

Primi studi microbiologici delle grotte nei gessi messiniani emiliano-romagnoli

ETTORE LOPO¹, MARTINA CAPPELLETTI²

Riassunto

Lo studio della microbiologia delle grotte interessa discipline che spaziano dall'ecologia alle biotecnologie mediche e industriali, ciononostante, la maggior parte degli studi condotti ad oggi riguardano grotte carbonatiche, mentre poco si sa sulla microbiologia delle grotte che si sviluppano nel gesso. In questo contributo presentiamo i risultati delle prime analisi microbiologiche condotte su due diverse grotte: la Grotta del Bules (ER RN 864), una delle poche cavità presenti in Regione ad essere caratterizzata dalla presenza di una sorgente sulfurea, e La Tanaccia (ER RA 114), una delle grotte più conosciute in Romagna, rappresentativa di molte delle cavità presenti in Regione. Le analisi del DNA microbico hanno mostrato che la Grotta del Bules è dominata da batteri noti per essere in grado di ossidare e ridurre diversi composti dello zolfo, suggerendo che il ciclo dello zolfo può giocare un ruolo centrale nel metabolismo delle comunità microbiche presenti. Diversamente, la Tanaccia è popolata da microrganismi tipicamente associati ad ambienti oligotrofici, ovvero caratterizzati da una scarsa concentrazione di nutrienti organici. Questi risultati suggeriscono che la presenza di zolfo ridotto sia uno dei principali fattori a determinare le differenze fra le comunità microbiche presenti nelle grotte studiate in questo lavoro. Questo lavoro fornisce prime importanti informazioni sulla biodiversità microbica presente nelle grotte di gesso, suggerendo quali potrebbero essere le principali strategie metaboliche adottate dai microrganismi che colonizzano questi particolari ambienti sotterranei.

Parole chiave: Microbiologia nelle grotte, Grotte di gesso, Composti dello zolfo, Comunità microbiche.

Abstract

The study of cave microbiology involves disciplines ranging from ecology to industrial and medical biotechnology. However, the majority of studies that have been conducted so far concern caves in carbonate rocks, while little is known about the microbiology of caves in gypsum. In this paper, we present the results of the first microbiological analyses of two different caves: the Grotta del Bules (ER RN 864), one of the few hollows in the region with a sulphur spring, and La Tanaccia (ER RA 114), which is one of the best known caves in Romagna and exemplifies the nature of many of the hollows found in the region. Microbial DNA analysis has shown that the Grotta del Bules is dominated by bacteria that are known for being capable of reducing and oxidizing sulphur compounds, which suggests that the sulphur cycle might play a central role in the metabolism of the microbial communities found there. In contrast, La Tanaccia is populated by microorganisms typically associated with oligotrophic environments, i.e. places with low nutrient concentrations. The results suggest that the low sulphur level is one of the main reasons behind the differences between the microbial communities in the caves examined in this study. The paper provides important initial information about microbial biodiversity in gypsum caves and suggests what might be the main metabolic strategies utilized by the microorganisms that colonize these distinctive underground environments.

Keywords: Microbiology in caves, Gypsum caves, Sulphur compounds, Microbial communities.

Nonostante la microbiologia delle grotte risulti importante in diversi ambiti, la maggior parte degli studi condotti ad oggi riguardano grotte carbonatiche, mentre gli studi condotti sulle grotte di gesso sono ancora scarsi e raramente associati allo studio microbiologico.

Lo scopo di questo contributo è quello di riportare i risultati delle prime analisi finalizzate a studiare la biodiversità microbica presente in due diverse grot-

te: la Grotta del Bules (ER RN 864), situata nei gessi della Romagna orientale, e La Tanaccia (ER RA 114), situata nel Parco Regionale della Vena del Gesso.

Le grotte sono ambienti isolati, bui e caratterizzati da una scarsa disponibilità di nutrienti rispetto all'ambiente esterno. Queste peculiarità definiscono i principali vincoli ai quali tutte le forme di vita che le popolano devono adattarsi, compresi i microrganismi. Lo studio delle strategie di adattamento messe in atto

¹ Università di Bologna, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBiT), Via Irnerio 42, 40126 Bologna (BO); ettore.lopo2@unibo.it

² Università di Bologna, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBiT), Via Irnerio 42, 20126 Bologna (BO); martina.cappelletti2@unibo.it

dai microrganismi permette di comprendere l'importanza che essi rivestono negli ecosistemi sotterranei e il loro coinvolgimento nella formazione delle concrezioni e delle mineralizzazioni che caratterizzano le grotte.

Tutti gli ecosistemi esposti alla luce solare sono caratterizzati dalla presenza di organismi, come le piante o alcuni batteri, in grado di sfruttare l'energia solare per fissare l'anidride carbonica in carbonio organico, generando nutrienti disponibili per il resto della comunità. Nelle grotte, l'assenza di luce rende impossibili i processi fotosintetici che avvengono in superficie, e la produzione primaria (produzione di composti organici a partire dalla CO₂ presente in atmosfera) coinvolge microrganismi chemiolitotrofi, in grado di sfruttare l'energia chimica derivante dall'ossidazione di composti inorganici ridotti presenti nell'ecosistema (come lo zolfo, i solfuri, i nitriti, l'idrogeno e il ferro) per fissare la CO₂ in composti organici (CHEN *et alii* 2009, GHEZZI *et alii* 2019, D'ANGELI *et alii* 2019). Sebbene alcuni microrganismi presenti in grotta possano utilizzare come fonte di energia i nutrienti organici derivanti dall'esterno (trasportati dall'acqua, del vento, o da animali), la chemiolitotrofia rende possibile una colonizzazione stabile degli ambienti sotterranei. Il metabolismo degli organismi chemiolitotrofi risulta infatti nella sintesi di molecole che possono essere condivise con altri microrganismi e utilizzati da questi come fonte nutritiva (BARTON, JURADO 2007). Questi fenomeni di cooperazione portano alla formazione di comunità microbiche complesse che a loro volta possono rappresentare una fonte nutritiva per altri organismi presenti in grotta, come piccoli invertebrati. Inserendosi alla base della catena alimentare di ecosistemi sotterranei, i microrganismi presenti nelle grotte rivestono un ruolo ecologico di primaria importanza (ROACH *et alii* 2011). I rapporti di cooperazione che rendono possibile la formazione delle comunità microbiche nelle grotte possono essere anche accompagnati da relazioni di competizione per le scarse fonti nutritive presenti. Questo può portare alla produzione di molecole antimicrobiche e antifungine il cui studio può sfociare in applicazioni biotecnologiche e biomediche (ZADA *et alii* 2021, GHEZZI *et alii* unpublished).

È stato dimostrato che le attività dei microrganismi presenti in grotta possono essere coinvolte nella formazione degli speleotemi (SAURO *et alii* 2018). Nonostante la speleogenesi sia guidata principalmente da processi abiotici, il metabolismo microbico può contribuire sia attivamente che passivamente alla formazione di concrezioni e mineralizzazioni. Esempi di contributo attivo alla formazione di speleotemi possono riguardare attività metaboliche di ammonifica-

zione, denitrificazione, riduzione di solfati e ossidazione di solfuri, che possono portare all'aumento della concentrazione dello ione HCO₃⁻ con conseguente aumento di pH e precipitazione di carbonato di calcio (RIDING 2000). Gli ioni carichi positivamente presenti nel substrato (come gli ioni calcio e magnesio) possono inoltre interagire con la superficie delle cellule microbiche cariche negativamente, che fungono così da siti di nucleazione attorno al quale il carbonato può successivamente precipitare (ENYEDI *et alii* 2020). Sebbene il ruolo dei microrganismi nella formazione di speleotemi sia supportato da diverse evidenze, il coinvolgimento microbico nella dissoluzione e precipitazione del gesso rimane ad oggi poco studiato.

Inquadramento geologico della Grotta del Bules e della Tanaccia

Gli studi presentati in questo lavoro riguardano la Grotta del Bules (ER RN 864), situata nei gessi della Romagna Orientale, e la grotta Tanaccia (ER RA 114), situata all'interno del Parco della Vena del Gesso. La scelta di effettuare i primi studi microbiologici su queste due cavità deriva dalle peculiarità che le caratterizzano: la Grotta del Bules rappresenta un caso particolare, come descritto in seguito, mentre La Tanaccia presenta caratteristiche simili a molte delle grotte presenti sui gessi Emiliano-Romagnoli, e per questa ragione è stata scelta come grotta rappresentativa delle cavità presenti in Regione.

I gessi della Romagna orientale, diversamente dalle altre aree carsiche presenti in Emilia-Romagna, risultano ricchi di acque solfuree e depositi di zolfo, la cui presenza è testimoniata dalle diverse miniere presenti nella zona. La formazione di tali depositi è stata attribuita all'azione di batteri solforiduttori, microrganismi presenti nel sottosuolo che in presenza di sedimenti organici sono in grado di ridurre il solfato in zolfo elementare. Nella porzione terminale della Grotta del Bules è presente una delle poche sorgenti solfuree ipogee nei gessi dell'Emilia-Romagna. L'acido solfidrico che ne deriva è stato associato alla formazione dei cristalli prismatici di gesso che ricoprono alcune delle pareti e delle concrezioni presenti all'interno della grotta (FORTI, LUCCI 2016). Sebbene la biodiversità microbica presente in ambienti carsici solfurei sia già stata studiata in passato (es: grotte di Frasassi), non sono mai stati svolti studi finalizzati a valutare in che modo la presenza di sorgenti solfuree ipogee influenza le comunità microbiche nei gessi Emiliano-Romagnoli.

La Tanaccia è situata all'interno del Parco Regionale della Vena del Gesso ed è una delle grotte più conosciute e studiate della Romagna. La cavità è costituita da un ampio ramo fossile scavato da un torrente che

oggi scorre una decina di metri più in basso (GRUPPO SPELEOLOGICO FAENTINO, SPELEO GAM MEZZANO 2015) e diversamente dalla Grotta del Bules non è interessata da sorgenti solfuree. Dati gli elementi che la caratterizzano, La Tanaccia può essere considerata una cavità rappresentativa di molte grotte presenti nei gessi dell'appennino Emiliano-Romagnolo.

I campioni microbiologici raccolti dalle due grotte e le metodiche di studio applicate

Durante le campagne di campionamento (tenutesi a settembre del 2023) sono stati individuati e prelevati in condizioni di sterilità i campioni su cui effettuare le analisi microbiologiche. I campioni raccolti rappresentano i diversi ambienti osservati all'interno della Grotta del Bules e della Tanaccia, e possono essere raggruppati in cinque diverse tipologie: patine colorate, vermicolazioni, cristalli prismatici di gesso, apparenti colonie batteriche e campioni d'acqua (figg. 1-2). All'interno di entrambe le grotte, vicino all'ingresso, sono stati prelevati anche sedimenti privi di patine (o di altri elementi indicativi di attività microbica) da utilizzare come controllo. Il confronto tra le comu-

nità microbiche presenti nei campioni di interesse e nei campioni di controllo ha permesso di distinguere i microrganismi strettamente associati all'ambiente grotta da quelli derivanti dall'esterno per mezzo di correnti d'aria o acqua.

Le prime analisi svolte hanno avuto l'obiettivo di caratterizzare le comunità microbiche presenti all'interno dei diversi campioni in modo da rispondere alle seguenti domande: quali batteri sono presenti all'interno dei campioni prelevati? Ci sono differenze tra le comunità microbiche presenti nella Grotta del Bules e nella Tanaccia? I batteri, data la presenza di gesso, sono coinvolti nel ciclo dello zolfo? Le prime analisi effettuate per rispondere a queste domande si sono basate sull'analisi del DNA. Il DNA estratto da ciascun campione è stato utilizzato per amplificare mediante PCR i geni codificanti l'rRNA 16S, che sono stati successivamente sequenziati. Il gene codificante l'rRNA 16S è il marcatore tassonomico procariotico per eccellenza e la sua analisi permette di identificare i microrganismi presenti all'interno delle comunità microbiche. Questa analisi indica la biodiversità microbica associata ad ogni campione, che a sua volta

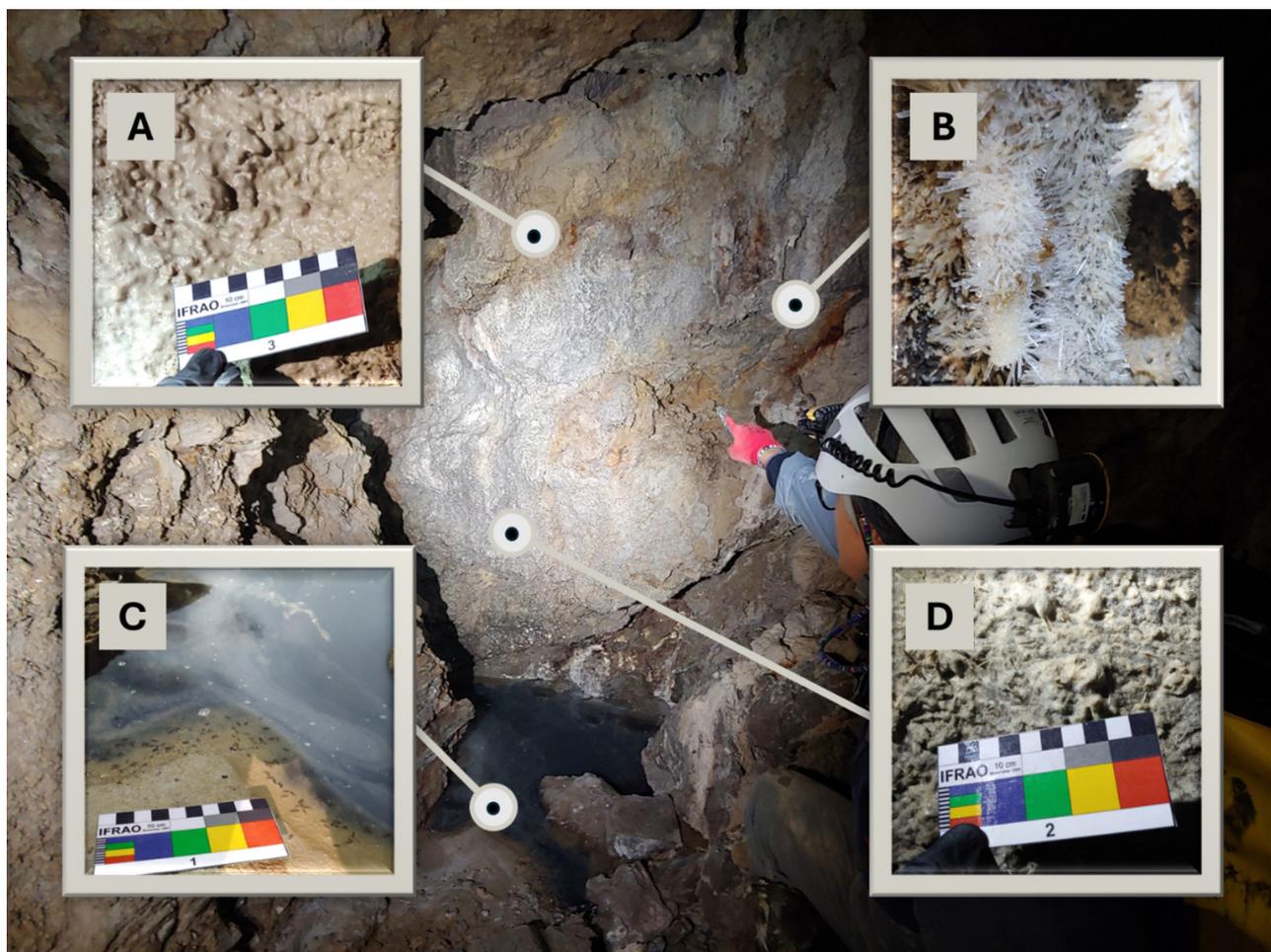


Fig 1 – Esempi di alcuni dei campioni prelevati dalla Grotta del Bules: A) Patina. B) Cristalli di gesso. C) Patina bianca galleggiante. D) Pseudo-vermicolazioni (foto E. Lopo).

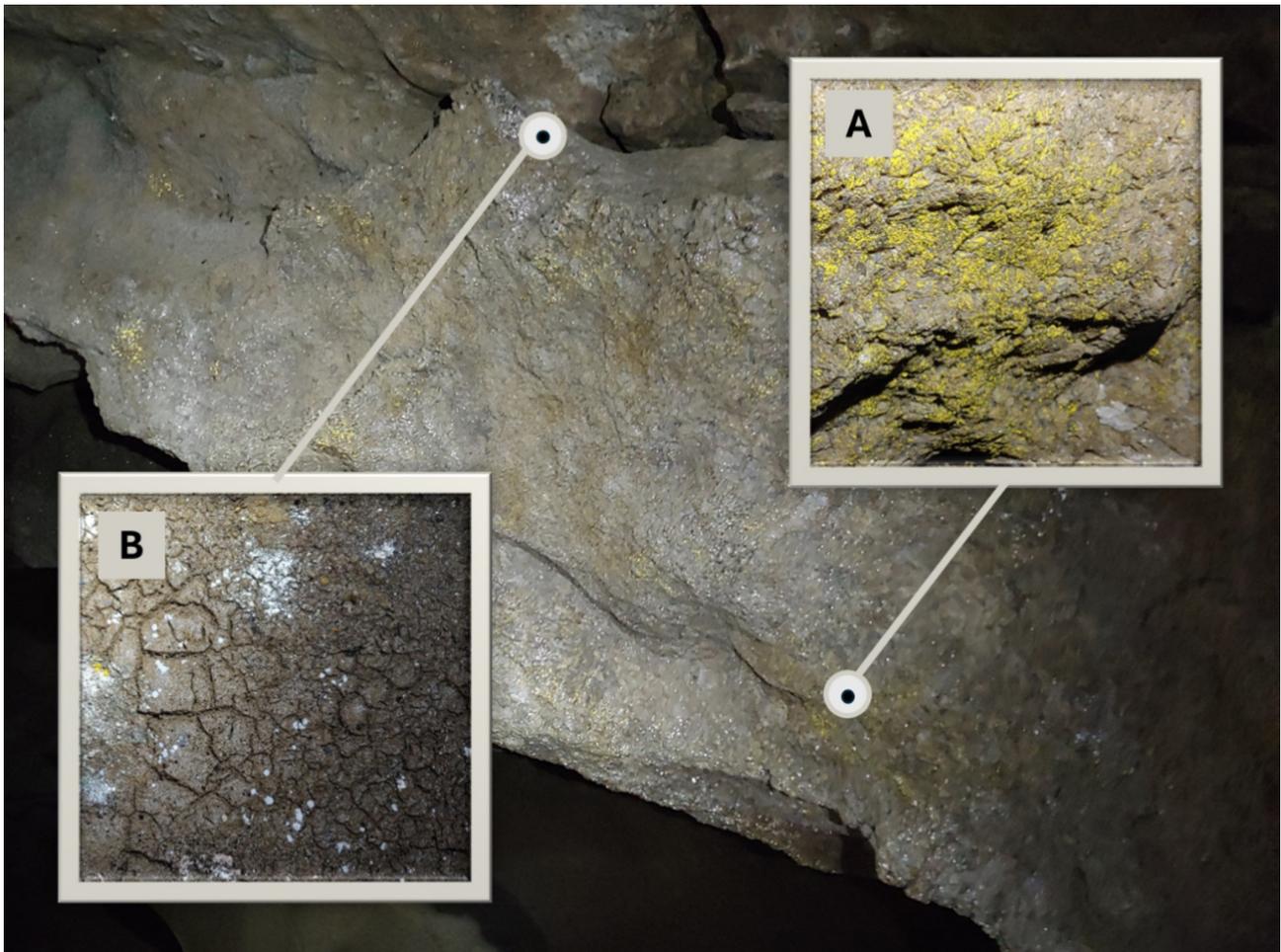


Fig 2 – Esempi di alcuni dei campioni prelevati dalla grotta Tanaccia: A) Colonie gialle. B) Colonie bianche (foto E. Lopo).

fornisce indicazioni riguardo la presenza di determinate funzioni associabili ai microrganismi. Tutte le analisi microbiologiche sono state svolte presso il MEM Lab (*Molecular Environmental Microbiology Lab*) dell'Università di Bologna (<https://site.unibo.it/molecular-environmental-microbiology-lab/it>).

Microbiologia della Grotta del Bules

Le analisi del DNA microbico hanno messo in luce la presenza di microrganismi noti per essere coinvolti in diverse fasi del ciclo dello zolfo, ovvero batteri solforiduttori e solfoossidanti. I batteri solforiduttori sono in grado di utilizzare diversi composti dello zolfo (come lo zolfo elementare, il tiosolfato e gli ioni solfato), generando composti dello zolfo ridotti, come i solfuri. I principali batteri solforiduttori trovati nella Grotta del Bules appartengono ai generi *Geobacter* e *Desulfocapsa* e sono stati riscontrati quasi esclusivamente all'interno di campioni d'acqua e delle patine galleggianti analizzate, dove insieme arrivano a rappresentare fino al 20% delle rispettive comunità microbiche (fig. 3). La grande abbondanza di questi gruppi bat-

terici nella Grotta del Bules potrebbe essere dovuta al fatto che possono usare il solfato disciolto in acqua nella respirazione anaerobica (in assenza di ossigeno), fornendo composti utilizzabili come nutrienti dai batteri solfoossidanti (FINSTER *et alii* 2013, JANSSEN *et alii* 1996, CACCAVO *et alii* 1994).

I batteri solfoossidanti, al contrario dei solforiduttori, sono in grado di ossidare composti ridotti dello zolfo generando composti ossidati, come per esempio i solfati. Gruppi diversi di questi batteri sono stati rilevati sia nelle acque che nei restanti campioni. Nelle acque sono stati rilevati principalmente batteri appartenenti ai generi *Sulfurovum*, *Sulfurimonas* e *Thiobacillus*, di cui fanno parte specie chemiolitotrofiche in grado di ossidare lo zolfo elementare e i tiosolfati (MINO *et alii* 2014, WANG *et alii* 2020). I generi *Sulfuriferula*, *Sulfurifustis* e *Thiomonas* sono invece risultati più abbondanti nei campioni solidi. Anch'essi sono noti per essere in grado di ossidare composti ridotti dello zolfo producendo zolfo elementare o solfato (D'ANGELI *et alii* 2019). I solfati generati dal metabolismo dei batteri solfoossidanti potrebbero favorire la formazione di

cristallizzazioni e concrezioni di gesso.

All'interno di un campione d'acqua, oltre a batteri solforiduttori e solfoossidanti, sono stati identificati batteri simbiotici di amebe e di altri microrganismi eucariotici, nonché batteri comunemente associati al suolo. Questi includono batteri appartenenti agli ordini *Paracaedibacterales* e *Rickettsiales* e al genere *Flavobacterium*. La presenza di questi microrganismi suggerisce che le comunità microbiche presenti nella Grotta del Bules sono, almeno in parte, influenzate dall'ambiente esterno. Ciò è coerente con le piccole dimensioni della grotta, che facilitano l'ingresso di acqua di percolazione, materia organica e animali.

Sulla base di queste analisi, le comunità microbiche della grotta del Bules possono essere suddivise in due macro-gruppi: quelle presenti all'interno dei campioni d'acqua e quelle che caratterizzano i restanti campioni (ovvero quelli solidi). Il campione di controllo (campione prelevato all'ingresso della grotta, al buio e senza indicazioni di attività microbica) ha mostrato una comunità microbica profondamente diversa rispetto ai campioni interni alla grotta. Questo indica che le comunità microbiche presenti sul gesso, nelle patine, nelle vermicolazioni e nell'acqua della Grotta del Bules sono specifiche dell'ambiente grotta e sono scarsamente influenzate dall'ambiente esterno.

Microbiologia della grotta Tanaccia

Le analisi microbiologiche dei campioni prelevati dalla grotta Tanaccia hanno messo in luce la presenza di batteri coinvolti in diversi processi ecologici e cicli biogeochimici, come l'ossidazione del metano, il ciclo dell'azoto e la fissazione dell'anidride carbonica presente in atmosfera. Le comunità microbiche presenti sulle patine colorate prelevate dal soffitto della Sala Piatta (sala collocata nella parte terminale della grotta) (Fig. 4) sono dominate da batteri appartenenti al taxon WB1-P19 (appartenente alla famiglia *Nitrosococcaceae*), comunemente rilevati all'interno di *moonmilk*s, sedimenti e patine presenti in grotta, ma mai isolati in laboratorio e ancora non caratterizzati dal punto di vista funzionale. (MARTIN-POZAS *et alii* 2023a; GHEZZI *et alii* 2024). Altri batteri abbondanti nelle patine analizzate e noti per essere coinvolti nel ciclo dell'azoto appartengono alle famiglie *Nitrospiraceae*, *Nitrosomonadaceae* e *Beijerinckiaceae*. In particolare, i membri di quest'ultimo taxa sono in grado di fissare l'azoto atmosferico (N_2) convertendolo in ioni ammonio (NH_4^+), che possono essere utilizzati come fonte di azoto e di energia da altri microrganismi. Sono stati inoltre identificati batteri metanotrofi appartenenti alle famiglie *Methyloligellaceae* e *Methylo-mirabilaceae*, in grado di ossidare il metano presente



Fig 3 – Campionamento delle acque dalla Grotta del Bules. La quasi totalità di batteri solforiduttori rilevati in questo studio derivano dalle patine galleggianti e dal sedimento presente sul fondo della pozza mostrata in figura (foto E. Lopo).

in traccia nell'atmosfera. Anche in questo caso, batteri appartenenti alle suddette famiglie sono stati rilevati all'interno grotte prese in considerazione in precedenti studi (MARTIN-POZAS *et alii* 2022; GHEZZI *et alii* 2024).

Diversamente dalla Grotta del Bules, la presenza di microrganismi noti per essere coinvolti nel ciclo dello zolfo nei campioni della Tanaccia è molto limitata. Batteri solfoossidanti appartenenti ai generi *Sulfobacillus* e *Thiomonas*, e batteri solforiduttori, come *Geobacter*, sono stati rilevati all'interno di una pozza d'acqua acida situata su una colata carbonatica e sul sedimento rosso-bruno sottostante (fig. 5), ma sono totalmente assenti all'interno delle diverse patine e colonie microbiche campionate.

L'analisi del DNA microbico estratto dalle colonie bianche e gialle prelevate dalle pareti della grotta (fig. 2) hanno messo in evidenza alcune similitudini e differenze tra i due campioni con diversa colorazione. In entrambi i casi, le colonie batteriche risultano costituite principalmente da attinobatteri appartenenti al genere *Crossiella*, che rappresentando il 50-60% delle rispettive comunità sono risultati i batteri dominanti. La presenza di questi batteri in grotta, messa in evidenza in diversi studi, è stata associata alla fissazione dell'anidride carbonica e a processi di biomineralizzazione del carbonato (MARTIN-POZAS *et alii* 2023b). Altri attinobatteri presenti all'interno dei campioni analizzati, anche se in minor misura (dallo 0,1% al 2,5% delle comunità, a seconda del campione e del genere di appartenenza), sono *Streptomyces* e *Gaiella*, risultati più abbondanti all'interno delle colonie bianche rispetto alle gialle. L'1-3% dei microrganismi che

costituiscono le due tipologie di colonie sono inoltre rappresentati dal genere WB1-P19, lo stesso genere batterico risultato dominante all'interno delle patine della Sala Piatta.

La differente colorazione delle colonie batteriche dei campioni in fig. 2 potrebbe essere data dalla presenza di alcuni proteobatteri appartenenti all'ordine *Xanthomonadales*, che rappresentano circa il 6% dei microrganismi presenti nelle colonie gialle, mentre sono totalmente assenti all'interno delle colonie bianche. Questa evidenza è coerente con altri studi pubblicati in letteratura, in cui i *biofilm* gialli spesso presenti in grotta vengono associati a microrganismi appartenenti all'ordine in questione (MARTIN-POZAS *et alii* 2023a).

Conclusioni

Nonostante il substrato roccioso in cui si sviluppano La Tanaccia e la Grotta del Bules sia il medesimo (gesso), le prime analisi basate sullo studio del DNA hanno messo in evidenza importanti differenze tra i microrganismi presenti nelle due grotte. La grotta del Bules è dominata da batteri noti per essere coinvolti in varie fasi del ciclo dello zolfo, come per esempio la riduzione dei solfati e l'ossidazione di composti ridotti dello zolfo. Questi microrganismi sono stati probabilmente selezionati in seguito alla presenza di acido solfidrico derivante dalla sorgente sulfurea interna alla grotta, e la loro predominanza suggerisce che il metabolismo associato allo zolfo giochi un ruolo centrale all'interno delle comunità microbiche. Diversamente, le analisi condotte sui campioni prelevati dalla grotta Tanaccia hanno evidenziato la presenza di proteobat-



Fig. 4 – Campionamento delle patine colorate presenti sul soffitto della Sala Piatta della grotta Tanaccia (foto M. Cappelletti).



Fig. 5 – Pozza d’acqua acida al di sopra di una colata carbonatica. Gli unici generi batterici noti per essere coinvolti nel ciclo dello zolfo all’interno della grotta Tanaccia sono stati rilevati esclusivamente all’interno dell’acqua e nel substrato rosso bruno sottostante (foto E. Lopo).

teri e attinobatteri associabili al ciclo dell’azoto e alla fissazione del carbonio, mentre la presenza di batteri solfoossidanti e solforiduttori è limitata a un unico sito. Questi risultati suggeriscono che la presenza di zolfo ridotto sia uno dei principali fattori a determinare le differenze fra le comunità microbiche presenti nelle grotte studiate in questo lavoro. Nonostante questo studio abbia finora analizzato solo due grotte di gesso, fornisce prime importanti informazioni sulla biodiversità microbica presente in questi ecosistemi sotterranei, suggerendo quali potrebbero essere le principali strategie metaboliche adottate dai microrganismi che colonizzano questi particolari ambienti sotterranei.

Bibliografia

- H.A. BARTON, V. JURADO 2007. *What’s up down there? Microbial diversity in caves*. “Microbe-American Society for Microbiology”, 2(3), pp. 132–138.
- F. CACCAVO, D.J. LONERGAN, D.R. LOVLEY, M. DAVIS, J.F. STOLZ, M.J. McINERNEY 1994. *Geobacter sulfurreducens sp. nov., a hydrogen-and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism*, “Applied and environmental microbiology”, 60(10), 3752-3759.
- Y. CHEN, L. WU, R. BODEN, A. HILLEBRAND, D. KUMARESAN, H. MOUSSARD, M. BACIU, Y. LU, C.J. MURRELL 2009, *Life without light: microbial diver-*

sity and evidence of sulfur-and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. “The ISME journal”, 3(9), pp. 1093-1104.

- I. D’ANGELI, D. GHEZZI, S. LEUKO, A. FIRRINCIELI, M. PARISE, A. FIORUCCI, B. VIGNA, R. ADDESSO, D. BALDANTONI, C. CARBONE, A.Z. MILLER, V. JURADO, C. SAIZ-JIMENEZ, J. DE WAELE, M. CAPPELLETTI 2019, *Geomicrobiology of a seawater-influenced active sulfuric acid cave*, “PLOS One”, 14(8), e0220706.
- N.T. ENYEDI, J. MAKK, L. KÓTAI, B. BERÉNYI, S. KLÉBERT, Z. SEBESTYÉN, Z. MOLNAR, A.K. BORSODI, S. LEÉL-OSSY, A. DEMÉNY P. NÉMETH 2020. *Cave bacteria-induced amorphous calcium carbonate formation*. “Scientific reports”, 10(1), pp. 8696.
- K.W. FINSTER, K.U. KJELDSSEN, M. KUBE, R. REINHARDT, M. MUSSMANN, R. AMANN, L. SCHREIBER 2013, *Complete genome sequence of Desulfocapsa sulfexigens, a marine deltaproteobacterium specialized in disproportionating inorganic sulfur compounds*, “Standards in genomic sciences”, 8, pp. 58-68.
- P. FORTI, P. LUCCI 2016. *Come si sviluppano i cristalli prismatici di gesso sulle stalattiti?*, in M.L. GAMBERI, P. LUCCI, S. PIASTRA (a cura di), *gessi e Solfi della Romagna Orientale*, pp. 157.

- D. GHEZZI, F. SAURO, A. COLUMBU, C. CARBONE, P.Y. HONG, F. VERGARA, J. DE WAELE, M. CAPPELLETTI 2021, *Transition from unclassified Ktedonobacterales to Actinobacteria during amorphous silica precipitation in a quartzite cave environment*. "Scientific reports", 11(1), 3921.
- D. GHEZZI, L. SALVI, P.E. COSTANTINI, A. FIRRINCIELLI, M. IORIO, E. LOPO, M. SOSIO, A.H. ELBANNA, Z.G. KHALIL, R.J. CAPON, J. DE WAELE, F. VERGARA, F. SAURO, M. CAPPELLETTI, *Remote and ancient quartzite caves as a novel source of culturable microbes with biotechnological potential*, submitted to "Microbiological Research".
- D. GHEZZI, N.T. JIMÉNEZ-MORILLO, L. FOSCHI, E. DONINI, V. CHIARINI, J. DE WAELE, A.Z. MILLER, M. CAPPELLETTI 2024, *The microbiota characterizing huge carbonatic moonmilk structures and its correlation with preserved organic matter*, accepted in "Environmental Microbiome".
- GRUPPO SPELEOLOGICO FAENTINO, SPELEO GAM MEZZANO 2015. *Le grotte nei Gessi di Rontana, di Brisighella e della Bicocca*, in P. LUCCI, S. PIASTRA (a cura di), *I Gessi di Brisighella e Rontana, studio multidisciplinare di un'area carsica nella vena del gesso romagnola*, pp. 220.
- P.H. JANSSEN, A. SCHUHMANN, F. BAK, W. LIESACK 1996, *Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium Desulfocapsa thiozymogenes gen. nov., sp. nov.* "Archives of Microbiology", 166, pp. 184-192.
- P. LUCCI 2016, *Le grotte nei Gessi della Romagna orientale*, in M.L. GAMBERI, P. LUCCI, S. PIASTRA (a cura di), *Gessi e Solfi della Romagna Orientale*, pp. 72.
- T. MARTIN-POZAS, A. FERNANDEZ-CORTES, S. CUEZVA, J.C. CAÑAVERAS, D. BENAVENTE, E. DUARTE, C. SAIZ-JIMENEZ, S. SANCHEZ-MORAL, 2023a. *New insights into the structure, microbial diversity and ecology of yellow biofilms in a Paleolithic rock art cave (Pindal Cave, Asturias, Spain)*. "Science of the Total Environment", 897, 165218.
- T. MARTIN-POZAS, J.L. GONZALEZ-PIMENTEL, V. JURADO, L. LAIZ, J. CAÑAVERAS, A. FERNANDEZ-CORTES, S. CUEZVA, S. SANCHEZ-MORAL, C. SAIZ-JIMENEZ 2023b, *Crossiella, a rare Actinomycetota genus, abundant in the environment*. "Applied Biosciences", 2(2), pp. 194-210.
- T. MARTIN-POZAS, S. CUEZVA, A. FERNANDEZ-CORTES, J. CAÑAVERAS, D. BENAVENTE, V. JURADO, C. SAIZ-JIMENES, I. JANSSENS, N. SEIJAS, S. SANCHEZ-MORAL 2022, *Role of subterranean microbiota in the carbon cycle and greenhouse gas dynamics*, "Science of the Total Environment", 831, 154921.
- S. MINO, H. KUDO, T. ARAI, T. SAWABE, K. TAKAI, S. NAKAGAWA 2014. *Sulfurovum aggregans sp. nov., a hydrogen-oxidizing, thiosulfate-reducing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney, and an emended description of the genus Sulfurovum*. "International journal of systematic and evolutionary microbiology", 64(Pt_9), 3195-3201.
- R. RIDING 2000. *Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms*. "Sedimentology", 47, pp. 179-214.
- K.A. ROACH, M. TOBLER, K.O. WINEMILLER 2011. *Hydrogen sulfide, bacteria, and fish: a unique, subterranean food chain*. "Ecology" 92(11), pp. 2056-2062.
- F. SAURO, M. CAPPELLETTI, D. GHEZZI, A. COLUMBU, P.Y. HONG, H.M. ZOWAWI, C. CARBONE, L. PICCINI, F. VERGARA, D. ZANNONI, J. DE WAELE 2018, *Microbial diversity and biosignatures of amorphous silica deposits in orthoquartzite caves*, "Scientific reports", 8(1), 17569.
- S. WANG, L. JIANG, X. LIU, S. YANG, Z. SHAO 2020. *Sulfurimonas xiamenensis sp. nov. and Sulfurimonas lithotrophica sp. nov., hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotrophs within the Epsilonproteobacteria isolated from coastal sediments, and an emended description of the genus Sulfurimonas*. "International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology", 70 (4), pp. 2657-2663.
- S. ZADA, W. SAJJAD, M. RAFIQ, S. ALI, Z. HU, H. WANG, R. CAI 2021. *Cave microbes as a potential source of drugs development in the modern era*. "Microbial ecology", pp. 1-14.

www.site.unibo.it/molecular-environmental-microbiology-lab/it

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dalla Federazione Speleologica Regionale dell'Emilia-Romagna (FSRER). Si ringraziano Piero Lucci, presidente della FSRER, e il Prof. Jo De Waele (Università di Bologna) per averci fornito indicazioni di natura geologica e speleologica. Si ringraziano anche Katia Poletti e Giulia Alessandrini per il supporto fornito durante le attività di campionamento nelle grotte.