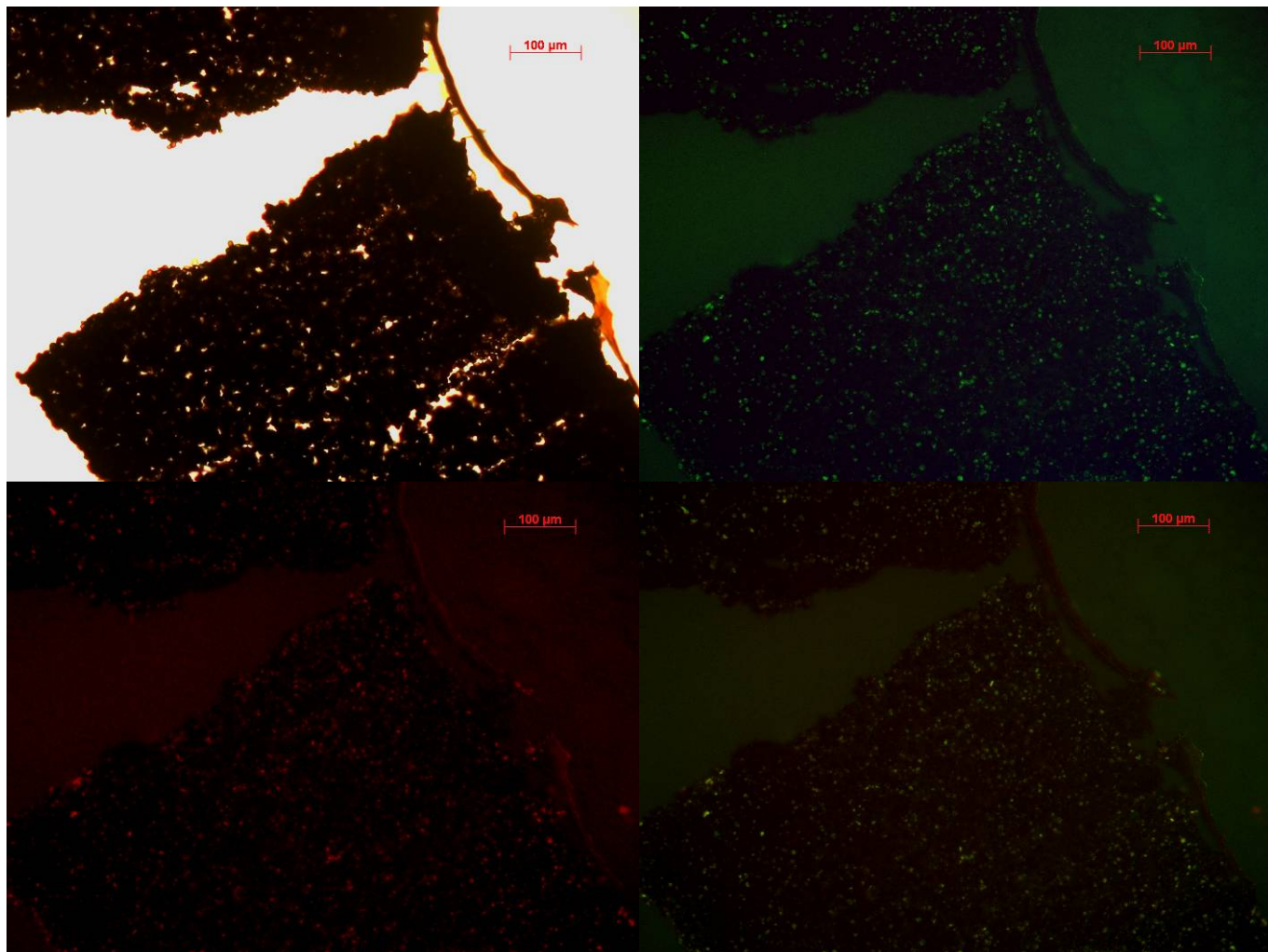


Figura 3.50 – Immagini in fluorescenza di una sezione *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta alla temperatura di 80°C per 1 ora utilizzando il colorante FUN 1. Le cellule vitali sono marcate verdi, in rosso quelle metabolicamente attive. L'ultima immagine mostra le cellule vitali più quelle attive (barra=100 μm).

C. minteri CCFEE 5187

90°C

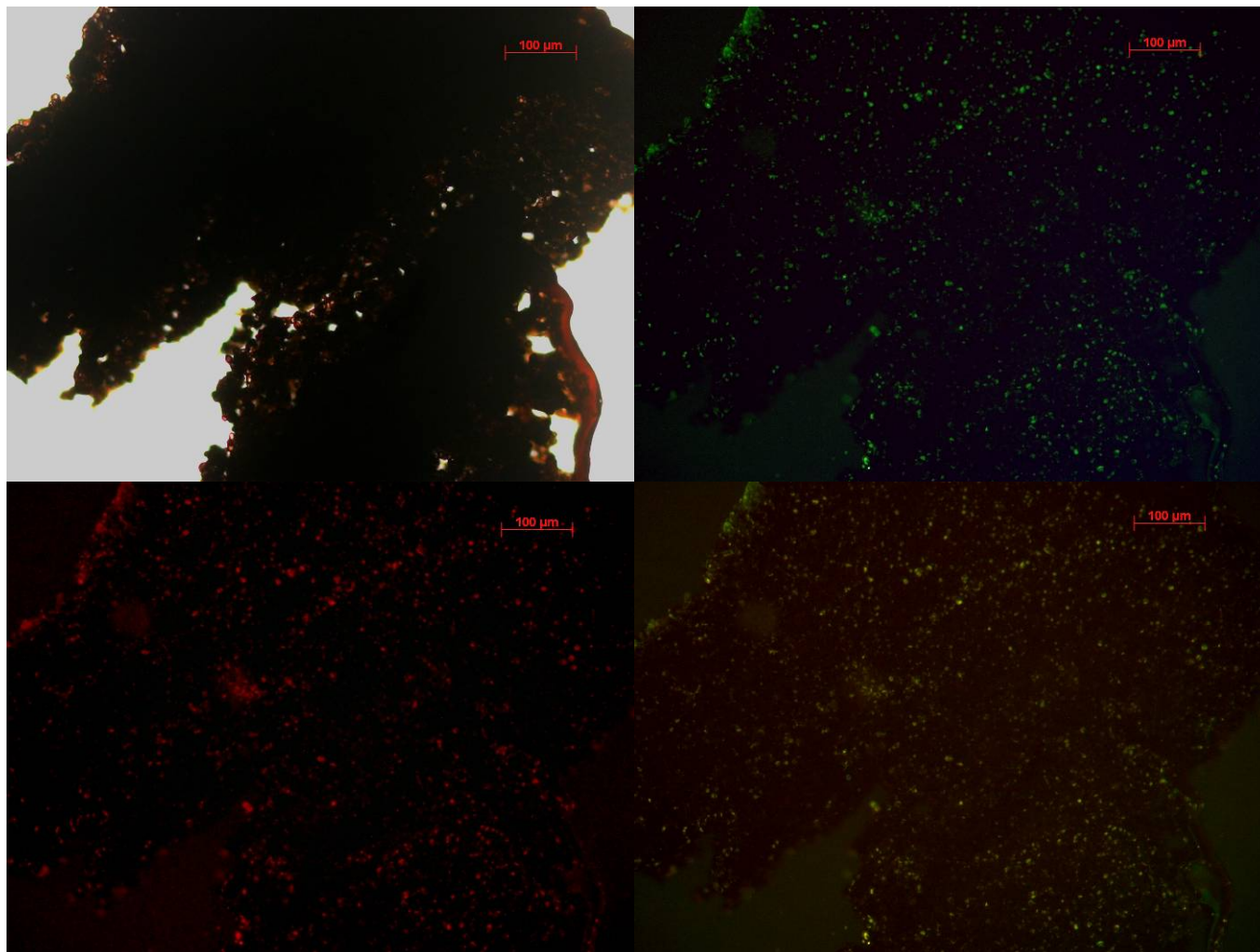


Figura 3.51 – Immagini in fluorescenza di una sezione *C. minteri* CCFEE 5187 sottoposta alla temperatura di 90°C per 1 ora utilizzando il colorante FUN 1. Le cellule vitali sono marcate verdi, in rosso quelle metabolicamente attive. L'ultima immagine mostra le cellule vitali più quelle attive (barra=100 µm).

4. DISCUSSIONE

Nel presente lavoro sono stati selezionati tre isolati ascrivibili al genere *Cryomyces*, due di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e 534) ed uno di *C. minteri* (CCFEE 5187), tra i 26 funghi neri criptoendolitici antartici, provenienti dalla Terra Vittoria del Nord e del Sud, presenti nella *Culture Collection of Fungi from Extreme Environment* (CCFEE), allo scopo di saggiarne la resistenza a tre dei più importanti fattori di stress delle regioni polari: le basse temperature, la radiazione ultravioletta e lo stress osmotico (COCKELL & KNOWLAND, 1999).

La resistenza mostrata agli stress suddetti, ha comportato la loro utilizzazione, insieme a campioni di roccia antartica colonizzata, come modello di studio per prove di simulazione delle condizioni spaziali e marziane condotte presso l'Istituto di Medicina Aerospaziale DLR di Colonia (Germania). Il superamento di tali prove rappresentava un requisito necessario per la selezione di isolati fungini idonei per l'esperimento LIFE, che prevede l'esposizione di campioni biologici a condizioni spaziali reali nell'ambito del programma EXPOSE dell'ESA sull'International Space Station.

Di seguito vengono riportati dapprima i risultati degli esperimenti di resistenza agli stress terrestri, quindi quelli di simulazione spaziale effettuati presso il DLR di Colonia (*Experiment Verification Test*, EVT, relativi a vuoto, ripetuti cicli di temperatura, UV-C ed UV policromatico per gli EVT-E1 e combinazione di vuoto o atmosfera simulata marziana con la dose massima di UV policromatico per gli EVT-E2).

4.1. RESISTENZA AGLI STRESS TERRESTRI

4.1.1. BASSE TEMPERATURE

Già gli studi condotti da SELBMANN *et al.* (2005) avevano individuato, per i tutti gli isolati studiati, la loro natura psicrofila con un *optimum* di crescita nell'intervallo di 10-20°C ed in molti casi con crescita ancora rilevata a 0°C.

In questo lavoro è stata dimostrata non solo la sopravvivenza degli isolati saggiati dopo 12 mesi di conservazione a 5 diverse basse temperature (da 0 a -25°C) ma la loro resistenza ad almeno 7 ripetuti cicli di scongelamento e congelamento a tali temperature. In tutti i casi, infatti, gli isolati dimostrano di non esserne influenzati, mantenendo intatta la loro abilità non solo di germinazione ma anche di formazione delle colonie (tab. 3.2, 3.3 e 3.4). Questo risultato appare rilevante se comparato con quello ottenuto da SELBMANN *et al.* (2002) sul fungo antartico filamentoso *Phoma herbarum* CCFEE 5080, in grado di resistere a non più di 4 ripetuti cicli di congelamento a -25°C e scongelamento.

È noto che gli organismi polari terrestri, in particolare, sono in grado di sopravvivere sia a temperature inferiori agli 0°C per lunghi periodi sia ai frequenti episodi giornalieri di congelamento e scongelamento che caratterizzano gli ambienti polari (MONTIEL, 2000).

Sebbene nell'intero continente antartico siano presenti funghi capaci di crescere sia a basse temperature sia a temperature maggiori di 35°C, molti di essi risultano essere psicrofili e, più spesso, mesofili psicrotolleranti. Gli psicrofili, in grado di crescere intorno agli 0°C, con un *optimum* di temperatura intorno a 15°C ed un *maximum* inferiore od uguale a 20°C (VISHNIAC, 2006; ROBINSON, 2001), ed i mesofili psicrotolleranti, in grado di crescere in un più ampio *range* di temperatura (KERRY, 1990; ZUCCONI *et al.*, 1996; AZMI & SEPPELT, 1997; ROBINSON, 2001), sono indicativi, rispettivamente, di un adattamento a condizioni ambientali che si presentano stabilmente fredde o a condizioni instabili con forti fluttuazioni termiche (ONOFRI, 1999; ONOFRI *et al.*, 2004; SELBMANN *et al.*, 2005; RUISI *et al.*, 2007).

L'abilità di tollerare sia temperature estremamente basse che rapidi e frequenti cambiamenti di temperatura da parte dei funghi neri meristemati antartici perciò non sorprende, dal momento che l'ambiente in cui vivono, il deserto freddo delle Valli Secche di McMurdo, è caratterizzato non solo da basse temperature ma anche da forti escursioni termiche. Basti pensare che la temperatura sulla superficie delle rocce, durante l'estate australe può, in soli 42 minuti, passare anche 14 volte attraverso il punto di congelamento dell'acqua (NIENOW & FRIEDMANN, 1993).

Malgrado i meccanismi di questa resistenza non siano ancora stati studiati è possibile ipotizzarne alcuni sulla base delle caratteristiche peculiari appartenenti ai funghi neri meristemati: tra queste la possibile azione protettiva che è legata alla produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS).

I funghi neri meristemati antartici producono frequentemente sostanze polimeriche extracellulari, esternamente alle ife o in prossimità dei conidi multicellulari, come nel caso di *C. minteri* CCFEE 5187 (SELBMANN *et al.*, 2005) (fig. 3.7B1) le cui colonie sono avvolte da spesse croste di matrice di EPS o di *Friedmanniomyces endolithicus* isolato da comunità criptoendolitiche di roccia pegmatite, nella Terra Vittoria del Nord (ONOFRI *et al.*, 1999).

DE LOS RÌOS *et al.* (2003) riportano una situazione simile anche per il microsistema endolitico antartico: la presenza descritta di una matrice EPS, come parte integrante dell'organizzazione dei biofilm microbici litici esistenti, potrebbe creare e mantenere condizioni microambientali appropriate, tamponando le fluttuazioni di disponibilità di nutrienti e di pH. In questo modo gli EPS del biofilm contribuirebbero ad arginare le sfavorevoli condizioni fisiche e chimiche che si creano (su nano-scala) nelle rocce alle basse temperature, preservando così i microrganismi che ne compongono le comunità (DE LOS RÌOS *et al.*, 2004).

Il meccanismo attraverso il quale queste molecole agiscono non è stato ancora ben chiarito, tuttavia si suppone proteggano le cellule dal cambiamento della permeabilità agli ioni Na⁺ e K⁺ durante il congelamento e lo scongelamento e agiscano sulla viscosità della soluzione extracellulare evitando l'eccesso di stress.

Sembra che possano anche alterare la struttura delle molecole dell'acqua, all'interno ed intorno alle cellule, formando durante il congelamento una struttura vitrea che controlla la cristallizzazione stessa dell'acqua (RUISI *et al.*, 2007). SELBMANN *et al.* (2002) hanno dimostrato che la produzione di EPS in un isolato fungino antartico di *Phoma herbarum* Westend, un fungo filamentoso isolato dal suolo, è relativa alla sua abilità nel prevenire il danno dovuto ai ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. In questo caso, quando gli EPS sono presenti, il micelio, dopo ripetuti cicli di congelamento/scongelamento, mantiene un'alta capacità di crescita; al contrario, in loro assenza, la crescita fungina è marcatamente ridotta.

Un altro elemento caratteristico di questi funghi è costituito dalla spessa parete melanizzata che riveste le cellule e le intere microcolonie (GORBUSHINA, 2003) (fig. 3.7A1), proteggendo, probabilmente, dalla perdita d'acqua per essiccazione (STERFLINGER & KRUMBEIN, 1995; STERFLINGER, 1998) e dallo stress osmotico (STERFLINGER, 2005) indotti dalle basse temperature. Uno strato mucillaginoso, possibilmente incrostato di melanina, copre lo strato esterno delle cellule sia dei controlli sia dei trattati di *C. minteri* mostrati in figura 3.8A.

Oltre a ciò non si può escludere che altri meccanismi di tolleranza al freddo siano utilizzati, come quelli legati all'alterazione della composizione dei lipidi di membrana che in Antartide, come in altri habitat freddi, è stata più volte riscontrata (RUSSELL, 1990). Alcuni cambiamenti nella composizione degli acidi grassi in risposta alle basse temperature sono stati osservati in isolati antartici dei funghi filamentosi *Geomyces vinaceus* Dal Vesco e *G. pannorum* (Link) Sigler & J.W. Charmich. (FINOTTI *et al.*, 1993) e dei lieviti *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner, *C. laurentii* (Kuff.) C.E. Skinner e *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison (ZLATANOV *et al.*, 2001); analogamente, è stato osservato un incremento nella produzione di acido linolenico e arachidonico in alcuni isolati antartici di *Mortierella alpina* Peyronel, *M. antarctica* Linnem. e in *Cadophora fastigiata* Lagerb. & Melin quando coltivati a basse temperature (MAGGI *et al.*, 1991; ONOFRI *et al.*, 1994).

Altri adattamenti alla disidratazione e allo stress osmotico indotti dalle basse temperature risultano spesso, invece, dalla sintesi di differenti soluti compatibili che hanno un ruolo di protezione dell'attività enzimatica. Ogni qualvolta infatti un fattore di stress esterno altera la composizione del contenuto intracellulare di soluti, per distruzione dei legami idrogeno (congelamento) o per perdita di acqua (disidratazione), la cellula fungina tende a compensarne l'effetto negativo con l'accumulo intracellulare (osmoregolazione) di uno o più specifici soluti chiamati *soluti compatibili* od *osmoliti* (BLOMBERG & ADLER, 1992). Si tratta di composti dal basso peso molecolare che operano a basso potenziale osmotico, senza che sia richiesta alla cellula alcuna modifica strutturale o enzimatica sensibile, e che, anche ad alte concentrazioni, non interferiscono né con il metabolismo intracellulare né con l'attività enzimatica. Tra questi i polioli (alcoli poliidrici o polidrossilici), come il glicerolo (BROWN, 1978), il mannitolo (FEOFILOVA *et al.*, 1994) ed alcuni zuccheri derivati, come il trealosio (THEVELEIN, 1984; WEINSTEIN *et al.*, 2000), che operano in più modi: come crioprotettori, in grado cioè di abbassare il punto di congelamento del fluido intracellulare (NASH, 1966), come osmoregolatori (LEWIS & SMITH, 1967), nella regolazione coenzimatica, come riserve di carboidrati e composti traslocatori (JENNINGS, 1984).

Un accumulo di carboidrati crioprotettori in risposta a temperature di crescita non ottimali è stato osservato in *Humicola marvinii* M.E. Palm & Weinst. (trealosio intracellulare e glicerolo extracellulare) e in *Mortierella elongata* Linnem. (trealosio intracellulare), entrambe isolate dal suolo minerale dei pendii rocciosi dell'Antartide marittima (WEINSTEIN *et al.*, 2000). Sembra che il trealosio prodotto in *Mortierella elongata* a basse temperature agisca incorporandosi nei lipidi di membrana e mantenendo così separati i gruppi polari terminali delle catene aciliche; durante l'essiccamento, invece, ad alte concentrazioni, pare aiuti le membrane a conservare le proprie proprietà fisiche analogamente a quelle dei lipidi idratati (CROWE & CROWE, 1993).

L'abilità duplice di poter stabilizzare gli enzimi così come le membrane, rende il trealosio in grado di svolgere un importante ruolo negli organismi chiamati

anidrobiotici, cioè capaci di sopravvivere alla completa disidratazione (CROWE *et al.*, 1984, 1986, 1992; BILLI & POTTS, 2002).

4.1.2. IRRAGGIAMENTO UV

La radiazione solare è ecologicamente e biologicamente un fattore importante; oltre ad essere un elemento necessario al processo di fotosintesi è anche un fattore ambientale dannoso per l'ecosistema terrestre, a causa della vulnerabilità degli organismi alla radiazione UV-B (280-315 nm) e, in alcuni casi, alla radiazione UV-A (315-400 nm) (EDWARDS *et al.*, 2004).

È noto che lo strato di ozono stratosferico che protegge la Terra dalla radiazione solare a bassa lunghezza d'onda, cioè dalla radiazione ultravioletta B (fig. 4.1), biologicamente pericolosa, è o è stato in diminuzione per via, principalmente, del rilascio antropogenico di inquinanti atmosferici come i clorofluorocarburi (CFC), clorocarburi (CC) e organobromuri (OB), così come è noto il conseguente incremento del livello della radiazione solare UV-B che raggiunge la superficie della Terra (FREDERICK & SNELL, 1988; FREDERICK *et al.*, 1989; BLUMTHALER & AMBACH, 1990; CRUTZEN, 1992; KERR & McELROY, 1993).

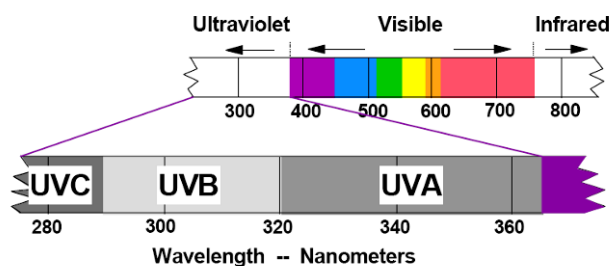


Figura 4.1 – La porzione dello spettro ultravioletto relativa quella della radiazione solare sulla superficie terrestre (TAKAHASHI & OHNISHI, 2004).

La riduzione dello strato di ozono è stata riportata sia in Antartide come nell'Artico e nelle regioni subartiche (KERR, 1994), ma è sull'Antartide che risulta più marcata, dove i livelli di ozono, rilevati fin dal 1978 (FARMAN *et al.*, 1985), negli ultimi decenni sono diminuiti più del 70% durante il periodo del tardo inverno e inizio primavera (SINHA & HÄDER, 2002), raddoppiando i livelli di UV-B sulla superficie terrestre (MADRONICH *et al.*, 1998).

Questa deplezione è comunemente attribuita alla combinazione unica di freddo estremo e di circolazione della stratosfera, relativa al vortice polare, che determina le condizioni favorevoli per le reazioni dell'ozono con i CFC. In questo contesto le nuvole della stratosfera polare giocano un importante ruolo nella formazione del buco dell'ozono antartico nel periodo primaverile, attivando il cloro e denitrificando la stratosfera (FARMAN *et al.*, 1985; LUBIN & JENSEN, 1995).

La radiazione ultravioletta induce effetti dannosi in tutti gli organismi viventi, dai batteri alle piante inferiori e superiori, agli animali e agli umani (TAKAHASHI & OHNISHI, 2004). Mentre la radiazione UV-C (<280 nm) non è ecologicamente rilevante, dal momento che viene quantitativamente assorbita dall'ossigeno e dall'ozono atmosferico terrestre, lo stesso non si può dire della radiazione a lunghezza d'onda più lunga, l'UV-B e l'UV-A, anche se la maggior parte viene assorbita dall'ozono della stratosfera (MADRONICH *et al.*, 1998).

L'alta esposizione UV danneggia una varietà di biomolecole vitali. Mentre l'UV-A generalmente causa soltanto danni indiretti nel DNA catalizzando la formazione di intermedi chimici come le specie reattive dell'ossigeno, l'UV-B è la componente biologicamente efficace della radiazione solare che oltre ad agire direttamente sul DNA, inducendo la formazione di molti fotoprodotti (FRIEDBERG *et al.*, 1995; GRIFFITHS *et al.*, 1998), distrugge le proteine, inclusi organelli e lipoproteine della membrana cellulare (KARENTZ, 1994).

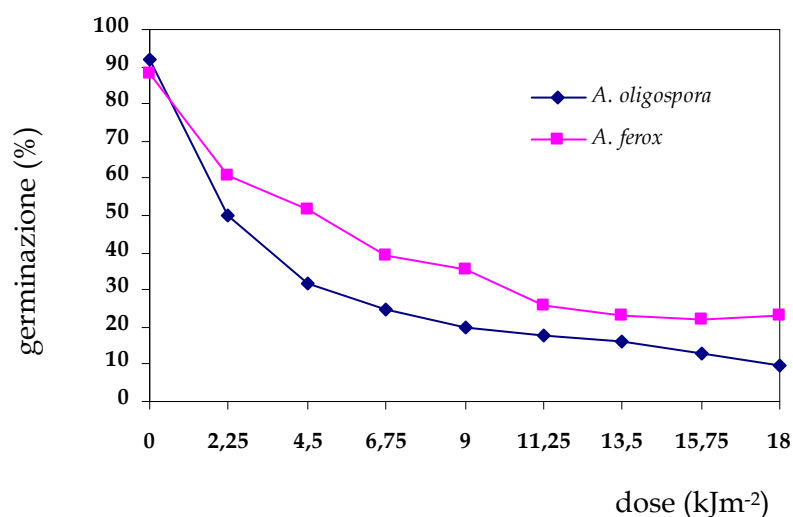
La riduzione dei livelli di ozono stratosferico che si verifica durante il periodo primaverile sull'Antartide ha accresciuto negli anni gli studi sulle abilità sia dei biota acquatici sia di quelli terrestri di tollerare la crescita dei livelli di radiazione UV-B sulla Terra.

I risultati dei test di germinazione riportati nelle figure 3.5 e 3.6 dimostrano come gli isolati di funghi neri d'interesse, che colonizzano rocce arenarie esposte, per parecchi mesi durante l'estate australe, ad alte radiazioni solari, siano ben adattati a condizioni di forte esposizione UV-B.

In precedenza sono stati compiuti studi sugli effetti della radiazione UV su una sospensione di spore di un isolato fungino europeo, *Arthrobotrys oligospora* Fresen.,

confrontato con uno antartico, morfologicamente simile, nema- ed entomofago, *A. ferox* Onofri & Tosi (ZUCCONI *et al.*, 2002). In quella circostanza le spore dell'isolato antartico *A. ferox* avevano mostrato una più alta tolleranza agli UV-B dimostrata da una maggiore abilità di germinazione. Tale abilità sembra probabilmente legata alla capacità di produrre carotenoidi fotoprotettivi, micosporine ed aminoacidi derivati micosporine-simili (MAAs), come agenti protettori dagli UV, localizzati nella parete cellulare e nella struttura di membrana delle cellule (ARCANGELI *et al.*, 1997; ARCANGELI & CANNISTRARO, 2000).

I risultati ottenuti in questo lavoro sull'irraggiamento ad aumentati livelli di UV-B, se comparati con i dati relativi ai due ceppi di *Arthrobotrys* fino a 120' di irraggiamento, sono interessanti. *C. antarcticus* CCFEE 515, *C. minteri* CCFEE 5187 e *C. antarcticus* 534 sono, infatti, capaci di mantenere una percentuale di germinazione cellulare ben più alta di quella mostrata da *A. ferox*: il 50% della sopravvivenza dei propaguli è raggiunto dopo una dose di irraggiamento UV-B tra i 16,2 ed i 21,6 kJm⁻² contro i 2,5 kJm⁻² osservati per le spore del fungo antartico *A. ferox* (fig. 4.2). Inoltre dopo poco più di 18 kJm⁻² *C. antarcticus* CCFEE 515, *C. minteri* CCFEE 5187 e *C. antarcticus* 534 mostrano una percentuale di mortalità rispettivamente del 39, 41 e 60% rispetto al 75% delle spore di *A. ferox*.



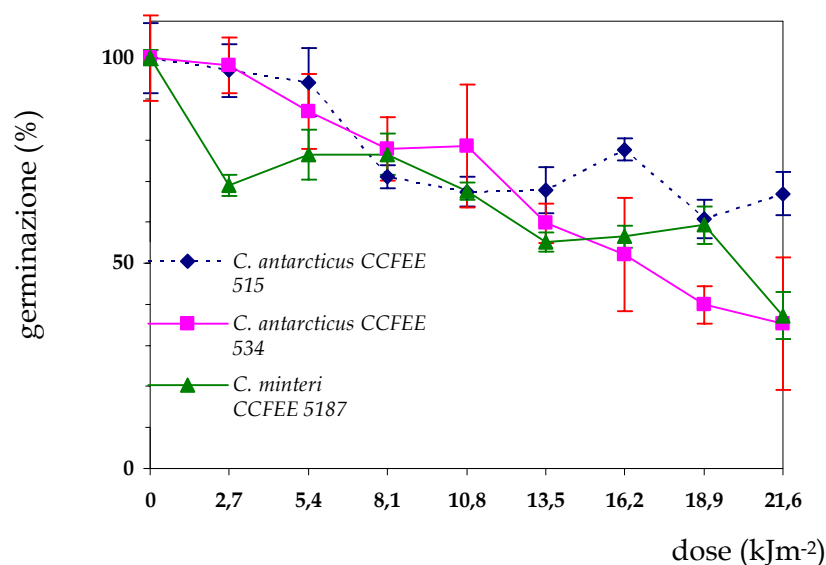


Fig. 4.2 – Curva di germinazione di spore di *Arthrotrichia oligospora* e *A. ferox* (ZUCCONI *et al.*, 2002) confrontata con quella dei propaguli di *C. antarcticus* (CCFEE 515 e 534) e *C. minteri* (CCFEE 5187), irraggiati con UV-B per tempi da 0 a 120' (incrementi di 15').

Generalmente i microrganismi terrestri in ambienti esposti ad alte radiazioni UV producono diverse sostanze (carotenoidi, micosporine, melanina, etc.) che sono potenzialmente in grado di proteggerli contro i danni da UV-B. Alcuni sono composti intra- o extracellulari che proteggono le molecole coinvolte criticamente nel metabolismo cellulare, altri sono pigmenti accessori che possiedono proprietà utili alla dissipazione dell'energia in eccesso proveniente dall'UV-B, così da evitare la generazione di radicali di ossigeno liberi tossici (SMITH *et al.*, 1992; BUTLER & DAY, 1998; COCKELL & KNOWLAND, 1999; VOLKMANN *et al.*, 2003).

Alcuni tra i taxa fungini registrati in Antartide, quali *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Epicoccum nigrum* Link, *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes e *Ulocladium consortiale* (Thüm.) E.G. Simmons (DOMSCH *et al.*, 1980) sono funghi melanizzati conosciuti per la loro resistenza agli UV (DOMSCH *et al.*, 1980). HUGHES *et al.* (2003) hanno osservato la produzione di un pigmento marrone, molto probabilmente melanina, da un isolato fungino antartico di *Phoma herbarum* nelle 24 ore di esposizione ad elevata radiazione UV-B.

Le melanine appartengono ad un gruppo di pigmenti comuni tra i funghi, incluso il genere *Phoma* (STERFLINGER, 2000) comune in Antartide che, per la loro

forte capacità di assorbire nella regione UV dello spettro (BUTLER & DAY, 1998) potrebbero proteggere le cellule dal danno UV. Tra l'altro molti autori riferiscono della presenza di pigmenti melaninici protettivi nelle pareti cellulari di lieviti e funghi neri (BELL & WHEELER, 1986; DIAKUMAKU, 1995; KOGEJ *et al.*, 2003; DADACHOVA *et al.*, 2007).

Questa più alta resistenza degli isolati saggiati potrebbe quindi essere la conseguenza delle loro caratteristiche morfologiche e fisiologiche quali le pareti fortemente ispessite e pigmentate e la presenza di EPS.

Le foto al SEM ed al TEM hanno, di fatto, evidenziato la presenza di una matrice polimerica extracellulare che riveste non solo le singole cellule (compattandole intracolonialmente) ma l'intera colonia esposta agli UV-B (fig. 3.7 e 3.8), probabilmente conferendo loro una protezione mediante assorbimento (LOUIS & COOKE, 1983, 1985).

Allo stesso modo le microfotografie al TEM hanno rilevato la presenza di melanina nella spessa parete cellulare a formare strati di granuli elettron-densi (fig. 3.8B) che agiscono probabilmente come UV *scavenger* (BELL & WHEELER, 1986; URZÌ *et al.*, 1995) e non solo.

Analogamente a ciò che avviene per il lievito nero *Aureobasidium pullulans* nell'assorbimento di ioni rame (GADD & MOWLL, 1985), infatti, le proprietà della melanina di legare i metalli sia nella parete cellulare sia intorno alla cellula, nella matrice di EPS, potrebbero contribuire non soltanto a fornire ioni essenziali a questi funghi, ma a stimolarne la sopravvivenza e la crescita in condizioni stressanti (GORBUSHINA, 2003).

In ogni caso è stato ipotizzato che potrebbero essere coinvolti altri gruppi di composti, capaci di assorbire gli UV, diversi dalla melanina, quali ad esempio le micosporine, che hanno un efficiente spettro di assorbimento UV tra 310-320 nm, e la cui presenza è già stata riportata per gli MCF (GORBUSHINA, 2003). Alcuni microrganismi contengono una combinazione di pigmenti differenti, che individualmente non riuscirebbero ad operare un'adeguata protezione, ma che

insieme possono minimizzare il danno da radiazione UV (WYNN-WILLIAMS & EDWARDS, 2001).

La formazione, invece, di globuli intracellulari ben delimitati nelle cellule trattate (fig. 3.8B) potrebbe coincidere con l'accumulo intracellulare, causato dallo stress osmotico per perdita d'acqua, di soluti compatibili.

In questo contesto, perciò, i funghi neri meristemati isolati dalle comunità critoendolitiche possono rappresentare quel modello di organismo in grado di esibire differenti meccanismi protettivi contro gli UV-B. L'accrescimento meristematico, che permette di esporre la minor superficie possibile alla luce del sole, la presenza di una spessa parete melanizzata, l'abilità potenziale, analogamente ad altri funghi neri che abitano le rocce, di produrre micosporine legate non soltanto alla schermatura UV (GORBUSHINA *et al.*, 2003), insieme, sono da considerare a tutti gli effetti una grande ed efficace strategia difensiva contro le radiazioni UV (SELBMANN *et al.*, 2005; STERFLINGER, 2005).

Il test di irraggiamento UV-C è stato effettuato su campioni essiccati di *C. antarcticus* CCFEE 515, che tra i tre isolati si è dimostrato maggiormente resistente agli UV-B; la risposta positiva ottenuta dopo la somministrazione di una dose compresa tra 24 e 2880 kJm⁻², manifestata con la conservazione della vitalità (fig. 3.9), conferma maggiormente il dato acquisito precedentemente relativo alla resistenza all'esposizione UV-B. In comparazione con le ascospore delle specie licheniche *Fulgensia bracteata* (Hoffm.) Räsänen e *Xanthoria elegans* (Link) Th.Fr. esposte alla stessa dose massima di UV-C (DE VERA *et al.*, 2003), l'isolato ha però dimostrato una capacità di germinazione notevolmente minore, nonostante l'irraggiamento sia avvenuto direttamente sulle colonie essiccate che, rispetto ai singoli propaguli, dovrebbero offrire una maggiore protezione. Una diversa resistenza all'irraggiamento era stata riscontrata tra le ascospore delle specie licheniche, da ritenersi legata, secondo gli autori, alla loro disposizione nell'asco e alla strutturata e compatta parete di quest'ultimo; unitamente all'azione protettiva della matrice gelatinosa del tallo, le ascospore stratificate superiormente

proteggerebbero quelle poste nella porzione inferiore dell'asco (DE VERA *et al.*, 2004).

4.1.3. STRESS OSMOTICO

Gli isolati sono stati saggiati a condizioni di stress osmotico aggiungendo nel terreno di coltura concentrazioni sempre maggiori (fino al 27%) di NaCl. I risultati ottenuti rivelano una buona tolleranza allo stress osmotico da parte di tutti e tre gli isolati. I campioni, infatti, sono ancora in grado di crescere alla concentrazione salina del 24%, e la crescita da loro dimostrata è comparabile con quella di un vero alofilo, come il lievito nero *Hortaea werneckii* (Horta) Nishim. & Miyaji, isolato a Delos (Grecia), che cresce in un intervallo di 0-27% di NaCl con un *optimum* al 7% (STERFLINGER *et al.*, 1998).

Il continente antartico è estremamente arido; le precipitazioni nevose, unica forma di precipitazione, sono spesso meno di 100 mm in un anno e prima di potersi sciogliere in gran parte sublimano facendo in modo che ben poca umidità sia in grado di penetrare nei microhabitat esistenti (WYNN-WILLIAMS & EDWARDS, 2000). Tale condizione è peggiorata dalla presenza dei forti venti catabatici che, promuovendo rapidi fenomeni di evaporazione, favoriscono la formazione di relativamente alte concentrazioni saline su rocce, laghetti poco profondi e suolo (NISHIYAMA, 1977; DES MARAIS, 1995). Di conseguenza la crescita attiva microbica in un ambiente così estremamente freddo è influenzata dalla formazione di ghiaccio e necessariamente dalla poca acqua allo stato liquido che è biologicamente disponibile (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003).

La presenza di tali condizioni ci spinge a supporre che microrganismi isolati da comunità criptoendolitiche debbano esibire una certa resistenza agli stress osmotici; i dati ottenuti sono ad ogni modo da ritenere ben oltre ogni aspettativa. Le analisi ultrastrutturali (TEM) hanno mostrato come la resistenza di questi tre isolati ad alte concentrazioni di NaCl sia legata quasi certamente al grado di melanizzazione cellulare (fig. 3.15); ciò è in accordo con i cambiamenti nella

melanizzazione della parete cellulare e della struttura della colonia rilevata in specie alofile e xerofile del genere *Trimmatostroma* in ambienti ipersalini (KOGEL *et al.*, 2006). Sebbene entrambe le specie di riferimento, *T. salinum* e *T. abietis* provengano da nicchie ecologiche molto differenti tra loro (le saline per il primo e le rocce per il secondo), l'essiccamento atmosferico e l'ipersalinità impongono loro uno stress caratteristico legato al basso potenziale d'acqua che si riflette sulla distribuzione della melanina nella cellula. Mentre in *T. salinum* la melanizzazione si esprime a livello cellulare, dove ciascuna cellula è protetta da una spessa parete avente un distinto compatto ed denso strato di melanina, nella specie alotollerante *T. abietis* i granuli di melanina legati sono meno organizzati e si trovano depositati nello strato esterno della matrice polisaccaridica. Come per *T. abietis*, gli isolati di questo lavoro potrebbero reagire allo stress indotto dal cloruro di sodio a livello della colonia, manifestando la presenza della melanina lontano dalla parete all'esterno della matrice polisaccaridica (fig. 3.15).

Solitamente i microrganismi che si adattano ad ambienti caratterizzati da moderati ed alti contenuti salini immagazzinano, in risposta allo stress idrico, un gruppo particolare di osmoliti organici (ROBERTS, 2005); i funghi, inclusi i lieviti, reagiscono allo stress osmotico con l'accumulo intracellulare di specie chimiche neutre, i soluti compatibili, per la maggior parte rappresentati dal glicerolo, arabitolo, eritritolo e dal trealosio (BLOMBERG & ADLER, 1992; BREWER 1999; BROWN *et al.*, 1972; BROWN, 1978; LAHAV *et al.*, 2002; PASCUAL *et al.*, 2002) che ne mantengono positiva la pressione di turgore.(vedi paragrafo 4.1.1).

L'accumulo di abbondanti globuli intracellulari osservati alle microfotografie al TEM suggerisce perciò un possibile coinvolgimento nei funghi neri di soluti compatibili in veste di osmoregolatori (STERFLINGER, 1998).

4.2. RESISTENZA A CONDIZIONI SIMULATE SPAZIALI E MARZIANE

Le buone risposte ottenute per i singoli fattori di stress terrestri hanno consentito l'utilizzazione degli isolati, nella seconda parte del lavoro di tesi, come modello di studio per prove di simulazione delle condizioni spaziali e marziane. Il superamento di tali prove era necessario per verificare la loro idoneità all'invio sulla Stazione Spaziale Internazionale (esperimento LIFE).

Sia i risultati ottenuti nei cicli di congelamento/scongelo, infatti, che quelli relativi all'esposizione UV e allo stress osmotico, acquisiscono notevole importanza in vista delle frequenti fluttuazioni termiche, nell'ordine di $-20/+20^{\circ}\text{C}$, delle alte dosi UV, sia policromatiche che monocromatiche, e del vuoto ai quali questi campioni sono stati sottoposti nei test di verifica ed idoneità per il volo spaziale (Experiment Verification Test - EVTs).

Al termine delle EVTs gli isolati, a cui si sono aggiunti i campioni di roccia, hanno complessivamente dimostrato di possedere una buona capacità di resistenza sia a condizioni simulate spaziali (vuoto, ampie fluttuazioni termiche e radiazioni mono e policromatiche), applicate singolarmente o in combinazione, sia a quelle simulate marziane (atmosfera marziana e UV policromatico), per brevi e/o lunghe esposizioni, per un totale di 13 prove. Questo risultato è sicuramente significativo in vista dell'esperimento LIFE, anche se non sorprende in considerazione delle caratteristiche morfologiche ed adattative peculiari possedute da questi funghi.

Tra gli isolati, *C. minteri* è risultato essere il più resistente alle condizioni applicate; la sua capacità di sopravvivenza e resistenza è stata osservata sia nei test colturali, con l'eccezione dell'esposizione combinata al vuoto e alla dose massima di UV policromatico, sia in quelli colorimetrici. Questi ultimi, non solo hanno confermato i risultati ottenuti con le prove colturali, soggette a variabili non sempre prevedibili, ma hanno anche confutato l'unico risultato negativo che era stato ottenuto in coltura.

Sottoposto alla condizione più offensiva tra quelle degli EVT_s, quella del vuoto combinato con la dose massima di UV 200-400 nm pari a $1,5 \times 10^5$ kJm⁻², *C. minteri* potrebbe aver perduto la capacità di crescere in coltura. Alcune specie di microrganismi, infatti, adattati a condizioni ambientali estreme, presentano delle difficoltà di crescita sui terreni normalmente utilizzati in laboratorio. Questi microrganismi, dopo essere stati esposti a particolari condizioni di stress, entrano in uno stato definito “vitale ma non coltivabile” (*viable but not culturable* - VBNC) (WEICHART, 1999). In questo stato le cellule mantengono buona parte delle caratteristiche proprie delle cellule vitali, come “integrità e vitalità cellulare”. Questo stato di non rilevabilità sembra essere una conseguenza della *dormienza*, vale a dire l’assenza di significativa attività cellulare caratterizzata da ridotta attività metabolica, o della *anidrobiosi*, cioè la completa o quasi totale inibizione dell’attività metabolica; dormienza ed anidrobiosi sono, per definizione, fenomeni reversibili (FEOFILOVA, 2003). In questo modo cellule dormienti possono non mostrare alcuna attività cellulare né assorbimento di nutrienti. A questo punto il criterio necessario per determinarne la vitalità cellulare presume la presenza di integrità cellulare, membrana cellulare intatta, presenza di DNA e RNA e la potenzialità di effettuare sintesi proteica (WEICHART, 1999). L’utilizzo su *C. minteri* dei saggi colorimetrici, con i fluorocromi FUN 1 e SYTOX Green, ha permesso di valutare lo stato biologico dell’isolato dimostrandone, dopo opportuna reidratazione, non solo la vitalità ma anche l’attività metabolica (tab. 3.25 e figg. 3.31-3.35).

I risultati degli irraggiamenti alle dosi massime di UV policromatico, sia separati che in combinazione, assumono un valore di particolare rilevanza in considerazione del fatto che la dose di radiazione a cui sono stati sottoposti gli isolati in 20 gg. corrisponde a quella che riceveranno i campioni nello spazio nell’arco di 1,5 anni. Sebbene, inoltre, dal confronto tra le figg. 3.25 e 3.36 relative alla vitalità ed alla mortalità rilevate con i fluorocromi, emerga una non completa sovrapponibilità dei risultati, da imputare sia alla forte oscillazione dei dati intorno alla media sia alla forte variabilità delle risposte nell’ambito dei singoli

test, appare chiaro che l'isolato *C. minteri* resiste ottimamente a tutti i trattamenti estremi cui è stato sottoposto tanto che per alcuni test (UV 254 nm a 100 Jm^{-2} , UV 200-400 nm a 1,5, $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$, vuoto a 10^{-5} Pa per 1 ora ed 1 settimana e cicli a $-20/+20^\circ\text{C}$) sembra addirittura essere stimolato.

Per quanto riguarda i frammenti di roccia colonizzata, i risultati positivi ottenuti per la maggioranza delle condizioni applicate sono stati incoraggianti; i test colturali, gli unici effettuati sui frammenti di roccia, hanno sempre indicato il mantenimento della vitalità dei funghi, delle alghe e dei batteri della comunità cryptoendolitica. I diversi valori di biodiversità riscontrati dopo i trattamenti (tab. 3.7), così come la prevalenza di una componente biologica rispetto alle altre, è probabilmente da imputare alla non uniformità dei frammenti di roccia iniziali, presumibilmente diversamente colonizzati. Ciò permette anche di spiegare le differenze osservate nel numero di alghe tra il test del vuoto dopo 1 h di esposizione (0) ed quelli relativi al vuoto dopo 1 settimana (455) o 20 giorni (638), così come il basso numero di CFU alla dose minore di UV-C (10 Jm^{-2}) (2) rispetto a quello ottenuto con le dosi maggiori di 100 (455) e 1000 Jm^{-2} (303).

Soltanto tre campioni risultano completamente negativi ai test colturali, cioè quelli relativi all'esposizione alle dosi di UV 200-400 nm di $1,5 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ (EVT-E1) e al vuoto (20 gg) combinato con la dose UV massima di $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ (EVT-E2). Gli 8 dati positivi ottenuti, su 11 test effettuati, hanno complessivamente dimostrato una buona vitalità della comunità rispetto al frammento di controllo mantenuto in laboratorio. La mancanza di 2 dei test previsti, quelli relativi alla combinazione della dose UV 200-400 nm $1,5 \times 10^5 \text{ kJm}^{-2}$ (EVT-E2) con le condizioni marziane ed il corrispondente *dark control*, è dovuto alla scarsità del numero dei frammenti disponibili. Dei due campioni, infatti, uno era stato impiegato per una precedente semina non andata a buon fine e l'altro è stato destinato a future indagini mediante l'utilizzo della microscopia confocale.

La mancanza di funghi neri lichenizzati e non, su MEA, al momento delle osservazioni, è probabilmente da ricondurre alla lunga fase di latenza che

caratterizza molti isolati di funghi neri delle rocce, nonché dall'azione competitiva della componente fungina a rapida crescita (funghi filamentosi e lieviti).

4.3. RESISTENZA ALLE ALTE TEMPERATURE

Un ottimo risultato si è ottenuto esponendo gli isolati essiccati alle temperature di 60, 80 e 90°C in previsione della possibilità che tali temperature siano raggiunte durante le fasi di volo e stazionamento nello spazio (fig. 3.44-3.47). Al termine dei trattamenti sia gli isolati *C. antarcticus* CCFEE 515, 534 e *C. minteri* CCFEE 5187 per la temperatura di 60°C sia gli isolati più idonei per il volo spaziale, *C. antarcticus* CCFEE 515 e *C. minteri* per le temperature di 80 e 90°C hanno dimostrato quanto questi funghi meristemati possano resistere, in stato essiccato, alle alte temperature, sia a breve (15' a 60°C) che lunga esposizione (60' a 60, 80 e 90°C). Questa straordinaria resistenza è stata confermata dai test colorimetrici condotti su *C. minteri*: l'isolato una volta reidratato, dopo 60' di esposizione a 90°C, dimostra, rispetto al controllo, non soltanto di resistere ma di essere stimolato (fig. 3.48).

Generalmente, per i funghi neri meristemati melanizzati valori di temperatura letali per una colonia completamente idratata e fisiologicamente attiva rientrano tra i 35 ed i 75°C; se la colonia è in stato disidratato resiste a 120°C per almeno 30 minuti, riacquistando l'attività di crescita dopo il trasferimento su un substrato fresco (STERFLINGER *et al.*, 1998). La disidratazione sembra quindi essere un prerequisito essenziale per resistere agli stress termici (STERFLINGER, 2005). La tolleranza all'essiccamento, descritta per i funghi delle rocce da STERFLINGER & KRUMBEIN (1995), fa sì che gli isolati testati possano essere disidratati senza subire danni e, in questo stato, fornire risposte positive alle elevate temperature saggiate. Considerando i risultati di questo lavoro è interessante osservare come in alcune occasioni la crescita degli isolati, essiccati e sottoposti ad alta temperatura, sembri essere addirittura stimolata dopo la loro reidratazione.

Probabilmente, come avviene per i licheni epilitici ed i cianobatteri (LARCHER, 1994), i funghi neri si comportano in modo *peciloidrico*: dopo uno stato di latenza

legato alla disidratazione, che consente loro di superare condizioni ambientali estremamente sfavorevoli, sono in grado di riprendere una crescita attiva successiva ad una re-idratazione del tallo legata al ripristino di condizioni ambientali favorevoli. È probabile che il mantenimento della vitalità e dell'attività di crescita dei funghi meristemati neri possa essere dovuto non solo alla loro spessa e peculiare parete cellulare ma anche all'accumulo intracellulare, contro i danni da disseccamento, dei già citati polioli e trealosio (STERFLINGER, 2005).

Infine, benché l'ambiente naturale dei funghi criptoendolitici antartici presi in esame sia caratterizzato da basse piuttosto che da alte temperature, bisogna ricordare che sono noti molti funghi neri meristemati che, isolati da climi caldi, anche desertici, sono costretti a tollerare temperature di gran lunga superiori a quelle richieste per la crescita ottimale; l'esposizione solare su alcune superfici rocciose infatti può, in alcune zone, raggiungere temperature superiori ai 70°C (SADOUKI & WITTMANN, 1998) e l'assorbimento della radiazione solare da parte di colonie epilitiche di questi funghi, dovuto alla loro forte pigmentazione, può portare ad un notevole incremento della temperatura della colonia (DORNIEDEN *et al.*, 1997).

5. CONCLUSIONI

Per lungo tempo le indagini esobiologiche hanno focalizzato l'attenzione su modelli procariotici (HORNECK *et al.*, 1994; NICHOLSON *et al.*, 2000) per la loro semplice organizzazione, la loro primordiale comparsa e l'apparente maggiore resistenza agli stress rispetto agli eucarioti. Oggi sappiamo che molti eucarioti, definiti estremofili, sono in grado non solo di sopravvivere, ma di vivere, ed anche prosperare, in diversi ambienti estremi (AMARAL ZETTLER *et al.*, 2002); tra questi, i funghi neri meristemati sono uno degli esempi più interessanti (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2005; STERFLINGER, 2005). In particolar modo, i funghi neri criptoendolitici che colonizzano le rocce di uno degli ambienti terrestri tra i *più estremi*, il deserto delle Valli Secche di McMurdo in Antartide, caratterizzato dalla coesistenza di molteplici condizioni ambientali particolarmente stressanti, sono già stati suggeriti come modelli eucariotici per speculazioni esobiologiche e lo studio della loro ecologia riveste un grande interesse scientifico (ONOFRI *et al.*, 2004).

Nelle Valli Secche antartiche, funghi e alghe lichenizzati, funghi neri meristemati, batteri, cianobatteri ed alghe non lichenizzate sono in grado di sopravvivere all'interno delle porosità delle rocce formando comunità criptoendolitiche *dominate dai licheni* (FRIEDMANN, 1982).

Tra i funghi neri meristemati che colonizzano queste comunità, gli isolati *Cryomyces antarcticus* CCFEE 515 e 534 e *Cryomyces minteri* CCFEE 5187 sono stati oggetto di studio del presente lavoro.

La dimostrazione dell'elevata resistenza a fattori di stress terrestri, quali basse temperature, radiazione ultravioletta ed elevata concentrazione salina, ci ha permesso di selezionarli quali candidati per successive prove di simulazione di condizioni spaziali e marziane, in previsione del loro invio nello spazio. Gli isolati fungini di *C. antarcticus* e *C. minteri*, insieme a frammenti di roccia colonizzata, sono stati quindi sottoposti a test di verifica di simulazione spaziale e marziana (EVTs), presso il DLR di Colonia, che ne valutassero la resistenza a condizioni extraterrestri. Il superamento di queste prove rappresentava una tappa necessaria

per consentire il loro invio nello spazio, come previsto dal programma LIFE (Lichens and Fungi Experiment). Tale programma nasce da una collaborazione tra Italia, Germania e Spagna, nell'ambito di EXPOSE-EuTEF dell'ESA, che si propone di saggiare la resistenza a lungo termine in ambiente spaziale di organismi criptoendolitici antartici e di licheni epilitici, esponendoli per un periodo di circa 1,5 anni sulla Stazione Spaziale Internazionale (ISS) a condizioni sia spaziali esterne che ambientali di Marte.

Come ipotizzato sulla base della provenienza e delle caratteristiche morfologiche ed adattative degli organismi antartici oggetto di studio, gli isolati fungini *C. antarcticus* CCFEE 515 e *C. minteri* CCFEE 5187, insieme alla comunità criptoendolitica dominata dai licheni, avendo superato brillantemente gli EVT, sono risultati i campioni più idonei da sottoporre ad esperimenti nello spazio.

Sia gli isolati che i frammenti di roccia colonizzata hanno, infatti, dimostrato di saper resistere a prove di simulazione spaziale riguardanti il vuoto (10^{-5} Pa per 1h e 1 settimana), ripetuti cicli di temperatura (da -20°C a $+20^{\circ}\text{C}$ per due settimane), UV-C (254 nm a 10 Jm^{-2} , 100 Jm^{-2} e 1000 Jm^{-2}) e l'intero spettro UV (200-400 nm, lampada SOL 2000, a 1,5, 1.5×10^3 e $1.5 \times 10^5\text{ kJm}^{-2}$), a una combinazione di questi nonché a condizioni ambientali di Marte.

Fino ad oggi, indipendentemente dall'organismo indagato, le ricerche condotte in questo campo si erano focalizzate primariamente sugli effetti dell'UV-B, UV-C e in minor misura dell'UV-A o sull'effetto del vuoto, ma mai su un ampio intervallo di parametri test come quello qui sperimentato (HORNECK, *et al.*, 1994; DE VERA *et al.*, 2003, 2004).

Gli esperimenti descritti in questo lavoro sono stati i primi effettuati su funghi neri e su frammenti di roccia colonizzata in condizioni spaziali simulate. La capacità di sopravvivere ad un così ampio intervallo di condizioni estreme da parte dei singoli microrganismi fungini e dell'intera comunità si basa, da un lato sulle peculiari caratteristiche morfologiche degli isolati stessi, quali le spesse pareti melanizzate delle loro cellule isodiametriche (SELBMANN *et al.*, 2005), la presenza all'esterno delle ife di sostanze polimeriche extracellulari (SELBMANN *et al.*, 2002,

2005) e l'alta adattabilità e plasticità dell'organizzazione microcoloniale, dall'altro sull'alta valenza ecologica che l'intera comunità possiede rispetto ai suoi singoli componenti, combinati con la *peciloidria*, prerequisito necessario per sopravvivere a condizioni estreme spaziali.

I risultati ottenuti promuovono quindi i funghi neri e le comunità criptoendolitiche ad affrontare un esperimento così proibitivo come quello di esposizione per così lungo tempo (1,5 anni) nello spazio (Esperimento LIFE) in condizioni di vuoto, radiazioni cosmiche e solari non solo spaziali ma anche simulate marziane, con discrete probabilità di successo.

Quindi sia frammenti di rocce antartiche di arenaria colonizzate da comunità criptoendolitiche, sia colonie di *Cryomyces antarcticus* CCFEE 515 e di *Cryomyces minteri* CCFEE 5187 partiranno per lo spazio il 6 dicembre 2007 con lo Space Shuttle. Se, come è auspicabile, l'esperimento LIFE avrà successo, anche con un esito minimo, questo risultato potrà essere utilizzato per speculare sulla possibilità di trasferimento di forme di vita da un pianeta all'altro (litopanspermia), di come alcuni organismi viventi possano sopravvivere a condizioni così estreme, i limiti entro i quali è possibile la vita sulla Terra nonché l'origine e l'evoluzione della vita.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABYZOV S.S., 1993 – Microorganisms in the Antarctic ice. In: FRIEDMANN E.I. (ed.), *Antarctic Microbiology*, Wiley-Liss, New York, pp. 265-295.
- AHMADJIAN V., JACOBS J.B., 1987 – Studies on the development of synthetic lichens. *Bibliotheca Lichenologica* **25**: 47-58.
- AMARAL ZETTLER L.A., GOMEZ F., ZETTLER E., KEENAN B.G., AMILS R., SOGIN M.L., 2002 – Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* **417**: 137.
- ARCANGELI C., CANNISTRARO S., 2000 – In situ Raman microspectroscopic identification and localization of carotenoids; approach to monitoring of UV-B irradiation stress on Antarctic fungus. *Biospectroscopy* **57**: 178-186.
- ARCANGELI C., ZUCCONI L., ONOFRI S., CANNISTRARO S., 1997 – Fluorescence study on whole Antarctic fungal spores under enhanced UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **39**: 258-264.
- AZMI O.R., SEPPELT R.D., 1997 – Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. *Polar Biology* **18**: 128-134.
- BADA J.L., 2004 – How life began on Earth: A status report. *Earth and Planetary Science Letters* **226**: 1-15.
- BELL A.A., WHEELER M.H., 1986 – Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 411-451.
- BERTOLDO C., ANTRANIKIAN G., 2002 – Starch hydrolysing enzymes from thermophilic Archea and Bacteria. *Current Opinion Chemical Biology* **6**: 151-160.
- BERTSCH A., 1966a – Über den CO₂ - Gaswechsel einiger Flechten nach Wasserdampfaufnahme. *Planta* **68**: 157-166.

- BERTSCH A., 1966b - CO₂ - Gaswechsel und Wasserhaushalt der aerophilen Grünalge *Apatococcus lobatus*. *Planta* **70**: 46-72.
- BILLI D., POTTS M., 2002 - Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology* **153**: 7-12.
- BLÖCHL E., RACHEL R., BURGGRAF S., HAFENBRADL D., JANNASCH H.W., STETTER K.O., 1997 - *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**: 14-21.
- BLOMBERG A., ADLER L., 1992 - Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology* **33**: 145-212.
- BLUMTHALER M., AMBACH W., 1990 - Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in Alpine regions. *Science* **248**: 206-208.
- BROCK T.D., 1978 - Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag, New York, pp. 465.
- BREWER M.S., 1999 - Traditional preservatives-sodium chloride. In: ROBINSON R.K., BLATT C.A., PATEL P.D. (eds) *Encyclopaedia of food microbiology*. Academic Press, London, pp. 1723-1728.
- BRUL S., NUSSBAUM J., DIELBANDHOESING S.K., 1997 - Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* **28**: 169-178.
- BROWN A.D., SIMPSON J.R., 1972 - Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology* **72**: 589-591.
- BROWN A.D., 1978 - Compatible solutes and extracellular water stress in eukaryotic microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* **17**: 181-242.
- BÜDEL B., BECKER U., FOLLMANN G., STERFLINGER K., 2000 - Algae, fungi and lichens. In: BARTHOLOTT W., POREMBSKI S. (eds), *Vegetation of Inselbergs: biotic diversity of a tropical ecosystem*. *Ecological studies* **146**: 69-90.

- BUTLER M.J., DAY A.W., 1998 - Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 1115-1136.
- BUTIN H., PEHL L., DE HOOG G. S., WOLLENZIEN U., 1996 - *Trimmatostroma abietis* sp. nov. (Hyphomycetes) and related species. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 203-209.
- CAMPBELL I.B., CLARIDGE G.G.C., 1987 - Physical weathering and rock disintegration. In: *Antarctica: soil, weathering processes and environment*. Elsevier, Amsterdam, pp. 97-117.
- CLEAVES II H.J., CHALMERS J.H., 2004 - Extremophiles may be irrelevant to the origin of life. *Astrobiology* **4**: 1-9.
- COCKELL C.S., KNOWLAND J., 1999 - Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews* **74**: 311-345.
- COWAN D.A, TOW L.A., 2004 - Endangered Antarctic environments. *Annual Review of Microbiology* **58**: 649-690.
- CROWE J.H., CROWE L.M., 1993 - Evidence for direct interaction between disaccharides and dry phospholipids. *Cryobiology* **30**: 226-227.
- CROWE J.H., CROWE L.M., CHAPMAN D., 1984 - Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**: 701-703.
- CROWE L.M., WOMERSLEY C., CROWE J.H., REID D., APPEL L., RUDOLPH A., 1986 - Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **861**: 131-140.
- CROWE J.H., HOEKSTRA F.A., CROWE L.M., 1992 - Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* **54**: 579-599.
- CRUTZEN P.J., 1992 - Ultraviolet on the increase. *Nature* **356**: 104-105.
- DADACHOVA E., BRYAN R.A., HUANG X., MOADEL T., SCHWEITZER A.D., AISEN P., NOSANCHUK J.D., CASADEVAL A., 2007 - Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE* **2**: e457. doi:10.1371/journal.pone.0000457.

- DEASON T.R., BOLD H.C., 1960 - Physiological studies I. Exploratory studies of Texas sol algae. University of Texas Publications, 6022, pp. 70.
- DE HOOG G.S., HERMANIDES-NIJHOF E.J., 1977 - The black yeast and allied hypomycetes. *Studies in Mycology* **15**: 151-222.
- DE HOOG G.S., BEGUIN H., BATENBURG-VAN DE VEGTE W.H., 1997 - *Phaeotheca triangularis*, a new meristematic black yeast from a humidifier. *Antonie van Leeuwenhoeck* **71**: 289-295.
- DE HOOG G.S., ZALAR P., URZÌ C., DE LEO F., YOURLOVA N.A., STERFLINGER K., 1999 - relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies of Mycology* **43**: 31-37.
- DE HOOG G.S., VINCENTE V., CALIGIORNE R.B., KANTARGLIOCU S., TINTELNOT K., GERRITS VAN DEN ENDE A.H.G., HAASE G., 2003 - Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *Journal of Clinical microbiology* **41**: 4767-4778.
- DE LA TORRE J.R., GOEBEL B.M., FRIEDMANN E.I., PACE N.R., 2003 - Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3858-3867.
- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., SANCHO L. G., ASCASO C., 2003 - Acid microenvironments in microbial biofilms of Antarctic endolithic microecosystems. *Environmental Microbiology* **5**: 231-237.
- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., SANCHO L.G., ASCASO C., 2004 - Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganism by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* **50**: 143-152.
- DE DUVE C., 1995 - Vital Dust: Life as a Cosmic Imperative. Basic Books, New York, pp. 362.
- DES MARAIS D.J., 1995 - The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. *Advances in Microbial Ecology* **14**: 251-274.

- DEMIRJIAN D.C., MORIS-VARAS F., CASSIDY S.C., 2001 - Enzymes from extremophiles. *Current Opinion Chemical Biology* **5**: 144-151.
- DE VERA J.P., HORNECK G., OTT S., 2003 - The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space - I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* **1**: 285-293.
- DE VERA J.P., HORNECK G., RETTBERG P., OTT S., 2004 - The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space. II: Germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Advances in Space Research* **33**: 1236-1243.
- DIAKUMAKU E., GORBUSHINA A.A., KRUMBEIN W.E., PANINA L., SOUTKHARJEVSKI S., 1995 - Black fungi in marble and limestones -an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments *Science of the Total Environment* **167**: 295-304.
- DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.-H., 1980 - Compendium of soil fungi. Academic Press, London, Volumi 1-2 (supplement reprint IHW - Verlag, Eching 1993), pp. 859 + 405.
- DORNIEDEN T., GORBUSHINA A.A., KRUMBEIN W.E., 1997 - Änderungen der physikalischen Eigenschaften von Marmor durch Pizbewuchs. *International Zeitschrift für Bauinstandsetzen* **3**: 441-456.
- EDWARDS H.G.M., WYNN-WILLIAMS D.D., LITTLE S.J., DE OLIVEIRA L.F.C., COCKELL C.S., ELLIS-EVANS J.C., 2004 - Stratified response to environmental stress in a polar lichen characterized with FT-Raman microscopic analysis. *Spectrochimica Acta Parte A* **60**: 2029-2033.
- ELLIS-EVANS J.C., WALTON D., 1990 - The process of colonization in Antarctic terrestrial and freshwater ecosystem. *Proceeding of the NIPR Symposium on Polar Biology* **3**: 151-163.
- ESA, Human Spaceflight News, 2005, www.esa.int/SEMUJM638FE.

- FARMAN J.C., GARDINER B.G., SHANKLIN J.D., 1985 – Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/ NO_x interaction. *Nature* **315**: 207-210.
- FELLER G., GERDAY C., 2003 – Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nature Review Microbiology* **1**: 200-208.
- FEOFILOVA E.P., 2003 – Deceleration of vital activity as universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**: 1-18.
- FEOFILOVA E.P., TERESHINA V.M., GOROVA I.B., 1994 – Changes in carbohydrate composition of fungi during adaptation to thermostress. *Microbiology* **63**: 442-445.
- FIGUERAS M.J., DE HOOG G.S., TAKEO K., GUARRO J., 1996 – Stationary phase development of *Trimmatostroma abietis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 217-222.
- FINOTTI E., MORETTO D., MARSELLA R., MERCANTINI R., 1993 – Temperature effects and fatty acid patterns in *Geomyces* species isolated from Antarctic soil. *Polar Biology* **13**: 127-130.
- FINSTER, K., HANSEN, A.A., LIENGAARD, L., MIKKELSEN T., KRISTOFFERSEN T., MERRISON P., NØRNBERG J, LOMSTEIN B.A., 2007 – Mars simulation experiments with complex microbial soil communities. In COCKELL C.S. (ed.), *Microorganisms and Martian Environment*, ESA Special Publication (in stampa).
- FREDERICK J.E., SNELL H.E., 1988 – Ultraviolet radiation levels during the Antarctic spring. *Science* **241**: 438-440.
- FREDERICK J.E., SNELL H.E., HAYWOOD E.K., 1989 – Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochemistry and Photobiology* **50**: 443-450.
- FRIEDGERG E.C., WALKER G.C., SIEDE W., 1995 – DNA repair and mutagenesis. Washington, DC, American Society for Microbiology, pp. 698.
- FRIEDMANN E.I., 1977 – Microorganisms in Antarctic desert rocks from Dry Valleys and Dufek Massif. *Antarctic Journal of the United States* **12**: 26-29.

- FRIEDMANN E.I., 1978 – Melting snow in the Dry Valleys is a source of water for endolithic microorganisms. *Antarctic Journal of the United States* **13**: 162-163.
- FRIEDMANN E.I., 1982 – Endolithic Microorganisms in the Antarctic Cold Desert. *Science* **215**: 1045-1053.
- FRIEDMANN E. I., 1993 – Antarctic Microbiology. Wiley-Liss, New York, pp. 634.
- FRIEDMANN E.I., KIBLER A.P., 1980 – Nitrogen economy of endolithic microbial communities in hot and cold deserts. *Microbial Ecology* **6**: 95-108.
- FRIEDMANN E.I., 1986 – The Antarctic Cold Desert and the search for traces of Life on Mars. *Advance Space Research* **12**: 265-268.
- FRIEDMANN E.I., OCAMPO-FRIEDMANN R., 1976 – Endolithic blue-green algae in the Dry Valleys: primary producers in the Antarctic desert ecosystem. *Science* **193**: 1247-1249.
- FRIEDMANN E.I., WEED R., 1987 – Microbial trace-fossil formation, biogenous, and abiotic weathering in the Antarctic cold desert. *Science* **236**: 703-705.
- FRIEDMANN E.I., MCKAY C.P., NIENOW J.A., 1987 – The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: satellite-transmitted continuous nanoclimate data, 1984 to 1986. *Polar Biology* **7**: 273-287.
- FRIEDMANN E.I., HUA M., OCAMPO-FRIEDMANN R., 1988 – Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung* **58**: 251-259.
- FRIEDMANN E.I., KAPPEN L., MEYER M.A., NIENOW J.A., 1993 – Long-term productivity in the cryptoendolihic microbial community of Ross Desert, Antarctica. *Microbial Ecology* **25**: 51-69.
- FRIEDMANN E.I., SUN H.J., 2005 – Communities adjusting their temperature optima by shifting producer to consumer ratio, shown in lichens as models: I. Hypothesis. *Microbial Ecology* **49**: 523-527.

- GADD G.M., MOWLL J.L., 1985 - Copper uptake by yeast-like cells, hyphae and clamidospores of *Aureobasidium pullulans*. *Experimental Mycology* **9**: 230-240.
- GOLUBIC S., FRIEDMANN E. I., SCHNEIDER J., 1981 - The litobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology* **51**: 475-478.
- GORBUSHINA A.A., 2003 - Methodologies and techniques for detecting extraterrestrial (microbial) life. *Astrobiology* **3**: 543-554.
- GORBUSHINA A.A., KRUMBEIN W.E., PANINA L., SOUKHARJEVSKY S., WOLLENZIEN U., HAMANN K.H., 1993 - On the role of black fungi in colour change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiology Journal* **11**: 205-221.
- GORBUSHINA A.A., PANINA L.K., VLASOV D.Y., KRUMBEIN W.E., 1996 - Fungi deteriorating marble in Chersonnesus. *Mikologiya I Fitopatologiya* **30**: 23-27.
- GORBUSHINA A.A., KRUMBEIN W.E., 1999 - The poikilotrophic micro-organism and its environment. In: SECKBACH J. (ed.), *Enigmatic Microorganisms and life in extreme environments*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 177-185.
- GORBUSHINA A.A., WHITEHEAD K., DORNIEDEN T., NIESSE A., SCHULTE A., HEDGES J.I., 2003 - Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock-dwelling microcolonial fungi. *Canadian Journal of Botany* **81**: 131-138.
- GOTTLICH E., DE HOOG G.S., YOSHIDA S., TAKEO K., NISHIMURA K., MIYAJI M., 1995 - Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human *Tinea nigra*. *Mycoses* **38**: 489-494.
- GRANT W.D., 2004 - Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - B* **359**: 1249-1267.
- GREENFIELD L.G., 1988 - Forms of nitrogen in Beacon sandstone rocks containing endolithic microbial communities in Southern Victoria Land, Antarctica. *Polarforschung* **58**: 211-218.

- GRIFFITHS H.R., MISTRY P., HERBERT K.E., LUNEC J., 1998 - Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **35**: 189-237.
- GUNDE-CIMERMAN N., ZALAR P., DE HOOG S., PLEMENITAŠ A., 2000 - Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeast. *FEMS Microbiology Ecology* **32**: 235-240.
- GUNDE-CIMERMAN N., OREN A., PLEMENITAŠ A. 2005a - Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, The Netherlands, pp. 577.
- HAASE G., SONNTAG L., MELZER-KRICK B., DE HOOG G.S., 1999 - Phylogenetic inference by SSU gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. *Studies in Mycology* **43**: 80-97.
- HALE M.E., 1987. Epilithic lichens in the Beacon sandstone formation, Victoria Land, Antarctica. *Lichenologist* **19**: 269-287.
- HERBERT R.A., 1986 - The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms. In: HERBERT R.A., CODD G.A. (eds), *Microbes in Extreme Environments* Academic Press, New York, pp.1-23.
- HIRSH P., HOFFMANN B., GALLIKOWSKI C.A., MEVS U., SIEBERT J., SITTIG M., 1988 - Diversity and identification of heterotrophs from Antarctic rocks of the McMurdo Dry Valleys (Ross Desert). *Polarforschung* **58**: 261-270.
- HOLDGATE M.W., 1997 - Terrestrial ecosystem in the Antarctic. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **279**: 5-25.
- HORIKOSHI K., 1998 - Alkaliphiles. In: HORIKOSHI K., GRANT W.D. (eds), *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. Wiley, New York, pp.155-179.
- HORNECK G., 1993 - Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: result from experiments in space. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **23**: 37-52.

- HORNECK G., 1995 – Exobiology, the study of the origin, evolution and distribution of life within the context of cosmic evolution: a review. *Planetary and Space Science* **43**: 189-217.
- HORNECK G., 2000 – The microbial world and the case for Mars. *Planetary and Space Science* **48**: 1053-1063.
- HORNECK G., BUCKER H., REITZ G., 1994 – Long-term survival of bacterial spores in space. *Advances in Space Research* **14**: 41-45.
- HORNECK G., STÖFFLER D., ESCHWEILER U., HORNEMANN U., 2001a – Bacterial spores survive simulated meteorite impact. *Icarus* **149**: 285-290.
- HORNECK G., RETTBERG P., REITZ G., WEHNER J., ESCHWEILER U., STRAUCH K., PANITZ C., STARKE V., BAUMSTARK-KHAN C., 2001b – Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **31**: 527-547.
- HOROWITZ N.H., CAMERON R. E., HUBBARD J. S., 1972 – Microbiology of the Dry Valleys of Antarctica. *Science* **193**: 242-245.
- HORRÉ R., DE HOOG G.S., 1999 - Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Studies in Mycology* **43**: 176-193.
- HOUGH D.W., DANSON M.J., 1999 – Extremozymes. *Current Opinion Chemical Biology* **3**: 39-46.
- HUGHES K.A., LAWLEY B., NEWSHAM K.K., 2003 – Solar UV-B radiation inhibits the growth of Antarctic terrestrial fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1488-1491.
- JAVAUX E.J., 2006 – Extreme life on Earth - past, present and possibly beyond. *Research in Microbiology* **157**: 37-48.
- JENNINGS D.H., 1984 – Polyol metabolism in fungi. *Advances in Microbial Physiology* **25**: 149-193.

- JOHNSTON C.G., VESTAL J.R., 1986 - Does iron inhibit cryptoendolithic microbial communities? *Antarctic Journal of the United States* **21**: 225-226.
- JOHNSTON C.G., VESTAL J.R., 1989 - Distribution of inorganic species in two Antarctic cryptoendolithic microbial communities. *Journal of Geomicrobiology* **7**: 137-153.
- JOHNSTON C.G., VESTAL J.R., 1993 - Biogeochemistry of oxalate in the cryptoendolithic lichen-dominated community. *Microbial Ecology* **25**: 305-319.
- JOO W.A., KIM C.W., 2005 - Proteomics of Halophilic archaea. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **815**: 237-250.
- KAPPEN L., 1993 - Lichens in the Antarctic region. In: FRIEDMANN E.I. (ed.), *Antarctic Microbiology*, Wiley-Liss, New York, pp. 433-488.
- KAPPEN L., FRIEDMANN E.I., GARTY J., 1981 - Ecophysiology of lichens in the Dry Valleys of Southern Victoria Land. Antarctica I. Microclimate of the cryptoendolithic lichen habitat. *Flora* **171**: 216-235.
- KAPPEN L., FRIEDMANN E. I., 1983 - Ecophysiology of lichens in the Dry Valleys of Southern Victoria Land. Antarctica II. CO₂ gas exchange in cryptoendolithic lichens. *Polar Biology* **1**: 227-232.
- KARENTZ D., 1994 - Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. In: WEILER C.S., PENHALE P.A. (eds), *Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects*. American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 92-110.
- KERR J.B., 1994 - Decreasing ozone causes health concern. *Environmental Science and Technology* **28**: 514-518.
- KERR J.B., MCELROY C.T., 1993 - Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* **262**: 1032-1034.
- KERRY E., 1990 - Effects of temperature on growth rates of fungi from subantarctic Macguire Island and Casey, Antarctica. *Polar Biology* **10**: 293-299.

- KLEIN H.P., 1986 – Exobiology revisited. *Advances in Space Research* **6**(12): 187-192.
- KOGEJ T., LANISNIK-RIZNER T., GUNDE-CIMERMAN N., 2001 – Black yeasts from salterns: the effect of salt on melanization. In: VENTOSA A., ARAHAL D.R. (eds), International conference on halophilic microorganisms, Sevilla, Spain.
- KOGEJ T., WHEELER M.H., LANISNIK-RITZNER T., GUNDE-CIMERMAN N., 2003 – Inhibition of DHN-melanin biosynthesis by tricyclazole in *Hortaea werneckii*. In: WOLF K., BREUNIG G., BARTH G. (eds), *Non conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 143-148.
- KOGEJ T., WHEELER M.H., RIŽNER T.L., GUNDE-CIMERMAN N., 2004 – Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiology Letters* **232**: 203-209.
- KOGEJ T., GOSTINČAR C., VOLKMANN M., GORBUSHINA A.A., GUNDE-CIMERMAN N., 2006 – Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? *Environmental Chemistry* **3**: 105-110.
- KRISTJANSSON J.K., HREGGVIDSSON G.O., 1995 – Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**: 17-25.
- KWON-CHUNG K.J., BENNETT J.E., 1992 – Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 886.
- LAHAV R., FARELEIRA P., NEJIDAT A., ABELIOVICH A., 2002 – The identification and characterisation of osmotolerant yeast isolated from chemical wastewater evaporation ponds. *Microbial Ecology* **43**: 388-396.
- LANGE O.L., BERTSCH A., 1965. Photosynthese der Wüstenflechte *Ramalina maciformis* nach Wasserdampfaufnahme aus dem Luftram. *Naturwissenschaften* **52**: 215-216.
- LANGFELDER K., STREIBL M., JAHN B., HAASE G., BRAKHAGE A.A., 2003 – Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 143-158.

- LARCHER W., 1994 - Ökophysiologie der Pflanzen. 5. Auflage, Ulmer-Verlag, Stuttgart, pp. 394.
- LAZCANO A., MILLER S.L., 1996 - The origin and early evolution of life: Prebiotic chemistry, the pre-RNA world and time. *Cell* **85**: 793-798.
- LEWIS D.H., SMITH D.C., 1967 - Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytologist* **66**: 143-184.
- LINCOLN R.J., BOXHALL G.A., CLARK P.F., 1982 - A Dictionary of ecology, evolution and systematic, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 298.
- LOUIS I., COOKE R.C., 1983 - Influence of the conidial matrix of *Sphaerellopsis filum* (*Darluca filum*) on spore germination. *Transactions of the British Mycological Society* **81**: 667-670.
- LOUIS I., COOKE R.C., 1985 - Conidial matrix and spore germination in some plant pathogens. *Transactions of the British Mycological Society* **84**: 661-667.
- LUBIN D., JENSEN E.J., 1995 - Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature* **377**: 710-713.
- MADERN D., EBEL C., ZACCAI G., 2000 - Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* **4**: 91-98.
- MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J., 2003 - Metabolic diversity. In MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J., (eds), *Brock Biology of microorganisms*, 10th ed. Pearson Education Inc., Upper Saddle River, N.J., pp. 549-611.
- MADRONICH S., MCKENZIE R.L., BJÖRN L.O., CALDWELL M.M., 1998 - Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **46**: 5-19.
- MAGGI O., PERSIANI A.M., FABBRI A.A., DE LUCA C., LUNGHINI D., QUADRACCIA L., FANELLI C., 1991 - Differenze nella composizione fosfolipidica di diversi taxa fungini. *Giornale Botanico Italiano* **125**(3): 259.

- MANCINELLI R.L., WHITE M.R., ROTHSCHILD L.J., 1998 - Biopan survival I: exposure of the osmophiles *Synechococcus* sp. (Nageli) and *Haloarcula* sp. to the space environment. *Advances in Space Research* **22**: 327-334.
- MANZONI M., 2001 - La natura dell'Antartide. Springer- Verlag Italia, Milano, pp. 346.
- MARSHALL W.A., 1997 - Seasonality in Antarctic airborne fungal spores. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2240-2245.
- MATSUMOTO G.I., FRIEDMANN E.I., WATANUKI K., OCAMPO-FRIEDMANN R., 1992 - Novel long-chain *anteiso*-alkanes and *anteiso*-alkanoic acids in Antarctic rocks colonized by living and fossil cryptoendolithic microorganisms. *Journal of Chromatography* **598**: 267-276.
- MCKAY C.P., 1993 - relevance of antarctic microbial ecosystems to exobiology. In: FRIEDMANN E.I. (ed.), *Antarctic Microbiology*, Wiley-Liss, New York, pp. 593-601.
- MCGINNIS M.R., MCKENZIE R.A., CONNOLE M.D., 1985 - *Phaeosclera dematioides*, a new etiologic agent of phaeohyphomycoses in cattle. *Sabouraudia* **23**: 133-135.
- MENDOZA L., KARUPPAYIL S.M., SZANISZLO P.J., 1993 - Calcium regulates *in vitro* dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* **36**: 157-164.
- MILLARD P.J., ROTH B.L., TRUONG THI H., YUE S.T., HAUGLAND R.P., 1997 - Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labelling and viability testing of yeast. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2897-2905.
- MONTIEL P.O., 2000 - Soluble carbohydrates (trehalose in particular) and cryoprotection in polar biota. *CryoLetters* **21**: 83-90.
- MORITA R.Y., 1975 - Psychrophilic Bacteria. *Bacteriological Reviews* **39**: 144-167.
- NASH, T., 1966 - Chemical constitution and physical properties of compound able to protect living cells against freeze damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN H.T. (ed.), *Cryobiology*, London, Academic press, pp. 179-211.

- NICHOLSON W.L., MUNAKATA N., HORNECK G., MELOSH H.J., SETLOW P., 2000 -Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 548-672.
- NICOLAUS B., SCHIANO MORIELLO V., LAMA L., POLI A., GAMBACORTA A., 2004 - Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **34**: 159-169.
- NIENOW J.A., FRIEDMANN E.I., 1993 - Terrestrial lithophytic (rock) communities. In: FRIEDMANN E.I. (ed.), *Antarctic Microbiology*, Wiley-Liss, New York, pp. 343-412.
- NIENOW J.A., MCKAY C.P., FRIEDMANN E.I., 1988a - The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: mathematical models of the thermal regime. *Microbial Ecology* **16**: 253-270.
- NIENOW J.A., MCKAY C.P., FRIEDMANN E.I., 1988b - The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: light in photosynthetically active region. *Microbial Ecology* **16**: 271-289.
- NISHIYAMA T., 1977 - Studies on evaporite minerals from Dry Valley, Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Record (New Zealand)* **58**: 171-185.
- OCAMPO-FRIEDMANN R., FREDMANN E.I., 1993 - Biologically active substances produced by Antarctic cryptoendolithic fungi. *Antarctic Journal of the United States* **5**: 252-254.
- ONOFRI S., 1999 - Antarctic microfungi. In: SECKBACH J. (ed.), *Enigmatic microorganisms and life in Extreme Environment*, Dordrecht, Kluwer Academic, pp. 323-336.
- ONOFRI S., CASTAGNOLA M., ROSSI ESPAGNET S., 1980 - L'impiego della microscopia elettronica a scansione in micologia. *Micologia Italiana* **1**: 29-32.
- ONOFRI S., ZUCCONI L., TOSI S., 2007a - Continental Antarctic Fungi. HIW-Verlag, Eching, pp. 237.

- ONOFRI S., PAGANO S., ZUCCONI L., TOSI S., 1999. *Friedmanniomyces endolithicus* (Fungi, Hyphomycetes), anam.-gen. and sp. nov., from continental Antarctica. *Nova Edwigia* **68**: 175-181.
- ONOFRI S., SELBMANN L., ZUCCONI L., PAGANO S., 2004 - Antarctic microfungi as a model for exobiology. *Planetary and Space Science* **52**: 229-237.
- ONOFRI S., SELBMANN L., ZUCCONI L., TOSI S., DE HOOG G.S., 2005 - The Mycota of Continental Antarctica. *Terra Antarctica Reports* **11**: 37-42.
- ONOFRI S., TOSI S., PERSIANI A.M., MAGGI O., RIESS S., ZUCCONI L., 1994 - Mycological reserches in Victoria Land terrestrial ecosystem. Proceedings of the Second Meeting on "Antarctic Biology", Padova, 26-28 February 1992. Scienza e cultura, Edizioni Universitarie Patavine, Padova, pp. 19-32.
- ONOFRI S., SELBMANN L., DE HOOG G.S., GRUBE M., BARRECA D., RUISI S., ZUCCONI L., 2007b - Evolution of fungi at boundaries of life. *Advances in Space Research* (in stampa).
- ØVSTEDAL D.O., LEWIS SMITH R.I., 2001 - Lichens of Antarctica and South Georgia. In: *A Guide to their Identification and Ecology*. ØVSTEDAL D.O., LEWIS SMITH R.I. (eds), *Studies in Polar Research*, Università di Cambridge, pp. 1-35.
- PAKCHUNG A.A.H., SIMPSON P.J.L., CODD R., 2006 - Life on Earth. Extremophiles continue to move the goal posts. *Environmental Chemistry* **3**: 77-93.
- PALMER F.E., EMERY D.R., STEMMLER J., STALEY J.T., 1987 - Survival and growth of microcolonial rock fungi as affected by temperature and humidity. *New Phytologist* **107**: 155-162.
- PALMER R.J., FRIEDMANN E.I., 1990a - Water relation and photosyntesis in the cryptoendolithic microbial habitat of hot and cold deserts. *Microbial Ecology* **19**: 111-118.
- PALMER R.J., FRIEDMANN E.I., 1990b - Water relations, thallus structure and photosynthesis in Negev desert lichens. *New Phytologist* **116**: 597-603.

- PASCUAL S., MELGAREJO P., MAGAN N., 2002 - Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum*. *Mycopathologia* **156**: 93-100.
- PETROVIČ U., GUNDE-CIMERMAN N., PLEMENITAŠ A., 1999 - Salt stress affects sterol biosynthesis in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Microbiology Letters* **180**: 325-330.
- RETTBERG P., RABBOW E., PANITZ C., HORNECK G., 2004 - Biological space experiments for the simulation of Martian conditions: UV radiation and Martian soil analogues. *Advances in Space Research* **3**: 1294-1301.
- RETTBERG P., 2005 - The influence of space parameters like solar ultraviolet radiation on the survival of microorganisms. In: HOOVER R.B. *et al.* (eds), *Perspectives in Astrobiology*. IOS Press, pp. 126-131.
- RIDDELL R.W., 1950 - Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* **42**: 265-270.
- ROBERTS D.M^cL., 1999 - Eukaryotic cells under extreme conditions. In: SECKBACH J. (ed.), *Enigmatic microorganisms and life in Extreme Environment*, Dordrecht, Kluwer Academic, pp. 165-173.
- ROBERTS M.F., 2005 - Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**: 5
- ROBINSON C.H., 2001 - Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist* **151**: 341-353.
- ROTHSCHILD L.J., MANCINELLI R.L., 2001 - Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-1101.
- RUIBAL C., PLATAS G., BILLS G.F., 2005 - Isolation and characterization of melanized fungi from limestone in Mallorca. *Mycological Progress* **4**: 23-38.
- RUISI S., BARRECA D., SELBMANN L., ZUCCONI L., ONOFRI S., 2007 - Fungi in Antarctica. *Review of Environmental Science and Biotechnology* **6**: 127-141.

- RUSSELL N.J., 1990 – Cold adaptation of microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Science* **326**: 595-611.
- SECKBACH J., 1994 – Evolutionary pathways and enigmatic algae: *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and related cells. In: SECKBACH J. (ed.), *Developments in Hydrobiology Enigmatic Microorganisms and life in extreme environments*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 349.
- SECKBACH J., 1999 – Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 687.
- SELBMANN L., ONOFRI S., FENICE M., FEDERICI F., PETRUCCIOLI M., 2002 – Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Research in Microbiology* **153**: 585-592.
- SELBMANN L., DE HOOG G.S., MAZZAGLIA A., FRIEDMANN E. I., ONOFRI S., 2005 – Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Studies in Mycology* **51**: 1-32.
- SEPPELT, R.D., GREEN, T.G.A., SCHROETER, B., 1995 – Lichens and mosses from the Kar Plateau, Southern Victoria Land, Antarctica. *New Zealand Journal of Botany* **33**: 203-220.
- SCHULTE W., DEMETS R., BAGLIONI P., RETTBERG P., HEISE-ROTENBURG R., TOPORSKI J., 2006 – BIOPAN and EXPOSE: Space exposure platforms for exo/astrobiological research in earth orbit with relevance for Mars exploration. *Geophysical Research Abstracts* **8**: 06643.
- SIEBERT J., HIRSH P., 1988 – Characterization of 15 selected coccal bacteria isolated from Antarctic rock end soil samples from the McMurdo Dry Valleys (South Victoria Land). *Polar Biology* **9**: 37-44.
- SINHA R.P., HÄDER D.P., 2002 – UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemistry and Photobiology Science* **1**: 225-236.

- SMITH R.C., PRÉZELIN B.B., BAKER K.S., BIDIGARE R.R., BOUCHER N.P., COLEY T., KARENTZ D., MACINTYRE S., MATLICH H.A., MENZIES D., ONDRUSEK M., WAN Z., WATERS K.J., 1992 - Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* **255**: 952-959.
- SADOUKI H., WITTMANN F.H., 1998 - Simulation of temperature gradients and stresses in natural stone plates under solar radiation. *International Zeitschrift für Bauinstandsetzen* **1**: 53-72.
- STALEY J.T., PALMER F.E., ADAMS J.B., 1982 - Microcolonial common inhabitants on desert rocks? *Science* **215**: 1093-1095.
- STERFLINGER K., 1998 - Temperature and NaCl-tolerance of rock inhabiting meristematic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 271-281.
- STERFLINGER K., 2000 - Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal* **17**: 97-124.
- STERFLINGER K., 2005 - Black yeast and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: ROSA C.A., GABOR P. (eds), *Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. New York, Springer pp. 505-518.
- STERFLINGER K., GORBUSHINA A.A., 1997 - Morfological and molecular characterization of a rock inhabiting and rock decaying dematiaceous fungus isolated from antique monuments of Delos (Cyclades, Greece) and Chersonesus (Crimea, Ukraine). *Systematic and Applied Microbiology* **20**: 329-335.
- STERFLINGER K., KRUMBEIN W.E., 1995 - Multiple stress factors affecting growth of rock-inhabiting black fungi. *Botanica Acta* **108**: 490-496.
- STERFLINGER K., KRUMBEIN W.E., 1997 - Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiology Journal* **14**: 219-230.
- STERFLINGER K., DE HOOG G.S., HAASE G., 1999 - Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology* **43**: 5-22.
- STETTER, K.O., 1988 - Hyperthermophiles - physiology and enzymes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **42**: 315-317.

- STETTER K.O., 1999 - Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* **452**: 22-25.
- SUN H.J., FRIEDMANN E.I., 2005 - Communities adjusting their temperature optima by shifting producer to consumer ratio, shown in lichens as models: II. Experimental verification. *Microbial Ecology* **49**: 528-535.
- TAKAHASHI A., OHNISHI T., 2004 - The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on International Space Station. *Biological Sciences in Space* **18**: 255-260.
- THEVELEIN J.M., 1984 - Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews* **48**: 42-59.
- THOMPSON D.C., CRAIG R.M.F., BROMLEY A.M., 1971 - Climate and surface heat balance in an Antarctic Dry Valleys. *New Zealand Journal of Science* **14**: 245-251.
- UIJTHOF J.M.J., DE HOOG G.S., 1995 - PCR-ribotyping of currently accepted *Exophiala* and *Phaeococcomyces* sp. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**: 35-42.
- URZÌ C., REALINI M., 1998 - Colours changes of Noto's calcareous sandstone as related to its colonization by microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation* **42**: 45-54.
- URZÌ C., WOLLENZIEN U., CRISEO G., KRUMBEIN W.E., 1995 - Biodiversity of the rock inhabiting microflora with special reference to black fungi and black yeasts. In: ALLSOPP D., HAWKSWORTH D.L., COLWELL R.R. (eds), *Microbial diversity and ecosystem function*. CAB International, Wallington, U.K., pp.289-302.
- URZÌ C., DE LEO F., DE HOOG G.S. STERFLINGER K., 2000 - Recent advances in the molecular biology and ecophysiology of meristematic stone-inhabiting fungi. In CIFEM O., TIANO P., MASTROMEI G., (eds), *Of microbes and art. The role of microbial communities in the degradation and protection of culturale heritage*. Ed Plenum, New York, pp. 3-19.
- VAN DEN BURG B., 2003 - Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion Chemical Biology* **6**: 213-218.

- VESTAL J.R., 1988 – Carbon metabolism of the cryptoendolithic microbiota from the Antarctic desert. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 960-965.
- VINCENT W.F., 1988 – Microbial ecosystems of Antarctica. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 303.
- VINCENT W.F., 2000 – Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science* **12**: 374-385.
- VISHNIAC H.S., 2006 – Yeast biodiversity in the Antarctic. In: ROSA C.A., GABOR P. (eds), *Biodiversity and ecophysiology of Yeasts*, Springer, pp. 419-440.
- VOLKMANN M., WHITEHEAD K., RÜTTIGERS H., RULLKÖTTER J., GORBUSHINA A.A., 2003 – Mycosporine-glutamicol-glucoside: a natural UV-absorbing secondary metabolite of rock-inhabiting microcolonial fungi. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**: 897-902.
- WEED R., ACKERT R.P. JR, 1986 – Chemical weathering of Beacon Supergroup sandstones in the cold desert of Antarctica.: BERTHELIN J., (ed.), *Diversity of Environmental Biogeochemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 327-339.
- WEICHART D.H., 1999 – Stability and survival of VBNC cells – conceptual and practical implications. In BELL C.R., BRYLINSKY M., JOHNSON-GREEN P. (ed.), *Microbial biosystems: new frontiers; to grow or not to grow: nonculturability revisited*. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- WEINSTEIN R.N., MONTIEL P.O., JOHNSTONE K., 2000 – Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. *Mycologia* **92**: 222-229.
- WELSH D.T., 2000 – Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Review* **24**: 263-290.

- WHEELER M.H., BELL A.A., 1986 - Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: MCGINNIS M.R., (ed.), *Current topics in medical mycology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 338-387.
- WIERZCHOS J., DE LOS RÍOS A., SANCHO L.G., 2004 - Viability of endolithic micro-organism in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica established by confocal and fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy* **216**: 57-61.
- WOLLENZIEN U., DE HOOG G.S., KRUMBEIN W.E., URZÌ C, 1995 - On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of the Total Environment* **167**: 287-294.
- WYNN-WILLIAM D.D., EDWARDS H.G.M., 2000 - Antarctic ecosystem as model for extraterrestrial surface habitats. *Planetary and Space Science* **48**: 1065-1075.
- WYNN-WILLIAMS D.D., EDWARDS H.G.M., 2001 - In: HORNECK G., BAUMSTARK-KHAN C. (eds), *Environmental UV radiation: biological strategies for protection and avoidance, in astrobiology: the quest for the conditions of life*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 244-259.
- YOSHIDA S., TAKEO K., DE HOOG G.S., NISHIMURA K., MIYAJI M., 1996 - A new type of growth exhibited by *Trimmatostroma abietis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 211-215.
- ZALAR P., DE HOOG G.S., GUNDE-CIMERMAN N., 1999a - Taxonomy of the endoconidial black yeast genera *Phaeotheca* and *Hyphospora*. *Studies in Mycology* **43**: 49-56.
- ZALAR P., DE HOOG G.S., GUNDE-CIMERMAN N., 1999b - *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Studies in Mycology* **43**: 57-62.
- ZLATANOV M., PAVLOVA K., GRIGOROVA D., 2001 - Lipid composition of some yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica* **46**: 402-406.
- ZUCCONI L., RIPA C., SELBMANN L., ONOFRI S., 2002 - Effects of UV on the spores of the fungal species *Arthrotrrys oligospora* and *A. ferox*. *Polar Biology* **25**: 500-505.

ZUCCONI L., PAGANO S., FENICE M., SELBMANN L., TOSI S., ONOFRI S., 1996 - Growth temperature preference of fungal strain from Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* **16**: 53-61.

BIBLIOGRAFIA SITI WEB

DLR, Agenzia Spaziale Tedesca:

<http://www.dlr.de/en/desktopdefault.aspx>

ESA, Agenzia Spaziale Europea:

<http://www.esa.int/>

MNA, Museo Nazionale dell'Antartide:

<http://mna.it/>

Molecular Probes:

<http://probes.invitrogen.com/handbook/>; www.invitrogen.com

Sankyo Denki, Co, JP :

http://www.sankyo-denki.co.jp/e2_09.html

Allegato

TERRENI DI COLTURA

Sono riportate di seguito le ricette relative alla composizione dei terreni di coltura utilizzati unitamente ad una piccola descrizione riguardante la loro scelta e la lista dei componenti.

Nelle tabelle in calce la ditta fornitrice dei singoli prodotti.

BBM ** (BOLD'S BASAL MEDIUM)**

Descrizione	Composizione	
<u>1. Stock solution</u>		
NaNO ₃	20 g/800 ml	20 ml
CaCl ₂	1 g/400 ml	10 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 g/400 ml	10 ml
K ₂ HPO ₄	3 g/400 ml	10 ml
KH ₂ PO ₄	7 g/400 ml	10 ml
NaCl	1 g/400 ml	10 ml
<u>2. Trace elements</u>		
H ₃ BO ₃	1,142 g/l	1 ml
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,498 g/l	1 ml
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,882 g/l	1 ml
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,144 g/l	1 ml
MoO ₃	0,071 g/l	1 ml
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,157 g/l	1 ml
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,049 g/l	1 ml
EDTA	5,000 g/l	1 ml
KOH	3,100 g/l	1 ml
Aggiustare il pH a 6.0		

****Deason T.R., Bold H.C., 1960

BG11 (BLUE GREEN ALGAE MEDIUM)

Descrizione	Composizione		
È un terreno utilizzato per il rilevamento di cianobatteri e alghe verdi.	NaNO ₃	1,5	g/l
	K ₂ HPO ₄	0,040	g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,075	g/l
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,036	g/l
	Acido citrico	0,006	g/l
	Citrato d'ammonio ferrico	0,006	g/l
	EDTA (sale disodico)	0,001	g/l
	NaCO ₃	0,020	g/l
	Mix di metalli (tracce)	1	ml
	Agar	10,0	g/l
Mix di metalli (tracce)			
	H ₃ BO ₃	2,860	g/l
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,810	g/l
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,222	g/l
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,390	g/l
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079	g/l
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	49,40	g/l

DRBC* (DICHLORAN ROSE-BENGAL CHLORAMPHENICOL AGAR BASE)

Descrizione	Composizione		
È un terreno selettivo utilizzato per l'identificazione generale e la numerazione della flora dei miceti. Gli effetti cumulativi del basso valore di pH (5.6), del contenuto di Rose-Bengal e della presenza di Dichloran portano ad una più stretta inibizione batterica e della propagazione rapida di muffe e lieviti con formazione di colonie dal diametro inferiore.	Peptone	5,0	g/l
	Destrosio	10,0	g/l
	Potassio fosfato biacido	1,0	g/l
	Magnesio solfato	0,5	g/l
	Dichloran	0,002	g/l
	Rose-Bengal	0,025	g/l
	Agar	15,0	g/l

* manuale OXOID, 1993, Unipath S.p.a., Milano

MEA* (MALT EXTRACT AGAR)

Descrizione	Composizione		
È un terreno tradizionalmente utilizzato per il rilevamento, l'isolamento e il conteggio di lieviti e muffe.	Malt Extract	30	g/l
	Peptone	5	g/l
	Agar	15	g/l

* manuale OXOID, 1993, Unipath S.p.a., Milano

MEA2** (MALT EXTRACT AGAR 2%)

Descrizione	Composizione		
Terreno MEA modificato.	ME	0,2	1
	H ₂ O	0,8	1
	Agar	15	g/l

** List of Cultures, 35th edition 2001, CBS, The Netherlands

TM*** (TREBOUXIA MEDIUM)

Descrizione	Composizione		
È un terreno utilizzato per il rilevamento di alghe verdi.	BBM	970	ml
	Proteose peptone	2,5	g
	Glucose	5	g
	Agar	15	g

*** Ahmadjian V., 1967

TY (TRYPTON YEAST MEDIUM)

Descrizione	Composizione		
È un terreno utilizzato per la coltura dei batteri.	Trypton	5,0	g/l
	Yeast Extract	3,0	g/l
	CaCl ₂ anhydrous	0,4	g/l
	Agar	17,0	g/l
aggiungere nipagina (methyl-para-hydroxy-benzoate), un antifungino, 0,03% (w/v)			

COMPONENTI SUBSTRATI E RELATIVI PRODUTTORI

Agar batteriologico	Applichem Gmbh, Darmstad, Germany
DRBC	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Malt Extract	Applichem Gmbh, Darmstad, Germany
Proteose peptone	BD, Becton Dickinson Italia S.p.A., Milano
Trypton	BD, Becton Dickinson Italia S.p.A., Milano
Yeast Extract	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England

REAGENTI CHIMICI E SOLUZIONI UTILIZZATE

KILLIK[°]

Descrizione	Composizione
Matrice di inclusione per taglio al criostato. Tra le principali caratteristiche: - temperatura di congelamento del polimero ottimale per un buon taglio al criostato; - solubilità in acqua senza il rilascio di residui; - viscosità del polimero che consente di includere il campione in modo idoneo; - migliora l'adesione tissutale al supporto porta-campione.	Miscela di polimeri solubili in acqua 

[°] data sheet Bio-Optica

PBS^{°°} (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, TAMPONE FOSFATO SALINO)

Descrizione	Composizione		
Il PBS è una soluzione tampone comunemente usata nei laboratori di biologia e biochimica. E' una soluzione salina che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato. Il tampone aiuta a mantenere costante il pH. La concentrazione salina è isotonica. Proprio perché isotonico e non tossico per le cellule è anche usato come soluzione di lavaggio per le cellule.	NaCl	8,000	g/l
	KCl	0,200	g/l
	Na ₂ HPO ₄ anhydrous	1,150	g/l
	KH ₂ PO ₄	0,259	g/l

^{°°}data sheet Sigma-Aldrich

SOLUZIONE FISIOLÓGICA

Descrizione	Composizione		
Soluzione salina (0,9% w/v) tradizionalmente utilizzata per il mantenimento della pressione osmotica cellulare.	NaCl	9,0	g/l

TWEEN 20^{°°} 0,35%

Descrizione	Composizione		
Soluzione di Tween (0,35% v/v). Il Tween 20 è un tensioattivo non ionico appartenente alla famiglia dei polisorbati. Viene normalmente utilizzato nelle applicazioni biochimiche come agente emulsionante e nelle pre-estrazioni per rimuovere le proteine periferiche di membrana.	Tween 20	3,5	ml/l

^{°°}data sheet Sigma-Aldrich

SINGOLI REAGENTI E RELATIVI PRODUTTORI

NaCl	Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A
Acido citrico	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
CaCl₂ · 2H₂O	Riedel -de Haën, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
CaCl₂ anidro	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
Citrato d'ammonio ferrico	Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A
Choramphenicol	IBI, Shelton Scientific Inc., Shelton, CT, U.S.A
Co(NO₃)₂ · 6H₂O	Riedel-de Haën, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
CuSO₄ · 5H₂O	Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A
EDTA	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
FeSO₄ · 7H₂O	Merck, Darmstad, Germany
Glucose	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
H₃BO₃	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
K₂HPO₄	Merck, Darmstad, Germany
KH₂PO₄	Merck, Darmstad, Germany
Killik	Bio-Optica, Strumentazioni scientifiche, Milano s.p.a.
KOH	Merck, Darmstad, Germany
MgSO₄ · 7H₂O	Merck, Darmstad, Germany
MnCl₂ · 4H₂O	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
MoO₃	Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A
NaCO₃	Riedel-de Haën, Divisione Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
NaMoO₄ · 2H₂O	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
NaNO₃	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
Nipagina (methyl-para-hydroxy- benzeoate)	Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A
PBS	Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A
Tween 20	Fluka, Divisione Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A
ZnSO₄ · 7H₂O	Merck, Darmstad, Germany

COLORANTI VITALI

FUN1 [^] (F-7030, MOLECULAR PROBES)

Descrizione	Composizione
Il FUN 1 o [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide], è un composto alogenato asimmetrico delle cianine che possiede una carica positiva fissa, in grado di diffondere passivamente all'interno della membrana cellulare; utilizzato per analizzare la vitalità e l'attività metabolica di cellule fungine.	Soluzione 10 mM in DMSO

[^]data sheet Molecular probes

SYTOX GREEN[^] (S-7020, MOLECULAR PROBES)

Descrizione	Composizione
SYTOX Green è un colorante relativo agli acidi nucleici ed ai cromosomi. Comunemente ben eccitato ad una lunghezza d'onda pari a 488 nm la sua azione viene definita dall'emissione di una fluorescenza verde. Dal momento che risulta impermeabile alle cellule vive viene impiegato per analizzare il danneggiamento e la morte cellulare.	Soluzione 5 mM in DMSO

[^]data sheet Molecular probes

Ringraziamenti

Si ringrazia il prof. Silvano Onofri per gli insegnamenti accademici e di vita ricevuti e per la possibilità di aver svolto un lavoro così interessante.

La prof.ssa Laura Zucconi per la revisione critica ed i suggerimenti avuti e la dott.ssa Laura Selbmann per i consigli nell'attività di laboratorio.

La dott.ssa Annarita Taddei per la microscopia SEM e la dott.ssa Gabriella Gambellini per la microscopia TEM e Confocale del CIME, Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica, del DiSA per il supporto tecnico e la disponibilità ricevuti.

La Prof.ssa Siglinde Ott ed il dott. Jean Pierre de Vera dell'Istituto di Botanica dell'Università Heinrich-Heine di Düsseldorf (Germania) per gli insegnamenti ricevuti relativi all'utilizzo di coloranti vitali *in vivo* su microrganismi fungini.

La dott.ssa Elke Rabbow dell'Istituto di Medicina Aerospaziale (DLR) di Colonia (Germania) che ha permesso, in collaborazione con l'Agenzia Spaziale Europea (ESA), l'utilizzo delle *facility* per gli esperimenti di simulazione spaziale.

Le colleghe dottorande Alessandra e Serena, Caterina del laboratorio di Botanica Sistemica e Micologia, Sara e Cristina del laboratorio della Banca del Germoplasma del Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico, dell'Università della Tuscia di Viterbo, per l'amicizia, il supporto e l'incoraggiamento dimostratemi durante l'intero svolgimento del lavoro di dottorato.