

# Stigobionti

Vita acquatica  
nelle Grotte di Frasassi

FSM • FEDERAZIONE SPELEOLOGICA MARCHIGIANA  
A CURA DI ALESSANDRO MONTANARI

STIGOBIONTI > VITA ACQUATICA NELLE GROTTI DI FRASSASSI

FEDERAZIONE SPELEOLOGICA MARCHIGIANA > ALESSANDRO MONTANARI



# Stigobionti

Vita acquatica  
.....  
nelle Grotte di Frasassi



FSM • FEDERAZIONE SPELEOLOGICA MARCHIGIANA  
.....  
A CURA DI ALESSANDRO MONTANARI



---

Pubblicazione realizzata con i contributi della Regione Marche:  
L. R. 12/2000 - Decreto del Dirigente della P. F. Aree protette,  
Protocollo di Kyoto, Riqualificazione urbana n. 15/APP\_08 del 20/12/2005

© Tutti i diritti riservati.

**STIGOBIONTI - VITA ACQUATICA NELLE GROTTA DI FRASASSI**  
FSM - Federazione Speleologica Marchigiana  
A cura di Alessandro Montanari  
Direttore dell'Osservatorio Geologico di Coldigioco [Apiro · MC]

In copertina:

**FRONTE:** Grotta del Fiume, ramo del New Mexico,  
veduta panoramica del Lago delle Anguille  
**RETRO:** Grotta del Fiume, Lago Stratificato  
[fotografie di Sandro Mariani]

Dedicato a tutti gli speleologi,  
ultimi esploratori romantici  
del pianeta Terra.



**Federazione  
Speleologica  
Marchigiana**

## FEDERAZIONE SPELEOLOGICA MARCHIGIANA

La Federazione Speleologica Marchigiana (FSM), costituita dai Gruppi Speleologici Federati della Regione Marche, nasce come associazione non riconosciuta il 24 marzo 1968 a Macerata, per poi essere ufficializzata il 27 settembre 1999 a Senigallia. Attualmente ha sede legale a Jesi, in Via Papa Giovanni XXIII, 3.

Il Compito che la FSM si è assunta nell'ambito della speleologia regionale è quello di rappresentare tutti i gruppi ad essa aderenti; non ha scopo di lucro, è apartitica e aconfessionale. Promuove attività speleologica in tutte le sue forme, dallo studio di problematiche a carattere speleologico nell'ambito della Regione e fuori, alla tutela dell'ambiente ipogeo e carsico in generale.

Grazie all'impegno dei Gruppi Speleologici Federati il 23 febbraio 2000 la Regione Marche ha varato la Legge 12/2000 "Norme sulla Speleologia", che sancisce una volta per tutte la tutela del patrimonio carsico e speleologico. Successivamente la FSM ha stipulato una convenzione con la Regione Marche per l'aggiornamento, la conservazione e la revisione del Catasto Regionale delle Grotte, delle Forre e delle Aree Carsiche. Alla data odierna si sta inoltre attivando un Catasto Regionale delle Cavità Artificiali.

Oltre a curare i rapporti con privati ed Enti pubblici una delle attività statutarie della FSM è la promozione della Speleologia, che realizza anche attraverso la redazione di articoli scientifici su riviste specializzate, bollettini informativi e pubblicazioni.

Il libro "Stigobionti" raccoglie i frutti di oltre 5 anni di ricerche sugli organismi acquatici ipogei del complesso carsico di Frasassi, promosse e coordinate dalla FSM con il supporto scientifico dell'Osservatorio Geologico di Coldigioco.

Il Presidente della FSM  
SIMONE CERIONI

## GRUPPI SPELEOLOGICI FEDERATI

GRUPPO SPELEOLOGICO CAI SENIGALLIA  
STRADA COMUNALE VALLONE, 76  
60019 SENIGALLIA (AN)

GRUPPO SPELEOLOGICO CAI JESI  
PIAZZA DELLA REPUBBLICA, 1  
60035 JESI (AN)

ASGSV - ASSOCIAZIONE SPELEOLOGICA  
GENGA SAN VITTORE  
VIA GUGLIELMO MARCONI, 16  
60040 GENGA (AN)

GRUPPO GROTTRE RECANATI  
VIA BEATO PLACIDO, 13  
62019 RECANATI (MC)

GRUPPO SPELEOLOGICO ALTA VALLE DEL POTENZA  
c/o GIULIO FRANCO COTECHINI  
VIA SERAFINO CILOTTI, 2  
62025 PIORACO (MC)

GSM - GRUPPO SPELEOLOGICO MARCHIGIANO CAI  
ANCONA  
VIA VITTORIO VENETO, 10  
60122 ANCONA

CENTRO RICERCHE SPELEOLOGICHE "NOTTOLONI"  
c/o FLAVIO CALVANI  
BORGO COMPAGNONI, 14  
62010 MADONNA DEL MONTE (MC)

GSF - GRUPPO SPELEOLOGICO CAI FABRIANO  
VIA VITTORIO ALFIERI, 9  
60044 FABRIANO (AN)

ASSOCIAZIONE SPELEOLOGICA ACQUASANTANA  
FRAZ. SANTA MARIA  
63041 ACQUASANTA TERME (AP)

GRUPPO SPELEOLOGICO URBINATE  
VIA YURI GAGARIN  
61029 URBINO

GRUPPO AUTONOMO SPELEOLOGICO  
PORTOCIVITANOVA  
VIA SALVATORE QUASIMODO, 5  
62012 CIVITANOVA MARCHE (MC)

GRUPPO SPELEOLOGICO AGUGLIANO  
60020 AGUGLIANO (AN)

**ALESSANDRO MONTANARI**  
(Ancona, 1954)

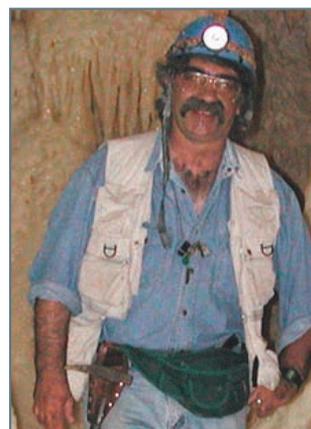
È Direttore dell'Osservatorio Geologico di Coldigioco, un centro privato fondato nel 1992 nei pressi di Apiro (Macerata) con David Bice e Walter Alvarez. Premio Rotary Gubbio (1992), Ufficiale dell'Ordine al Merito della Repubblica (1994), Premio Portonovo (2001), Sabbatical Award U. C. Berkeley Geology (2005), EGU Medaglia Jean Baptiste Lamarck (2007). Laureato in Geologia ad Urbino nel 1979, ha conseguito il PhD alla U. C. Berkeley nel 1986 dove è rimasto come ricercatore associato fino al 1993.

Come docente è stato Teaching Assistant a Berkeley in vari corsi di geologia di campagna, professore a contratto in corsi di tettonica a zolle a Perugia (1984), sedimentologia a Stanford (1988), geologia regionale a Berkeley (1990), stratigrafia a Camerino (1993), professore aggiunto all'Ecole des Mines de Paris (1993-1996), e professore a contratto a Chieti (2006-2007). Come professore a contratto per varie università statunitensi ed europee, dal 1993 insegna a Coldigioco in corsi ad hoc di rilevamento geologico, stratigrafia, sedimentologia, tettonica, geologia strutturale e geologia regionale (Appennino settentrionale, Dolomiti, Garfagnana, Croazia).

Organizzatore di alcuni convegni scientifici internazionali (IUGS-SPS 1987, IUGS-SOG 1992, ESF 1995, RETREAT 2005, Penrose 2007, FSM 2009), è membro di commissioni stratigrafiche e gruppi di lavoro della Unione Internazionale delle Scienze Geologiche. È autore di un centinaio di articoli tecnici in riviste scientifiche internazionali, atti di convegni e monografie stratigrafiche (IUGS, Elsevier, Springer, Giornale di Geologia, GSA), di alcuni testi di divulgazione scientifica ("Le Rocce del Conero Raccontano", "Ballata con la Terra", "Gocce di Tempo"), e progetti di conservazione di siti geologici (Parco del Cònero, Comunità Montana del San Vicino, Parco della Rossa e di Frasassi), e ha collaborato in alcuni programmi televisivi di divulgazione scientifica italiani e stranieri.

Collabora in vari progetti di ricerca sulla stratigrafia integrata e paleoclimatologia del Cretaceo-Neogene, il Quaternario speleotemico e sulla biologia delle grotte di Frasassi con istituti europei e statunitensi. È stato correlatore e supervisore di tesi di laurea e di PhD per una cinquantina di studenti di vari istituti italiani e stranieri, inclusi il Carleton College, l'Ecole des Mines de Paris, l'Università di Vienna, l'Università di Amsterdam, l'Università di Camerino e l'Università di Chieti, consulente tecnico per la Chevron Overseas Petroleum Co. (1987-1989) e per laboratori di analisi petrografica del calcestruzzo.

Tiene occasionalmente seminari integrativi in licei e istituti delle Marche e ha collaborato con l'Associazione Nazionale degli Insegnanti di Scienze Naturali tra il 2000 e il 2002. Divenuto membro del Gruppo Speleologico Marchigiano di Ancona nel 1968, ha partecipato alle prime esplorazioni della Grotta Grande del Vento scoperta dal GSM nel 1971 e continuato l'attività speleologica fino alla fine degli anni settanta. Una volta tornato in Italia dopo la lunga residenza negli Stati Uniti, ha riesumato l'attività di ricerca speleologica nel 2002 collaborando con i gruppi della Federazione Speleologica Marchigiana in progetti di ricerca sulla biospeleologia e la neotettonica del complesso carsico di Frasassi.



## RINGRAZIAMENTI

<b>DAZY BHARTY</b> .....	Università di Camerino, Italia
<b>JAN BAUERMEISTER</b> .....	Università di Göttingen, Germania
<b>MARCO BODON</b> .....	Università di Siena, Italia
<b>BETTY BOROWSKY</b> .....	Nassau Community College, U.S.A.
<b>RICHARD BOROWSKY</b> .....	New York University, U.S.A.
<b>FEDERICO BUONANNO</b> .....	Università di Macerata, Italia
<b>SAMUELE CARNEVALI</b> .....	GSF - Gruppo Speleologico CAI, Fabriano, Italia
<b>SIMONE CERIONI</b> .....	ASGSV - Associazione Speleologica Genga San Vittore, GSF, Italia
<b>COMPAGNIA PER LA COMUNICAZIONE</b> .....	Civitanova Marche, Italia
<b>SHARMISHTHA DATTAGUPTA</b> .....	Università di Göttingen, Germania
<b>DEBORA DE MICHELE</b> .....	Università dell'Aquila, Italia
<b>GREG DRUSCHEL</b> .....	Vermont University, U.S.A.
<b>CHRISTER ERSÉUS</b> .....	Università di Gothenburg, Svezia
<b>JEAN-FRANÇOIS FLOT</b> .....	Università di Göttingen, Germania
<b>BARBARA FRASCA</b> .....	Università dell'Aquila, Italia
<b>DIANA GALASSI</b> .....	Università dell'Aquila, Italia
<b>SANDRO GALDENZI</b> .....	Liceo Scientifico di Jesi, Italia
<b>MINDA GOWARTY</b> .....	Nassau Community College, U.S.A.
<b>GORDAN KARAMAN</b> .....	Accademia delle Scienze, Montenegro
<b>EMILIO INSOM</b> .....	Università di Camerino, Italia
<b>DANIEL JONES</b> .....	Pennsylvania State University, U.S.A.
<b>ANTONIETTA LA TERZA</b> .....	Università di Camerino Italia
<b>MAURO LEPORONI</b> .....	ASGSV - Associazione Speleologica Genga San Vittore, Italia
<b>JENN MACALADY</b> .....	Pennsylvania State University, U.S.A.
<b>MAURIZIO MAINIERO</b> .....	GSM - Gruppo Speleologico Marchigiano, Italia
<b>SANDRO MARIANI</b> .....	GSF - Gruppo Speleologico CAI, Fabriano, Italia
<b>MAXWELL MONTANARI</b> .....	Osservatorio Geologico di Coldigioco, Italia
<b>CLAUDIO ORTENZI</b> .....	Università di Macerata, Italia
<b>GIORGIO ROSCIONI</b> .....	GSF - Gruppo Speleologico CAI, Fabriano, Italia
<b>TARMO TIMM</b> .....	Università di Tartumaa, Estonia
<b>HUBERT VONHOF</b> .....	Università di Amsterdam, Olanda

### **CASSA DI RISPARMIO DI FABRIANO E CUPRAMONTANA S.P.A.**

Si ringraziano i soci dei gruppi speleologici GSF di Fabriano e GSM di Ancona per il lavoro di esplorazione e rilievo del "New Mexico" tutt'ora in corso; in particolare vogliamo ricordare GABRIELE BORGIONI (GSF) e PAOLO GRILLANTINI (GSM), primi esploratori di questo nuovo e interessante ramo della Grotta del Fiume.

<b>PREFAZIONE</b> .....	pag.	VII
<b>PREMESSA</b> .....	pag.	IX
<b>CRONISTORIA DELLA RICERCA</b> .....	pag.	1
<b>INTRODUZIONE</b>		
Inquadramento geologico .....	pag.	11
Carsismo ipogenico sulfidico ed ecosistema autotrofo .....	pag.	14
<b>I DOMINI DELLA VITA</b>		
Tassonomia e filogenesi .....	pag.	17
Origine ed evoluzione delle cellule viventi .....	pag.	20
Frasassi: ambiente estremofilo, vivaio ancestrale .....	pag.	24
I tre domini della vita in una goccia di acido .....	pag.	25
<b>SISTEMATICA DEGLI STIGOBIONTI DI FRASASSI</b>		
Procarioti .....	pag.	31
Protozoi .....	pag.	35
Platelminti .....	pag.	42
Nematodi .....	pag.	44
Anellidi .....	pag.	46
Rotiferi .....	pag.	48
Molluschi .....	pag.	50
Artropodi .....	pag.	55
Ostracodi .....	pag.	56
Copepodi .....	pag.	61
Anfipodi .....	pag.	65
<b>LE ACQUE CURATIVE DI FRASASSI</b>		
La medicina miracolosa dello zolfo .....	pag.	77
Frasassi: un brodo primordiale .....	pag.	78
<b>CONCLUSIONI</b> .....	pag.	81
<b>REFERENZE CITATE</b> .....	pag.	83



---

**STIGOBIONTE** (n. m. s.; (pl. stigobionti);  
dal greco Στυξ (Stige): mitologico fiume sotterraneo dell'Ade;  
e βίος (bios): vita. Riferito ad organismi endemici di acque sotterranee.





Dante Alighieri  
Inferno, Canto VII, vv. 100-130

V

Noi ricidemmo il cerchio a l'altra riva  
sovr'una fonte che bolle e riversa  
per un fossato che da lei deriva.  
102

L'acqua era buia assai più che persa;  
e noi, in compagnia de l'onde bige,  
intrammo giù per una via diversa.  
105

In la palude va c'ha nome Stige  
questo tristo ruscel, quand'è disceso  
al piè de le maligne piagge grige.  
108

E io, che di mirare stava inteso,  
vidi genti fangose in quel pantano,  
ignude tutte, con sembiante offeso.  
111

Queste si percotean non pur con mano,  
ma con la testa e col petto e coi piedi,  
troncandosi co' denti a brano a brano.  
114

Lo buon maestro disse: "Figlio, or vedi  
l'anime di color cui vinse l'ira;  
e anche vo' che tu per certo credi  
117

che sotto l'acqua è gente che sospira,  
e fanno pullular quest'acqua al summo,  
come l'occhio ti dice, u' che s'aggira.  
120

Fitti nel limo dicon: "Tristi fummo  
ne l'aere dolce che dal sol s'allegra,  
portando dentro accidioso fummo:  
123

or ci attristiam ne la belletta negra".  
Quest'inno si gorgoglian ne la strozza,  
ché dir nol posson con parola integra".  
126

Così girammo de la lorda pozza  
grand'arco, tra la ripa secca e 'l mézzo,  
con li occhi vòlti a chi del fango ingozza.



Conosciamo meglio alcune aree della Luna o di Marte rispetto a quello che si nasconde solo a pochissimi metri sotto i nostri piedi. Eppure il mondo nascosto delle grotte ha tanto da raccontarci. Entrare nelle Grotte di Frasassi significa iniziare uno straordinario viaggio nella geologia, nell'evoluzione e in generale nella Scienza. Ricordo molto bene la profonda impressione che mi ha lasciato la prima volta che vi sono entrato per effettuare delle riprese. È difficile trovare un luogo al mondo di così rara bellezza. È una cattedrale del tempo, frutto di un lavoro immenso della Natura. Solo pochi si accorgono di quanto possa raccontare anche un singolo dettaglio di questo sistema di grotte, anche il più piccolo.

Questo volume ne è un esempio. Vi prende per mano e nel farvi incontrare i vari abitanti di Frasassi, vi racconta la storia della vita sulla Terra. Tutt'attorno a noi, infatti, sono rimasti tutti i pionieri e i protagonisti della nostra evoluzione: dai batteri, agli invertebrati, agli esseri viventi superiori. Molti di essi si trovano anche nelle grotte di Frasassi, sorprendendo i visitatori che ignorano che ci possa esserci vita in questi ambienti bui e silenziosi. Prendendo spunto da essi, è possibile viaggiare lungo i miliardi di anni del nostro passato e raccontare quella che è forse la storia più bella: l'evoluzione della vita sul nostro pianeta. Esattamente come hanno fatto tutti i ricercatori e gli speleologi che hanno collaborato alla stesura di quest'opera, coordinata da Alessandro Montanari.

Il merito di questo lavoro è di avvicinare il lettore, in modo sintetico e chiaro, alle scoperte che nel corso delle generazioni hanno chiarito il cammino della vita. Ma ha anche il merito di rendere meno buio l'ambiente delle grotte, svelando le piccole meraviglie che si nascondono nelle sue acque.

Sorprende infatti pensare che lo spettacolare mondo delle grotte sia in realtà un mondo intimamente legato all'acqua. Il cuore di molte montagne, in effetti, nasconde torrenti e laghi sepolti: la loro acqua proviene dalle piogge e dalle nevi cadute sui rilievi, che s'infilano nelle viscere delle montagne per sgorgare spesso a valle, sotto forma di sorgenti che alimentano cittadine e città. Quello che sorprende è la durata di questo viaggio. Non è come quello dell'acqua piovana che scorre su di un tetto infiltrandosi in pochi secondi nelle grondaie. I tempi possono essere sorprendentemente lunghi. Un esempio riguarda la città di Roma: l'acqua che esce dai suoi rubinetti proviene dalle piogge e dalle nevi cadute circa 30-40 anni fa sugli Appennini. Insomma, l'acqua di un bicchiere nella nostra capitale ha cominciato il suo percorso quando l'uomo non era ancora andato sulla Luna. E lo stesso accade per molte altre sorgenti sparse nella nostra penisola.

Ma questa è solo una delle curiosità del mondo nascosto delle grotte. Le altre, le scoprirete ora. Buon viaggio!

Alberto Angela



Gli operatori della ricerca descritta in questo libretto si sono premurati di rendere accessibili al pubblico le nuove conoscenze sugli stigobionti di Frasassi, oltre che a proporre la lettura di articoli scientifici specialistici che però sono spesso scritti in un linguaggio algebrico di difficile comprensione per chi non lavora nel campo della ricerca scientifica. Per questo motivo si è voluto curare la pubblicazione di questo libretto usando un linguaggio divulgativo accessibile a tutti pur mantenendo il più possibile la correttezza scientifica. Si vuole però sottolineare che molte delle informazioni e scoperte documentate in questo libro non sono state ancora pubblicate, nella loro pienezza, in riviste specialistiche referenziate, e quindi non hanno ancora passato il vaglio ufficiale della revisione da parte della comunità scientifica. Ci si limita dunque a riportare e documentare, con illustrazioni, foto originali e rapporti preliminari forniti dai vari collaboratori scientifici, le faune acquatiche delle grotte di Frasassi molte delle quali, fino a qualche anno fa, non se ne conosceva nemmeno l'esistenza.



Cronistoria della ricerca

---



Durante una spedizione congiunta del Gruppo Speleologico CAI di Fabriano (GSF) e del Gruppo Speleologico Marchigiano CAI di Ancona (GSM), nel **2001** fu scoperto un nuovo grande ramo carsico nella parte più interna della Grotta del Fiume, a Frasassi, che si addentra orizzontalmente nelle viscere di Monte Valmontagnana per circa un chilometro e mezzo. Questo nuovo sviluppo ipogeo, battezzato dagli speleologi New Mexico, è caratterizzato da una serie di grandi laghi (**figura 1**) popolati dal *Niphargus ictus*, un piccolo crosta-

to unica nel suo genere, suscitò non pochi interrogativi: Sono davvero anguille? E da dove sono venute? Sono forse endemiche della grotta? Come hanno fatto a salire sulle pareti viscido e subverticali fino a cinque metri di altezza e rimanere appiccicate lì? E quando sarebbe successo questo fatto? Fu così che gli esploratori ottennero il supporto di uno speleologo veterano del GSF, il dr. Maurizio Borioni, al tempo Vice Presidente Esecutivo dell'industria fabrianese ELICA s.p.a. di Francesco Casoli, che promosse un finanziamento a favore dei



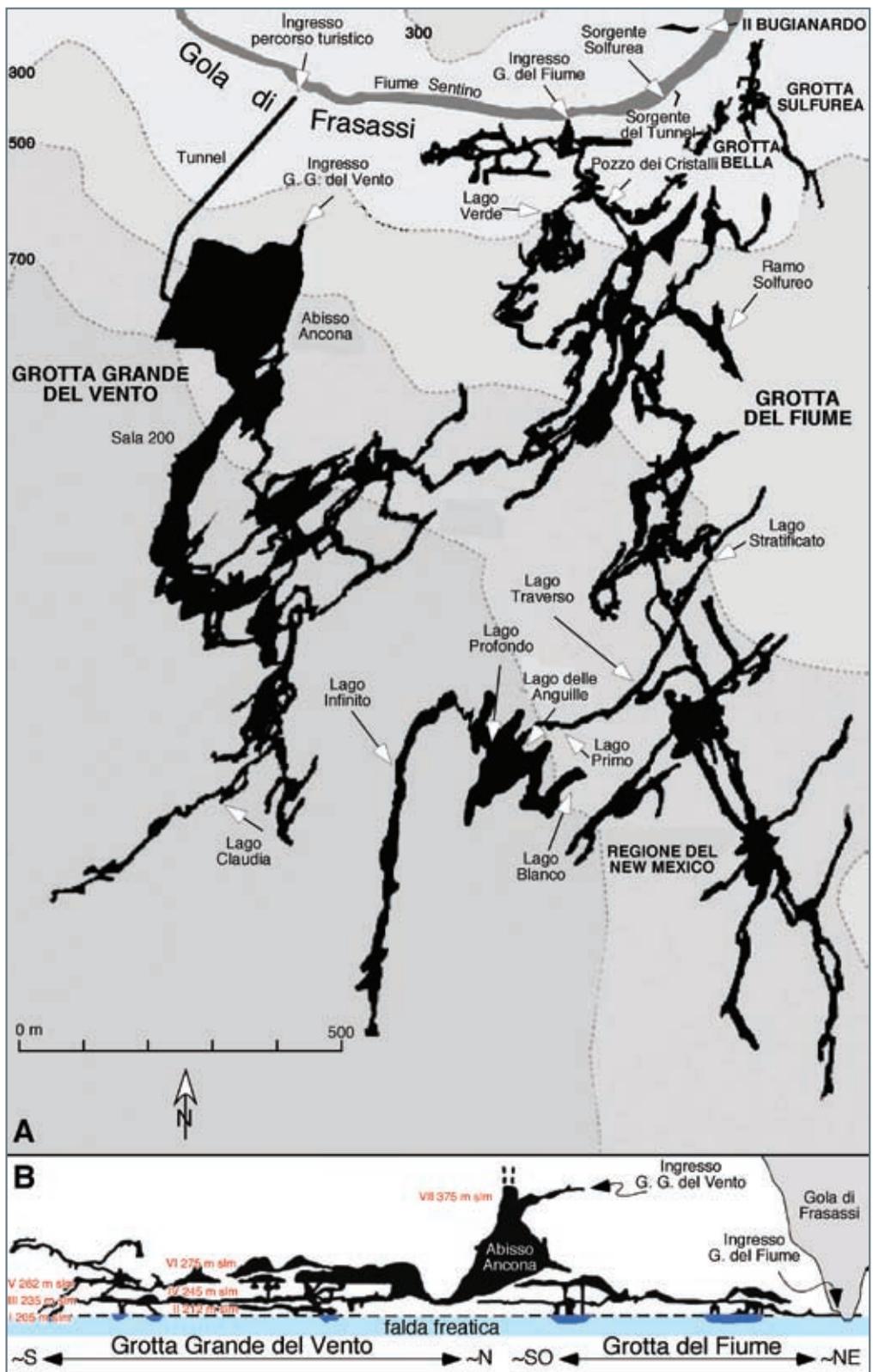
ceo anfipode simile ad un gamberetto e già riscontrato in quasi tutti i laghi e laghetti del complesso carsico di Frasassi comprendente il sistema Grotta del Fiume-Grotta Grande del Vento (**figura 2**). Ma il ritrovamento più sensazionale ed inconsueto fatto in questa nuova parte di grotta, ancora vergine, di difficile accesso e tutta da esplorare, fu un gran numero di resti subfossili di anguille lunghe fino a 70 cm, stranamente appiccicate, come fossero stampate, sulle sponde rocciose e quasi verticali di questi laghi fino ad un'altezza di 5 metri sopra il livello della falda acquifera (**figura 3A, B**). Tale scoperta, del tut-

due gruppi speleologici da parte della Fondazione Casoli per intraprendere una ricerca scientifica e trovare risposte a questi intriganti interrogativi. Chiesero al dr. Alessandro Montanari, uno speleologo veterano del GSM e Direttore dell'Osservatorio Geologico di Coldigioco (Comune di Apiro, Macerata), di assumere il ruolo di coordinatore scientifico.

La ricerca ebbe inizio nel **2002** ed oltre al geologo dr. Maurizio Mainiero del GSM e il dr. Sandro Mariani del GSF, al tempo laureando in geologia all'Università di Camerino, furono coinvolti colleghi specialisti delle

**Figura 1** - Veduta panoramica del Lago delle Anguille.  
Foto di S. Mariani

2





**FIGURA 2 (A SINISTRA)**  
 A) Planimetria del complesso carsico Grotta Grande del Vento-Grotta del Fiume e indicazione dei laghi ipogei studiati; B) sezione idealizzata della grotta con indicate le quote dei piani carsici.  
 Da Mariani et al., 2007.

**FIGURA 3 (A FIANCO)**  
 A) Anguille subfossili rinvenute sulle sponde del Lago delle Anguille; B) particolare di anguille subfossili giacenti a circa 2 metri sopra il livello della falda freatica.  
 Foto di S. Mariani.

Università di Utrecht, Amsterdam e Perugia. Il lavoro di ricerca fu lungo, complesso e interdisciplinare, ma portò a dei risultati inattesi e di un certo valore scientifico tanto che furono poi pubblicati in *Earth and Planetary Science Letters*, una prestigiosa rivista scientifica internazionale (Mariani et al. 2007). In breve, stando alla morfologia dello scheletro, e in particolare del cranio, e alla forma e disposizione dei denti (**figura 4A, C**) le nostre

anguille apparrebbero alla comune specie europea *Anguilla anguilla*, e sembra siano penetrate nella grotta in tempi diversi durante gli ultimi 8.000 anni, probabilmente attraverso fessure o comunque passaggi comunicanti con il Fiume Sentino. Incapaci di ritrovare la via d'uscita, queste anguille si sarebbero adattate a vivere nei laghi ipogei per un certo periodo di tempo, cibandosi di organismi endemici della grotta come i sopra citati anfipodi

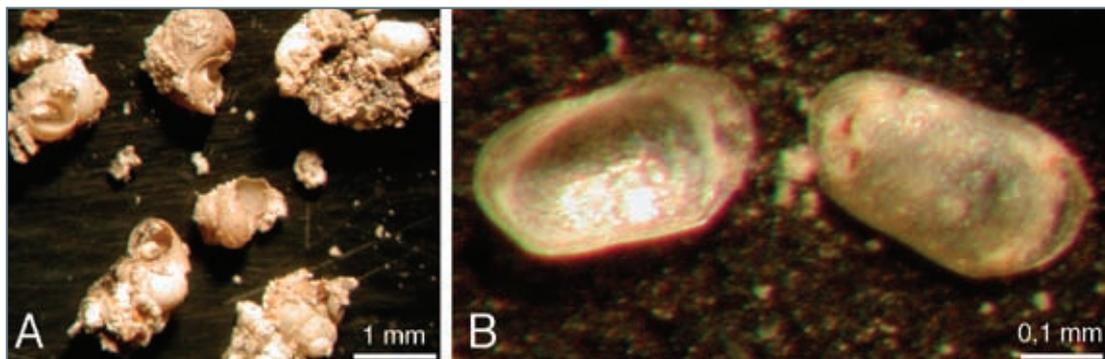
**FIGURA 4 (IN BASSO) - A)** Radiografia ai raggi X di un'anguilla subfossile del Lago delle Anguille (cortesia del Dr. A. De Luca dell'Ambulatorio Veterinario Barigelli di Jesi); **B)** Cranio di anguilla subfossile del Lago delle Anguille; **C)** particolare della mandibola di un'anguilla subfossile mostrante la forma arcuata e acuminata dei denti e la disposizione a più file degli alveoli dentali, caratteristiche tipiche della specie *Anguilla anguilla*.  
 Foto di A. Montanari.



ma anche delle mucillagini di colonie solfobatteriche che sono abbondanti nelle acque sulfidiche ipogee di Frasassi. Ciò è dimostrato dal fatto che la composizione isotopica del carbonio nei resti delle anguille è la stessa di quella degli organismi endemici dell'ambiente chemiosintetico e autotrofo della grotta, anfipodi compresi, ed è molto diversa da quella di un qualsiasi altro organismo che vive all'esterno, sotto la luce del sole, in un ecosistema fotosintetico. La datazione radioisotopica col metodo del carbonio 14 ha poi indicato che le anguille campionate più in alto sul livello del lago hanno un'età più vecchia di quelle campionate più in basso. Da qui si è concluso che le anguille, dopo la loro morte, siano rimaste a galla gonfie di gas prodotti dalla decomposizione, per finire poi contro le sponde del lago sotterraneo sospinte dalla debole corrente del flusso vadoso, ri-

torno ai 0,5-0,6 millimetri all'anno. Da studi geologici recenti si sa però che il sollevamento tettonico in questa parte dell'Appennino è di circa 0,2-0,3 millimetri all'anno (200 o 300 metri per milione di anni). Dunque, l'abbassamento della falda acquifera nel periodo post-glaciale implica non solo l'incisione da parte del Fiume Sentino del suo letto roccioso, cosa che avviene attualmente, ma anche la rimozione di detrito sciolto che si era formato durante l'ultima glaciazione e che aveva ingolfato, con uno strato probabilmente spesso alcuni metri, il suo alveo.

Durante la preparazione dei campioni destinati alle analisi isotopiche, ci si è accorti che i resti di pelle e di ossa delle anguille subfossili racchiudevano dei minuscoli gusci calcarei di organismi quali gasteropodi e ostracodi (**figura 5A, B**). Quest'ultimi sono dei crostacei sub-millimetrici



**FIGURA 5** - A) Conchiglie di gasteropodi e B) di ostracodi rinvenute fra i resti subfossili di anguilla al Lago delle Anguille. Foto di A. Montanari.

manendo attaccate alla roccia durante il lento processo di putrefazione. Dunque, se ora un'anguilla vecchia di 7.600 anni si ritrova incollata a circa quattro metri di altezza, significa che il livello della falda acquifera si è abbassato di altrettanti metri durante questo periodo. Ciò è spiegabile dal fatto che dalla fine dell'ultima glaciazione (ovvero l'inizio dell'Olocene), il Fiume Sentino ha inciso il letto della Gola di Frasassi in risposta al continuo e lento sollevamento tettonico dell'Appennino. Stando alle età radioisotopiche delle anguille subfossili, la velocità media di approfondimento dell'alveo del Sentino a Frasassi nell'ultimo periodo post-glaciale è calcolabile

racchiusi in una conchiglia bivalente trapezoidale od ovoidale simile, per forma, ad una minuscola cozza. Fino a quel momento non si conosceva l'esistenza di ostracodi nelle grotte di Frasassi. I gusci di gasteropodi, delle dimensioni intorno al millimetro, potevano invece riferirsi ad una specie endemica già segnalata da Galdenzi e Sarbu (2000) in un laghetto della Grotta Solfurea e attribuita alla specie *Islamia pusilla*. Questa scoperta ispirò un progetto di ricerca sulle faune acquatiche del complesso carsico di Frasassi, allora poco conosciute e limitate alle segnalazioni di Galdenzi e Sarbu (2000) riguardo ai sopracitati anfipodi e micro-gasteropodi.

Nel **2005** la Federazione Speleologica Marchigiana (FSM), su iniziativa di Maurizio Mainiero e di Sandro Mariani, ottenne un finanziamento dalla Regione Marche (Assessorato Aree Protette, Protocollo di Kioto e Riqualificazione Urbana) per intraprendere il lavoro preliminare di ricerca sugli *stigobionti* (da *Stige* = mitologico fiume infernale e *bionte* = essere vivente in greco antico), ovvero le faune acquatiche delle grotte di Frasassi. Furono così contattati alcuni specialisti zoologi, paleontologi e microbiologi a cui si chiese la collaborazione per lo studio e l'identificazione degli organismi già individuati, negli anni precedenti, nei laghi della Grotta del Fiume.

La prof.ssa Jenn Macalady, titolare del laboratorio di microbiologia molecolare della Pennsylvania State University e già da anni membro del circolo di scienziati facenti capo all'Osservatorio Geologico di Coldigioco, aveva iniziato indipendentemente una ricerca sui solfobatteri di Frasassi con l'aiuto del suo folto gruppo di studenti ricercatori e con la collaborazione di Sandro Mariani e dello stesso Galdenzi. La Macalady allestì un laboratorio di geo-microbiologia in una stanza della sua casa nel piccolo borgo di Coldigioco dove poter effettuare *in situ* la preparazione dei campioni prelevati in grotta e le analisi microbiologiche e chimiche preliminari. Il complesso lavoro di identificazione genetica delle biomasse batteriche delle grotte di Frasassi fu pubblicato nella rivista specialistica *Applied and Environmental Microbiology* nell'agosto del 2006 (Macalady et al., 2006).

All'inizio della ricerca, quando ancora si cercavano spiegazioni circa le anguille, era stato contattato il prof. Richard Borowsky, zoologo dell'Istituto di Biospeleologia dell'Università di New York e specialista in pesci troglobiti. Pur confermando su base prettamente morfologica l'appartenenza alla specie *anguilla*, una sua analisi preliminare del DNA dei resti subfossili di Frasassi diede esito negativo probabilmente a causa dello

scarso stato di conservazione della materia organica. Ma per un caso del tutto fortuito venne fuori che sua moglie, dr.ssa Betty Borowsky, insegnante di biologia al Nassau Community College di Garden City (New York) era una specialista di anfipodi. Sicché la Borowsky fu invitata a collaborare con il nostro gruppo di ricerca e iniziò subito, già nell'estate del 2005, le sue osservazioni circa il comportamento e la fisiologia del *Niphargus ictus* di Frasassi. Parallelamente, la Macalady con la sua assistente dr.ssa Sharmishtha Dattagupta, ora professoressa all'Università Georg August di Göttingen (Germania), intrapresero un'indagine sulla genetica del *Niphargus* collaborando con un altro gruppo di ricerca coordinato dal dr. Sandro Galdenzi di Jesi. Questa ricerca congiunta, che è ancora in corso, ha come principale scopo quello di verificare l'omogeneità genotipica di questi anfipodi in diversi laghi freatici del complesso carsico di Frasassi.

All'inizio del **2006**, il dr. Montanari, durante un sabbatico all'Università di Berkeley in California, ebbe l'occasione di contattare la dr.ssa Dawn Peterson, una micropaleontologa nota per i suoi contributi scientifici alla conoscenza e alla classificazione degli ostracodi. La Peterson accettò con entusiasmo di collaborare nella ricerca e già da una visione preliminare di alcuni campioni che il Montanari si era portato con sé, si accorse che la fauna ostracode della grotta doveva essere complessa e diversificata. Nel frattempo, gli speleologi del GSF e del GSM proposero ed ottennero, in veste di Federazione Speleologica Marchigiana (FSM), un finanziamento dall'Assessorato Aree Protette, Protocollo di Kioto e Riqualificazione Urbana della Regione Marche per sviluppare un programma triennale di ricerca sulle faune acquatiche del complesso carsico di Frasassi. Sin da quel momento si pianificò un programma di esplorazione e campionamento sistematico in vari laghi della grotta, nonché nella Sorgente

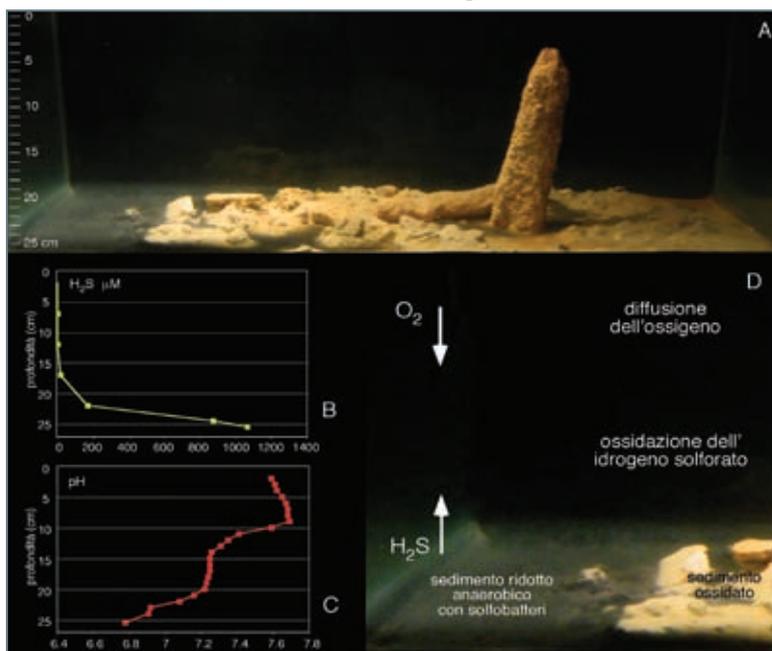
## 6

**FIGURA 6** - A) Veduta panoramica del mesocosmo da 100 litri di Coldigioco; B) profilo della concentrazione di idrogeno solforato e C) del pH e modello idrochimico del mesocosmo (profili chimici di D. Jones). Foto di A. Montanari.

Solfurea che sgorga sul Sentino in prossimità dell'ingresso della Grotta del Fiume. Fu allora contattato il dr. Marco Bodon, noto specialista di gasteropodi che anni addietro aveva individuato una nuova specie di microgasteropode, *Islamia* sp. 2, in un campione proveniente dalla Grotta Solfurea.

gira intorno ai 12,5 °C, dunque simile alla temperatura costante di 13,5 °C delle acque freatiche di Frasassi.

Una volta decantato il fango in sospensione (**figura 6A**), si è passati ad effettuare un'analisi chimica con una sonda elettronica per stabilire la concentrazione dell'idrogeno solforato ( $H_2S$ ) e il grado di acidità (pH) nella



All'inizio del **2007** fu allestito, in una vecchia cantina-grotta dell'Osservatorio Geologico di Coldigioco, un mesocosmo da 100 litri nel quale si è cercato di riprodurre al meglio le condizioni ambientali di un lago ipogeo sulfidico. Si è ottenuto ciò prelevando dell'acqua sulfidica, frammenti di roccia calcarea e alcuni chilogrammi di fango batterico dal Lago Verde, nonché una mezza dozzina di anfipodi adulti. Il mesocosmo avrebbe permesso l'osservazione dal vivo dei comportamenti della fisiologia del nostro *Niphargus ictus*, cosa alquanto difficile se non impossibile da fare nell'ambiente naturale della grotta. L'ambiente nella cantina-grotta è permanentemente e completamente buio e la temperatura varia da un minimo di 8 °C in febbraio, ad un massimo di 16 °C in luglio. Per la maggior parte dell'anno, la temperatura si ag-

cola d'acqua. Da questa analisi si è subito visto che l'acqua del mesocosmo si era stratificata, formando un orizzonte sulfidico sul fondo dell'acquario, spesso alcuni centimetri e leggermente acido (**figura 39B**). In pratica nel piccolo del mesocosmo si sono ricreate condizioni simili a quelle osservate e misurate nei laghi ipogei (**vedi figura 19 e 20C**). Il problema stava che con il tempo l'ossidazione dell'idrogeno solforato causata dalla diffusione dell'ossigeno proveniente dall'esterno portava ad un assottigliamento dell'orizzonte sulfidico e quindi alla eliminazione graduale di solfobatteri ossidanti che necessitano dell' $H_2S$  per il loro metabolismo chemiosintetico. Questo fenomeno si manifestava dapprima in aree leggermente più elevate del fondale che gradualmente si sbiancavano o addirittura si arrossavano per la formazione di ossidi di

ferro (vedi parte destra del mesocosmo in **figura 6A** in contrasto con la parte sinistra scura). Dunque, per non lasciare gli anfipodi senza cibo, è stato necessario cambiare periodicamente parte dell'acqua della vasca rimpiazzandola con acqua sulfidica fresca prelevata al Lago Verde, oppure aggiungendo alcuni grammi di solfuro di sodio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) che reagisce in acqua producendo idrogeno solforato, e/o aggiungendo alla vasca fango e filamenti batterici prelevati in grotta.

Nel frattempo, proseguirono i campionamenti di sedimento in vari specchi d'acqua della grotta per verificare la presenza di organismi stigmobionti. In questi campioni analizzati dalla dr.ssa Peterson vennero individuate le valve di decine di specie di ostracodi regolarmente accompagnate da gusci del microgasteropode *Islamia* sp. 2. Inizialmente solo al Lago Verde furono ritrovati alcuni rari esemplari vivi di ostracode, mentre nessun individuo vivo di microgasteropode fu allora riscontrato in nessuno dei laghi campionati nella Grotta del Fiume. I numerosi gusci dell'animale venivano trovati sempre vuoti. Infine, sia la dr.ssa Dattagupta che la dr.ssa Peterson riscontrarono, nei campioni di sedimento prelevati nei laghi della Grotta del Fiume, la presenza di piccoli vermi probabilmente appartenenti alla famiglia dei *Naidadae*. Allora la Dattagupta si rivolse ad un collega svedese, specialista dei vermi oligocheti, il prof. Christer Erséus, del Dipartimento di Zoologia dell'Università di Gothenburg, ed al suo più stretto collaboratore il prof. Tarmo Timm, titolare della Stazione di Limnologia dell'Università di Agraria di Tartumaa, in Estonia. Da un'analisi del DNA di campioni di vermi prelevati al Ramo Solfureo della Grotta del Fiume, l'Erséus scoprì che si trattava molto probabilmente di un verme del genere *Potamothrix* la cui specie doveva ancora essere determinata, ma che comunque non corrispondeva geneticamente a nessuna delle specie di naidadi da lui conosciute sot-

to il profilo genetico. Dunque, molto probabilmente il nostro *Potamothrix* rappresenta una nuova specie.

Nella prima settimana di gennaio del **2008** un felice evento allietò il mesocosmo di Coldigioco: una femmina di *Niphargus ictus* diede alla luce, o meglio al buio, sei piccoli anfipodi. Una seconda figliata di otto piccoli *Niphargus* avvenne poco dopo, all'inizio di febbraio. Nel frattempo il gruppo di ricerca della Pennsylvania State University effettuava nuove scoperte nel mondo degli organismi unicellulari della grotta (Macalady et al., 2008a). Ormai era chiaro che la diversità batterica delle acque sulfidiche di Frasassi era straordinariamente elevata e rappresentata da migliaia di specie. Intanto la Peterson a Berkeley riconosceva e documentava una ventina di diverse specie di ostracodi tra le quali due nuove specie mai viste prima ed esclusivamente endemiche di Frasassi.

All'inizio dell'anno il Montanari contattò la dr.ssa Antonietta La Terza, del laboratorio di Microbiologia Molecolare dell'Università di Camerino, dopo aver saputo che in collaborazione con il dr. Claudio Ortensi ed il dr. Federico Buonanno dell'Università di Macerata, aveva iniziato un'indagine sui protozoi del Lago Verde. Due diverse specie di protozoi ciliati erano già state individuate nelle acque sulfidiche del Lago Verde, aggiungendosi così al già ricco bestiario stigmobitico di Frasassi. Si pensò allora di organizzare un incontro informale all'Osservatorio Geologico di Coldigioco fra tutti i ricercatori coinvolti in questa ricerca. Lo scopo era quello di scambiarsi informazioni circa lo stato della ricerca individuale ma anche di spiegarsi, tra i vari colleghi interdisciplinari, i metodi e gli scopi delle loro indagini specialistiche. Il meeting ebbe luogo alla fine di giugno con il nome di "Biospeleo Pow-wow" e la maggior parte dei ricercatori e collaboratori vi parteciparono. La dr.ssa Borowsky, con il marito Richard e con una sua studentessa laureanda, Minda Gowarty,

ebbe l'occasione di osservare, per una decina di giorni, i comportamenti degli anfipodi nel mesocosmo allestito all'Osservatorio Geologico di Coldigioco. Fu organizzata una spedizione *ad hoc* al Lago Verde e al Pozzo dei Cristalli per catturare una quarantina di anfipodi che furono utilizzati per un complesso esperimento sul loro comportamento di interazione di coppia e per verificare la loro reazione alla luce. Nella cantina-grotta di Coldigioco fu allestito un laboratorio dove, in una ventina di capsule Petri da 120 mm, furono sistemati in ciascuna una coppia di anfipodi. Oltre ad aver potuto osservare dal vivo la muta del carapace in diversi individui, ed addirittura ad assistere alla nascita di altri piccoli anfipodi nel mesocosmo, la Borowsky fece un gran numero di prove cronometrate in ambiente controllato che dimostrarono che il nostro *Niphargus ictus*, nonostante sia completamente privo di occhi, reagisce se investito da un fascio luminoso.

All'inizio di luglio, fu organizzata una spedizione conoscitiva al Lago Claudia, nella parte più interna della Grotta Grande del Vento. Infatti il dr. Galdenzi durante il meeting ci informò che, anni addietro, aveva notato la presenza di microgasteropodi vivi in questo lago ipogeo. Furono prelevati dei campioni d'acqua e anche del sedimento utilizzando una piccola pompa idrovora provvista di filtro per la cattura di particelle e microorganismi che furono immediatamente analizzati al centro di Coldigioco. Questa verrà ricordata come la pesca miracolosa di tutto il programma di ricerca in quanto furono rinvenuti, in questi primi campioni di assaggio, tutti gli animali vivi fin ora identificati negli altri laghi della grotta, incluso un esemplare di verme piatto che solo una volta era stato riscontrato dalla dr.ssa Dattagupta in un campione proveniente dalla Grotta Solfurea. Oltre a questi già noti organismi, il Lago Claudia è risultato essere popolato da un nuovo gruppo di crostacei planctonici mai riscontrati prima nella grotta: i copepodii. Fu dunque allestito un nuovo

piccolo mesocosmo da 15 litri nella cantina-grotta di Coldigioco appositamente ideato per osservare direttamente dal vivo il comportamento di microrganismi che compongono la cosiddetta *meiofauna*, quali i protozoi, i copepodii, i gasteropodi, i vermi e gli ostracodi che altrimenti, essendo così minuti, si sarebbero persi nel mesocosmo da 100 litri.

Il **2009** segna il termine del programma di ricerca triennale della FSM supportato dal finanziamento della Regione Marche. Non che i ricercatori abbiano abbandonato all'improvviso i loro studi ed investigazioni specialistiche sulla biologia stigobitica di Frasassi. Al contrario, ricerche specifiche sui vari gruppi di organismi si sono intensificate durante quest'anno ed hanno portato a nuove scoperte. Jan Bauermeister e Jean-Francois Flot, ricercatori all'Università di Göttingen, definirono su basi genetiche che nelle grotte di Frasassi sono presenti, oltre al *Niphargus ictus*, altre tre specie diverse di anfipodi, apparentemente nuove ed endemiche di queste grotte. La stessa conclusione venne raggiunta, su basi biologiche, da Betty Borowsky in collaborazione con lo specialista zoologo prof. Gordjan Karaman dell'Accademia delle Scienze del Montenegro, lo stesso che nel 1985 definì la specie *Niphargus ictus*. Intanto i ricercatori del gruppo di Camerino confermarono la presenza di protozoi ciliati in altri laghi della grotta appartenenti ad almeno sei diverse specie, tutte ancora da definire su base genetica. Grazie alla collaborazione della dr.ssa Diana Galassi, della sua assistente dr.ssa Barbara Fiasca e della studentessa Debora De Michele del Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università dell'Aquila, tutte specialiste in copepodii stigobi, venne determinato che questi piccoli crostacei popolano praticamente tutti gli specchi d'acqua freatica del complesso carsico di Frasassi comprendendo numerose nuove specie endemiche ancora da definire.

Come previsto dal programma della FSM, a settembre fu organizza-

to un convegno all'Hotel Frasassi di Genga dove, grazie al supporto della Regione Marche e della Cassa di Risparmio di Fabriano e Cupramontana, furono convocati una trentina di ricercatori interdisciplinari che presentarono i risultati preliminari delle loro ricerche, svolte nell'ambito dei vari rami specialistici, sull'incredibile ecosistema stigobitico delle grotte.

In sintesi, questi anni di ricerche interdisciplinari sui vari aspetti biologici ed eco-ambientali del mondo sotterraneo di Frasassi hanno portato alla luce un ecosistema stigobitico incredibilmente ricco e differenziato, con specie uniche che nel corso di millenni si sono adattate e specializzate in questo che potremmo definire una Galapagos sotterranea unica al mondo. I risultati di queste ricerche sono in via di pubblicazione in riviste scientifiche specializzate internazionali difficilmente accessibili al pubblico. Si è quindi ritenuto opportuno illustrare, in chiave divulgativa, le meraviglie di questo mondo biotico sotterraneo in questo libretto.

# Introduzione

---



### Inquadramento geologico

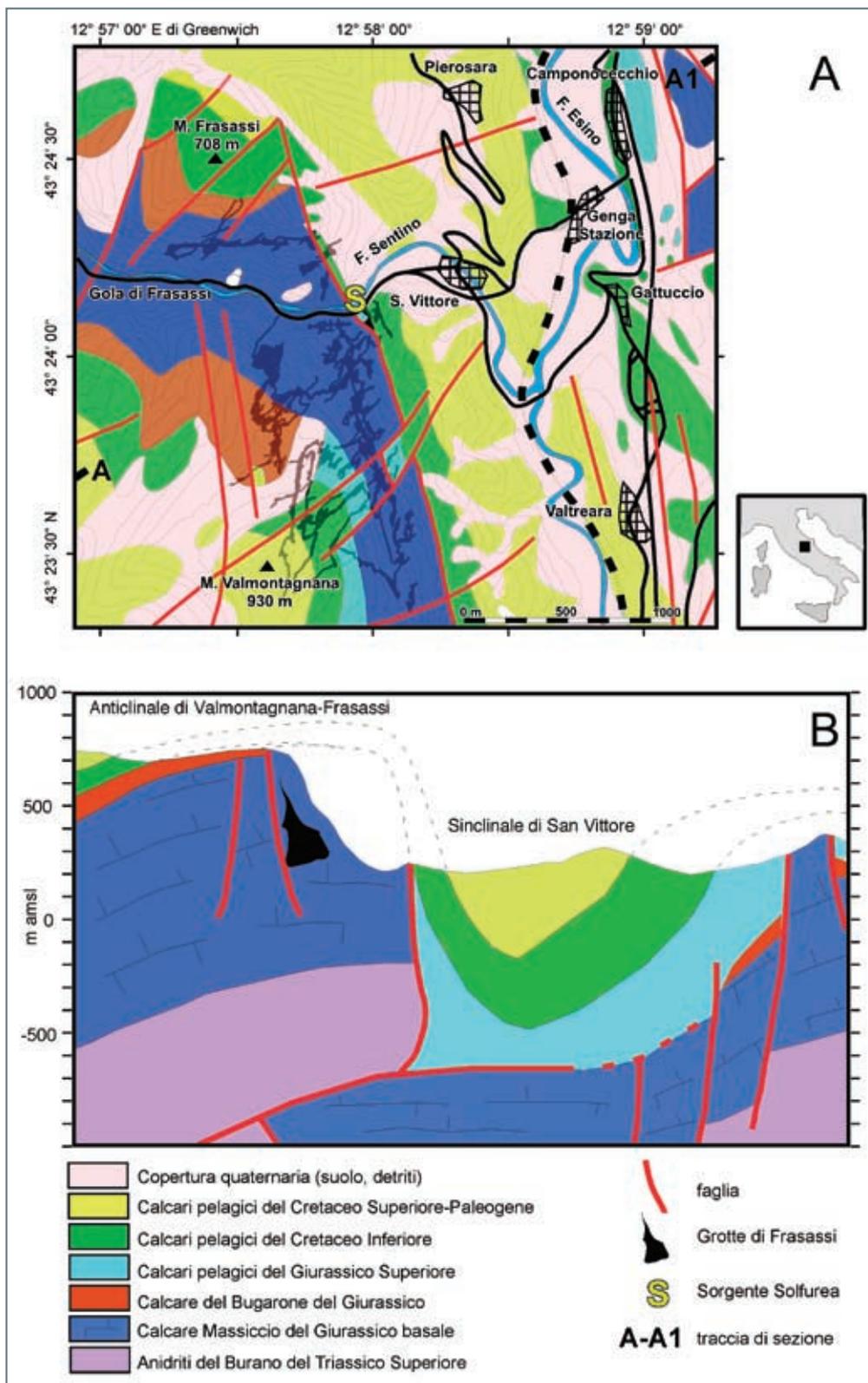
Il complesso carsico di Frasassi si sviluppa all'interno dell'anticlinale di Monte Valmontagnana-Monte Frasassi con un labirinto di passaggi lungo circa 25 chilometri. Per anticlinale s'intende una piega tettonica delle formazioni rocciose stratificate che costituiscono la parte superficiale della crosta terrestre dove al nucleo della piega si trovano gli strati più antichi mentre all'esterno quelli di formazioni più recenti (**figura 7A, B**). Questa piega anticlinale, avente un'asse con direzione nordovest-suddest (caratteristica direzione tettonica appenninica), presenta dunque strati inclinati in senso opposto rispetto all'asse, ovvero verso nordest sul versante orientale e verso sudovest sul versante occidentale (**vedi figura 7B**). Il nucleo dell'anticlinale è costituito dalla Formazione del Calcarea Massiccio, un calcarea compatto, bianco, molto puro in quanto essenzialmente fatto di carbonato di calcio (ovvero di calcite con formula  $\text{CaCO}_3$ ) che si è formato nel Giurassico Inferiore (tra circa 200 e 196 milioni di anni fa) in un ambiente di mare molto basso paragonabile, ad esempio, agli odierni banchi corallini e alle piattaforme carbonatiche delle Bahamas e della Florida. Il Calcarea Massiccio poggia sulla Formazione delle Anidriti del Burano, del Triassico Superiore, spesso fino a due chilometri e costituita da un'alternanza di strati calcarei, marne, calcari bituminosi (ovvero ricchi di sostanza organica e idrocarburi) e anidrite, un minerale di solfato di calcio ( $\text{CaSO}_4$ ) simile per composizione al gesso ma privo di acqua. Queste rocce sedimentarie si sono depositate tra 203 e 200 milioni di anni fa circa in un bacino di mare molto basso dove la forte evaporazione ha causato la precipitazione di sali minerali tra cui, appunto, l'anidrite. Le Anidriti del Burano non affiorano nella zona di Frasassi ma, come vedremo in seguito, hanno avuto ed hanno tuttora un ruolo essenziale nel processo di carsificazione del sovrastante Calcarea Massiccio

e la conseguente formazione delle Grotte di Frasassi.

Al Calcarea Massiccio fa seguito una successione ben stratificata di formazioni policrome costituite da calcari più o meno puri, a volte contenenti noduli e strati di selce, e marne (rocce calcaree con una certa componente argillosa), sedimenti questi che si sono formati in seguito al lento accumulo, in un ambiente di mare profondo, di gusci e scheletri di microrganismi planctonici. Questa successione sedimentaria, che rappresenta un arco di tempo deposizionale che va dai 196 ai 40 milioni di anni fa circa, affiora in cima al Monte Valmontagnana e al Monte Frasassi, nonché sui fianchi dell'anticlinale.

Sugeriamo ai lettori e alle lettrici che ne fossero interessati di consultare le pubblicazioni divulgative del Parco Naturale della Gola della Rossa e di Frasassi (2000), di Montanari et al. (2002) e di Galdenzi (2004a) per avere una descrizione più dettagliata della geologia e dell'evoluzione sedimentaria e tettonica dell'area di Frasassi. Per ciò che riguarda invece il soggetto specifico delle grotte, consigliamo la lettura di Galdenzi (2004b), che include una serie di articoli tecnici di vari autori sugli aspetti della speleogenesi e delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del complesso carsico di Frasassi. Perseguendo il tema della presente pubblicazione, ci premuriamo comunque di dare una breve spiegazione di come si sia formato l'ambiente ipogeo di Frasassi che ospita un così complesso e diversificato ecosistema stigobitico.

L'evoluzione carsica di Frasassi è strettamente legata all'evoluzione tettonica e morfologica degli ultimi tre milioni di anni di storia geologica appenninica. Il processo di deformazione tettonica della successione sedimentaria dell'Appennino umbromarchigiano iniziò nel tardo Miocene, ovvero intorno ai cinque milioni di anni fa, quando, in risposta ad un regime tettonico compressivo, la parte superiore della crosta terrestre iniziò a fagliersi e corrugarsi forman-



do grandi pieghe anticlinaliche e sinclinaliche. Il processo deformativo fu accompagnato da un generale sollevamento tettonico regionale che, alla fine, condusse all'emersione dei sedimenti marini stratificati che si erano accumulati nei 200 milioni di anni precedenti ed erano ormai compattati e cementati in formazioni rocciose stratificate. Col procedere di questa emersione, le formazioni rocciose venivano sottoposte a processi di alterazione e di erosione da parte degli agenti atmosferici e si vennero così a formare le prime valli fluviali ed i primi rilievi montuosi.

Le formazioni che per prime vennero attaccate e modellate dalla erosione furono ovviamente quelle più giovani, ovvero le ultime ad essersi formate nel lungo processo di accumulo della successione sedimentaria. Man mano che il sollevamento procedeva, le valli fluviali si allargavano e si approfondivano fino a che l'erosione fluviale raggiunse le rocce più antiche, di età giurassica, costituite da calcari piuttosto duri e resistenti. A questo punto si vennero a formare le prime gole, strette e via via più profonde, data l'impossibilità per i fiumi di cambiare il loro corso in già ben definite valli fluviali. Fu così che circa due - tre milioni di anni fa, il letto del Fiume Sentino raggiunse la parte sommitale della formazione più antica della successione sedimentaria esposta, il Calcarea Massiccio, e cominciò ad incidere la Gola di Frasassi.

Come accennato sopra, il Calcarea Massiccio è costituito da carbonato di calcio praticamente puro, ed è quindi particolarmente soggetto a dissoluzione carsica ad opera di acque meteoriche. Queste, arricchendosi nell'atmosfera e nel suolo di anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) e formando quindi acido carbonico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), percolano nella massa calcarea attraverso fessurazioni della roccia (faglie e fratture) e la disciolgono formando cavità carsiche. In gergo speleogeologico, questo processo di formazione di cavità carsiche viene chiamato *epigenico* in quanto avviene per dissoluzione da

parte di acque aggressive provenienti dall'alto e che hanno quindi un effetto importante nella parte più superficiale della massa calcarea. Man mano che le fessurazioni si allargano in seguito alla dissoluzione del calcare, le acque di infiltrazione, dette *vadose*, si arricchiscono del carbonato di calcio disciolto e lo riprecipitano nelle cavità carsiche precedentemente formate sotto forma di concrezioni calcaree dette *speleotemi* (le stalagmiti e le stalattiti).

Con il progredire del sollevamento tettonico e del conseguente approfondimento della Gola di Frasassi, iniziò, all'interno del massiccio calcareo, un nuovo processo di dissoluzione non più epigenico ma *ipogenico*. Successe che una falda acquifera profonda formatasi nelle Anidriti del Burano e contenente idrogeno solforato ( $\text{H}_2\text{S}$ ) fu raggiunta dalla falda acquifera carbonatica che, per via dell'approfondimento della gola, si era nel frattempo abbassata. Praticamente la falda sulfidica raggiunse il cosiddetto *livello piezometrico*, corrispondente alla quota di flusso del Fiume Sentino. Il miscelamento delle due diverse acque ed in particolare il contatto dell'acqua sulfidica con l'ossigeno dell'atmosfera della grotta, porta alla formazione di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), un agente molto più aggressivo dell'acido carbonico e quindi molto più efficiente nel dissolvere il calcare. Stando alle dimensioni delle caverne e alla presenza di depositi residui di gesso microcristallino prodotto dalla reazione in ambiente subaereo dei vapori d'idrogeno solforato con il calcare, sembra che questo processo ipogenico sia iniziato quando il livello piezometrico aveva raggiunto la quota della grotta del Buco Cattivo, il cui ingresso è oggi ubicato a circa 200 metri sopra l'attuale livello piezometrico. In termini di tempo, considerando una velocità media di sollevamento tettonico di circa 0,2-0,3 millimetri all'anno, il carsismo sulfidico a Frasassi sarebbe iniziato tra i settecento mila e un milione di anni fa. Con il carsismo ipogenico sulfidico

**FIGURA 7 -** A) Carta geologica semplificata e B) profilo strutturale dell'area di Frasassi. Da Mariani et al., 2007.

s'instaurò, nei laghi freatici di Frasassi, l'ecosistema stigobionte che ci accingiamo a descrivere. Occorre però dare prima una breve spiegazione di come il carsismo sulfidico si relaziona, in termini biochimici, con lo sviluppo di un ecosistema chemiosintetico e autotrofo.

### Carsismo ipogenico sulfidico ed ecosistema autotrofo

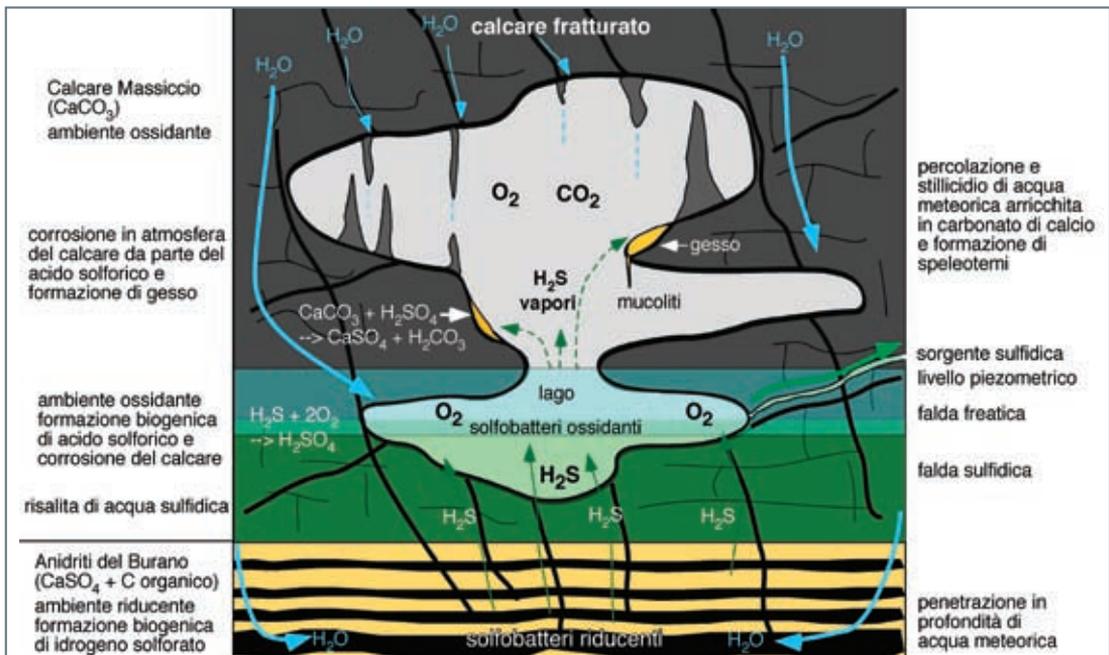
Acque di origine meteorica scese in profondità attraverso fratture e faglie delle formazioni rocciose superficiali entrano in contatto con le rocce della Formazione delle Anidriti del Burano, in un ambiente interstiziale privo di ossigeno. La presenza di solfato di calcio (l'anidrite descritta sopra) e delle marne bituminose ricche di carbonio organico fossile che costituiscono questa formazione, rappresentano i presupposti per una reazione di riduzione da parte di batteri anaerobici che vivono in questo ambiente interstiziale profondo. Si viene così a formare l'idrogeno solforato ( $H_2S$ ) che, sciolto nell'acqua, risale per un effetto artesiano lungo fratture associate ad una grossa faglia che taglia l'anticlinale di Frasassi sul suo lato

orientale, praticamente all'uscita della Gola di Frasassi. È proprio in questo luogo, all'intersezione tra la faglia ed il letto del Fiume Sentino, che la risalita di idrogeno solforato si manifesta con alcune sorgenti cosiddette solfuree (vedi figura 7A, B). L'azione batterica in questa reazione di riduzione del solfato di calcio è necessaria in quanto l' $H_2S$  non può formarsi inorganicamente a temperature inferiori ai 200 °C, mentre la temperatura delle acque sulfidiche a Frasassi sono decisamente fredde aventi esse una temperatura costante di circa 13,5 °C.

All'interno del massiccio calcareo di Frasassi, l'acqua sulfidica forma una falda ipogea che raggiunge il livello piezometrico entrando in contatto con l'acqua carbonatica e ben ossigenata della falda freatica (vedi modello grafico in figura 8).

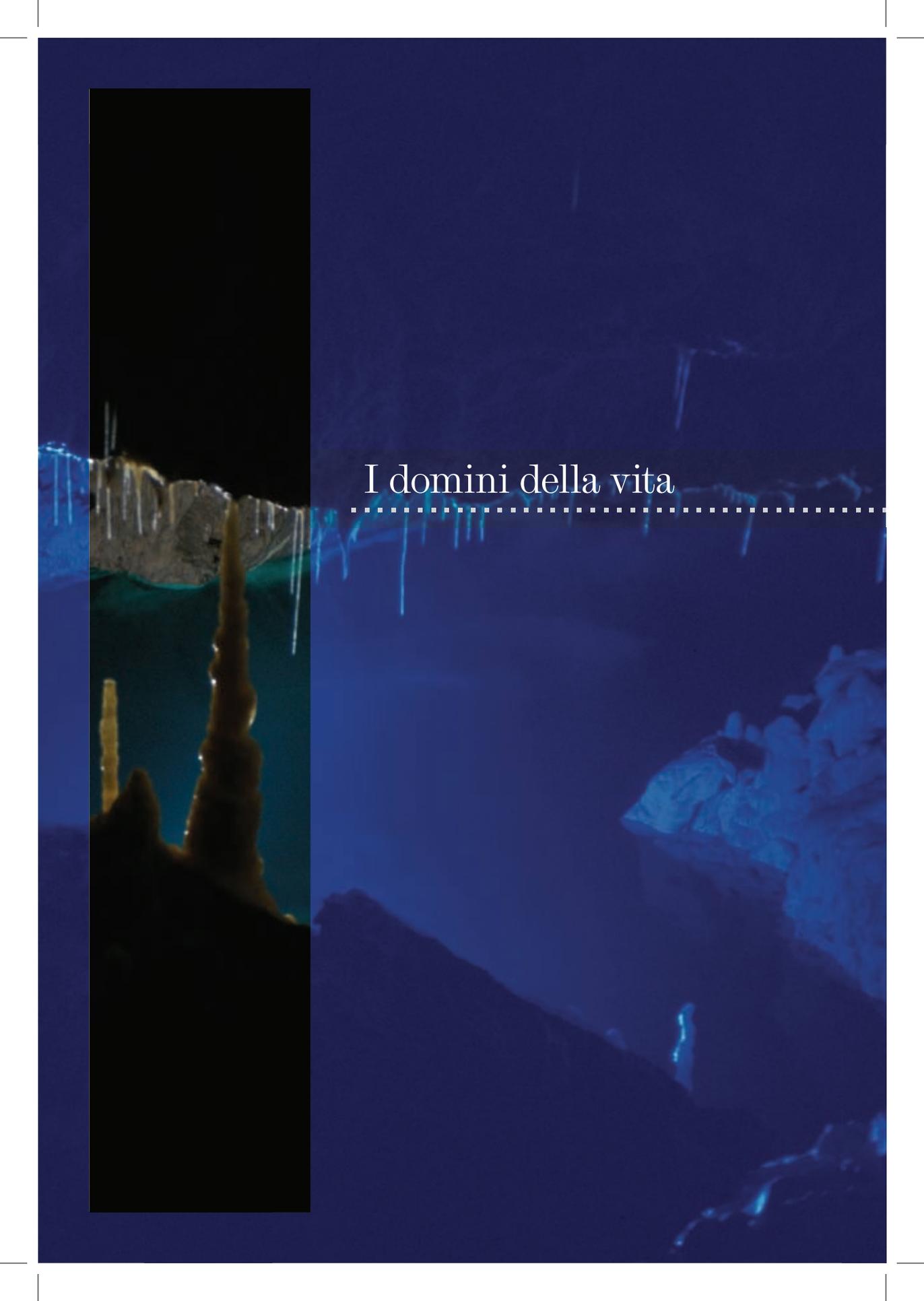
A questo punto l' $H_2S$  interagisce con l'ossigeno creando le condizioni ideali a solfobatteri ossidanti per accelerare la reazione di ossidazione liberando  $H^+$  e formando acido solforico ( $H_2S + 2 O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ = H_2SO_4$ ). La continua produzione di acido solforico nella falda freatica, che sarebbe estremamente limitata se non fosse per l'azione dei solfobat-

FIGURA 8 - Modello schematico del sistema idrochimico delle grotte di Frasassi. Sugerito da G. Druschel.



teri, causa la dissoluzione del calcare e la precipitazione di gesso ( $\text{CaSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ). Il gesso però è solubile in acqua ed è quindi evacuato dal sistema idrico della grotta con il lento ma continuo ricambio vadoso. In alcuni casi, l'idrogeno solforato esala dalla superficie della falda acquifera e si disperde nell'atmosfera della grotta. Questa esalazione sulfidica causa la corrosione delle volte rocciose della grotta con la conseguente formazione di depositi di gesso microcristallino e la crescita di biofilm mucilluginosi penduli (le mucoliti) estremamente acidi (pH 0-0,5 - vedi Galdenzi e Maruoka, 2003 e Macalady et al., 2007).

In conclusione, il complesso ipogeo di Frasassi è il risultato di carsismo sulfidico ipogenico nel quale solfobatteri ossidanti hanno, da centinaia di migliaia di anni a questa parte, un ruolo primario nella intensa corrosione del Calcare Massiccio (Galdenzi et al., 1999, 2008; Macalady et al., 2006, 2008). In pratica, l'origine delle grotte di Frasassi è dovuta ad un processo biologico e non tanto a un puro fenomeno inorganico di dissoluzione chimica del calcare. La continua ed abbondante produzione di materiale organico da parte dei batteri chemioautotrofi, ovvero organismi che sono capaci di sintetizzare il loro cibo da sostanze inorganiche usando energia chimica (nel nostro caso l'ossidazione dell' $\text{H}_2\text{S}$ ), costituisce la base di un complesso e diversificato ecosistema stigobitico nel quale organismi superiori si sono adattati a vivere senza dover dipendere dalla fotosintesi.



I domini della vita

---

### Tassonomia e filogenesi

Per meglio apprezzare la diversità biologica e la complessità ecologica delle grotte di Frasassi, vogliamo introdurre e spiegare, nel più semplice modo possibile, i principi fondamentali della suddivisione e della classificazione degli organismi viventi.

Fin dai tempi dell'antichità, i biologi si sono impegnati a classificare gli organismi ordinandoli in gruppi nei quali differenti specie hanno caratteristiche comuni o delle assomiglianze tra loro (piante, animali, mammiferi, rettili, uccelli, erbivori, carnivori, ecc.). Inizialmente, lo scopo principale era quello di una facile e diretta identificazione di organismi mai studiati prima che, man mano, si aggiungevano al sempre crescente numero di forme di vita conosciute nel nostro pianeta. Lo svedese Carl Nilsson Linnaeus (1707-1778), *alias* Linneo, è considerato il padre della moderna classificazione scientifica degli organismi viventi. Il merito maggiore del Linneo fu la definizione e l'introduzione della nomenclatura binominale nel sistema di classificazione delle piante e degli animali.

La portata dell'innovazione linneana fu enorme. Precedentemente il sistema di nomenclatura era semplicemente basato su un'estesa descrizione e distinzione di ogni pianta o animale, sulla base dei caratteri diagnostici ritenuti rilevanti, in modo del tutto arbitrario, da ogni classificatore.

Con il metodo linneano a ciascun organismo sono attribuiti due nomi (in latino e scritti in corsivo): il primo si riferisce al *genere* di appartenenza dell'organismo stesso ed è uguale per tutte le *specie* che condividono alcuni caratteri principali; il secondo termine, che è spesso descrittivo, designa la specie propriamente detta, ed è seguito dal nome del classificatore che l'ha definita con la data della pubblicazione di tale definizione. Gli individui di ogni specie hanno la capacità di riprodursi trasferendo il proprio patrimonio genetico alle nuove generazioni di individui della stessa specie. Nacque così il concetto di tassonomia (dal greco antico *taxis* = ordine, *arrangiamento*, e *nomos* = legge o scienza) con il quale si classificano gli organismi in ranghi gerarchici detti *taxon* (*taxa* al plurale).

Per dare un esempio di classificazione tassonomica prendiamo il caso del più volte citato *Niphargus ictus*, l'anfipode che popola i laghi ipogei di Frasassi.

Con il progredire degli studi biologici e l'invenzione di tecniche e di strumenti sempre più sofisticati, dai microscopi ottici capaci di mettere a fuoco ed ingrandire oggetti sempre più piccoli fino ai moderni microscopi a scansione elettronica, sono anche aumentate le capacità per meglio distinguere gli organismi l'uno dall'altro e classificarli in taxa diversi, sempre più definiti. Successe dunque che organismi una volta ritenuti appar-

TAXON	NOME	ETIMOLOGIA
Regno	Animalia	organismi animati
Phylum	Arthropoda	provvisi di appendici articolate
Classe	Malacostraca	rivestiti da una crosta molle
Ordine	Amphipoda	con corpo compresso lateralmente
Famiglia	Niphargidae	con zampe molto lunghe
Genere	<i>Niphargus</i>	nome del genere
Specie	<i>ictus</i> (Karaman 1985)	specie definita da G. Karaman nel 1985

**TABELLA 1** - Classificazione dei regni tassonomici.

tenenti allo stesso taxon, ora sono classificati in gruppi tassonomici diversi, e addirittura si è spesso verificata la necessità di inventare nuovi taxa e categorie, promuovendo o degradando un taxon da un rango gerarchico all'altro. Si creano così suddivisioni tassonomiche come il Subordine, il Superordine, l'Infraordine, il Parvordine oppure il Subphylum, il Superphylum, ecc. Ad esempio, se una volta il nostro *Niphargus* rientrava nella classe dei Crustacea, poi

già complesso schema tassonomico e nei criteri di classificazione biologica. La struttura stessa del DNA permette ora di risalire alla storia evolutiva di un organismo e definirne i rapporti di parentela con altri organismi, a prescindere dalle similitudini morfologiche o fisiologiche. Insomma, la classificazione di un organismo oggi viene fatta sulla base della *filogenesi*, ovvero sulla definizione di *cladi*, che sono come i rami di un albero ognuno rappresentante un taxon. Ciò ha

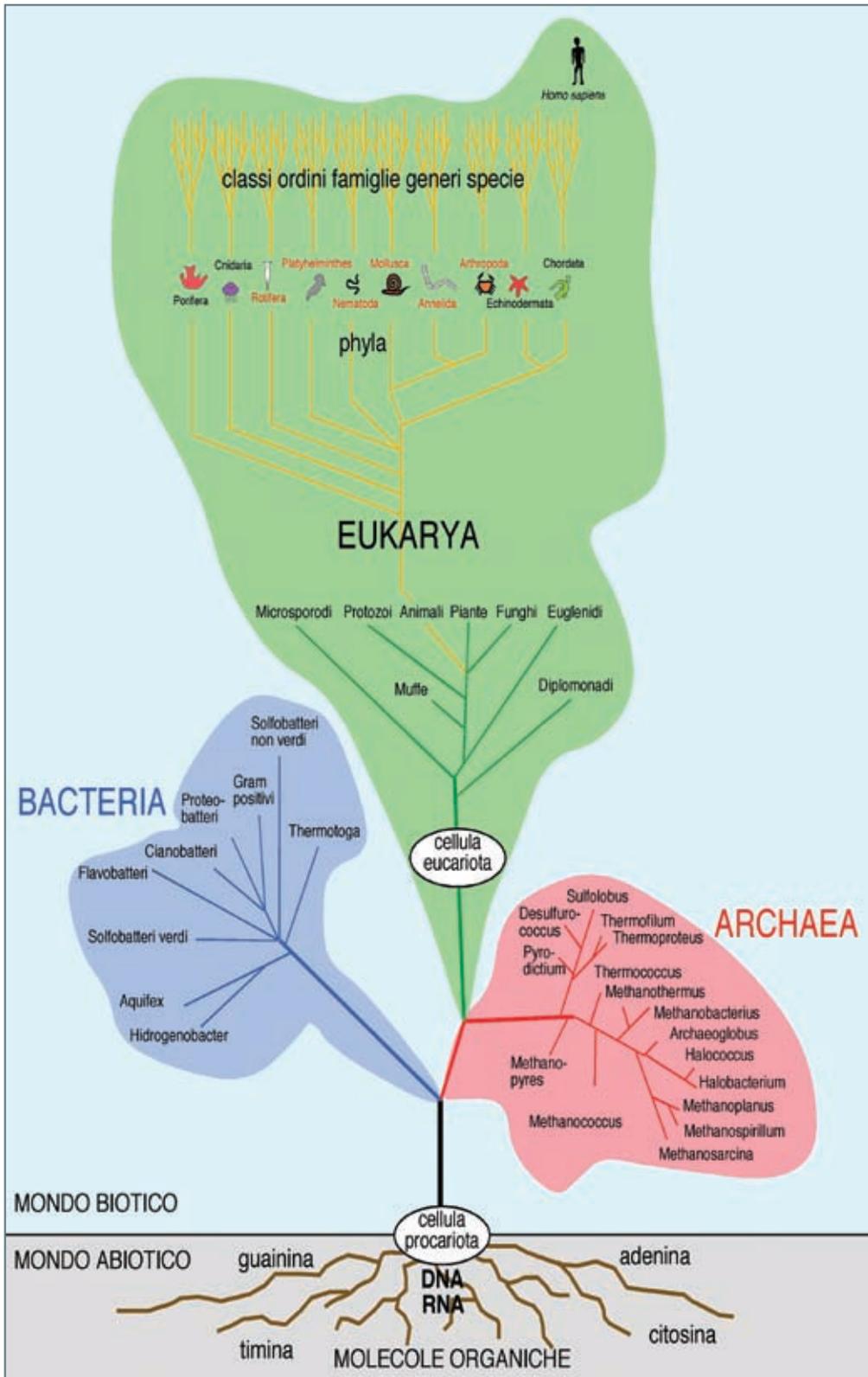
Tabella 1 - Classificazione dei regni tassonomici						
Linnaeus 1735 2 regni	Haeckel 1866 3 regni	Chatton 1937 2 imperi	Copeland 1956 4 regni	Whittaker 1969 5 regni	Woese et al. 1977 6 regni	Woese et al. 1990 3 domini
non trattato	Protista	Prokaryota	Monera	Monera	Eubacteria	Bacteria
					Archeobacteria	Archaea
Vegetabilia	Plantae	Eukaryota	Protista	Protista	Protista	Eukarya
				Fungi	Fungi	
Animalia	Animalia		Plantae	Plantae	Plantae	
			Animalia	Animalia	Animalia	

la stessa classe è stata "promossa" a Subphylum, mentre la classe per il nostro anfipodo è diventata quella dei Malacostraca. Questa tendenza di sempre crescente distinzione e suddivisione non risparmiò nemmeno il taxon gerarchicamente più elevato, il Regno. Ai tempi di Linneo, si riconoscevano solo due regni dei viventi: il regno delle piante (Vegetabilia) e quello degli animali (Animalia). Poi man mano che nuove specie, generi, famiglie, ordini, classi, e phyla aumentavano con la scoperta di nuovi organismi e con la migliore definizione morfologica e fisiologica per poterli distinguere e raggruppare sulla base delle loro similitudini biologiche, i regni dei viventi, in due secoli e mezzo di progresso scientifico, sono divenuti tre, poi quattro, poi cinque fino a raggiungere il numero di sei regni verso la fine degli anni '70 (**tabella 1**).

L'avvento della microbiologia molecolare e la codificazione del DNA ha portato, negli ultimi decenni, ad una revisione e ad un certo scompiglio nel

portato alla creazione di un nuovo e più alto rango tassonomico, il Dominio (**vedi tabella 1**), e per la fortuna degli studenti che devono ricordare tutte queste cose, per adesso i domini della vita sono solo tre: Bacteria (batteri), Archaea (archea) ed Eukarya (eucarioti). In **figura 9** vediamo come, dal ceppo iniziale della prima cellula procariota con le radici che affondano nel mondo molecolare abiotico, si dirama poi la filogenesi degli eucarioti e come da questo nuovo ramo dipartono poi i vari regni, phyla, classi, ordini, famiglie e generi, fino ad arrivare all'ultimo rametto in cima all'albero della vita: la specie (nel caso particolare la nostra, *Homo sapiens*, che in pratica è il frutto di quest'albero, il risultato ultimo dell'evoluzione partita da una cellula procariota tre miliardi e ottocentomila anni fa).

**FIGURA 9** - Modello cladistico schematico della filogenesi dei tre domini della vita: batteri, archa e eucarioti. I phyla di animali rappresentati nelle Grotte di Frasassi sono indicati in rosso. Il cladio della specie *Homo sapiens* diparte originariamente dalla cellula eucariota. Sintesi grafica di A. Montanari.



### Origine ed evoluzione delle cellule viventi

Un grande quesito, forse il più grande che l'uomo si sia mai posto, è quello sull'origine della vita. Nel mondo scientifico il quesito fondamentale sull'origine della vita si traduce nella ricerca del come e del quando, mentre nel mondo della fede religiosa il come ed il quando hanno poca importanza rispetto alla domanda ancor più crucciante del perché dell'esistenza delle cose. Pur non sottovalutando l'importanza del Mistero e della meditazione mistica, ci sentiamo obbligati a rimanere, umilmente, nel ristretto, seppur ben definito, campo scientifico per cercare di spiegare il come ed il quando dello straordinario ecosistema stigobitico di Frasassi.

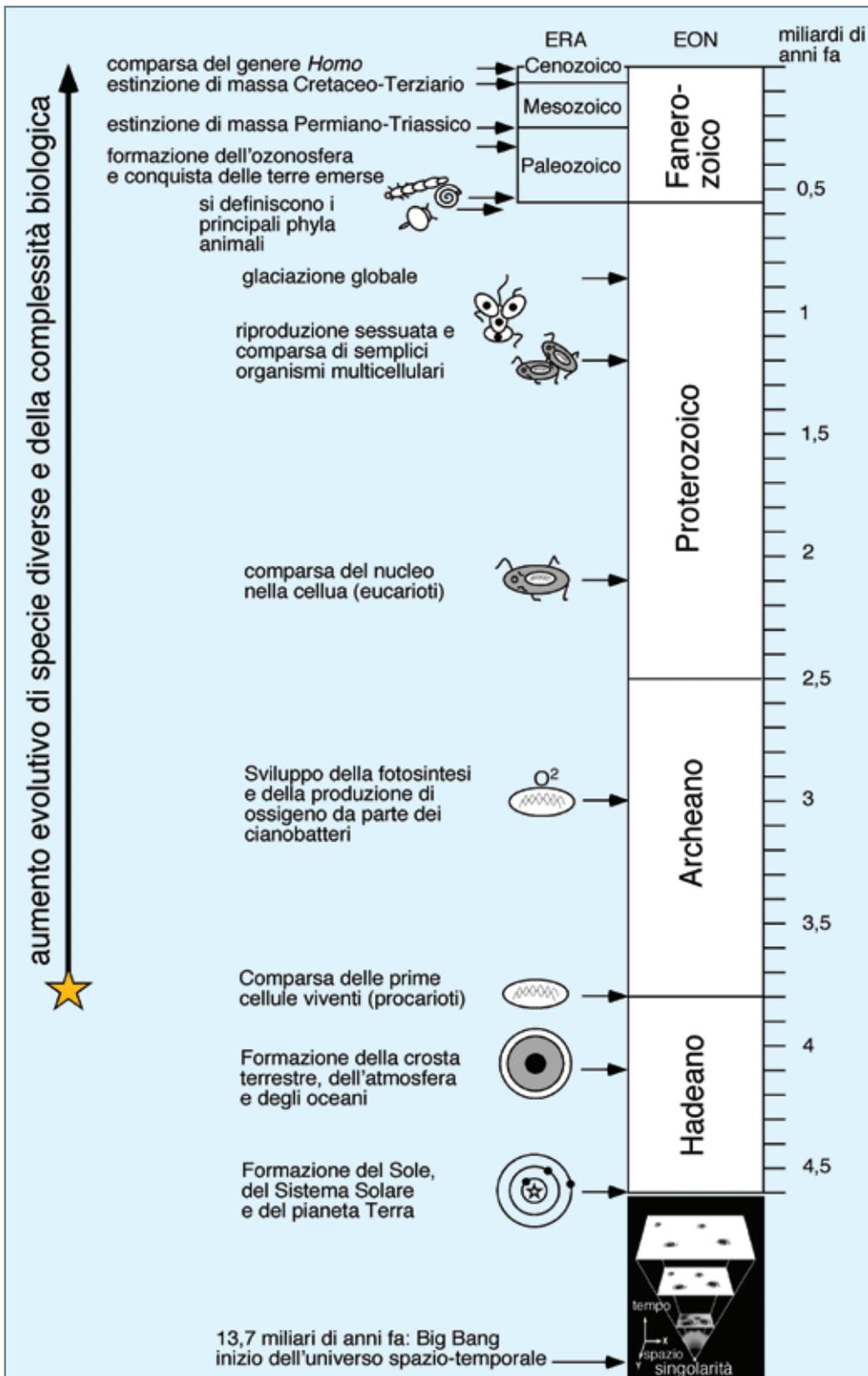
Con lo scopo di inquadrare nella scala tempo l'evoluzione della vita sul nostro pianeta ed i principali eventi che hanno scandito questa evoluzione, proponiamo un diagramma estremamente semplificato tratto dalla pagina web Wikipedia (2009) Timeline of Evolution (**figura 10**). Il pianeta Terra si è materializzato nei primi momenti dell'esplosione stellare che ha portato alla formazione del Sistema Solare, circa 4,6 miliardi di anni fa. Il nostro Sole è una stella relativamente giovane se si considera che, stando alla Teoria della Relatività, l'universo è iniziato circa 13,7 miliardi di anni fa con il Big Bang, allorché si sono definite le dimensioni del tempo e dello spazio. Dunque, non esisteva un "cosa" prima del Big Bang in quanto non esisteva ancora il tempo, e quindi non esisteva un "prima", né tanto meno esisteva un "dove" visto che lo spazio è venuto con il Big Bang. Il "tutto" è partito da un concetto detto "*singularità*". Dal momento del Big Bang ci sono voluti ben tre minuti per la materia subatomica appena nata (protoni, neutroni, elettroni) ad organizzarsi nei primi atomi di elio e di idrogeno, e da quel momento il processo di espansione e conseguente raffreddamento dell'universo si è espresso con la formazione di nuove entità materiali, di

nuovi atomi e aggregazioni, come le stelle e le galassie. E la vita quando è cominciata? Nessuno ha questa risposta in tasca ma qualcosa possiamo azzardare a dire circa l'origine della vita sul nostro pianeta Terra.

Nel primo miliardo di anni dalla aggregazione di materia solare che ha formato la Terra, le condizioni ambientali non erano idonee alla nascita e al sostenimento della vita, ovvero di organismi fatti di precarie molecole organiche capaci di riprodursi spontaneamente. Ci volle almeno mezzo miliardo di anni per raggiungere una temperatura della superficie terrestre sufficientemente bassa da poter permettere la formazione di una crosta solida, di masse oceaniche e di un'atmosfera seppur ancora infernale. La prima atmosfera terrestre era essenzialmente fatta di idrogeno e di elio, ma si è poi velocemente arricchita di altri gas in seguito alla degassazione vulcanica. Diventò così estremamente densa e composta da gas come il vapor d'acqua ( $H_2O$ ), l'anidride carbonica ( $CO_2$ ), l'azoto ( $N_2$ ), il cloro ( $Cl_2$ ), lo zolfo ( $S_2$ ), il monossido di carbonio (CO), l'anidride solforosa ( $SO_2$ ), l'ammoniaca ( $NH_3$ ) ed il metano ( $CH_4$ ). L'assenza di ossigeno libero rendeva questa atmosfera primordiale estremamente riducente. Eppure queste condizioni estreme potevano già aver permesso la formazione delle prime molecole organiche, come gli amminoacidi, gli idrocarburi e i nucleotidi i quali, accoppiandosi selettivamente, formano l'acido ribonucleico (RNA) in catene elicoidali semplici.

Da evidenze paleontologiche sembra che le prime semplici cellule viventi siano comparse circa 3,8 miliardi di anni fa, probabilmente da un processo di autoriproduzione dell'RNA che richiede l'utilizzo di energia libera, spazio vitale e l'aggregazione di altre molecole organiche (proteine, acidi nucleici) che formano vari tipi di organuli (ribosomi) ognuno con una sua propria funzione di scambio con l'ambiente, il tutto incapsulato in un involucro contenente il DNA. Il DNA, o acido desossiribonucleico, è una

**FIGURA 10** - Diagramma semplificato dell'evoluzione della vita nella scala del tempo geologico. Tratto da Wikipedia.



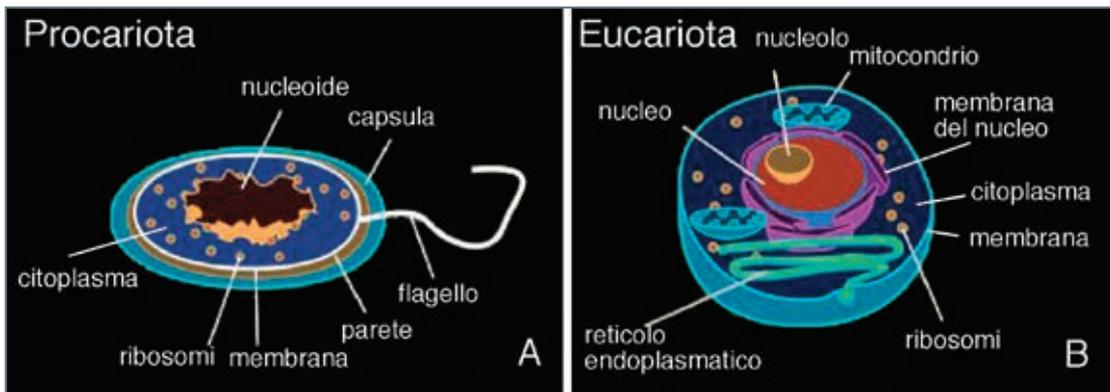
macromolecola composta da due polimeri di nucleotidi avvolti a formare una doppia elica. Si può dire che i nucleotidi rappresentano l'alfabeto della vita sulla Terra: infatti il corredo genetico delle cellule è espresso come una sequenza di nucleotidi. Tramite i nucleotidi, le due eliche del DNA sono unite fra loro grazie a deboli legami ad idrogeno. I nucleotidi contengono lo zucchero deossiribosio e le basi azotate adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). È a questo punto che è apparsa la prima cellula viva, molto probabilmente nelle acque oceaniche, capace di riprodursi e trasmettere alle nuove generazioni le proprie caratteristiche organiche, il suo DNA e le sue strategie biologiche per sfruttare le risorse energetiche e chimiche dell'ambiente.

I primi organismi viventi sono i procarioti (dal latino *pro* = avanti, prima, ed dal greco antico *karyon* = noce, nucleo) che includono i *batteri* e gli *archea*. I primi procarioti erano organismi unicellulari chemioautotrofi, parola che sta a significare la capacità di nutrirsi autonomamente utilizzando risorse chimiche fornite dall'ambiente, l'anidride carbonica come risorsa di carbonio e l'ossidazione di sostanze inorganiche come risorsa energetica. Originalmente si riteneva che gli *archea* fossero metanogenici ed esclusivamente *estremofili*, ovvero che vivono in ambienti estremi per le alte temperature, oppure iperacidi o iperbasi. Oggi invece si sa che gli *archea* vivono anche in svariati ambienti non-estremi, sia marini

che terrestri. La differenza tra *archea* e *batteri* risiede piuttosto in particolari dettagli nella loro costituzione del DNA tanto che rappresentano due domini separati. Ciò che li accomuna è comunque il fatto di essere unicellulari e che la loro cellula è priva di un nucleo vero e proprio (**figura 11A**).

Alcuni *batteri*, evolvendo in seguito ad accidentali cambiamenti molecolari, si differenziarono da altri per aver sviluppato la capacità di utilizzare la radiazione solare come fonte di energia che è alla base della fotosintesi. Dapprima i *batteri* non producevano ossigeno, ma poi, circa tre miliardi di anni fa, un nuovo gruppo, i cianobatteri, impararono ad usare l'acqua come agente riducente e la radiazione solare come fonte energetica generando ossigeno come prodotto di scarto. Da quel momento l'atmosfera terrestre cominciò ad arricchirsi di ossigeno, cosa che non fu gradita da molte altre specie di *batteri* che si estinsero, ma ciò stimolò ulteriormente l'evoluzione con una sempre crescente differenziazione di nuove specie. Bisognerà aspettare fino a 2,1 miliardi di anni fa per vedere succedere qualcosa di molto importante alla cellula dei procarioti che condizionò, irreversibilmente, l'evoluzione della vita sul nostro pianeta: la formazione del nucleo. Nascono così gli *eucarioti* (il dominio degli Eukarya, dal greco antico *eu* = vero, buono, e *karyon* = noce, nucleo) che nella loro cellula, oltre al DNA racchiuso in un nucleo protetto da una membrana di nuova invenzione, contengono orga-

**FIGURA 11** - A) Modello semplificato della cellula procariota e B) di quella eucariota. Tratto da Wikipedia.



nuli aventi funzioni sempre più specializzate e differenziate (**figura 11B**). Si ipotizza che gli eucarioti si siano evoluti in seguito ad un processo detto *fagocitosi*, ovvero un battere che si inghiotte (fagocita) un altro inglobandolo completamente in se stesso.

Fino a questo momento gli organismi si riproducevano tramite un semplice processo di scissione di loro stessi ma già da 1,2 miliardi di anni fa alcuni eucarioti avevano scoperto il sesso e la riproduzione sessuata (meno male!). Altri ancora cominciarono ad aggregarsi a formare nuovi organismi multicellulari e addirittura ad associarsi in colonie cellulari seppur di limitata complessità. Intanto le caratteristiche fisiche e la composizione chimica dell'atmosfera era cambiata proprio a causa della capacità di questi organismi primordiali di utilizzare l'ambiente a proprio vantaggio sfruttando l'energia chimica e la fotosintesi, e producendo ossigeno ed altri prodotti di scarto, tra cui la materia organica che, per alcuni organismi di nuova generazione, gli *eterotrofi*, costituiva una fonte di cibo (praticamente energia pre-confezionata).

La continua evoluzione delle forme di vita tendente alla differenziazione specifica, alle innovazioni strategiche e quindi alla produzione di nuovi organismi portò, a partire da 580 milioni di anni fa, ad una popolazione di organismi multicellulari sorprendentemente complessa e diversificata. La maggior parte dei regni e dei phyla moderni sono già ben rappresentati sotto forma di fossili in rocce sedimentarie formati tra i 580 ed i 500 milioni di anni fa. L'accumulo nell'atmosfera di ossigeno biogenico portò alla formazione dello strato di ozono che, bloccando la radiazione ultravioletta, permise la colonizzazione della terra ferma, sia da parte di invertebrati marini, sia di pesci primitivi che divennero anfibi, poi rettili ed infine mammiferi ed uccelli, sia da parte di alghe, che divennero piante pronte ad invadere le terre emerse, accompagnate dai primi funghi, probabilmente simbiotici.

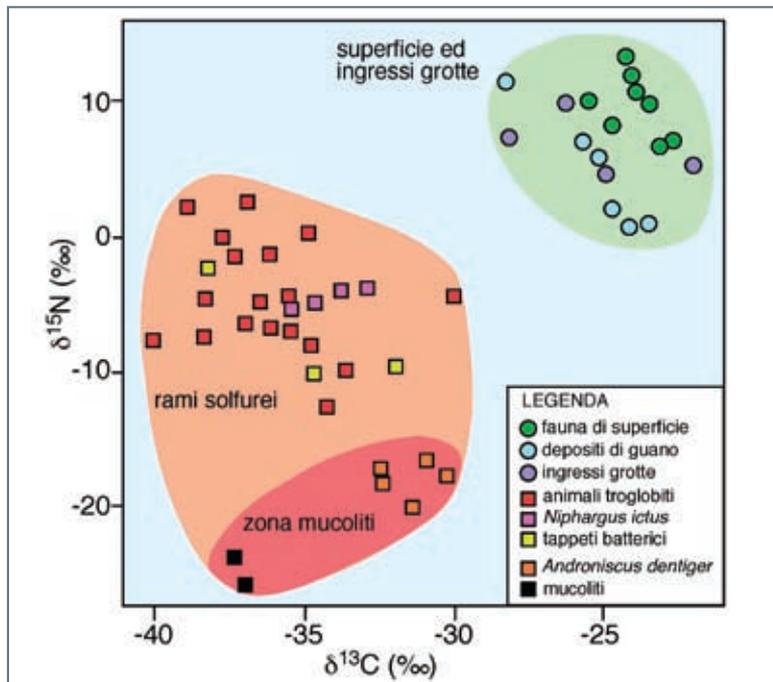
Gli ultimi 580 milioni di anni della storia della Terra, l'Eon del Fanerozoico, sono ampiamente documentati dalle rocce sedimentarie che hanno registrato tutte le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche degli ambienti e del clima in continua evoluzione. Nuove specie venivano alla luce mentre altre si estinguevano, spesso in massa in seguito a cambiamenti causati da occasionali impatti di oggetti extraterrestri (comete ed asteroidi), oppure da immani effusioni vulcaniche, nonché dal riarrangiamento delle placche litosferiche in continuo movimento spinte dalle forze endogene della tettonica globale. Le piante inventarono il fiore come strategia riproduttiva 130 milioni di anni fa, mentre la comparsa del genere *Homo* avvenne solo 2,3 milioni di anni fa (un duemillesimo della storia della Terra, l'ultimo seimillesimo del tempo dall'inizio dell'universo), e specie simili alla nostra comparvero probabilmente 200 mila anni fa. Noi tutti siamo degli eucarioti molto molto giovani.

### Frasassi: ambiente estremofilo, vivaio ancestrale

L'ambiente di grotta, qualsiasi grotta essa sia, non è di per sé un ambiente estremofilo. Tutto sommato in grotta ci si sta bene: c'è silenzio, c'è tanta pace, protezione totale da radiazioni solari nocive (gli UV), la temperatura è costante e mite, c'è acqua in abbondanza e, volendo, per chi si accontenta, c'è anche del cibo. Ciò che manca nella maniera più assoluta è la luce. Questo preclude la fotosintesi e quindi la vita per tutti quegli organismi che dipendono dall'irradiazione solare per espletare il loro metabolismo, ovvero i cianobatteri e le piante. Eppure nelle grotte vivono e si riproducono vari tipi di organismi, detti *troglobiti* (dal greco antico = che vivono in grotta), appartenenti a generi che normalmente si trovano all'esterno, nel nostro familiare mondo fotosintetico. Questi organismi si sono adattati a vivere in grotta grazie al cibo fornito da animali che usano l'ambiente sotterraneo solo come rifugio, come tana, per passare la notte oppure per trascorrere il letargo invernale e per questo detti *troglofili* (che

amano la grotta), come i pipistrelli, i roditori ed altri animali di vario genere, inclusi... gli speleologi. I pipistrelli, per esempio, si cibano all'esterno di insetti o di frutti ma poi finiscono col defecare in grotta formando cumuli di guano. Il guano viene poi attaccato dall'azione batterica ed i batteri, in questo caso, costituiscono il cibo organico per esseri viventi superiori, come vermi e insetti i quali, a loro volta, costituiscono il cibo per vertebrati troglobiti eterotrofi come lo *Speleomantes italicus*, un piccolo anfibio simile ad una salamandra, comune nelle Grotte di Frasassi e conosciuto con il nome generico di geotritone italiano.

Galdenzi e Sarbu (2000) hanno individuato, nelle Grotte di Frasassi, una quindicina di questi invertebrati endemici, tra cui anche due specie acquatiche, l'anfipode *Niphargus ictus* ed un piccolo gasteropode idrobiide originariamente classificato come *Islamia pusilla* ma che sembra appartenere ad una non ancora definita specie del genere *Islamia* e provvisoriamente indicata come *Islamia* sp. 2. Però molti di questi organismi, inclusi l'anfipode ed il piccolo gasteropode, hanno composizioni isotopiche



**FIGURA 12** - Composizione isotopica dell'azoto e del carbonio di organismi troglobiti rinvenuti nelle Grotte di Frasassi a confronto con quella di organismi rinvenuti fuori della grotta oppure in prossimità dei cumuli di guano. Da Sarbu et al., 2000.

dell'azoto e del carbonio anomale, ovvero che non corrispondono a quelle di organismi che crescono all'esterno della grotta o in prossimità del guano di pipistrello (**figura 12**). Questi animali biochimicamente diversi sono stati rinvenuti nelle zone sulfidiche della grotta, laddove la falda freatica è ricca di idrogeno solforato proveniente dalle Anidriti del Burano. In queste acque proliferano batteri chemioautotrofi che, come già si è detto, utilizzano il processo d'ossidazione dell'idrogeno solforato come fonte di energia per vivere e riprodursi. Va da sé che questo processo chemiosintetico porta ad una composizione isotopica della materia organica differente da quella degli organismi che dipendono dal processo fotosintetico. L'idrogeno solforato è un gas tossico, velenoso e irrespirabile per organismi che utilizzano l'ossigeno per carburare il loro metabolismo, ma permette una rilevante produzione di materia organica grazie ai solfobatteri chemiosintetici che, a loro volta, costituiscono il cibo per tutto un ecosistema estremofilo. In sintesi, l'ecosistema estremofilo delle grotte di Frasassi rappresenta una realtà biologica ancestrale dove la vita si sviluppa e si sostiene con le stesse modalità e strategie che abbiamo visto succedere miliardi di anni fa sul nostro pianeta.

Prima di addentrarci nel fantastico mondo stigobitico di Frasassi vogliamo esporre i risultati della ricerca di uno dei nostri collaboratori, Daniel Jones, che ha studiato in estremo dettaglio, come parte della sua tesi di laurea al Carleton College (Minnesota, U.S.A.), le mucoliti di Frasassi, quelle mucillagini pendule che si formano in seguito all'azione batterica laddove i vapori d'idrogeno solforato attaccano

le volte rocciose della grotta. Questo ci fa comprendere come la vita possa essersi sviluppata in un ambiente estremofilo a dir poco infernale, come quello che si poteva trovare all'alba della filogenesi terrestre.

### I tre domini della vita in una goccia di acido

Le mucoliti sono piccoli filamenti di materia gelatinosa che cola dalle pareti umide della grotta laddove esse sono attaccate da esalazioni di  $H_2S$  con una concentrazione di almeno 0,2 parti per milione (ppm). A guardarle da vicino fanno un po' di ribrezzo ricordando il classico filo di mucciolo che penzola dal naso del ragazzino raffreddato e privo di fazzoletto (parafrastrario non scientifico ma efficace nel dare l'idea della cosa). Le mucoliti a Frasassi furono scoperte da Galdenzi et al. (1999) che ne riconobbero l'origine batterica ed il ruolo che questi microorganismi hanno nel produrre acido solforico tramite l'ossidazione dell' $H_2S$ , dissolvendo il calcare e precipitando gesso (**figura 13 A-C**). L'estrazione del DNA da queste mucoliti e l'analisi delle sequenze genetiche del gene ribosomico 16S rRNA hanno poi consentito Vlesceanu et al. (2000) di rilevare la presenza di due diversi tipi di solfobatteri con forti affinità al genere *Thiobacillus*. L'acidità delle mucoliti originariamente misurata da Galdenzi et al. (1999) è estremamente forte, con un pH di 0-0,5, tanto da far supporre che solo solfobatteri estremofili potessero vivere in quell'ambiente così acido. Ma non era esattamente così.

Lo studio delle mucoliti a Frasassi fu portato avanti da Jones (2006) e poi da Macalady et al. (2007) i quali

**FIGURA 13** - Mucoliti fotografate *in situ* nella Grotta del Fiume: A) al Pozzo dei Cristalli le mucoliti colano da una crosta di gesso microcristallino, oppure B) da cristalli di gesso selenitico; C) al Ramo Sulfureo la crosta di gesso microcristallino contiene zolfo elementare. Foto di D. Jones.



applicarono le più sofisticate tecniche analitiche della microbiologia molecolare ed in particolare la tecnica detta di reazione polimerasi a catena (PCR) per definire, dal DNA estratto da un campione organico, una cosiddetta libreria, ovvero una sequenza di cloni, di copie del DNA. Questa tecnica è relativamente semplice e rapida (per un microbiologo molecolare, s'intende) ed è capace di riprodurre un gran numero di copie di molecole di DNA da piccolissime quantità di materiale organico, anche in casi di scarsa preservazione.

Per l'identificazione delle cellule procariote, si applica comunemente il clone 16S dell'RNA ribosomico (rRNA), che è una componente di una piccola sottounità ribosomica procariotica (30S).

Ogni cellula ha in sé, nelle sostanze organiche che la compongono, un codice diagnostico dato dalla struttura atomica e dall'arrangiamento strutturale delle proteine e dell'RNA (la sopracitata sequenza delle basi azotate dei nucleotidi ACGT). Una volta definito il codice genetico, si passa al confronto con le sequenze genetiche già catalogate nei database, le cosiddette librerie, e vengono così individuati i singoli soggetti sulla base delle somiglianze genetiche (vedi esempio in figura 14).

Un primo approccio nello studio di un campione organico consiste di

“fotografare” la situazione microbiologica del campione con la tecnica detta FISH (che sta per fluorescenza *in situ* per ibridazione). In parole povere, si tratta di aggiungere al campione dei marcatori, come ad esempio degli antibiotici, che attaccano selettivamente particolari proteine contenute nelle cellule. Batteri, archea ed eucarioti hanno caratteristiche proteiche diverse, alcune uniche per ciascun tipo di organismo, per cui questa marcatura, rilevabile con speciali microscopi a fluorescenza, permette di evidenziare, con diversi colori, le diverse proteine attaccate dai marcatori e quindi i diversi tipi di cellule, e addirittura di avere una stima della loro abbondanza relativa. Diamo un esempio mostrando l'immagine di un campione di mucolite prelevato nel Ramo Solfureo della Grotta del Fiume da Daniel Jones che rivela la presenza di cellule procariote (sia batteri che archea) ma anche di cellule eucariote che non sono state attaccate dal marcatore (figura 15). Insomma, i tre domini della vita racchiusi in una goccia di acido solforico con pH zero (figura 16).

Le cellule procariote appartengono a diversi gruppi di organismi che, grazie alla sequenziazione del DNA, sono stati confrontati con soggetti già conosciuti a livello generico (tabella 2). L'*Acidithiobacillus thiooxidans* è l'organismo più importante nelle mu-

**FIGURA 14** - Esempio di identificazione genomica per PCR (sequenza del gene 18S rRNA) del protozoo ciliato *Euplotes aediculatus* rinvenuto nel Lago Verde. Analisi di F. Buonanno e C. Ortensi, 2009.

```
gb|EU103618.1| Euplotes aediculatus strain Lahorensis 18S ribosomal RNA gene,
complete sequence
Length=1875

Score = 324 bits (175), Expect = 1e-85
Identities = 184/188 (97%), Gaps = 2/188 (1%)
Strand=Plus/Plus
```

Ceppo Frasassi	7	GATT-AGCCATGCATGCTCTAAGTATAAAGGATTATAAATAGAAACTGCAAATGGCTCATT	65
Ceppo Lahorensis	42	GATTAAAGCCATGCATGCTCTAAGTATAAAGGATTATAT-GAAACTGCAAATGGCTCATT	100
Ceppo Frasassi	66	CAAACAGTTATAGTTTATTTGATATTC AAGCTAATATTCTTATTAGTTAAATGGATAACC	125
Ceppo Lahorensis	101	CAAACAGTTATAGTTTATTTGATATTC AAGCTAATATTCTTATTAGTTAAATGGATAACC	160
Ceppo Frasassi	126	GTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGTTACGGGGAACCTTACCGGTCCCCAGCGTTTAT	185
Ceppo Lahorensis	161	GTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGTTACGGGGAACCTTACCGGACCCAGCGTTTAT	220
Ceppo Frasassi	186	TAGATTTA	193
Ceppo Lahorensis	221	TAGATTTA	228

Tabella 2 - Procarioti identificati nei mucoliti della Grotta del Fiume		
gruppo di appartenenza	specie	presunta fisiologia
<b>Bacteria</b>		
γ-proteobacteria	Acidithiobacillus sp	solfo-ossidante, autotrofico
Actinobacteria	Acidimicrobium sp.	solfo-ossidante?
Firmicutes	Firmicutes sp.	solfo ossidante
Linea TM6		sconosciuta
α-proteobacteria	Mitochondria	organuli
<b>Archaea</b>		
Thermoplasmata	Ferroplasma sp.	solfo/C organico-ossidante?
Thermoplasmata	'C-plasma'	solfo/C organico-ossidante?

Dal confronto con 177 cloni 16SrRNA di 3 diverse librerie (Macalady et al., 2007).

TABELLA 2 - Procarioti identificati nei mucoliti della Grotta del Fiume.

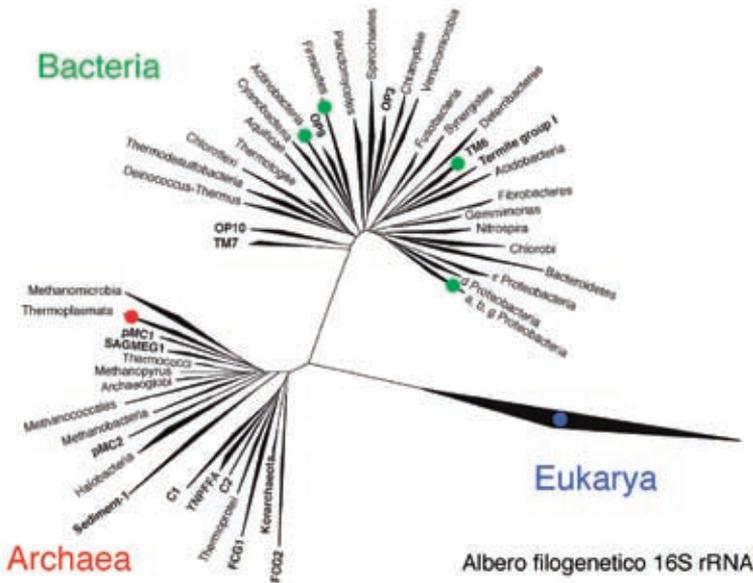


FIGURA 15 - Albero filogenetico dei microorganismi rinvenuti in un mucolite della Grotta del Fiume a seguito dell'analisi genomica PCR del gene 16S rRNA. Da Macalady et al., 2007.

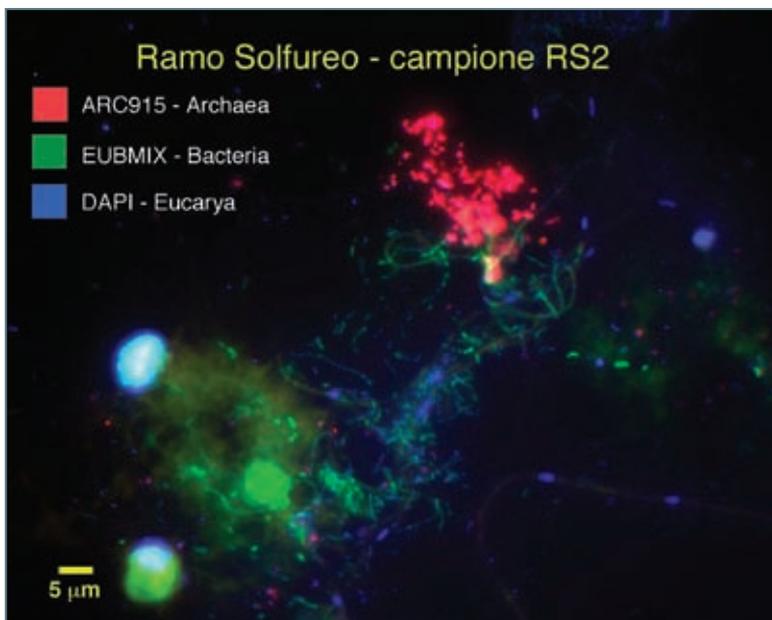
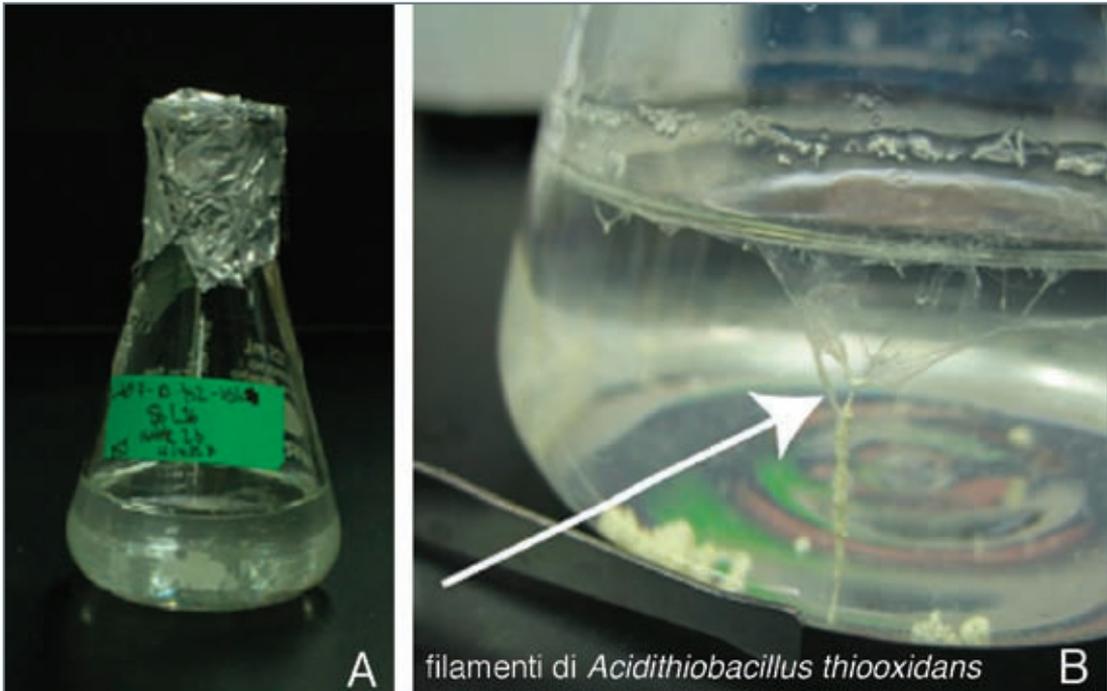


FIGURA 16 - Immagine microfotografica a fluorescenza FISH di un campione di mucolite del Ramo Solfureo mostrante l'associazione di cellule di archea (in rosso), di batteri (in verde) e di eucarioti (in blu). Da Macalady et al., 2007.

**FIGURA 17** - A) Coltura *in vitro* del battere estremofilo *Acidithiobacillus thiooxidans*, principale costituente delle mucoliti di Frasassi; B) particolare della morfologia della colonia batterica. Foto di D. Jones.

coliti ed è un battere autotrofo che utilizza l'ossidazione dell'idrogeno solforato come risorsa di energia ed il carbonio contenuto nell'atmosfera della grotta sotto forma di CO<sub>2</sub> per costruire la propria biomassa con anche una piccola aggiunta di azoto: un lavoro da cellula, si fa per dire, semplice ma redditizio. Questa specie si è riprodotta velocemente in coltura di laboratorio formando cospicui biofilm e dimostrando che è la principale responsabile della formazione delle mucoliti (**figura 17 A, B**). Al secondo posto per abbondanza nelle mucoliti di Frasassi ci sono gli archea della

famiglia dei Thermoplasmatales. Non si è ancora riusciti a crescere questi organismi in colture di laboratorio ma ciò nonostante le analisi filogenetiche e genomiche hanno indicato che essi sono eterotrofi, ovvero che si nutrono della biomassa prodotta dal solfobattere *A. thiooxidans*, praticamente cibo precotto, inscatolato e pronto all'uso. Sono stati individuati altri organismi meno abbondanti di procarioti del genere *Acidimicrobium* e forse di altri generi, nonché di eucarioti ancora da definire a livello generico. La ricerca è in corso.

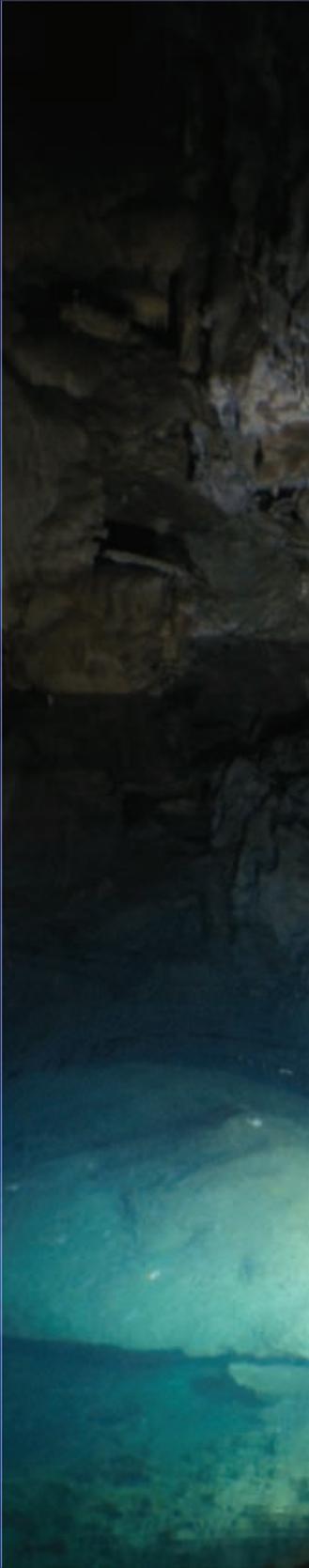


A

filamenti di *Acidithiobacillus thiooxidans*

B





# Sistematica degli Stigobionti di Frasassi

---

Passiamo ora alla descrizione delle varie forme di vita che abbiamo identificato nelle acque freatiche del complesso carsico di Frasassi. Procediamo con ordine partendo dalle forme più semplici, i Procarioti, fino a passare in rassegna quelle via via più complesse che comprendono vari gruppi tassonomici di Eucarioti come i protisti, i vermi, i rotiferi, i molluschi, per finire con i crostacei. Abbiamo visto con le mucoliti che alcuni tipi di solfobatteri chemiosintetici ed autotrofi costituiscono il cibo per archea ed eucarioti associati in questo ambiente subaereo estremofilo, e rappresentano quindi la base di una catena alimentare corta ed estremamente semplice. La domanda che ci si pone è se un simile sistema trofico possa esistere anche nell'ambiente stigobitico delle nostre grotte. Insomma, che succede nelle acque freatiche sulfidiche di Frasassi? Studi precedenti confermano senza dubbio che questo sistema trofico esiste e se la cavi abbastanza bene (Galdenzi & Sarbu, 2000; Sarbu et al. 2000). Ci resta dunque da descrivere come questo ambiente estremofilo, chemiosintetico ed autotrofo si sviluppa nelle viscere del massiccio di Frasassi.

### Procarioti

La storia delle anguille subfossili della Grotta del Fiume che abbiamo brevemente riassunto nella cronistoria della nostra ricerca ci aveva fatto capire che le acque freatiche devono contenere una cospicua biomassa sufficiente a mantenere in vita, per un certo periodo, questi voracissimi pesci. Manifestazioni evidenti di questa biomassa si ritrovano in numerosi siti

nella grotta, alla superficie di laghetti e rigagnoli dove l'acqua sulfidica proveniente dalle Anidriti del Burano esala idrogeno solforato dal caratteristico odoraccio di uova marce. In questi siti le colonie solfobatteriche formano filamenti mucilluginosi biancastri (**figura 18A**), oppure dei veri e propri tappeti batterici che galleggiano o ricoprono i fondali dei laghi freatici (**figura 18B**). Ricordano un po' la coltura batterica fatta in laboratorio da Daniel Jones che abbiamo mostrato nella **figura 17**, ed i filamenti batterici biancastri che si vedono ondeggiare con la corrente nel ruscello di acqua sulfidica che sgorga dalla Sorgente Solfurea sul Fiume Sentino (**figura 18C**).

Nei grandi laghi del ramo del New Mexico, nella parte più interna della Grotta del Fiume (vedi ubicazione nella mappa in **figura 2**), che possono raggiungere i dieci metri di profondità, non si notano manifestazioni sulfidiche in superficie. Eppure ovunque si vedono chiaramente interi branchi di anfipodi che nuotano nelle acque superficiali di questi laghi e ci si chiede di che cosa si cibino costoro visto che non si notano ammassi batterici. La risposta venne da un esperimento fatto al Lago delle Anguille da Mariani et al. (2007) i quali lasciarono in uno di questi laghi delle sonde fatte di dischi pre-pesati di marmo di Carrara (carbonato di calcio puro), dal diametro di circa 25 mm, attaccati ad intervalli di 10 cm lungo una sagola di nylon. La sagola fu fissata ad un chiodo conficcato sulla sponda rocciosa del lago e tenuta in tesa verticalmente nell'acqua da un peso legato alla fine della sonda. Una prima sonda fu recuperata dopo un anno dall'inizio dell'esperimento e i dischi

**FIGURA 18** - Sorgenti sulfidiche di Frasassi: A) Ramo Solfureo e B) Pozzo dei Cristalli nella Grotta del Fiume; C) Sorgente del Pescatore e Sorgente Solfurea sul Fiume Sentino. Si noti il colore biancastro dell'acqua che fuoriesce dalla Sorgente Solfurea dovuto ai filamenti batterici che qui si sviluppano. Foto di J. Macalady.

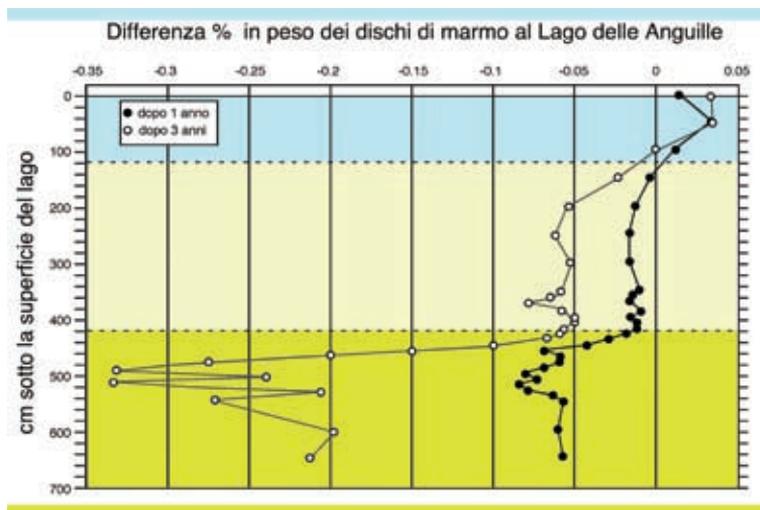


di marmo, dopo essere stati opportunamente asciugati con una lampada all'infrarosso, furono pesati uno ad uno con una bilancia di precisione. Il risultato di questo esperimento è stato che i dischi di marmo nel primo metro di acqua superficiale avevano

Si trattava ora di verificare, toccando con mano, la presenza di questa biomassa batterica nelle profondità della falda freatica.

Fu così organizzata nel 2004 un'esplorazione speleologica subacquea con la collaborazione di un

**FIGURA 19** - Profili di dissoluzione del carbonato di calcio nel Lago delle Anguille. Da Mariani et al., 2007.



guadagnato peso, ovvero si erano concrezionati di carbonato di calcio precipitato dall'acqua carbonatica vadosa. Al contrario, i dischi tra 1 e 4 metri sotto il livello della falda acquifera avevano perso un po' di peso, e quelli ancora più profondi fino a circa -7 metri avevano perso un'ancora più cospicua massa di carbonato.

A tre anni dall'inizio dell'esperimento la seconda sonda fu prelevata e i dischetti di marmo pesati con lo stesso procedimento eseguito in precedenza; le differenze di peso confermarono i risultati ottenuti dalla prima sonda (**figura 19**). Da ciò si dedusse che l'acqua di questi laghi è stratificata e al fondo c'è uno strato di acqua che aggredisce, ovvero scioglie, il carbonato di calcio. L'ipotesi più semplice era che l'acqua profonda fosse ricca di idrogeno solforato e che ciò avesse promosso la proliferazione di solfobatteri autotrofi ossidanti che a loro volta producono acido solforico, lo stesso che viene prodotto dal metabolismo dei batteri mucolitici. Questa scoperta portò alla quadratura del modello genetico delle grotte ipogeniche di Frasassi sintetizzato in **figura 8**.

sommizzatore specializzato il quale, munito di bombole e assicurato ad una sagola, fu assistito dagli speleologi dei gruppi CAI di Fabriano e di Ancona mentre si immergeva nel Lago Infinito. Ciò che il coraggioso speleosub scoprì là sotto ha dell'incredibile. Nelle profondità del lago si aprivano enormi caverne sommerse, riempite da un'intricata foresta di colonie batteriche ramificate, assomiglianti ad alberi alti fino a tre metri e con i rami protesi verso l'alto saldamente attaccati alla roccia.

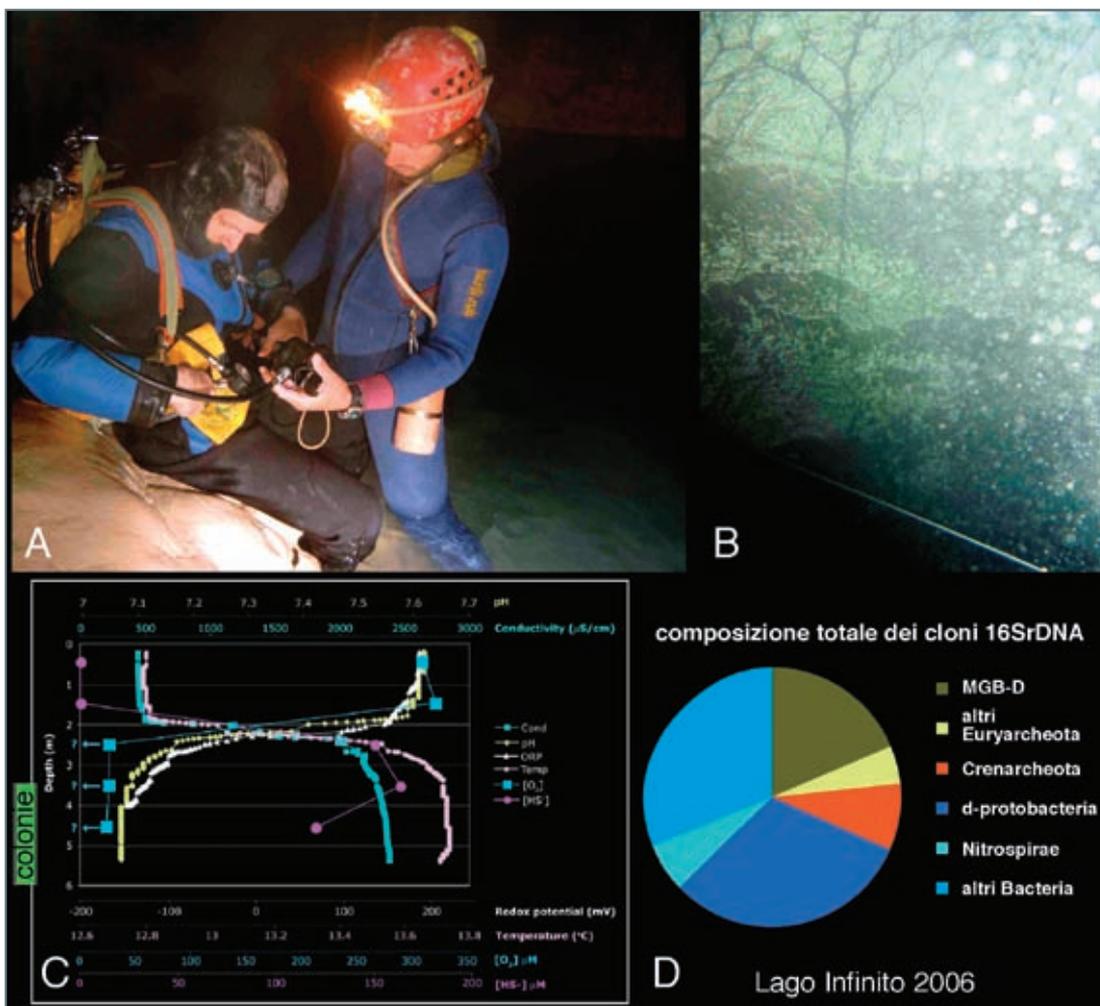
Ora che la biomassa era stata individuata, bisognava capire di che cosa fosse esattamente fatta. Una seconda spedizione fu organizzata nel 2006 e questa volta lo speleosub Giorgio Roscioni del Gruppo Speleologico CAI di Fabriano, con l'assistenza dei compagni speleologi Simone Cerioni e Sandro Mariani (**figura 20A**) s'immerse nel Lago Infinito munito dell'occorrente per campionare i cordoni batterici e scattare fotografie (**figura 20B**), mentre si eseguiva un profilo chimico e fisico dell'acqua con delle sonde analitiche calate a diverse profondità (**figura 20C**). I dati prelimi-

**FIGURA 20** - A) Lo speleosub Giorgio Roscioni si prepara per l'immersione nel Lago Infinito assistito dallo speleo-geologo Sandro Mariani. Foto di Simone Cerioni; B) immagine subacquea dei cordoni batterici rinvenuti nelle profondità del Lago Infinito. Il diametro della sagola di sicurezza è di 4 mm. Foto di G. Roscioni; C) profili delle caratteristiche fisiche e chimiche (ossigeno ed idrogeno solforato) del Lago Infinito. Da Macalady et al., 2008b; D) composizione genetica dei procarioti presenti nelle colonie microbiotiche del Lago Infinito. Da Macalady et al., 2008b.

nari delle analisi chimiche e genomiche sono stati presentati al convegno annuale dell'Associazione Geofisica Americana (AGU) a San Francisco nell'agosto del 2008 (Macalady et al., 2008b) che rilevano la presenza di una complessa associazione procariota costituita da un gran numero di diversi tipi di batteri e archea (**figura 20D**), tra i quali un gruppo enigmatico conosciuto con la sigla MGB-D (Marine Benthic Group-B), ed altri ancora che, stando al confronto con la banca dati, sembrano rappresentare forme nuove con un metabolismo differente da quello di specie conosciute.

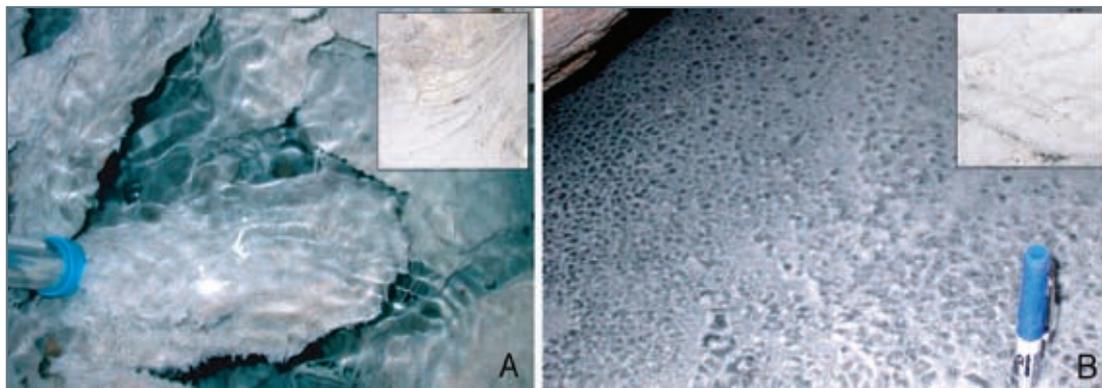
Le analisi genomiche di questi campioni sono ancora in corso nel laboratorio di microbiologia molecolare della Pennsylvania State University

ma già Macalady et al. (2006) avevano condotto accurate analisi delle biomasse batteriche prelevate in acque sulfidiche superficiali della Grotta Solfurea e del Ramo Solfureo nella Grotta del Fiume e monitorate per un periodo di quattro anni. In queste si riconoscono due principali forme degli ammassi batterici: una morfologia piumata, caratteristica di acque sulfidiche correnti, ed una cotonata tipica di acque stagnanti (**figura 21A, B**). Macalady e co-autori hanno osservato che i biofilm cotonati si ricompongono rapidamente dopo essere stati scompigliati durante l'operazione di campionamento. Questo comportamento non si è manifestato nei biofilm piumati. Il colore di questi biofilm è bianco, dovuto probabilmente alla

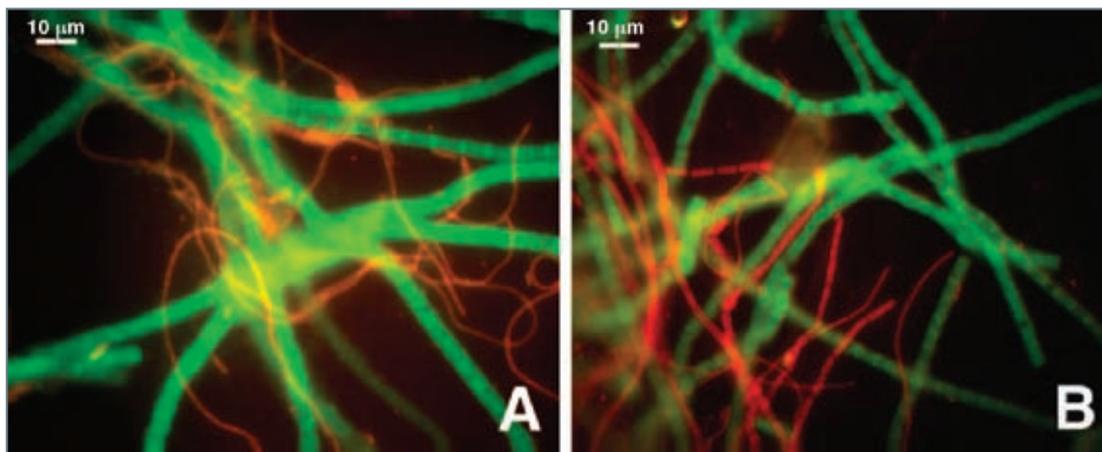


## 34

**FIGURA 21** - Tipologie dei film batterici nelle acque sulfidiche della Grotta del Fiume, A) tipo piumato e B) tipo cotonato, con rispettivi ingrandimenti nei riquadri. Foto di J. Macalady.



**FIGURA 22** - Immagini microfotografiche a fluorescenza FISH mostranti cellule batteriche contenute nei biofilm della Grotta Sulfurea (A) e del Ramo Sulfureo (B). Le cellule ibridizzate con EUBMIX appaiono di colore verde (eucarioti), quelle ibridizzate con il marcatore DELTA495a appaiono in rosso (batteri), mentre quelle ibridizzate con entrambi i marcatori appaiono con il giallo-arancio. Da Macalady et al., 2006.



presenza di piccole particelle di zolfo elementare. Oltre ad una differenza di comportamento, i due tipi di biofilm si differenziano anche per i diversi tipi di procarioti che li compongono (**figura 22A, B**). Sono principalmente costituiti da 13 differenti gruppi di batteri (**figura 23**) che a loro volta sono rappresentati da migliaia di differenti spe-

renti sono leggermente più ossigenate di quelle stagnanti, e ciò favorisce batteri del tipo *Thiothrix* che hanno bisogno di un tasso di ossigeno superiore per esplicare il loro metabolismo solfo-ossidante di quello che è invece richiesto dai *Beggiatoa*. Rimane il fatto che i solfobatteri dominanti in queste biomasse producono

in continuazione acido solforico che viene immediatamente neutralizzato dall'ambiente basico della grotta rappresentato dal calcare. In pratica su ogni centimetro quadrato di roccia calcarea attaccata da questi batteri, 15 milligrammi di carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) si disciolgono ogni anno. Ciò mantiene l'acqua della grotta ad un livello pressoché neutro (pH 7,3) ma porta anche alla continua corrosione del calcare ed allo sviluppo ed allargamento delle cavità freatiche.

In un secondo studio ancor più dettagliato, Macalady et al. (2008a) esaminano i ruoli reciproci che questi

Proteobacteria-ε dei generi *Thiobacillus*, *Arcobacter* ed altri ancora costituiscono una frazione subordinata della biomassa batterica totale in entrambi i tipi di biofilm. Gli Archaea costituiscono meno del 3% della biomassa.

La ragione di queste differenziazioni specifiche risiede principalmente nel fatto che le acque sulfidiche cor-

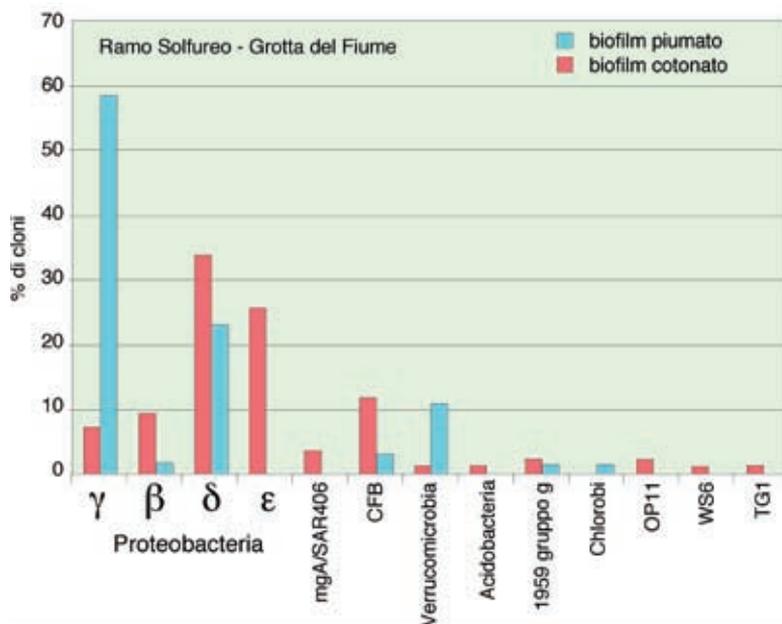


FIGURA 23 - I principali gruppi di batteri contenuti nei due tipi morfologici di biofilm (piumato e cotonato) nella Grotta del Fiume. Da Macalady et al., 2006.

differenti gruppi di batteri hanno nella loro così complessa comunità ipogea. Ne viene fuori che non tutti i batteri sono solfo-ossidanti ma ce ne sono altri che sono solfo-riducenti. Tutti vivono insieme nello stesso ambiente ed ognuno ha una funzione biologica diversa all'interno di questa complessa comunità. La cosa importante rilevata dal gruppo di studio di Macalady è però che la composizione di queste comunità batteriche non è la stessa nei diversi siti esaminati e addirittura può cambiare nel tempo nello stesso sito. Ciò è dovuto al fatto che le caratteristiche chimiche di un particolare lago della grotta, o anche di un rigagnolo sulfidico, cambiano durante il corso dell'anno in quanto cambia la miscelazione tra acqua sulfidica e acqua carbonatica vadosa in risposta alle precipitazioni meteoriche. Sicché in un dato bacino cambia la concentrazione dell'ossigeno rispetto a quella dell'idrogeno solforato e questo favorisce la proliferazione di un certo gruppo di batteri rispetto ad altri. Non ci sono poi solo solfobatteri chemiosintetici autotrofi, ma anche eterotrofi, e tutti insieme costituiscono una comunità interdependente dove ognuno fa il suo lavoro. I diagrammi in **figura 24** danno un'immediata impressione non

solo della diversità biologica ma anche delle variazioni nel tempo tra diversi siti sulfidici di Frasassi.

### Protozoi

Tempo fa veniva riconosciuto un gruppo tassonomico di organismi eucarioti che essendo diversi sia dai procarioti che dalle piante, animali o funghi, costituivano un regno a sé: i Protisti. La maggior parte degli organismi che compongono questo gruppo sono unicellulari ma ne esistono anche di multicellulari. Alcuni sono fotosintetici, altri si nutrono di materia organica. Nella moderna tassonomia basata sulla filogenesi i Protisti non vengono più riconosciuti come un taxon a sé stante ed i diversi gruppi di protisti sono oggi accorpati in regni diversi, come le Piante, le Muffe ed i Protozoi. Quest'ultimi sono anch'essi rappresentati da organismi molto diversi fra loro per forma, fisiologia, e caratteristiche trofiche. Pur non mancando delle eccezioni, i Protozoi sono in genere unicellulari, con dimensioni dai 10 ai 500  $\mu\text{m}$ , si cibano per fagocitosi e hanno la capacità di muoversi nell'acqua grazie a cilia e flagelli. Sulla base delle loro caratteristiche motorie, questi organismi si distinguono

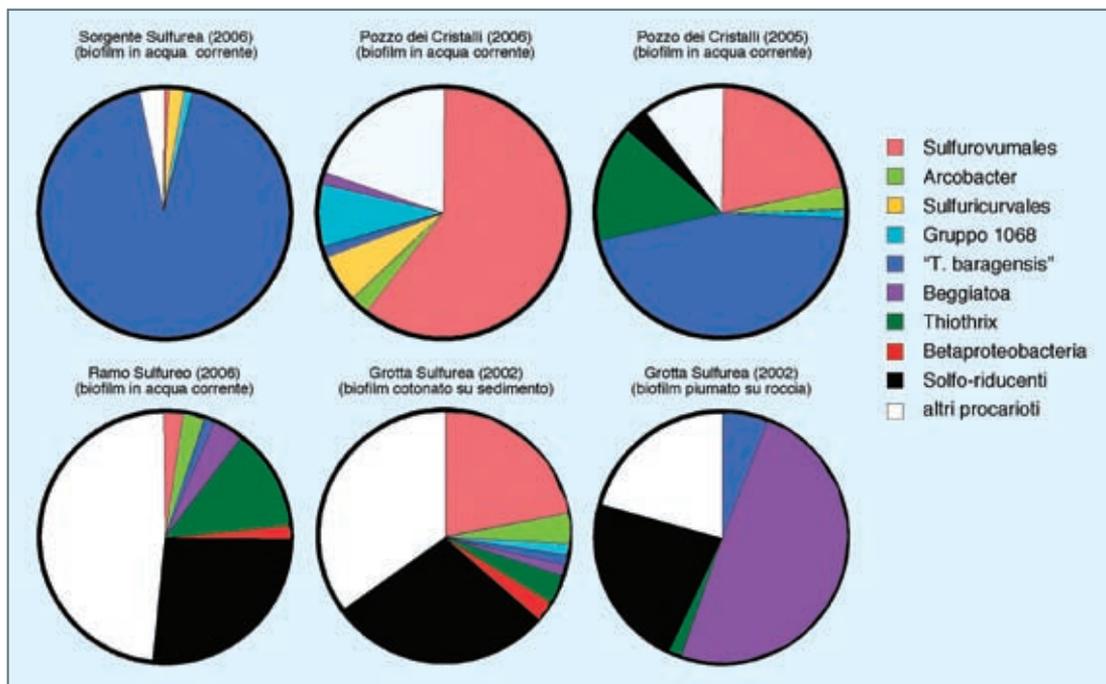
in quattro gruppi: i Flagellati (dotati di lunghi flagelli), gli Amoeboidi (con pseudopodi transienti), i Ciliati (dotati di corte ciglia vibranti) e gli Sporozoi (non-mobili ma che producono spore).

Nelle acque e nei sedimenti delle sorgenti sulfidiche di Frasassi, i Protozoi sono di casa. Sono stati più volte riscontrati dai vari ricercatori che hanno investigato nell'universo microbiologico di Frasassi ma studi approfonditi su questo gruppo non sono stati ancora pubblicati. In un suo rapporto preliminare sugli ostracodi stigobionti, la Peterson segnala la presenza, in un campione di sedimento prelevato alla Sorgente Solfurea, di alcune specie di protozoi appartenenti al gruppo dei Thecamoebia: *Arcella* sp., *Centropyxis aculeata*, *Diffugia corona*, *Diffugia pyriformis*, *Diffugia* sp. e *Cyclopyxis arcelloides*.

Per ciò che riguarda l'ambiente di grotta, solo recentemente ci si è resi conto della diversità e abbondanza dei protozoi dopo che un campione di fango carico di batteri è stato prelevato in un ruscello di acqua sulfidica in fondo al Pozzo dei Cristalli e poi coltivato in mesocosmo a Coldigioco. Non appena l'acqua del mesocosmo

si è stratificata per un fatto di densità, formando uno strato sulfidico e anossico sul fondo ed uno d'acqua carbonatica ossigenata in superficie (**figura 25A**), nel giro di un paio di giorni sul vetro della vasca immediatamente al di sotto dell'interfaccia sulfidico-anossico/carbonatico-ossigenato si è sviluppata una vistosa colonia di Epsilonprotobatteri filamentosi (**figura 25B**) e tra i filamenti si è subito notata una miriade di organismi microscopici, inclusa una gran varietà di protozoi, tutti indaffarati a cibarsi dei batteri (**figura 25C**). Questa colonia batterica potrebbe essere paragonata ad una barriera corallina in miniatura dove grazie a condizioni ambientali ideali di acque chiare, calde, ben ossigenate ed energizzate dalla luce solare, è presente la più alta diversità biologica dell'ambiente marino, fatta di piante e animali delle più svariate specie che convivono in uno straordinario equilibrio di simbiosi, parassitismo e predazione. Nel nostro caso l'energia non proviene dai raggi del sole bensì dall'ossidazione dell'idrogeno solforato la cui energia chimica viene utilizzata dai solfobatteri ossidanti per riprodursi e costituire così

**FIGURA 24** - Abbondanza relativa dei principali gruppi di organismi procarioti nei diversi biofilm analizzati nelle acque sulfidiche di Frasassi. Da Macalady et al., 2008a.



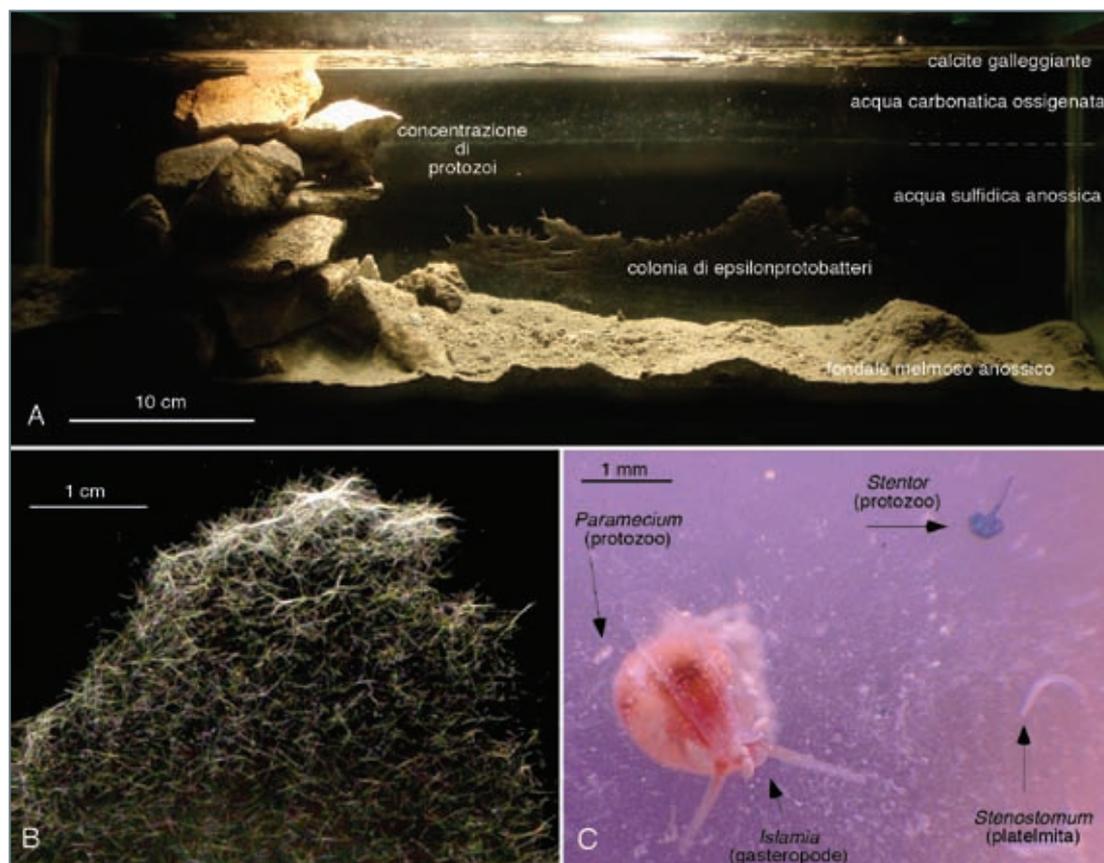
la base della catena alimentare del complesso microcosmo stigobitico della grotta.

Si sa ancora poco sulla tassonomia specifica dei protozoi rinvenuti nel Pozzo dei Cristalli e coltivati in mesocosmo a Coldigioco. Per arrivare ad una completa classificazione specifica e stabilire il ruolo ecologico che ogni specie ha nel complesso ambiente stigobitico di Frasassi occorrerebbero sofisticate analisi genomiche e biochimiche per ciascuna forma riconoscibile, il che, a parte alcuni dati preliminari ottenuti da una sola specie (vedi più avanti), è ancora tutto da fare. Ci limitiamo quindi a mostrare le immagini delle varie forme fin ora riconosciute dando per ciascuna di esse una descrizione sommaria ed una collocazione tassonomica a livello generico. Prima di tutto c'è da dire che i nostri protozoi di grotta appartengono esclusivamente al gruppo dei ciliati (Phylum Ciliophora),

i quali nel mondo annoverano circa 7.500 specie diverse, e popolano tutti i possibili ambienti acquatici, sia marini che terrestri che interstiziali. Sono caratterizzati da corte ciglia vibranti dette cilia (**figura 26A**) che utilizzano principalmente per il movimento sia nelle specie planctoniche, sia nelle specie bentoniche e/o sessili, ovvero che sono ancorate ad un substrato. Variano in dimensione da una decina di micron a lunghezze massime di due millimetri. Si cibano principalmente di minuscole particelle organiche di origine batterica o algale; alcuni sono parassiti, altri simbiotici, e certamente sono tra i più complessi organismi del regno dei protozoi.

Il più corposo ciliato planctonico rinvenuto nel mesocosmo appartiene al genere *Paramecium* con la sua caratteristica forma ovoidale, a confetto, che grazie ad una serie continua di corte cilia tutt'attorno al corpo (**figura 26B**), si muove sul fondo in continua-

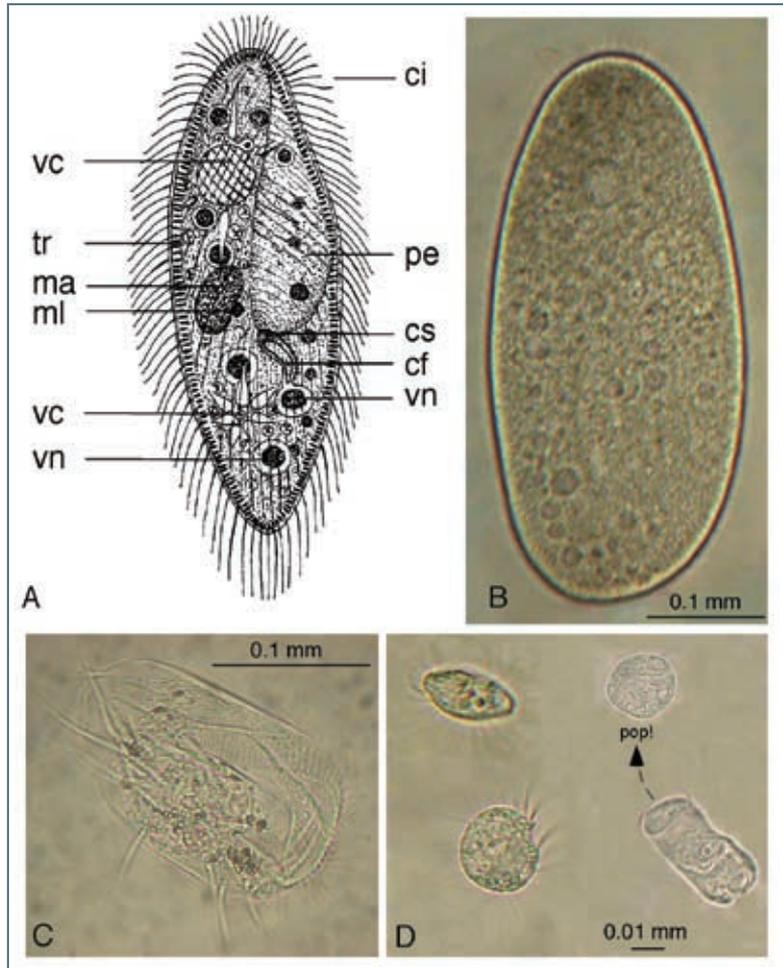
**FIGURA 25** - A) Veduta panoramica del mesocosmo da 15 litri di Coldigioco; B) particolare della colonia di epsilonprotobatteri sviluppatasi sul vetro dell'acquario; C) macrofotografia della colonia batterica del mesocosmo mostrante l'associazione di gasteropodi (*Islamia* sp. 2), platelminti (*Stenostomum* sp.) e protozoi (*Stentor coeruleum* e *Paramecium*). Foto di A. Montanari.



zione, invertendo spesso la direzione di marcia ruotando su se stesso, in un modo simile a quello delle automobili-gioco che invertono la direzione di marcia non appena incontrano un ostacolo. Il *Paramecium* è anche un buon nuotatore e si sposta agevolmente nell'acqua libera compiendo di tanto in tanto delle evoluzioni acroba-

molto più lunghe disposte su un lato del corpo. Ci sono poi una miriade di protozoi planctonici piccolissimi che nuotano velocissimi in tutte le direzioni. Ci è stato per ora impossibile isolarli e fotografarli al microscopio per effettuare un riconoscimento tassonomico. Tuttavia in un paio di fotogrammi fortunati si è riusciti ad immortalari e

**FIGURA 26** - A) Schema anatomico di un protozoo ciliato: vc, vacuoli contrattili; tr, tricocisti; ma, macronucleo; mi, micronucleo; vn, vacuoli nutritivi; pe, peristoma; cs, citostoma; cf, citofaringe; ci, cilia (modificato da De Agostini, 1968); microfotografie a luce trasmessa *in vivo* di protozoi ciliati rinvenuti nelle acque sulfidiche delle grotte di Frasassi: B) *Paramecium* sp.; C) *Euplotes aediculatum*; e D) di varie forme non identificate di piccolissimi protozoi. Foto di A. Montanari.



tiche avitandosi come un aereo da combattimento.

Più piccoli del *Paramecium* ma altrettanto agili nel girovagare senza sosta sul fondo in un modo che ricorda le macchinine dell'autoscontro in un luna park, gli *Euplotes* (**figura 26C**) nuotano anche nell'acqua libera compiendo evoluzioni e avvitamenti, usando, come mezzo di propulsione, una serie di cilia vibranti situate nella parte anteriore dell'organismo, e cilia

perlomeno a riconoscere che, infatti, sono degli organismi ciliati, alcuni con forme allungate ma la maggior parte con forme subsferiche (**figura 26D**). Tra questi ne è stato osservato uno *in vivo* dopo essere stato asportato dal mesocosmo per il tempo necessario di essere fotografato in movimento al microscopio. L'organismo ha la forma di un sacchetto lungo circa 50  $\mu\text{m}$ , nuota lentamente e, ad intervalli regolari di qualche secondo, con uno

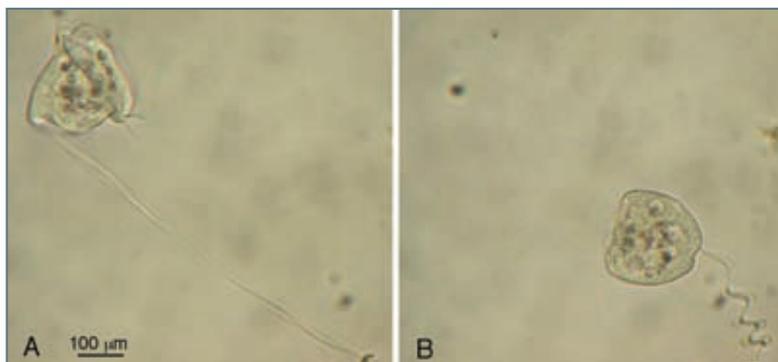
scatto fulmineo... pop! si contrae assumendo la forma di una piccola sfera (**vedi figura 26D**).

Nel microcosmo della colonia batterica sono stati individuati anche protozoi sessili del genere *Vorticella*. Questi non nuotano né deambulano ma stanno ancorati con un lungo e sottile stelo al substrato e l'organismo, che ha una forma di calice, vibrando le cilia si muove lentamente dondolandosi nell'acqua (**figura 27A**). All'improvviso, con uno scatto fulmineo, lo stelo si arriccia in spirali come fosse una molla, e il calice dell'organismo si ritira fino a raggiungere il fondo (**figura 27B**). Poi, piano piano, lo stelo si ridistende e il calice del protozoo riprende il suo lento dondolare spinto dal continuo moto vibratorio delle cilia.

Il più elegante dei protozoi fin ora riconosciuti in grotta è lo *Stentor*, probabilmente della specie *Stentor coeruleous*, non solo bello da vedere, ma rimarcabile per il modo con cui si muove e cambia di forma. Lo *Stentor*, a differenza degli altri microorganismi stigobionti che in genere sono diafani (ovvero bianchi o incolori), esibisce

sole. Ma il nostro *Stentor* di Frasassi di luce non ne vede nemmeno un fotone e quindi sarà interessante capire, a seguito di futuri studi biochimici mirati, che altra funzione possa avere la stentorina in questo organismo stigobionte.

Lo *Stentor* vive in gruppo e a volte forma delle colonie (**figura 28A**). Come la *Vorticella*, anch'esso si muove dondolandosi nell'acqua usando le cilia vibranti poste nella parte anteriore del corpo. A differenza della *Vorticella* però, quello dello *Stentor* non è un vero e proprio peduncolo, uno stelo, bensì la parte posteriore del corpo che si stira fino a diventare un filo sottilissimo raggiungendo una lunghezza di oltre un millimetro. Si aggrappa al fondale con delle corte cilia poste nell'apice posteriore del corpo, mentre si protrae spingendosi in alto e allungando il corpo grazie alla propulsione delle cilia anteriori. Quando la colonia viene disturbata da qualcosa (per esempio quando si introduce nell'acqua una minipipetta per aspirarli e campionarli facendola strisciare sul vetro), tutti insieme in un istante gli *stentor* si ritirano, accorciandosi fino



**FIGURA 27** - Microfotografie *in vivo* del protozoo sessile *Vorticella* sp. A) forma estesa; B) forma contratta. Foto di A. Montanari.

un bel colore blu-verde. Certamente questa colorazione non dipende dalla clorofilla. Il colore verde dello *Stentor* è dato da un chinone policiclico (un composto organico aromatico) chiamato appunto stentorina. La cosa strana è che la *stentorina* è un fotorecettore, in quanto sembrerebbe avere la funzione di far percepire la luce al protozoo, il che potrebbe sembrare normale per un organismo che vive nel mondo esterno sotto la luce del

o diventare delle palline verdi attaccate al substrato (**figura 28B**). Questo comportamento ricorda un po' quello degli anemoni di mare, come l'*Actinia equina*, meglio nota come pomodoro di mare.

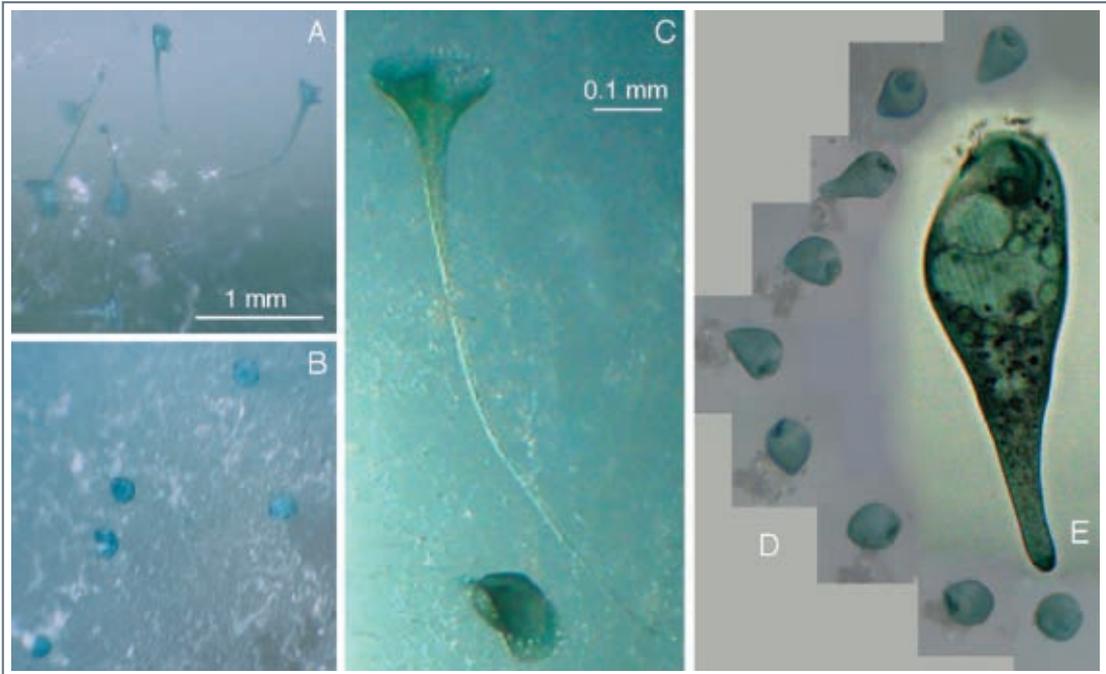
Lo *Stentor* non se ne sta sempre ancorato al substrato con la sua tipica forma a trombetta (**figura 28C**) ma di quando in quando si stacca e nuota liberamente nell'acqua con movimenti dolci e convoluti del corpo

che ricordano un piccolo fantasma che volteggia nell'aria (**figura 28D**), e il corpo assume una forma a goccia (**figura 28E**).

Uno studio dettagliato sui protozoi del complesso carsico di Frasassi è attualmente condotto dai ricercatori Antonietta La Terza, Santosh Kumar,

campioni di sequenze di DNA nucleare del ciliato codificati per l'RNA ribosomiale 18S, che sono attualmente in fase di studio.

Diversamente dall'*Urocentrum*, *Euplotes* si è ben adattato alle condizioni standard di laboratorio, permettendo ai ricercatori di effettuare analisi

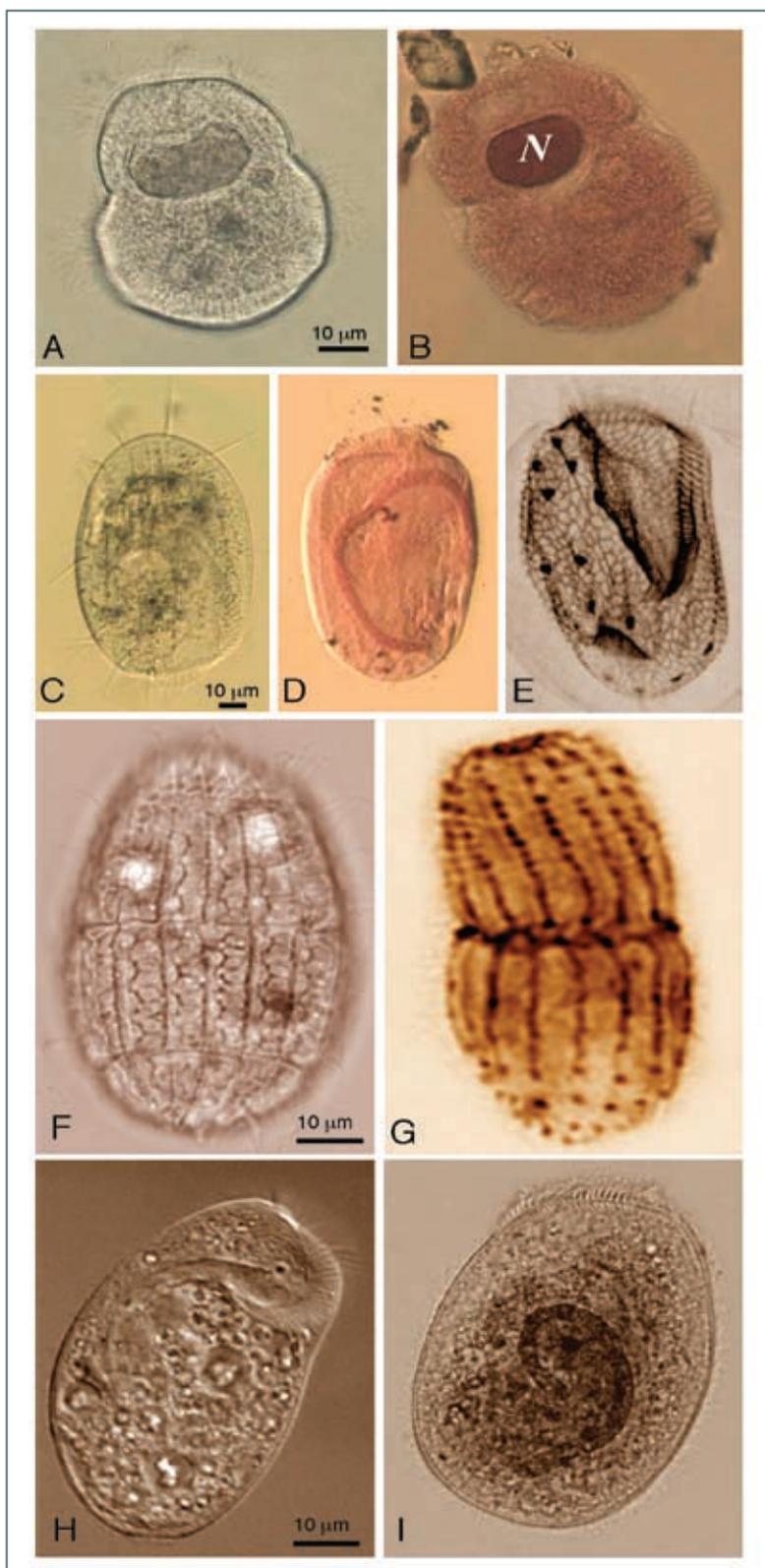


**FIGURA 28** - Il protozoo *Stentor coeruleus* ripreso *in vivo* nel mesocosmo di Coldigioco: A) colonia di forme estese; B) colonia di forme retratte; C) veduta laterale dello *Stentor* nella sua forma estesa sessile; D) fotogrammi di uno *Stentor* mentre nuota nell'acqua libera; E) *Stentor* nella sua forma planctonica mentre nuota nell'acqua libera. Foto di A. Montanari).

Dazy Bahti e Chandramohan Batrachalam dell'Università di Camerino in collaborazione con Federico Buonanno, Claudio Ortensi e Barbara Di Pretorio dell'Università di Macerata. In un primo campione di acqua sulfidica prelevata al Lago Verde della Grotta del Fiume furono riconosciute tre specie di ciliati appartenenti al genere *Urocentrum* (Oligohymenophorea), ancora da definire al livello di specie (**figura 29A, B**), all'*Euplotes aediculatus* (Heterotrichia), quest'ultimo del tutto simile all'*Euplotes* recentemente trovato al Pozzo dei Cristalli (**figura 29C, D, E**), e *Coleps hirtus* (Colepidae) (**figura 29F, G**). L'*Urocentrum* purtroppo non si è adattato alle condizioni di laboratorio e non ha quindi permesso di effettuare approfondite ricerche di tipo biochimico, ma solo una ricognizione di carattere morfologico. Si è potuto tuttavia estrarre

*in vivo* e *in vitro* particolarmente accurate. È stato così possibile determinarne il morfotipo specifico degli esemplari raccolti per mezzo della tecnica dell'impregnazione argentica, descriverne la struttura dell'apparato macro- e micronucleare della specie, e isolare cloni cellulari appartenenti a diversi *mating type*, fino a definirne la specie: *Euplotes aediculatus*.

Per consentire l'inequivocabile assegnazione degli esemplari raccolti nel Lago Verde alla specie *Euplotes aediculatus*, sono anche state effettuate delle analisi genetico-molecolari basate sul sequenziamento del gene SSrRNA (rRNA, 18S), un gene che, negli ultimi anni, ha largamente contribuito alla ricostruzione delle relazioni filogenetiche all'interno del genere *Euplotes*, come pure di altri gruppi di protozoi ciliati. Per effettuare tale indagine, il DNA totale estratto da



**FIGURA 29** - Microfotografie a luce trasmessa di protozoi ciliati rinvenuti nelle acque sulfidiche delle grotte di Frasassi: A) *Urocentrum* sp., esemplare vivo e B) esemplare fissato con indicato (N) l'apparato nucleare; C) *Euplotes aediculatus* esemplare vivo, D) esemplare fissato con evidenziato apparato nucleare (foto di C. Ortolani e F. Buonanno) e E) esemplare tinto in soluzione argentica (foto di C. Kumar); F) esemplare di *Coleps hirtus* vivo e G) in soluzione argentica al momento della riproduzione per scissione; H) *Urocentrum* sp., esemplare vivo e I) con apparato nucleare in risalto. Foto di C. Kumar.

colture pure di *Euplotes* è stato sottoposto a Reazioni a Catena della Polimerasi (PCR), utilizzando una coppia di oligonucleotidi primer "universali" per la sequenza del gene codificante per l'rRNA. Il prodotto della reazione di PCR pari ad un frammento di DNA di circa 1800 coppie di basi (bp), è stato successivamente sottoposto a reazioni di sequenza. Il confronto della sequenza parziale di circa 200 bp del prodotto di PCR con quelle di altre sequenze geniche depositate presso la banca dati del National Center for Biotechnology Information, ha confermato che gli esemplari raccolti al Lago Verde erano effettivamente portatori del gene SSrRNA di *Euplotes aediculatus* (figura 14).

Parimenti, da colture massive degli esemplari di *Euplotes aediculatus*, si sta cercando ora di isolare gli eventuali fattori solubili secreti dal ciliato, per successive analisi chimiche e di attività biologica. Studi recenti hanno dimostrato che il protozoo ciliato *Climacostomum virens* (figura 29H, I), del quale i nostri ricercatori marchigiani hanno raccolto alcuni esemplari nel Fiume Sentino, all'altezza della Sorgente Solfurea, si difende dai potenziali predatori uni- e pluricellulari utilizzando una tossina, rappresentata da un lipide resorcinolico, che sintetizza ed accumula in piccole vescicole (*estrusomi*) localizzate a ridosso della membrana citoplasmatica. In caso di necessità, il ciliato scarica il contenuto degli estrusomi contro l'eventuale predatore che, se non danneggiato in modo irreversibile, si dà alla fuga. La tossina, denominata *climacostol*, è stata recentemente isolata, caratterizzata come 5-(Z)-non-2-enil-benzene-1,3-diolo e sintetizzata per via chimica. Sulla base delle provate attività terapeutiche ed antitumorali degli altri lipidi resorcinolici, negli ultimi quattro anni di indagini, si sono testate preparazioni chimiche sintetiche del *climacostol* su cellule promielocitiche leucemiche umane (HL60), del carcinoma squamoso umano (A431) e su cellule endoteliali umane non tumorali (EA.hy926). I risultati, recentemente

pubblicati da Buonanno et al. (2005, 2006 a-b, 2008 e 2009) mostrano che il *climacostol* possiede interessanti proprietà antitumorali che incoraggiano ulteriori studi, sia in vitro sia *in vivo*, per valutare l'utilizzo di questa sostanza nella bio-chimioterapia del cancro.

Passiamo ora alla descrizione delle diverse forme di animali multicellulari acquatici che abbiamo rinvenuto nelle grotte di Frasassi. Fino ad ora, abbiamo riconosciuto esponenti di sei phyla: Platyhelminthes (i cosiddetti vermi piatti o platelminti), Nematelminthes (i vermi cilindrici o filiformi detti anche nematodi), gli Annelida (i vermi segmentati detti anche anellidi), Rotifera, Mollusca (in particolare una specie di gasteropode) e gli Arthropoda (rappresentati da vari gruppi di crostacei).

### Platelminti

I platelminti sono noti come "vermi piatti" per la forma schiacciata del corpo ed appartengono al phylum dei Platyhelminthes. Hanno una simmetria bilaterale, sono sprovvisti di un apparato circolatorio e non hanno organi specializzati per la respirazione che avviene per traspirazione attraverso la superficie del corpo. Sono privi di un vero e proprio sistema nervoso che è rappresentato solo da un paio di gangli posti nella parte anteriore del corpo.

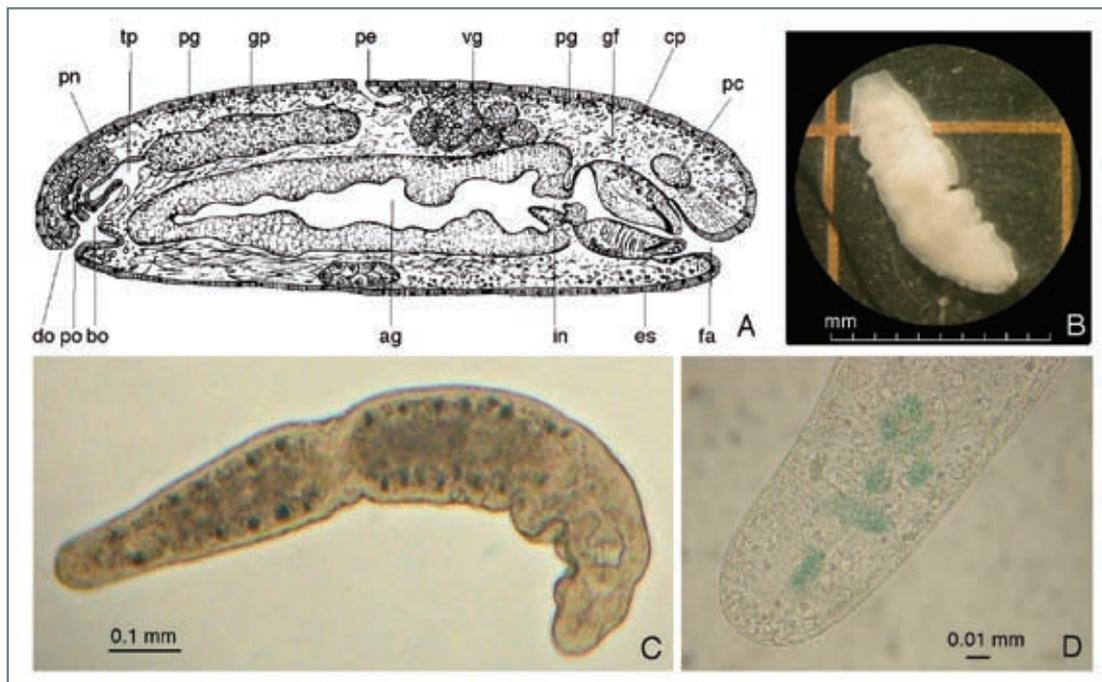
L'apparato digerente è solo parzialmente presente nel gruppo dei platelminti turbellari aceli ed è costituito da una bocca situata centralmente, una faringe ed un intestino a fondo cieco la cui forma può variare da un semplice tubo ad una serie di diverticoli. Gli organi escretori sono molto sviluppati e consistono di un sistema di canali ramificati che si aprono all'esterno con uno o più pori i quali, riducendosi di calibro, terminano internamente con una cellula a fiamma. Tale cellula è spesso caratterizzata da prolungamenti citoplasmatici che si estendono nel *parenchima*, la massa

corporea interna. Il parenchima è formato da una sostanza amorfa in cui si trovano disperse numerose cellule capaci di spostarsi con movimenti ameboidi e ha la funzione di assicurare la distribuzione delle sostanze nutritive tra i diversi strati del corpo. Alla base della cellula a fiamma, vi è un ciuffo di ciglia vibranti che sporgono nella cavità del tubulo terminale. Il movimento delle ciglia facilita l'espulsione dei detriti eliminati attraverso la cellula escrettrice. La maggior parte dei platelminti sono ermafroditi, ovvero che ogni individuo è provvisto di entrambe le gonadi, gli organi che producono le cellule riproduttive, sia femminili (uova) che maschili. Insomma questi animali pur nella loro semplicità hanno un'anatomia ed una fisiologia di gran lunga più complessa di quegli organismi unicellulari che abbiamo descritto fin qui (**figura 30A**). Vivono in tutti gli ambienti, sia marini che d'acqua dolce o salmastra, ed anche in ambienti umidi terricoli. Molti sono parassiti, come la famosa *Tenia saginata*, comunemente detta "verme solitario", la quale deposita le uova nei bovini da dove possono essere trasferiti nell'uomo in caso di

ingestione di carne infetta cruda o mal cotta. Sviluppandosi poi nell'intestino dell'uomo, questo platelminto può raggiungere una lunghezza di ben dodici metri. Altre specie hanno discrete dimensioni come le eleganti planarie che possono raggiungere diversi centimetri di lunghezza.

Nelle Grotte di Frasassi, nel corso della nostra ricerca e fra i tanti campioni prelevati in svariati siti, abbiamo individuato solo alcuni esemplari di platelminti. Il primo esemplare è stato scovato da Sharmishtha Dattagupta dell'Università di Göttingen, in un campione di sedimento melmoso prelevato in una pozza d'acqua sulfidica nel Ramo Solfureo della Grotta del Fiume. Ha una forma elongata, piatta e con contorni ondulati. L'esemplare supera di poco i dieci millimetri di lunghezza ed è di colore biancastro (**figura 30B**). Altri esemplari sono stati individuati nel fango sulfidico del laghetto della Grotta Solfurea sempre dalla Dattagupta. Un esemplare unico, del tutto simile ai precedenti, è stato individuato da Dawn Peterson dell'Università di Berkeley, in un campione di melma carbonatica prelevato al Lago Claudia nella Grotta Grande

**FIGURA 30** - A) Schema anatomico di un platelminto: bo, bocca; fa, faringe; es, esofago; in, intestino; ag, atrio genitale; po, poro genitale; do, dotto ovovitellino; pn, pene; pg, pigmento; gp, ghiandola prostatica; pe, poro escretore; vg, vitellogeno; gf, ghiandola frontale; ep, epidermide; pc, plesso cerebrale (modificato da De Agostini, 1968); B) microfotografia a luce riflessa del platelminto triclade rinvenuto nel Lago Claudia della Grotta Grande del Vento; C) microfono dal vivo del platelminto catenulide *Stenostomum* sp. rinvenuto nel Pozzo dei Cristalli ed allevato nel mesocosmo di Coldigioco; D) particolare della parte caudale dello *Stenostomum* mostrante, all'interno del corpo, delle particelle di colore verde che sono probabilmente dei frammenti del protozoo *Stentor* ingerito dall'animale. Foto di A. Montanari.



del Vento durante la sua meticolosa ricerca sugli ostracodi. Secondo il prof. Ulf Jondelius, direttore del Museo di Storia Naturale di Stoccolma e biologo specialista di plattelminti, il nostro verme piatto di Frasassi apparterebbe all'ordine dei Tricladida ma al momento è impossibile determinarne il genere e tanto meno la specie, il che richiederebbe uno studio anatomico dettagliato *in vivo* e un'analisi del DNA. È evidentemente un animale raro e richiederà tempo ed uno studio specialistico accurato per capire il ruolo che questo organismo ha nell'ecosistema stigobitico di Frasassi.

Un'altra specie di plattelminta è stata recentemente individuata nel ruscello sulfidico del Pozzo dei Cristalli, nella Grotta del Fiume. In realtà questo animale che a mala pena supera il millimetro di lunghezza (**figura 30C**) è stato riconosciuto nel mesocosmo di Coldigioco ed osservato *in vivo* mentre girovagava tra i filamenti della colonia batterica cibandosi voracemente di tutto ciò che incontrava nel suo continuo strisciare, sia filamenti batterici che protozoi sessili, incluso lo *Stentor* (**figura 30D**). Addirittura nel mesocosmo è stato possibile isolare decine di individui di questa specie che hanno permesso l'osservazione microscopica dettagliata *in vitro* e la preparazione di diversi campioni per ulteriori analisi anatomiche e genetiche. Date le sue minute dimensioni, sarebbe stato impossibile riconoscere questo animale nel suo ambiente naturale in grotta ed in questo caso, come in altri, il mesocosmo si è rilevato uno strumento utilissimo per l'individuazione della specie e per osservare dal vivo il suo comportamento. Secondo il prof. Jondelius questo minuscolo plattelminta apparterebbe al genere *Stenostomus* dell'ordine dei Catenulida.

Analisi ancora in corso sull'anatomia e la genetica ribosomale di questo piccolo stigobionte di Frasassi ci permetteranno di stabilire il ruolo che esso ha nell'ecosistema sulfidico autotrofo della grotta.

## Nematodi

Il phylum dei Nematoda, dal greco *nema* = filo e *eidosis* = forma, sono per l'appunto vermi filiformi, detti anche cilindrici, comprendenti almeno 90.000 specie conosciute. Ne esistono di specie libere, che popolano gli spazi interstiziali dei sedimenti umidi, fondali acquatici e sorgenti termali, e si nutrono di alghe, chi di batteri e funghi, chi di altri microorganismi invertebrati. Ci sono poi specie parassite che infestano una gran varietà di piante e di animali. Tra quest'ultime le specie più malfamate appartengono al genere *Trichinella* e sono la causa della *trichinosi*, una pericolosa infezione dell'apparato digerente che può estendersi anche al sistema nervoso causando gravi danni irreversibili e, raramente, anche la morte. Questi parassiti vivono e si riproducono in animali selvatici ma anche in animali domestici, tipicamente i maiali, e si trasmettono all'uomo allorché vengono ingerite carni crude o mal conservate di animali infetti che contengono le larve di questo nematode. Un altro nematode famoso è l'*Enterobius vermicularis*, un verme appartenente alla famiglia Oxyuridae meglio conosciuto come "il verme dei bambini". Anche questo vive nell'intestino di alcuni mammiferi e viene trasmesso ad altri individui, incluso l'uomo, tramite le uova che eventualmente si schiudono nella parte terminale dell'intestino causando affezioni pruriginose nella zona perianale e, nelle femmine, nella zona vulvare. In particolare i bambini, sempre a toccare tutto per poi mettersi le mani in bocca, tendono ad essere infettati da questo nematode e a sviluppare il malanno noto col nome di *ossiuriasi*.

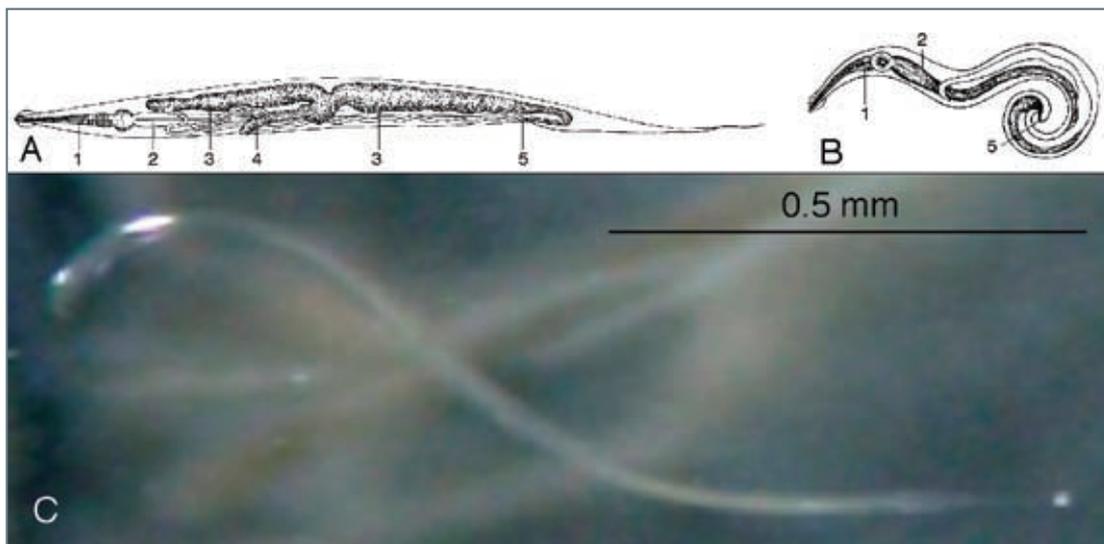
L'anatomia dei nematodi è un po' più complessa di quella dei plattelminti (**figura 31AB**). Innanzi tutto sono *eterofroditi*, ovvero maschi e femmine sono ben differenziati. Hanno un sistema nervoso formato da un gruppo di gangli connessi ad un anello che circonda l'intestino e dal quale si diramano cordoni nervosi

sia anteriormente, verso la bocca, che posteriormente, verso la coda. Il sistema digerente è formato da una bocca anatomicamente complessa (trilobata, con mascelle e labbra), da un esofago, un intestino e un foro anale, il tutto azionato da un sistema muscolare che, tramite contrazioni, permette l'ingestione ed il passaggio del cibo attraverso l'apparato digerente fino all'espulsione. La circolazione e l'assorbimento delle sostanze nutritive, nonché gli scambi gassosi che permettono l'attività metabolica di questi organismi, avvengono grazie alla circolazione di un liquido pseudocelomatico facilitata dai movimenti del corpo. La respirazione, ovvero lo scambio gassoso con l'ambiente esterno, avviene attraverso pori nella cuticola esterna del corpo dell'animale. I nematodi sono anche provvisti di speciali organi sensoriali, come setole e papille, in grado di percepire sostanze chimiche disperse nell'ambiente ed individuare la presenza di cibo, prede e predatori, nonché di *feromoni*, ovvero quelle sostanze chimiche prodotte dalle femmine per attirare l'attenzione dei maschi e innescare l'accoppiamento. Anche gli apparati sessuali di questi animali presentano una certa complessità. I maschi sono dotati di un testicolo per la produzione di spermatozoi, connesso tramite piccole condotte ad un orifizio dotato

di spicole che servono a divaricare il poro vaginale della femmina durante l'accoppiamento. L'apparato riproduttore femminile, a sua volta, è costituito da due ovari, da un utero e da una vagina. I nematodi possono essere ovipari o vivipari ed i neonati non hanno uno stadio larvale ma si sviluppano partendo da stadi giovanili morfologicamente simili agli adulti ed effettuando, nella crescita, alcune mute della cuticola fino a raggiungere la massima grandezza.

La presenza di rarissimi esemplari di nematodi nell'ambiente stigobitico di Frasassi è stata rilevata solo di recente in un campione di sedimento del Lago Verde e in un altro proveniente dal Lago della Bottiglia, in fondo al Pozzo dei Cristalli. Di loro non si sa praticamente nulla. Questi vermi raggiungono a malapena un millimetro di lunghezza, sono diafani, quasi trasparenti (**figura 31C**) e ci vorrà uno studio specialistico per definire la loro tassonomia ed il ruolo che essi hanno nell'ecosistema stigobitico della grotta.

**FIGURA 31** - Schema anatomico del nematode *Enterobius vermicularis* (il verme dei bambini), A) femmina, B) maschio: 1, faringe; 2, intestino; 3, utero; 4, vagina; 5, ano; C) microfotografia dal vivo di un nematode rinvenuto nel Lago della Bottiglia in fondo al Pozzo dei Cristalli. Foto di A. Montanari.



## Anellidi

Il phylum degli Annelida (gli anellidi) si riferisce a vermi che presentano un'evidente *metameria*, ovvero un corpo suddiviso in numerosi anelli, i metameri, pressoché uguali (**figura 32A,B**). Un classico esempio conosciuto da tutti è il lombrico. Ci sono anellidi di dimensioni submillimetriche con una mezza dozzina di anelli, altri giganteschi che possono raggiungere i tre metri di lunghezza e sono costituiti da centinaia di metameri.

La metameria interessa quasi tutti gli apparati importanti tranne quelli circolatorio e riproduttore. In pratica, ogni metamero (anello) riproduce un identico reticolo nervoso che parte da un sistema centralizzato. Però il metamero terminale è differente dagli altri in quanto contiene un paio di gangli cefalici costituendo così la testa. Da qui parte un nastro nervoso che circonda il canale digerente. Hanno un sistema circolatorio chiuso. Il vaso più importante posto dorsalmente lungo il corpo è detto aorta e contiene del sangue emoglobinico che fluisce verso la testa. In ogni metamero questa aorta si espande e contrae fungendo da rudimentale cuore pulsante. Sul ventre corre un altro vaso in cui affluisce il sangue dall'aorta tramite piccoli vasi secondari, sangue che fluisce poi verso l'estremità caudale.

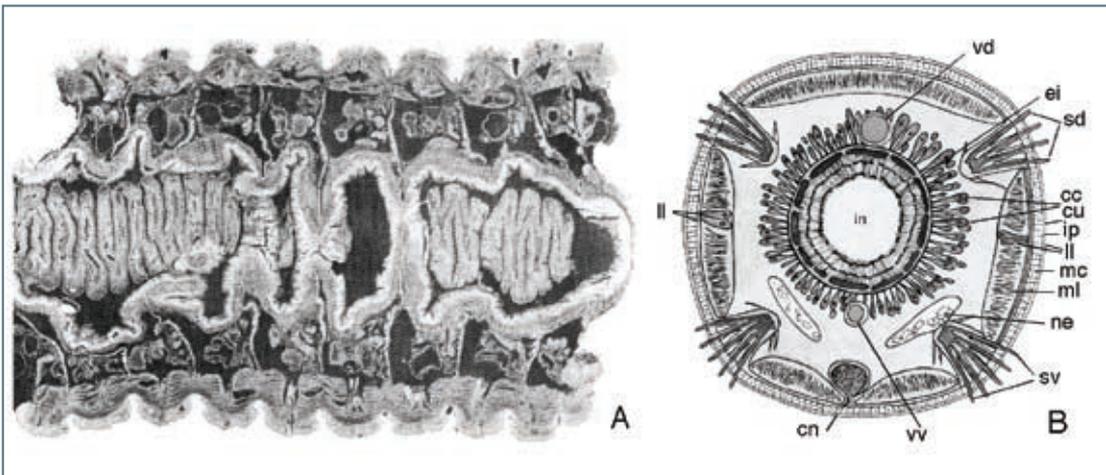
Il sistema digerente è complesso, parte da una bocca situata nel meta-

mero cefalico e finisce con un'apertura anale nel metamero finale caudale, passando per faringe, esofago e tubo digerente.

Gli anellidi, come tutti gli invertebrati, non hanno scheletro. Ogni metamero contiene però una cavità, detta *celoma*, riempita di liquido celomatico, che funge da supporto strutturale del corpo, una specie di scheletro idraulico. Il movimento dell'animale è garantito da due serie di muscoli presenti in ogni metamero. Quelli longitudinali fanno accorciare il metamero che quindi aumenta di diametro mentre quelli trasversali lo fanno allungare restringendone il diametro. In questo modo il proverbiale strisciare del verme si manifesta come un'onda di contrazione (allungamento seguito da accorciamento) che parte dal capo e attraversa ogni singolo metamero fino ad arrivare alla coda.

Gi anellidi, come i già visti vermi piatti, sono ermafroditi contenendo in sé sia gli organi sessuali femminili che quelli maschili. Molti si riproducono per *architomia*, ovvero si auto-dividono il corpo rigenerando due nuovi individui. La parte divisa con la testa rigenera la coda, cosa non molto difficile da fare, mentre la parte caudale deve rigenerare una nuova testa, il che comporta qualche difficoltà tecnica soprattutto perché in un primo momento l'organismo, privo di testa e di bocca, non può nutrirsi e deve

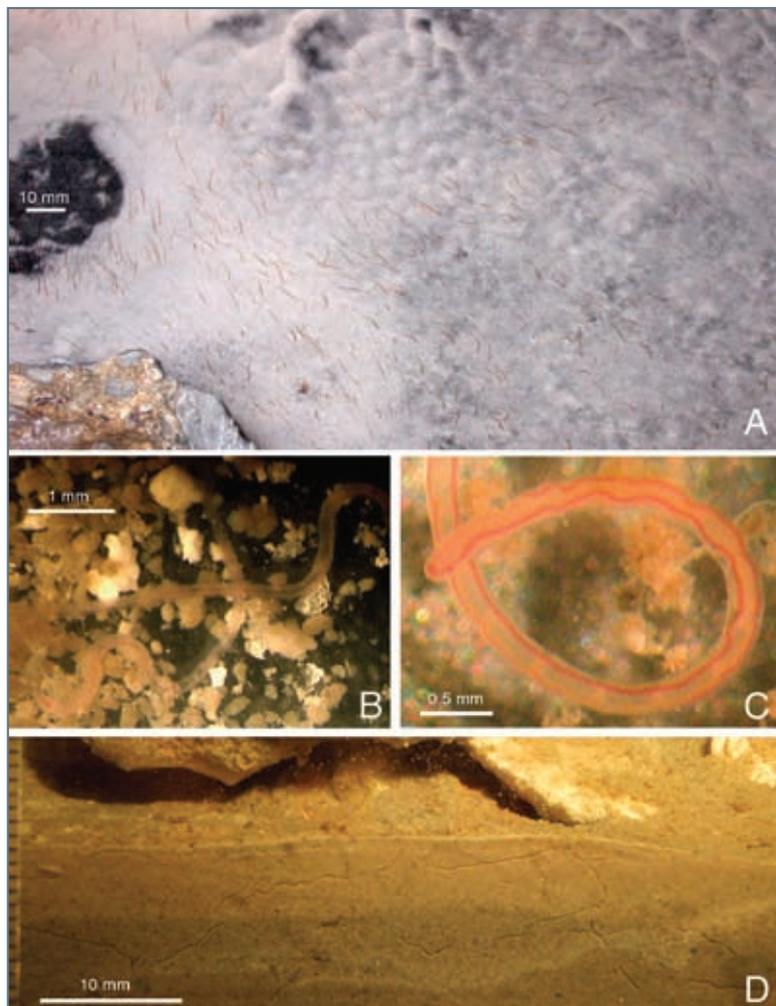
**FIGURA 32** - A) Sezione longitudinale di un anellide mostrante la struttura metamerica; B) schema anatomico di un anellide in sezione trasversale: vd, vaso dorsale; in, intestino; ei, epitelo intestinale; sd, setole dorsali; cc, cellule cloragogene; cu, cuticola; ip, ipoderma; mc, muscolatura circolare; ml, muscolatura longitudinale; ne, nefridi; sv, setole ventrali; vv, vaso ventrale; cn, catena neurale; ll, linea laterale (modificato da De Agostini, 1968).



quindi sopravvivere un breve periodo di digiuno.

Nella moderna tassonomia, il phylum Annelida comprende due classi principali: Polychaeta e Clitellata. Quest'ultima include due taxa che in passato venivano distinti in classi separate: Oligochaeta (comprendente i lombrichi) e Hiruidea (comprendente le sanguisughe). Nelle Grotte di Frasassi, Galdenzi e Sarbu (2000) segnalano la presenza di vermi oligocheti appartenenti alla famiglia Lumbriculidae e molto probabilmente rappresentanti una nuova specie endemica del genere *Rhynchelmis*. Questi vermi troglobiti sono stati rinvenuti sulle pareti umide della grotta e quindi non sono da considerarsi stigobionti in senso stretto. Nel corso

della nostra ricerca abbiamo riscontrato numerosi vermiciattoli rossi in campioni di sedimento provenienti da vari laghi sulfidici del complesso carsico di Frasassi. Macalady et al. (2006) segnalano numerosissimi individui frammisti negli ammassi piumati di biofilm batterici del Ramo Solfureo e della Grotta Solfurea (**figura 33A**). Non appena la colonia batterica viene disturbata, per esempio durante la campionatura, tutti questi vermiciattoli si dileguano nascondendosi rapidamente nel fango sottostante. Sono lunghi circa un centimetro con un diametro di circa 0,2 mm. Il colore rosso è dato dall'abbondante emoglobina che scorre nelle vene, ventrale e dorsale, dell'animale (**figura 33B, C**). L'emoglobina è una proteina solubi-



**FIGURA 33** - A) Un tappeto batterico in un rigagnolo di acqua sulfidica nella Grotta Solfurea sulla superficie della quale dimorano numerosi vermi rossi del genere *Potamothrix* tutti più o meno allineati secondo il flusso della debole corrente (foto di J. Macalady); B) Microfotografia a luce riflessa di vermi *Potamothrix* sp. vivi prelevati al Lago Claudia; C) dettaglio di un segmento caudale reciso dove si notano le vene dorsale e ventrale ancora pulsanti e piene di liquido emoglobinico; D) tracce di vermi *Potamothrix* sp. nel sedimento del mesocosmo di Coldigioco.

Foto di A. Montanari.

le, normalmente presente nei globuli rossi del sangue dei vertebrati ed è responsabile del trasporto dell'ossigeno molecolare ai tessuti. Ognuno dei suoi quattro globuli proteici ha al suo interno una molecola di ferro chiamata *gruppo eme* (da cui *emoglobina*) che ne impartisce il colore rosso. La presenza di emoglobina nei nostri vermi indicherebbe che essi si siano adattati a vivere in un ambiente con scarso ossigeno e la produzione di questa proteina li aiuterebbe a massimizzare l'uso del poco ossigeno disponibile.

Un campione prelevato alla Grotta Solfurea fu inviato al prof. Christer Erséus, specialista di anellidi e ricercatore genetista della università svedese di Gothenburg (vedi Erséus et al., 2008), il quale ha eseguito per noi un'analisi del DNA riconoscendo una fortissima assomiglianza genetica con un genere di vermi da lui studiati in alcuni laghi scandinavi. I nostri vermi rossi apparterrebbero alla classe Clitellata, ordine Haplotaxida, famiglia Naidadae (sinonimo di Tubificidae), e con tutta probabilità al genere *Potamothrix*. La specie è ancora da definire visto che sembra essere nuova ed endemica delle Grotte di Frasassi, mai classificata prima. Per definirla occorrerà attendere le analisi genetiche che il prof. Erséus sta conducendo in nuovi campioni prelevati in diversi siti nella grotta al fine di verificare l'omogeneità specifica e per inquadrare questi vermi nell'ecosistema stigobitico sulfidico. L'Erséus conterà sulla collaborazione del prof. Tarmo Timm, un biologo specialista di anellidi dell'università estone di Tartu con una grandissima esperienza nella tassonomia e classificazione dei vermi clitellati.

Nel frattempo, in uno dei mesocosmi di Coldigioco abbiamo introdotto alcuni esemplari di *Potamothrix* prelevati al Lago Claudia con la speranza di poterli osservare dal vivo. Dopo essere stati separati dal sedimento fangoso ed osservati per un po' al microscopio in un piatto Petri, i nostri vermiciattoli una volta introdotti nel

mesocosmo, non hanno perso tempo ad infilarsi nel sedimento melmoso sparendo rapidamente e per sempre dalla vista. Una sola volta, dopo diversi giorni, si è scorta la testa di un verme sbucare dal sedimento ed agitarsi nell'acqua. Non siamo sicuri dunque se i vermi si siano adattati allo stato di cattività e riprodotti. Certo è che hanno lasciato un gran numero di minuscoli tunnel nel sedimento, perfettamente visibili attraverso il vetro dell'acquario (**figura 33D**). Si tratterà ora di campionare il fango del mesocosmo e studiare la situazione che si è creata confrontandola con quella che sarà riscontrata in campioni prelevati dagli ambienti naturali della grotta. La ricerca va avanti.

### Rotiferi

Gli appartenenti al Phylum Rotifera sono organismi multicellulari di dimensioni microscopiche (raramente superano un millimetro di lunghezza), principalmente di acque dolci, meno diffusi in acque marine. Alcune specie vivono negli ambienti umidi dei muschi e dei licheni, oppure come parassiti di animali e piante. Hanno la capacità di incistarsi allorchè l'acqua nel loro ambiente viene a mancare, come potrebbe avvenire nella stagione secca in muschi e licheni, per poi "rifiore" non appena la condizione ambientale ritorna ad essere favorevole nella stagione umida. Le specie che vivono in acqua sono per la maggior parte bentoniche (che vivono sul fondo), o addirittura sessili (che sono permanentemente fisse al substrato), ma ne esistono anche di planctoniche che nuotano in acqua libera. Il corpo, suddiviso in capo, tronco e piede, seppur di minuscole dimensioni è costituito da un migliaio di cellule che compongono un'anatomia complessa fatta di vari organi (cervello, bocca, occhi, faringe, stomaco, intestino, ecc.), come illustrato schematicamente nella **figura 34A**.

I rotiferi devono il loro nome alla corona situata sul capo e composta da cilia che circondano la bocca

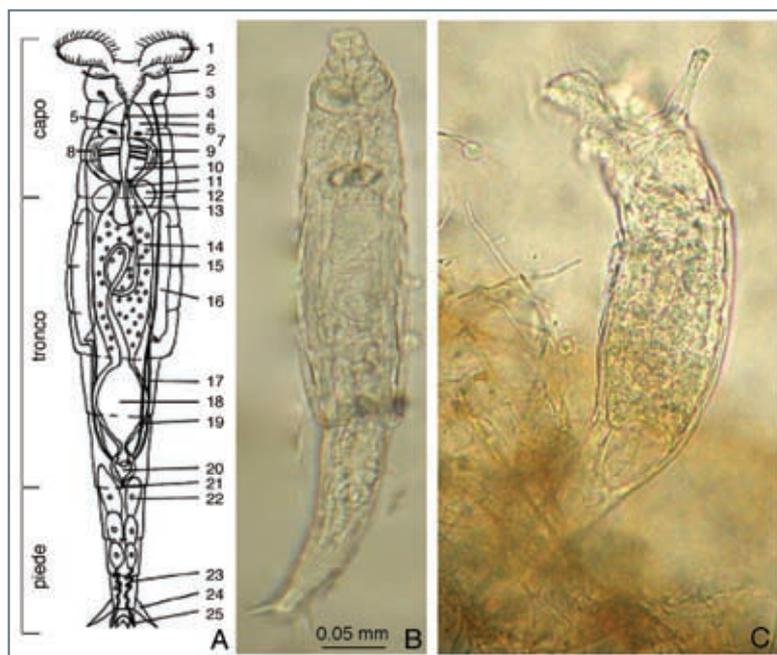
e che, in movimento, ha appunto l'aspetto di una ruota. Essa crea una corrente che spinge le particelle alimentari in una faringe filtratrice. Oltre ad avere la funzione di bocca, la corona ha anche funzione locomotoria e può essere retrattile. Nonostante abbiano i due sessi differenziati, nella maggior parte delle specie la riproduzione avviene per *partenogenesi* (dal greco *partenos* = vergine, e *genesis* = nascita), ovvero riproduzione verginale tanto che in alcune specie i maschi, di solito molto più piccoli e meno numerosi delle femmine, non sono stati mai individuati. In pratica nella partenogenesi lo sviluppo dell'uovo avviene senza che questo sia stato fecondato.

Esistono circa 2.200 specie di rotiferi fin ora conosciute nel mondo, ripartite in sole tre classi: Monogononta, Seisonidea e Bdelloidea. Esemplari appartenenti a quest'ultima classe sono stati rinvenuti nelle acque del Pozzo dei Cristalli e osservati nel mesocosmo di Coldigioco (figure 34B, C). Il corpo di questi piccoli animali presenta un rivestimento cuticolare suddiviso in anelli parzialmente retroflettibili uno nell'altro a mo' di cannocchiale tascabile

permettendo all'animale di contrarsi e allungarsi fino a raggiungere una lunghezza massima di mezzo millimetro. Sembra che i bdelloidei si riproducano esclusivamente per partenogenesi in quanto i maschi non sono stati mai trovati. Nel mesocosmo ne sono stati osservati diversi esemplari aggrappati con il piede al substrato nell'intricato intreccio filamento della colonia batterica, e protratti verso l'esterno con il corpo telescopico allungato al massimo. Spinti dall'azione rotatoria della corona, piccola e retrattile, filtrano in continuazione il cibo. In un esemplare osservato *in vivo* al microscopio è stata notata la presenza di una sorta di antenna sporgente dal capo e culminante con una piccola corona ciliata, anche questa retrattile. Se disturbati, gli animali si contraggono con uno scatto quasi a nascondersi tra i filamenti batterici per poi riallungarsi cautamente a pericolo finito.

A differenza di altri organismi, i rotiferi non si preservano adeguatamente in etanolo. Al contatto con l'alcol si contraggono diventando delle palline minuscole e irriconoscibili. La prof.ssa Claudia Ricci dell'Università di Milano, biologa specialista in rotiferi, si è gentilmente offerta di condurre

**FIGURA 34** - A) Schema anatomico di un rotifero bdellario del genere *Rotaria*: 1, disco trochiale; 2, cingolo; 3, profonephidium; 4, bocca; 5, tubo boccale; 6, cervello; 7, occhio; 8, faringe; 9, muscoli; 10, mastax; 11, esofago; 12, ghiandola gastrica; 13, ghiandola salivare; 14, stomaco; 15, lumen dello stomaco; 16, germo-vitellogemaco; 17, ovidotto; 18, intestino; 19, dotto nefridiale; 20, cloaca; 21, ano; 22, ghiandola pedale; 23, dotto della ghiandola pedale; 24, rostro; 25, piede. B) microfotografia *in vitro* di *Rotaria laticeps* rinvenuta nelle acque sulfidiche del Pozzo dei Cristalli; C) un altro esemplare di *Rotaria laticeps* del Pozzo dei Cristalli, allevata in mesocosmo e fotografata *in vivo*. Si noti il piede ancorato ad un ammasso batterico e l'antenna ciliata che sporge dal lato destro del capo. Foto di A. Montanari.



un primo studio conoscitivo su i nostri animaletti ed in un campione di esemplari vivi inviatole per courier express ha potuto riconoscere subito una sola specie attribuita a *Rotaria laticeps*. Questa specie è comune in ambienti esterni come pozze d'acqua, acquitrini, laghi, dove si ciba esclusivamente di microalghe. La nostra rotaria di grotta è diafana, cioè priva della pigmentazione rossastra che caratterizza la specie in ambienti acquatici esterni, ma conserva ancora gli occhi. Ciò farebbe pensare che l'animale sia entrato in grotta adattandosi ad una dieta batterica che probabilmente gli ha fatto perdere la tipica pigmentazione rossa. D'altro canto, la presenza di macchie oculari fa pensare che questa intrusione sia piuttosto recente. È possibile che le acque del Pozzo dei Cristalli siano state contaminate dagli stessi speleologi che visitano questa parte di grotta da più di mezzo secolo. Bisogna ricordare poi che i bdelloidi sono ottimi colonizzatori di ambien-

ti criptici o anche estremofili. Possono incistarsi ed essere trasportati in uno stato di vita latente detto *dormienza*, ed essendo partenogenici, non hanno bisogno di tutto quel complesso rituale di accoppiamento sessuato per riprodursi. Si tratterà ora di cercare la nostra rotaria in altre parti della grotta, possibilmente incontaminate e distanti dall'ingresso naturale, e capire se l'animale sia un effettivo e permanente abitatore del mondo sotterraneo e che ruolo ecologico abbia in esso.

### Molluschi

Il phylum dei Mollusca (i molluschi) sono rappresentati da un gran numero di animali invertebrati dal corpo molle (da cui il nome del phylum), sia terricoli che acquatici, continentali o marini, con o senza guscio. È il secondo phylum per grandezza del regno animale contando più di 110.000 specie dalle più svariate forme; sep-

TABELLA 3 - Specie di gasteropodi rinvenuti a Frasassi.

Tabella 3 - Specie di gasteropodi rinvenute a Frasassi

data	Sorgente Solfurea	Lago Verde	Pozzo dei Cristalli	Lago Stratificato	Lago Bianco	Lago delle Anguille	Lago Infinito	Lago Claudia
09/05/1983	<i>Bythinella cf. opaca</i> <i>Islamia sp. 2</i> <i>Haltia acuta</i> <i>Radix peregra</i>							
07/08/2005						<i>Islamia sp. 2</i>		
04/06/2006	<i>P. antipodarum</i> <i>Haltia acuta</i>	<i>P. antipodarum</i> <i>Haltia acuta</i>						
09/06/2006	<i>Islamia sp. 2</i> <i>P. antipodarum</i>				<i>Islamia sp. 2</i>		<i>Islamia sp. 2</i>	
21/12/2006	<i>P. antipodarum</i> <i>Haltia acuta</i>	<i>Islamia sp. 2</i> <i>P. antipodarum</i>						
06/04/2007	<i>P. antipodarum</i> <i>Ancylus fluviatilis</i>	<i>Islamia sp. 2</i>		<i>Islamia sp. 2</i>	<i>Islamia sp. 2</i>			
27/06/2007	<i>Bythinella cf. opaca</i> <i>P. antipodarum</i> <i>Ancylus fluviatilis</i> <i>Galba truncatula</i> <i>Haltia acuta</i> <i>Gyraulus albus</i> <i>Pisidium casertanum</i> <i>Pisidium personatum</i> <i>Pisidium subtruncatum</i>	<i>Islamia sp. 2</i>			<i>Islamia sp. 2</i>			
04/07/2008								<i>Islamia sp. 2</i>
21/10/2009			<i>Islamia sp. 2</i>					

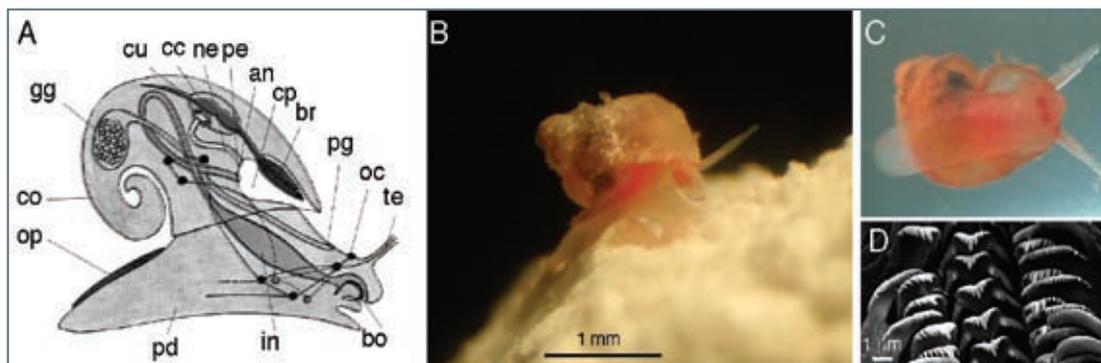
ambiente esterno
  ambiente ipogeo
  non campionato
 esemplari vivi

pie, polipi, calamari, lumache, vongole, e patelle sono tutti molluschi. Delle otto classi oggi riconosciute nel phylum dei molluschi solo i Bivalvia (i bivalvi) ed i Gastropoda (i gasteropodi) hanno rappresentanti in acque dolci e di questi solo i gasteropodi sono rappresentati da due specie fin ora riscontrate nell'ambiente ipogeo di Frasassi. Una di queste specie è dominante nell'ambiente stigobitico di Frasassi ed era stata identificata come *Islamia pusilla* da Galdenzi e Sarbu (2000) e Sarbu et al. (2000). Con il procedere degli studi si è constatato che il genere *Islamia* è molto più diffuso e differenziato nell'area mediterranea rispetto a quanto presunto, e comprende molte specie assegnate in precedenza a differenti generi (Bodon et al., 2001). Come parte del nostro progetto di ricerca, abbiamo effettuato numerose campionature di sedimento nei laghi ipogei della Grotta del Fiume (Lago Verde, L. Stratificato, L. Blanco, L. Claudia, Pozzo dei Cristalli e L. Infinito), nonché alla Sorgente Solfurea sulla riva destra del Fiume Sentino. I campioni, immersi *in situ* in etanolo concentrato al 75% vol. sono stati inviati al dr. Marco Bodon dell'Università di Siena per un approfondito studio di riconoscimento tassonomico e definizione anatomica, in collaborazione con il dr. Simone Cianfanelli del Museo di Storia Naturale di Firenze. Una sintesi sulla presenza e distribuzione dei gasteropodi nel Fiume Sentino e nei vari specchi d'acqua del complesso ipogeo di Frasassi nel corso degli anni è riportata in **tabella 3**.

Il Bodon ci spiega che gli ambienti sulfidici e non del Fiume Sentino e del complesso carsico di Frasassi non presentano una ricca popolazione (*taxocenosi*) a molluschi. Tuttavia l'ambiente acquatico ipogeo è colonizzato da questo piccolo e peculiare esponente della famiglia delle Hygrobiiidae (ordine dei Sorbeoconcha) con conchiglia valvatiforme, appartenente al genere *Islamia*. Proponiamo subito in **figura 35A-D** un modello anatomico di un gasteropode assieme ad alcune belle immagini del nostro piccolo mollusco originariamente campionato al Lago Claudia e da qualche anno allevato nel mesocosmo di Coldigioco. Sono immagini uniche in quanto mai fino ad ora questo microgasteropode era stato fotografato dal vivo con tale definizione. Saranno di aiuto per relazionare la narrativa su ciò che abbiamo appreso dallo studio specialistico dei gasteropodi di Frasassi.

Il genere *Islamia*, diffuso in vari paesi del sud Europa e dell'area mediterranea, conta parecchie specie, di cui otto presenti in Italia, distinguibili con sicurezza solo attraverso l'esame anatomico degli apparati genitali. Alcune di esse appartengono a nuove entità non ancora formalmente istituite, ma citate e descritte nella letteratura scientifica sotto il nome provvisorio di *Islamia* sp. 2 (Giusti et al., 1981; Bodon & Cianfanelli, 2002). La nostra lumachina stigobitica di Frasassi sarebbe proprio questa nuova specie, non corrisponderebbe dunque all'*Islamia pusilla* citata da Sarbu e Galdenzi (2000). L'*Islamia* sp. 2 è una specie di

**FIGURA 35** - A) Schema anatomico di un gasteropode: bo, bocca con radula; te, tentacolo; oc, occhio; pg, poro genitale; br, branchia; cp, cavità palleale; an, ano; pe, poro escretore; ne, nefridio; cc, celoma pericardico; cu, cuore; gg, ghiandola genitale; co, conchiglia; op, opercolo; in, intestino; pd, piede. Da De Agostini, 1968; B) veduta laterale e C) ventrale di un esemplare di *Islamia* sp. 2 ripreso *in vivo* nel mesocosmo di Coldigioco; si noti la peluria batterica che ricopre il guscio. Foto di A. Montanari; D) immagine al microscopio a scansione elettronica (SEM) della radula dell'*Islamia* sp. 2. Foto di M. Bodon.



piccole dimensioni, creno-stigobitica, vivente cioè in acque sorgive o sotterranee, e endemica dell'Italia centrale. Rispetto alle altre specie congeneriche italiane, possiede una conchiglia un poco variabile ma più grande e più robusta, decisamente conica, alta da circa 1 a circa 2 mm al massimo. È nota solo in poche stazioni campionate, per lo più sorgenti o grotte con acque debolmente sulfidiche delle Marche (Grotte di Frasassi, appunto), Lazio e Umbria (Bodon et al., 2005). Al Lago Claudia nella Grotta Grande del Vento, nel Lago Blanco e in alcuni specchi d'acqua in fondo al Pozzo dei Cristalli della Grotta del Fiume, sono stati trovati numerosi esemplari viventi di questa specie.

La degenerazione o assenza dell'apparato visivo (*anoftalmia*) ed un'apparente depigmentazione fanno supporre un lungo periodo di isolamento e di adattamento all'habitat sotterraneo. La specie non è però esclusiva degli ambienti ipogei in quanto altre popolazioni che vivono in sorgenti sono anch'esse scarsamente pigmentate e oculate. Come molti altri idrobiidi, la possibilità di cibarsi non esclusivamente del film algale ha dato loro la possibilità di colonizzare le acque sotterranee laddove, ovviamente, potesse esistere una biomassa batterica autotrofa, come appunto è il caso del complesso carsico sulfidico di Frasassi.

Nella Sorgente Solfurea sul Fiume Sentino, dove in un campione raccolto nel 1983 questa specie era presente, oggi non è stata più ritrovata, mentre negli ultimi anni si è insediato un altro idrobiide, *Potamopyrgus antipodarum* Gray 1843, che presenta una conchiglia conica allungata di 3,4-6,5 mm di altezza, talvolta provvista di una carena. Si tratta di una specie aliena originaria della Nuova Zelanda (a cui si riferisce il nome specifico *antipodarum* = degli antipodi) che, introdotta in Italia nel 1961, ha avuto, negli ultimi decenni, un'esplosione demografica in quasi tutto il Paese, colonizzando sorgenti, ruscelli e torrenti e assumendo il ruolo di una

vera e propria specie invasiva (Favilli et al., 1998; Cianfanelli et al., 2007). A volte, soprattutto nei primi anni dopo la sua comparsa, grazie alla sua adattabilità a variazioni ambientali (temperatura, acidità, tipo di cibo) e alla possibilità di riprodursi per *partenogenesi*, anche detta riproduzione unisessuale (tipica degli esseri ermafroditi), forma popolazioni densissime, di molte migliaia di esemplari per metro quadrato, entrando in competizione con molti altri molluschi di acque dolci. Ebbene, le sponde del Fiume Sentino a Frasassi sono letteralmente invase da questa specie aliena. Questo idrobiide non ha ancora invaso gli ambienti ipogei del complesso carsico di Frasassi, ad eccezione del Lago Verde, dove, per ora, sono stati rinvenuti solo un paio di esemplari, ma la sua potenzialità nel colonizzare anche habitat peculiari, come acque termali o sotterranee, potrebbe mettere a serio rischio l'esistenza dei molluschi endemici, nel nostro caso la piccola *Islamia* sp. 2.

Una sola conchiglia di un'altra specie aliena introdotta in Italia alla fine del 1800, *Haitia acuta*, è stata trovata in un campione di sedimento del Lago Verde, ma non vi sono prove certe che essa viva nel complesso sotterraneo, in quanto la sua presenza potrebbe derivare da contaminazione con materiale esterno. Infatti, il Lago Verde, trovandosi a poca distanza dall'entrata naturale della Grotta del Fiume ed essendo facilmente raggiungibile anche da uno speleologo improvvisato ed inesperto, presenta chiari segni di contaminazione dall'esterno, come rami d'albero, pezzi di legno e fogliame. *Haitia acuta* è ampiamente diffusa nelle acque superficiali di tutta Italia (Cianfanelli et al., 2007), ed è distinguibile per la conchiglia sinistrorsa, di forma ovata.

Altre specie acquatiche sono state raccolte nei sedimenti della Sorgente Solfurea sulla riva destra del Fiume Sentino (**tabella 3**). Anche in questo caso si tratta solo di conchiglie vuote, con tutta probabilità provenienti dai

sedimenti alluvionali depositatisi durante le piene del corso d'acqua, i cui resti non indicano, perciò, l'esistenza di popolazioni viventi nelle acque della sorgente, tranne appunto l'aliena *Potamopyrgus antipodarum*.

Dopo aver individuato una ricca popolazione di *Islamia* sp. 2 al Lago Claudia nel luglio 2008, abbiamo allestito un mesocosmo all'Osservatorio Geologico di Coldigioco con una quindicina di esemplari di questo piccolo gasteropode per osservarli dal vivo a capirne un po' di più sulla biologia, i comportamenti e le abitudini trofiche di questa nuova specie. L'animale è così piccolo che difficilmente può essere studiato dal vivo nel suo ambiente naturale di grotta. C'è da dire che nel piccolo specchio d'acqua del Lago Claudia, nella parte più interna della Grotta Grande del Vento, a più di un chilometro dall'uscita naturale della grotta, questi molluschi sono numerosi e principalmente concentrati su rocce a pochi centimetri di profondità lungo la riva del lago.

Ne sono stati trovati molti anche nascosti sotto le rocce ma sempre nello strato ossigenato superficiale d'acqua carbonatica laddove, più in profondità, esiste uno strato di acqua sulfidica. Lo stesso dicasi per il Lago della Bottiglia in fondo al Pozzo dei Cristalli, un piccolo specchio d'acqua a forma di pozzo, profondo e stratificato, dove il nostro piccolo gasteropode si concentra sui bordi rocciosi e quasi verticali del lago, nello strato d'acqua carbonatica superficiale.

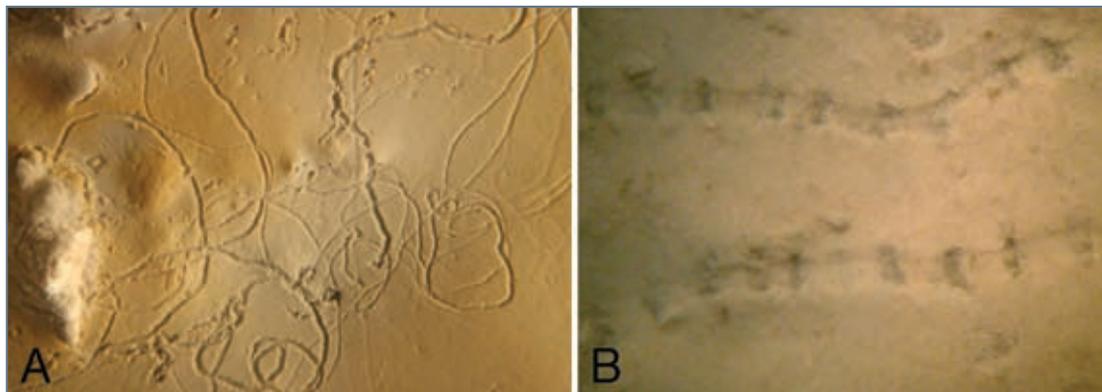
Questa preferenza di locazione è

stata notata anche nel mesocosmo: i molluschi sembrano preferire strisciare sulle rocce oppure sul vetro dell'acquario al di sopra dalla zona sulfidica e raramente vagano sul fondale melmoso. Quando lo fanno, disegnano delle tracce a ghirigori che, da vicino, mostrano impronte simili a quelle lasciate dai cingoli di un trattore (**figura 36A, B**). Probabilmente questo comportamento è legato all'ubicazione del cibo che, in questi ambienti ipogei sulfidici, è costituito dai solfobatteri. Il gasteropode bruca mentre striscia ad una velocità cronometrata su vetro di ben 10 millimetri al minuto.

Usando la *radula* per brucare (l'apparato masticatorio dei gasteropodi simile ad una grattugia; vedi **figura 35D**) è probabile che la nostra *Islamia* preferisca mangiare laddove il film batterico copre superfici dure e/o lisce, evitando così di ingerire sedimento microgranulare che disturberebbe la masticazione. Nel mesocosmo si è anche notato che il guscio di questo gasteropode è ricoperto da una specie di peluria costituita da un film batterico. Addirittura si è più volte osservato un animale brucare sul guscio di un consimile.

Come abbiamo notato nei vermi clitellati sopradescritti, anche i nostri piccoli gasteropodi contengono emoglobina nel loro corpo. Il piede è fatto di un tessuto muscolare pressoché trasparente, come pure i tentacoli ma la parte interna del corpo molle ha una visibile colorazione rossa che traspare attraverso il sottile guscio calcareo (**figure 35B, C**).

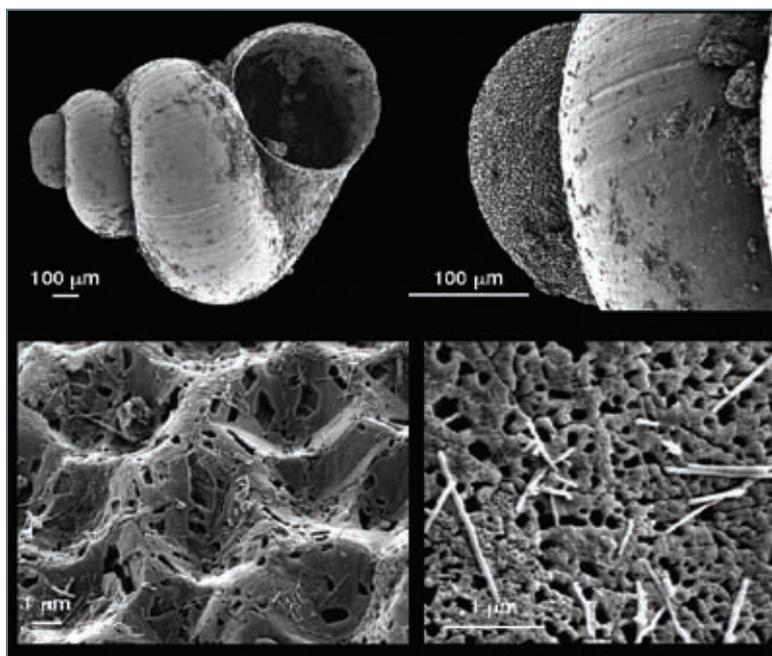
**FIGURA 36** - A) Tracce a ghirigori di *Islamia* sp. 2 sul sedimento melmoso del mesocosmo di Coldigioco; B) particolare delle tracce.  
Foto di A. Montanari.



Osservando il mesocosmo regolarmente tutti i giorni per diversi mesi, si è notato un altro comportamento strano ma interessante: i nostri micro-gasteropodi spesso galleggiano. Si attaccano con il piede sul pelo dell'acqua con l'apice della conchiglia rivolta verso il basso e rimangono così sospesi per lunghi periodi fino a che, spontaneamente, si lasciano andare e vanno a fondo. Non rimangono sul fondo anossico a lungo ma strisciano rapidamente (si fa per dire) fino a raggiungere le pareti di vetro dell'acquario oppure una pila di sassi per risalire verso la superficie. In alcuni casi si sono visti due animali appaiati, l'uno che sembrava brucare sul guscio dell'altro mentre erano sospesi sotto il pelo dell'acqua. Non sono stati mai osservati uscire dall'acqua. È possibile che questo comportamento sia dovuto alla ricerca di una migliore respirazione nella zona superficiale e più ossigenata del mesocosmo immediatamente sotto l'interfaccia tra acqua e atmosfera.

L'osservazione al microscopio a scansione elettronica (SEM) di alcuni gusci rinvenuti tra i resti di anguille microfossili della Grotta del Fiume ha rilevato alcuni particolari di questo

piccolo gasteropode che vale la pena di descrivere (**figura 37A-D**). Innanzitutto la *protoconca*, ovvero la spira apicale del guscio, presenta una microcultura malleata che è un carattere comune in quasi tutti gli idrobiidi (**figura 37B**). Tra le malleazioni si nota la presenza di un gran numero di pori (**figura 37C**), un particolare anch'esso comune a molti idrobiidi ma di cui si ignora la funzione. Si può ipotizzare che i pori possano servire per una migliore traspirazione che aiuterebbe l'animale a meglio sfruttare il poco ossigeno disponibile in acque stagnanti, ma questa ipotesi rimane tale fino ad una non facile verifica. La cosa più interessante che emerge da queste immagini SEM ad alta risoluzione è che cosparsi sul guscio di questi animali ci sono un gran numero di corpi bacilliformi assomiglianti a degli stecchini lunghi al massimo due millesimi di millimetro (**figura 37D**). I bacilli potrebbero essere i resti del presunto biofilm batterico che ricopre il guscio di questi gasteropodi stigobionti, e potrebbero rappresentare un interessante caso di simbiosi. Per verificare questa ipotesi, Sharmishtha Dattagupta si è impegnata ad analizzare, nel suo laboratorio di Göttingen,



**FIGURA 37** - Immagini al microscopio a scansione elettronica (SEM) di un guscio di *Islamia* sp. 2 rinvenuto tra i resti subfossili di un'anguilla del Lago delle Anguille con un'età determinata al radiocarbonio-14 di 7.600 anni (Mariani et al., 2007): A) guscio intero con le caratteristiche 4 spire sinistrorse; B) la protoconca; C) tessitura porosa e malleata della protoconca; D) corpi bacilliformi micrometrici sparsi sul guscio. Immagini SEM di H. Vonhof.

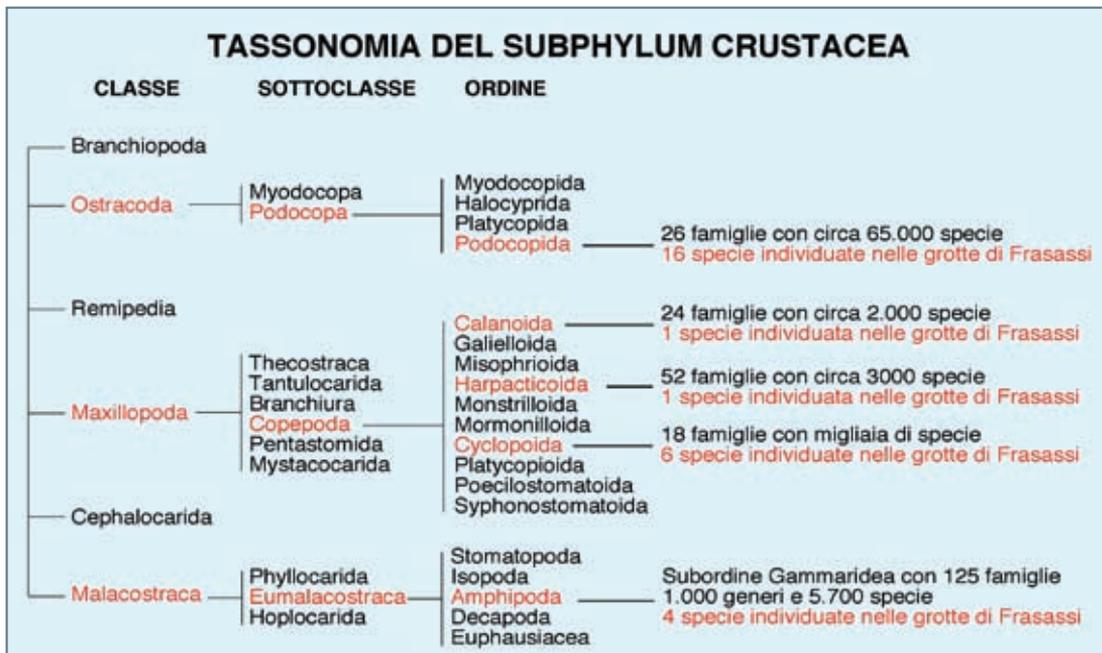
la componente genetica di questa peluria nonché il contenuto intestinale di alcuni esemplari di *Islamia* sp. 2 per vedere se effettivamente esiste un rapporto trofico e simbiotico tra il gasteropode ed i batteri come già verificato nel caso degli anfipodi stigobionti di Frasassi (Dattagupta et al., 2009).

**Artropodi**

Il phylum degli Arthropoda (dal greco antico *arthron* = articolazione e *podos* = piede) comprende tutti quegli animali invertebrati che hanno arti snodati ed un corpo segmentato (capo, torace e addome) coperto da un esoscheletro chitinoso che viene periodicamente rigenerato in un processo detto *muta*. Gli artropodi sono per la stragrande maggioranza eterofroditi e si riproducono dunque per accoppiamento sessuato. Il phylum è il più ricco di specie di tutto il regno animale ed è rappresentato dalle più svariate forme di organismi adattati a vivere in tutti gli ambienti del nostro pianeta, sia acquatici che terrestri, di acque dolci o salmastre, oppure marine e addirittura ipersaline. Nella vecchia nomenclatura tassonomica

venivano suddivisi in quattro classi principali: Crustacea (dotati di esoscheletro duro come granchi e aragoste), Myriapoda (con tante zampe come i centopiedi), Aracnidi (i ragni), ed Insecta (gli insetti). Nella moderna nomenclatura, la classe dei Crustacea è stata promossa al rango tassonomico di subphylum con la distinzione di sei classi rappresentate principalmente da animali acquatici: Branchiopoda (le pulci d'acqua), Remipedia (piccoli crostacei che vivono in acque interstiziali salate), Cephalocarida (piccoli crostacei di mare profondo) Ostracoda (con guscio calcareo bivalve), Maxillopoda comprendente, fra altre, la sottoclasse dei Copepoda (piccoli organismi submillimetrici con lunghe antenne) e Malacrostata (gamberi, granchi, aragoste, il krill dei mari freddi, le cavallette di spiaggia, ed anche i cosiddetti porcellini di Sant'Antonio). Tre di queste sei classi sono rappresentate nell'ambiente stigobitico di Frasassi: gli ostracodi con 16 specie diverse riconosciute, i maxillopedi rappresentati dai copepodi con 8 specie fin ora riconosciute, ed i malacrostacei rappresentati dagli anfipodi con quattro species del genere *Niphargus* (figura 38). Possiamo

**FIGURA 38** - Classi, sottoclassi e ordini del subphylum dei crostacei. In rosso i taxa presenti nelle Grotte di Frasassi.



dire che i crostacei sono gli animali acquatici dominanti e più evoluti nelle grotte di Frasassi.

### Ostracodi

Gli ostracodi sono piccoli crostacei con dimensioni dell'ordine di pochi decimi di millimetro, raramente superiori al millimetro, racchiusi in un guscio bivalve fatto di calcite. Il nome deriva dal greco antico *ostrakon* che significa guscio, conchiglia. Per il fatto di avere un guscio calcareo che si preserva bene nei sedimenti, gli ostracodi rivestono un certo interesse paleontologico e stratigrafico in quanto presenti come fossili nelle rocce sedimentarie sin dal Periodo Cambriano (580 milioni di anni fa), e sono rappresentati in tutti i continenti e gli oceani da un gran numero di ordini, generi e specie (figura 38). Vivono in tutti gli ambienti acquatici, sia marini che continentali, in acque dolci (sia fluviali che lacustri), termali, salmastre, salate, ipersaline, variamente ossigenate e a tutte le profondità.

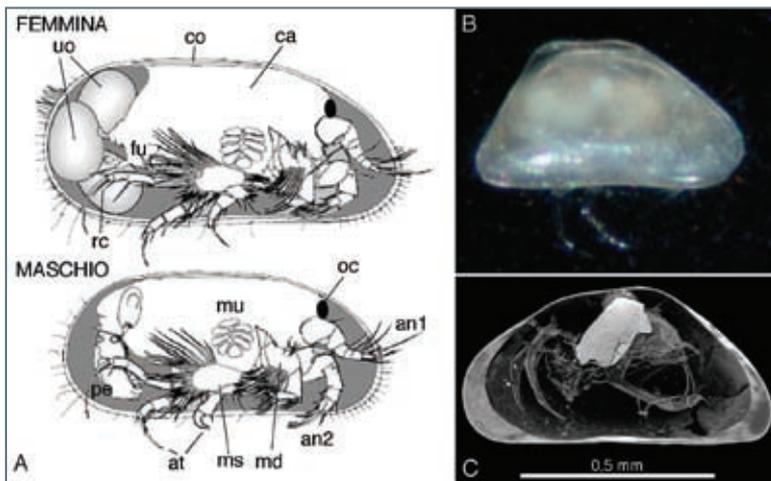
A chi non ne abbia mai visto uno è difficile descrivere un ostracode. Per analogia, se un'aragosta o un granchio è un soldato che indossa un'armatura, l'ostracode è un commilitone che se ne sta dentro un carro armato (figura 39A-D). L'anatomia interna è complessa trattandosi di organismi eucarioti multicellulari piuttosto evoluti. Sono eterofroditi ma non

presentano uno spiccato dimorfismo: le femmine, portatrici di uova, sono più o meno della stessa grandezza dei maschi. Sono tipicamente vegetariani e negli habitat fotosintetici si nutrono prevalentemente di alghe, ma non disdegnano brucare tappeti batterici che, senza dubbio, costituiscono il cibo per le specie che si sono adattate negli ambienti ipogei sulfidici delle Grotte di Frasassi.

Gusci di ostracodi sono stati trovati tra i resti sub-fossili di anguille nel ramo del New Mexico, nella parte più meridionale ed interna della Grotta del Fiume (Mariani et al., 2007). Gli ostracodi non erano mai stati segnalati prima nel complesso carsico di Frasassi. Esistono alcuni studi dettagliati su questi crostacei che si sono adattati in grotte marine, dove hanno sviluppato delle interazioni ecologiche complesse con la flora e la fauna circostante. Altre specie di ostracodi sono state rinvenute in pozzi d'acqua dolce. Studi sugli ostracodi in complessi carsici sono rari e certamente richiederebbero ulteriori investigazioni. Purtroppo gli ostracodi sono frequentemente ignorati o scarsamente considerati nella letteratura ecologica e in studi interdisciplinari, nonostante che la loro partecipazione ed importanza nei più svariati ecosistemi sia ampiamente riconosciuta in ostracodologia.

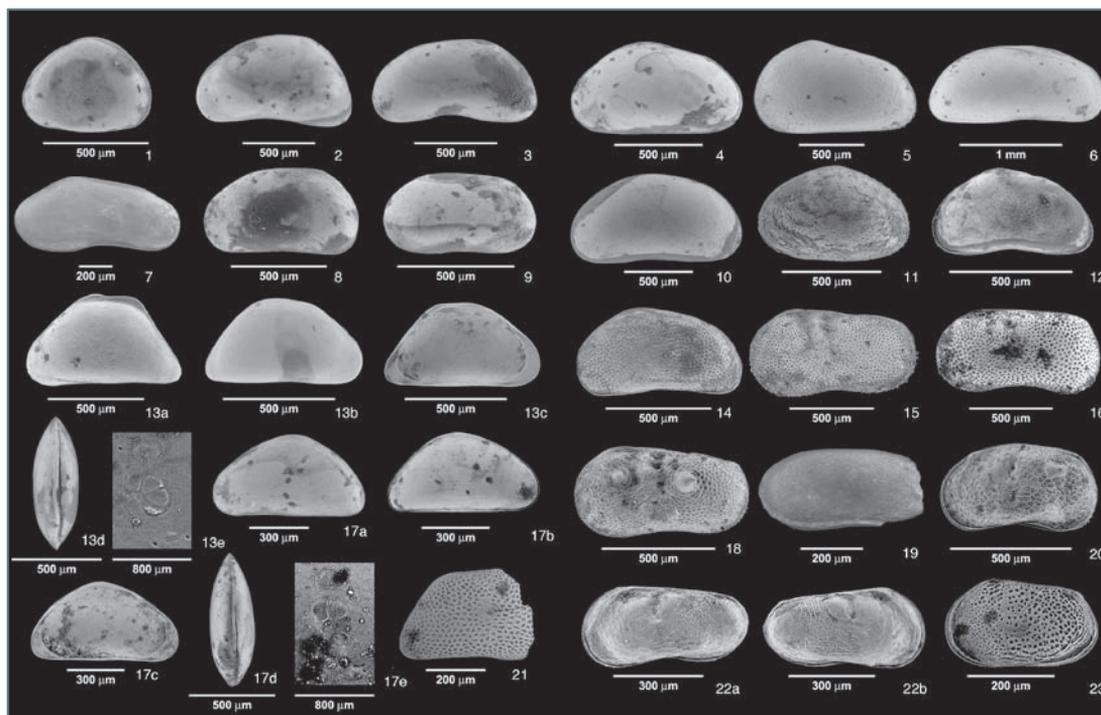
Tra il 2006 ed il 2009, abbiamo eseguito una campionatura siste-

**FIGURA 39** - A) Schema anatomico di ostracode (maschio e femmina): uo, uova; co, conchiglia; ca, carapace; rc, rostro caudale; mu, muscolo; oc, occhio; pe, pene; at, arti; ms, mascella; md, mandibola; an1 e an2, antenne (da varie fonti); B) microfotografia *in vivo* di un esemplare della nuova specie *Mixtacandona cavernicola* rinvenuta nel Lago Claudia. Si notino gli arti che fuoriescono dal guscio socchiuso. Foto di A. Montanari; C) la nuova specie *Pseudocandona frasassiensis* rinvenuta nella Sorgente Sulfurea di Frasassi. Immagini SEM di D. Peterson.



matica di sedimenti in vari laghi della Grotta del Fiume, nonché della Sorgente Solfurea di Frasassi, che hanno prodotto un gran numero di gusci di ostracodi rappresentanti in tutto 28 specie diverse. La straordinaria varietà di forme degli ostracodi di Frasassi è ben esibita nella **figura 40** cortesemente fornitaci in prima visione da Dawn Peterson dell'Università di Berkeley. La campionatura diffusa e ripetuta nei vari siti di Frasassi, partendo dal Fiume Sentino e addentrandosi nella grotta verso siti sempre più remoti, permette di visualizzare la distribuzione di queste specie e di

avanzare delle ipotesi circa la loro storia biologica. Nella **tabella 4** si vede quanto gli ostracodi siano differenziati ed abbondanti nelle pozze d'acqua sulfidica nei paraggi della Sorgente Solfurea dove 27 delle 28 specie riconosciute sono rappresentate da gusci accuratamente diagnosticati dalla Peterson. Le specie dominanti sono *Prionocypris zenkeri* e *Herpetocypris chevreuxi*, ma ce ne sono altre ancora ben rappresentate da decine o centinaia di gusci diagnosticati, tra cui la nuova specie *Pseudolimnocythere frassasiensis*, mentre altre sono rappresentate solo da alcuni



**FIGURA 40** - Principali specie di ostracodi identificate a Frasassi da Peterson et al. (2009); la barra di scala è equivalente ad una lunghezza di 100 µm (un decimo di millimetro); vs = valva sinistra; vd = valva destra; vle = veduta laterale esterna. 1. *Cypria reptans* (Bronshstein 1928), vs, vle; 2. *Candona candida* (Müller 1776), vs, vle; 3. *Candona neglecta* (G. O. Sars 1887), vs, vle; 4. *Pseudocandona* sp., valva destra (vd) danneggiata; 5. *Heterocypris salina* (Brady 1868), vs, vle; 6. *Prionocypris zenkeri* (Chyzer & Toth 1858), vs, vle; 7. *Fabaeformiscandona fabaeformis* (Fischer 1851), vd, vle; 8. *Pseudocandona albicans* (Brady 1864), vs, vle; 9. *Pseudocandona parallela* (G. W. Müller 1900), vs, vle; 10. *Herpetocypris chevreuxi* (Sars 1896), vs, vle; 11. *Psychrodromus olivaceus* (Brady & Norman 1889), vs, vle; 12. *Cypridopsis vidua* (O. F. Müller 1776), vs, vle; 13a. *Mixtacandona cavernicola*, vs femmina, vle; 13b. *Mixtacandona cavernicola*, vd femmina, vle; 13c. *Mixtacandona cavernicola*, vs, vle; 13d. *Mixtacandona cavernicola*, veduta dorsale; 13e. *Mixtacandona cavernicola*, impronte dei muscoli abduttori; 14. *Potamocypris fulva* (Brady 1868), vd, vle; 15. *Potamocypris zschokkei* (Kaufmann, 1900), vd, vle; 16. *Ilyocypris bradyi* (Sars 1890), vd, vle; 17a. *Pseudocandona frassasiensis*, vs, vle; 17b. *Pseudocandona frassasiensis*, vd, vle; 17c. *Pseudocandona frassasiensis*, vs, veduta interna; 17d. *Pseudocandona frassasiensis*, veduta dorsale; 17e. *Pseudocandona frassasiensis*, impronte dei muscoli abduttori; 18. *Ilyocypris gibba* (Ramdohr 1808), vs, vle; 19. *Ilyocypris monstifica* (Norman 1962), vs, vle; 20. *Vestalenula* cf. *V. boteai* (Danielpol 1970), vd, vle; 21. frammento di *Pseudocandona* sp., vs, vle; 22a. *Paralimnocythere* sp., vs., vle; 22b. *Paralimnocythere* sp., vd., vle; 23. *Pseudolimnocythere phreatamicus*, vd, vle. Immagini SEM di D. Peterson.

gusci. In tutto, 6 specie di ostracodi, la maggior parte rappresentate solo da pochi gusci, non sono state rinvenute in nessuno dei siti campionati in grotta né in pozze d'acqua non sulfidiche campionate lungo il greto del Fiume Sentino. Ciò suggerisce che queste specie non amino il buio probabilmente perché si nutrono esclusivamente di alghe e quindi non si sono mai adattate a vivere in grotta dove di alghe, per la totale mancanza di luce, non ce ne sono. Tutte le altre specie di ostracodi più o meno abbondanti nella Sorgente Solfurea sono state rinvenute anche in siti ipogei (**vedi tabella 4**), in particolare al Lago Verde. Questo piccolo specchio d'acqua si trova non lontano dall'ingresso naturale della Grotta del Fiume, a meno di 200 metri dalla Sorgente Solfurea.

Come già si è detto in precedenza parlando di gasteropodi, il Lago Verde presenta dei problemi di contaminazione dall'esterno. È possibile che sia stato alluvionato da qualche recente piena del Fiume Sentino se si considera che l'ingresso naturale della grotta si trova a meno di tre metri sopra il livello estivo del fiume. Quindi le specie di ostracodi qui rinvenute, come le specie di gasteropodi fluviali descritte nel precedente capitolo (**vedi tabella 3**), possono rappresentare degli intrusi involontari e non dei veri e propri stigobionti endemici.

Delle specie di ostracodi rinvenute nella Sorgente Solfurea ce ne sono tre particolarmente abbondanti in laghi ipogei, anzi nei laghi più interni del sistema carsico di Frasassi: la *Pseudolimnocythere phreatamicus* (nuova specie), la *Fabaeformiscandona fabaeformis*, e la *Mixtacandona cavernicola* (nuova specie). Dei 1160 esemplari di *Pseudolimnocythere phreatamicus* rinvenuti durante questa ricerca, solo 12 sono stati riscontrati anche all'esterno, 9 nella Sorgente Solfurea, e 3 nel Fiume Sentino. Purtroppo ad oggi non sono stati trovati esemplari vivi di questa specie. Ciò fa pensare che la *Pseudolimnocythere phreatamicus* sia una specie che, in passato, si sia adattata a vi-

vere in grotta preferendo l'ambiente ipogeo all'originale ambiente fluviale. Incerta è anche l'interpretazione che si può dare alla *Fabaeformiscandona fabaeformis*. La specie è abbastanza abbondante nella Sorgente Solfurea, sensibilmente meno abbondante nel Fiume Sentino e molto abbondante nei campioni prelevati al Lago Blanco nella parte più interna della Grotta del Fiume. Evidentemente, questa specie non disdegna la luce, ma nemmeno il buio, e probabilmente si accontenta di un nutrimento a base di solfobatteri. Resta il fatto che nessun esemplare vivo di *Fabaeformiscandona fabaeformis* è stato trovato all'interno della grotta. Ciò costituisce il problema maggiore incontrato in questo studio, ovvero che la maggior parte delle specie identificate è rappresentata esclusivamente da valve vuote: l'animale c'era ma nessuno è in casa al momento. Fanno eccezione *Fabaeformiscandona fabaeformis*, *Prionocypris zenkeri*, *Cypridopsis vidua*, *Potamocypris zschokkei*, *Limnocythere inopinata*, la nuova specie *Pseudocandona frasassiensis*, tutte trovate vive solo all'esterno della grotta, una non meglio identificata *Pseudocandona* sp. di cui due esemplari vivi sono stati ritrovati nel Lago Claudia della Grotta Grande del Vento e nella Sorgente Solfurea, *Pseudocandona albicans* di cui un solo esemplare vivo è stato trovato nel Lago Verde e la nuova specie *Mixtacandona cavernicola* che rappresenta l'unica specie di ostracode di cui sono stati trovati diversi esemplari vivi nelle Grotte di Frasassi, nel Lago della Bottiglia in fondo al Pozzo dei Cristalli e nel Lago Claudia. Ma essendo una nuova specie mai vista prima altrove, si sa ancora poco sulla sua bio-fisiologia.

La rarità di esemplari vivi riscontrati in tutti questi anni di ricerca in un gran numero di campioni raccolti in diversi siti porta a pensare che gli ostracodi a Frasassi siano effettivamente rari e che le migliaia di valve vuote rappresentino delle *tanatocenosi* (dal greco *thanatos* = morte e *koinos* = associazione), ovvero l'insie-

me di resti di organismi che vengono rinvenuti morti o allo stato fossile in un sedimento, ma che non sono autoc-toni. Per esempio, gusci di conchiglie varie come mitili e vongole, associati ad ossi di seppia e a carapaci di granchi nella sabbia di una spiaggia rappresentano una tanatocenosi: i resti degli animali che la compongono rappresentano organismi che non vivevano insieme nell'ambiente della spiaggia ma in ambienti diversi e in tempi diversi, poi trasportati e accumulati sulla battigia dalle onde del mare. La

tanatocenosi è l'opposto della *biocenosi*, ovvero l'associazione di resti di organismi che effettivamente vivono insieme in un determinato ambiente in un determinato momento, poi morti e sepolti in loco. È dunque difficile se non impossibile risalire alla biocenosi da una tanatocenosi visto che i gusci vuoti possono rappresentare organismi autoctoni vissuti in tempi diversi oppure materiale alloctono, ovvero rimaneggiato e risedimentato in un luogo diverso dall'origine.

La nuova specie *Mixtacandona*

TABELLA 4  
Ostracodi di Frassasi.

Tabella 4 – Ostracodi di Frassasi

GENERE E SPECIE	SITO CAMPIONATO										TOTALE
	FSS	FSR	LVE	LDB	LST	LTR	LDA	LBL	LIN	LCL	
<i>Vestalenula</i> cf. <i>V. boteai</i> Danielpol 1980							2				2
<b><i>Mixtacandona cavernicola</i> n.sp.</b>	3		36	50/11	7	6	13	383	13	121/5	632
<b><i>Mixtacandona</i> sp. 2</b>	3										3
<b><i>Mixtacandona</i> sp. 3</b>	1										1
<i>Fabaeformiscandona fabaeformis</i> Fischer 1851	299/3	46/8	61		5		5	383		1	800
<i>Candona neglecta</i> Sars 1887	63	11	26		1			1			102
<i>Candona candida</i> Muller 1776	96	31	1								128
<i>Candona</i> sp.	30	2									32
<i>Cryptocandona?</i> sp.	2										2
<i>Pseudocandona</i> sp.	73/1	6	82					1		3/1	165
<i>Pseudocandona paratella</i> Muller 1776	131	39	3		2						175
<i>Pseudocandona albicans</i> Hartwig 1901	45	8	11/1								64
<b><i>Pseudocandona frassasiensis</i> n.sp.</b>	7/2	1									8
<i>Herpetocypris chevreauxi</i> Sars 1896	687	21	36					4			748
<i>Heterocypris salina</i> Brady 1868	99	9	1								109
<i>Prionocypris zenkeri</i> Chyzer & Toth 1858	1541/5	131	7								1679
<i>Cypridopsis vidua</i> Muller 1776	347/4	11	8		1			1			368
<i>Cypria reptans</i> Brohnstein 1928	4	4	5								13
<i>Potamocypris zschokkei</i> Kaufmann 1900	56/2	26									82
<i>Potamocypris fulva</i> Brady 1868	28	9									37
<i>Ilyocypris gibba</i> Ramdohr 1808	60	7									67
<i>Ilyocypris monstiflora</i> Norman 1862	9/3	6									15
<i>Ilyocypris bradyi</i> Sars 1890	6										6
<i>Psychrodromus olivaceus</i> Brady & Norman 1889	193	15	2								210
<i>Limnocythere inopinata</i> Baird 1850	191/10	15	2								208
<b><i>Pseudolimnocythere phreatamicus</i> n.sp.</b>	9	3			2	14	448	176	505	3	1160
<b><i>Paralimnocythere</i> sp.</b>	2										2
<i>Genere e specie non determinati</i>	4										4
<b>TOTALE PER SITO</b>	<b>3986</b>	<b>401</b>	<b>281</b>	<b>50</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>468</b>	<b>949</b>	<b>518</b>	<b>128</b>	<b>6822</b>

## NOTE

Le specie sigobitiche o interstiziali sono indicate in grassetto

I numeri in nero si riferiscono alle valve singole

I numeri in rosso si riferiscono a esemplari trovati vivi

Al Lago delle Anguille sono state trovate solo valve singole tra i resti di anguille subfossili

## SITI CAMPIONATI

Fuori della grotta:

FSS = Frassasi Sorgente Solturea; FSR = Frassasi Fiume Sentino

Siti ipogei, in laghi treatici progressivamente più distanti dall'ingresso naturale:

LVE = L. Verde; LDB = L. della Bottiglia; LST = L. Stratificato; LDA = L. delle Anguille; LBL = L. Bianco; LIN = L. Infinito; LCL = L. Claudia

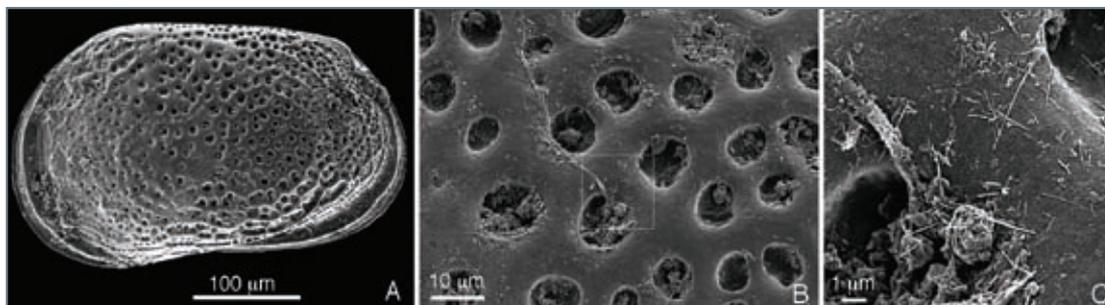
*cavernicola* è certamente endemica della grotta e probabilmente esclusiva di Frasassi. Il fatto di averne trovate frammiste nei resti fossili di anguille vecchie di migliaia di anni, fa supporre che la *Mixtacandona cavernicola* si sia originata da una specie precursore penetrata dall'esterno, adattata a vivere nel buio cibandosi di batteri ed evolvendo in una nuova specie stigobionte. Rimane da spiegare il perché ce ne siano alcune fra i resti organici delle anguille subfossili, ma sono molto più abbondanti nel sedimento del Lago Blanco, uno specchio d'acqua non distante ed in diretta comunicazione con il Lago delle Anguille (vedi mappa nella **figura 2**). Al contrario, la specie *Pseudolimnocythere phreatamicus* è molto abbondante sia nelle anguille subfossili che nel sedimento del Lago Blanco e del Lago Infinito. Una possibile spiegazione è che le anguille in putrefazione avevano sviluppato dei batteri che non piacevano alla *Mixtacandona cavernicola* tanto quanto alla *Pseudolimnocythere phreatamicus* che, secondo questa ipotesi, doveva essere di bocca buona. Lo stesso dicasi per l'altra specie stigobitica trovata in gran numero nel sedimento del Lago Blanco e del Lago Infinito: la *Fabaeformiscandona fabaeformis* (**vedi tabella 4**).

Fino ad ora siamo riusciti ad osservare *in vivo* la *Mixtacandona cavernicola* solo per brevi periodi al microscopio binoculare in un vaso Petri contenente l'acqua originale ed un po' di sedimento del Lago Claudia. Sarebbe praticamente impossibile osservare questi animali nel loro ambiente naturale di grotta essendo così piccoli e rari. Il nostro animaletto

si muove agevolmente tra i microgranuli del sedimento calcareo brucando filamenti batterici ed occasionalmente infilandosi fra i granuli del sedimento. Ogni tanto compie dei brevi salti o fa delle nuotate ma non si dilunga molto a mezz'acqua come invece farebbe un organismo planctonico. È completamente privo di occhi e sia il corpo che il guscio sono *diafani*, ovvero completamente bianchi, privi di un qualsiasi colore. Questa depigmentazione totale rafforza l'ipotesi che la *Mixtacandona cavernicola* sia un genuino stigobionte speciatosi a Frasassi molto tempo fa. Uno studio anatomico eseguito dalla Peterson (s'immagini cosa significhi sezionare un organismo lungo appena mezzo millimetro), ha evidenziato che questo candonide è più piccolo dei congeneri che vivono all'esterno e le femmine portano un basso numero di uova, al massimo quattro. Pare che abbia tempi di gestazione molto lunghi. Pur avendo un corpo con simmetria bilaterale, le valve sono asimmetriche, con la valva sinistra più alta anteriormente che si accavalla sulla valva destra lungo tutto il bordo della conchiglia. La superficie esterna delle valve mostra una fine sculturazione caratterizzata da sottili costole, pori ed un'area mediana con una serie di fossette profonde ed elongate. Non presenta dimorfismo sessuale.

Un primo esame al microscopio a scansione elettronica (SEM) di un guscio di *Pseudolimnocythere phreatamicus* rinvenuto tra i resti fossili di anguilla, ha rilevato la presenza di filamenti micrometrici attribuibili a batteri di tipo *bacillus* o *coccus* del tutto simili a quelli già rinvenuti sul guscio

**FIGURA 41** - A) Valva di *Pseudolimnocythere phreatamicus* rinvenuta fra i resti subfossili di anguilla al Lago delle Anguille; B) particolare mostrante la tessitura porosa del guscio; C) corpi bacilliformi micrometrici sparsi sul guscio. Immagini SEM di H. Vohnof.



del gasteropode stigobitico *Islamia* sp.2 descritto sopra (**figura 41A-C**). Come per i gasteropodi, ciò è abbastanza comune negli ostracodi, il cui guscio funge spesso da substrato di ancoraggio per organismi unicellulari come protozoi, batteri e alghe. Al momento non possiamo dire se questi batteri si siano ancorati sul guscio dei nostri ostracodi stigobionti per opportunismo o casualità oppure se, come a volte avviene, siano legati a questi animali da un rapporto simbiotico. Sarebbe necessario innanzi tutto eseguire uno studio tipologico di questi batteri su esemplari vivi e verificare se esistano o meno delle differenziazioni specifiche in relazione a specie diverse di ostracodi. Resta il fatto che studiare la tassonomia, le strategie di nutrimento e di riproduzione e, ovviamente, il ruolo ecologico che gli ostracodi hanno in questo particolare ambiente di grotta, costituisce un grande interesse per la comunità ostracologica internazionale nella quale simili situazioni geologiche e biologiche estremofile cominciano a ricevere una certa attenzione.

### Copepodi

I copepodi sono degli animaletti buffi. Ricordano dei piccoli e graziosi marziani, con antenne lunghe e divaricate, un occhio solo in fronte, e un corpo allungato che termina con due appendici digitate, la cosiddetta *furca* (**figura 42A, B**). Per la maggior parte sono planctonici, ovvero vivono sospesi in acqua muovendosi con brevi scatti utilizzando le antenne a mo' di remi (da cui il nome: dal greco antico *kope* = remo e *podos* = piede), e popolano sia tutti gli ambienti marini che gli ambienti di acque dolci e salmastre, calde e fredde, ma ce ne sono anche specie bentoniche e parassite (soprattutto di pesci e vermi). Sono suddivisi in dieci ordini e contano più di 14.000 specie diverse. Essi rappresentano la più grande fonte di proteine negli oceani e costituiscono il cibo principale per molti pesci. Il più delle specie sono di piccole dimensioni,

con una lunghezza del corpo che va da un minimo di un decimo di millimetro nei maschi parassiti del genere *Mysidion*, ad un massimo di ben 25 centimetri nelle femmine di *Pennella*.

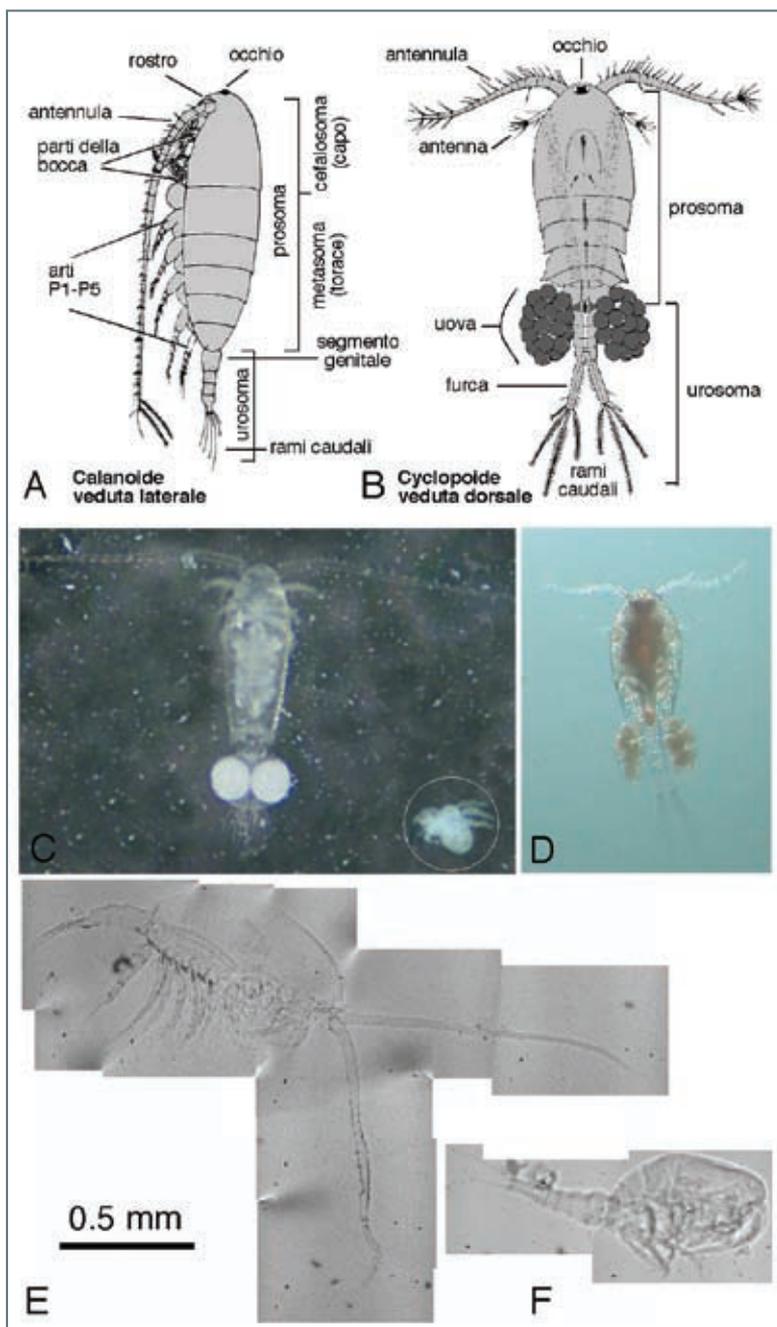
Normalmente il corpo è formato da 17 metameri. Non ha un vero e proprio *carapace* (il rivestimento chitinoso duro del corpo dei crostacei), ma sul capo, detto *cefalosoma*, è presente una piastra cuticolare che lo protegge. Il cefalosoma conta 6 segmenti fusi i quali, nella parte ventrale, sviluppano delle appendici che fungono da mascelle e mandibole. Al cefalosoma seguono quattro o cinque segmenti del *metasoma*. Cefalosoma e metasoma insieme costituiscono il *prosoma*. La parte terminale del corpo, detta *urosoma*, è composta da sei segmenti tipicamente *apodi* (senza piedi) gli ultimi dei quali si sviluppano nella *furca*. Le ultime due appendici terminali sono dette cercopodi (dal greco antico *kercos* = coda e *podos* = piede). Tra il prosoma e l'urosoma c'è un segmento molto mobile, ben articolato, che aiuta l'animale nei suoi scattanti movimenti natatori.

Si conoscono solo un paio di generi ermafroditi. Per la quasi totalità delle specie, i copepodi sono eterofroditi con la femmina sensibilmente più grande del maschio il quale utilizza le antenne per afferrarla e tenerla ferma durante l'accoppiamento. La femmina porta delle sacche ovifere che si sviluppano esternamente tra metasoma ed urosoma. I piccoli che nascono dalle uova si sviluppano in tre stadi di crescita: dai microscopici *naupli* con una morfologia che ricorda quella degli acari (**vedi figura 42C**), diventano poi *metanaupli*, per finire con lo stadio di *copepoditi* i quali, sebbene ancora piccolissimi, hanno già sviluppato le caratteristiche anatomiche e metameriche degli adulti. I copepodi non-parassiti si nutrono quasi esclusivamente di microalghe planctoniche sospese nell'acqua ma non disdegnano altri microorganismi come batteri e protozoi.

I copepodi, essendo privi di una conchiglia calcarea, non si preservano

facilmente allo stato fossile nei sedimenti e quindi non hanno valore paleontologico né stratigrafico. Per questo motivo la presenza di copepodi nelle Grotte di Frasassi non era stata mai rilevata nei numerosi campioni di sedimento prelevati in anni recenti nei laghi ipogei. Eppure la dr.ssa Diana Galassi del Dipartimento di Scienze

Ambientali dell'Università dell'Aquila e specialista di copepodi ci informa che si sapeva già della presenza di una specie di ciclopoide stigobitico rinvenuta da Kiefer, un ricercatore tedesco, nel lontano 1967 in un non bene precisato sito delle Grotte di Frasassi e classificata come *Diacyclops antrincola*. Successivamente la specie è



**FIGURA 42** - A) Schema anatomico di un copepode calanoide maschio (veduta laterale) e B) e di una femmina di ciclopoide (veduta dorsale); C) macrofotografia *in vivo* della nuova specie di calanoide (femmina) rinvenuta nel Lago Claudia. Si notino le due grosse uova racchiuse nella sacca ovifera, e un nauplio appena nato nel cerchio. Foto di A. Montanari; D) macrofotografia *in vivo* di un ciclopoide femmina con numerose uova rinvenuto nel Lago della Bottiglia in fondo al Pozzo dei Cristalli. Foto di A. Montanari; E) collage microfotografico a luce trasmessa *in vitro* di un calanoide maschio e F) di un ciclopoide maschio del Lago Claudia. Foto di E. Insom.

stata riportata in numerose altre località dell'Italia peninsulare e del Mediterraneo orientale (Turchia e Grecia), e nella costa dalmata conferendole una distribuzione di tipo periadriatico. *Diacyclops antrincola* si rinviene anche in acqua salmastre e anchialine, mostrando quindi una ampia tolleranza ecologica a diversi regimi di salinità. Nel tempo, lo status tassonomico della specie originariamente descritta delle Grotte di Frasassi (località tipo) è stato riconsiderato alla luce della rivisitazione di *Diacyclops cosanus* (Stella & Salvadori, 1954), specie anch'essa stigobia, e con la quale la specie *antrincola* è stata recentemente posta in sinonimia. Conseguentemente il nome corretto per la specie di Frasassi è *Diacyclops cosanus*.

Da parte nostra, la scoperta di numerosi copepodi nel luglio del 2008 nelle acque del Lago Claudia nella parte più interna della Grotta Grande del Vento è stata del tutto accidentale. Osservando al microscopio un campione d'acqua e sedimento si sono fatti subito notare grazie al loro peculiare modo di nuotare a scatti. Tuttavia è difficile poterli fotografare dal vivo innanzi tutto perché sono così piccoli e poi perché non stanno un attimo fermi. Una volta introdotti nel mesocosmo di Coldigioco si è potuto osservarli un po' meglio e coglierli con una macchina fotografica digitale con obiettivo macro da 15 ingrandimenti (**figura 42C, D**). Immagini sfocate, ma ciò nonostante si è potuto subito distinguere i maschi dalle femmine, più grandi e portatrici di sacche ovifere. Sono completamente diafani e privi di occhio, il che è indice di una lunga permanenza nell'ambiente di grotta che potrebbe aver indotto a nuove speciazioni.

Il prof. Emilio Insom del Museo di Storia Naturale dell'Università di Camerino si è offerto gentilmente di eseguire un primo studio conoscitivo di questi organismi opportunamente preparati e montati su vetrino per essere identificati con un potente microscopio a luce trasmessa (**figura 42E, F**). Ciò ha permesso di riconoscere

almeno due diversi tipi di copepodi rappresentanti altrettanti ordini tassonomici: Cyclopoida e Calanoida.

L'etimologia dei ciclopidi risale ovviamente all'unico occhio che hanno in fronte come i mitologici ciclopi. L'etimologia del nome Calanoida è invece così curiosa che vale la pena di raccontare. Lo zoologo William Elford Leach coniò il nome dell'ordine dei calanoidi nel 1819 ispirandosi al nome, o forse al soprannome grechizzato, di un vecchio filosofo ascetico hindu, Kalanos, il quale era al seguito dell'esercito di Alessandro Magno durante il famoso viaggio di conquista in India. Ogni mattina il vecchio filosofo, tutto nudo (come d'uso tra i gimnosofisti), salutava i soldati a braccia aperte esclamando la parola augurale *kalayam!* che significa "possa andare tutto bene!". Un'immagine che ricorda i copepodi che se ne stanno sospesi nell'acqua con le loro antenne divaricate come fossero braccia aperte.

Nelle prime settimane di residenza in cattività nel mesocosmo di Coldigioco i nostri animaletti si sono riprodotti moltiplicandosi, ma poi, nei mesi successivi, la popolazione si è ridotta sensibilmente. Ciò potrebbe essere dovuto ad una graduale diminuzione del cibo. Essendo questi copepodi planctonici, essi non brucano sul fondo i filamenti batterici come fanno gli ostracodi e gli anfipodi che setacciano il sedimento o addirittura ci scavano dentro, ma devono acciappare particelle organiche che vagano sospese nell'acqua. Queste possono essere cellule batteriche oppure protozoi ciliati. Il graduale degrado dell'habitat del piccolo mesocosmo dovuto alla facile perdita per ossidazione ed esalazione di idrogeno solforato e quindi alla diminuzione della principale fonte di energia dell'ecosistema stigobitico autotrofo, avrebbe potuto causare una drastica diminuzione della sospensione batterica mettendo in crisi anche i protozoi ciliati e infine i nostri copepodi.

La scoperta di copepodi nel mondo stigobitico di Frasassi è stata importante in quanto ha rivelato

la presenza di organismi planctonici che, come accennato sopra, rappresentano la principale fonte di proteine negli oceani e costituiscono il cibo per molti pesci, tra i quali i merluzzi e le aringhe. Se milioni di persone almeno una volta alla settimana possono gustare a tavola filetti o bastoncini impastati di merluzzo lo devono ai copepodi. Per affrontare lo studio di questo nuovo mondo planctonico sotterraneo gli speleologi della FSM si sono rivolti alla dr.ssa Diana Galassi del Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università dell'Aquila che, come esperta di biologia degli stigobionti ed in particolare dei copepodi (Galassi et al. 2009), si è gentilmente offerta di intraprendere uno studio dettagliato sulle popolazioni di copepodi del complesso carsico di Frasassi, con particolare attenzione alla ripartizione ambientale ed al ruolo ecologico che questi organismi rivestono nel nostro mondo sotterraneo.

Fu così che nell'autunno del 2009 gli speleologi della FSM e la stessa dr.ssa Galassi, con l'aiuto delle sue assistenti ricercatrici dr.ssa Barbara Frasca e la tesista Debora De Michele, hanno eseguito numerose campionature in vari siti della Grotta del Fiume e della Grotta Grande del Vento usando speciali retine per il campionamento del plancton e prelevato dati fisico-chimici dalle varie pozze d'acqua e laghi ipogei. Per adesso è stata identificata una sola forma di calanoide, la stessa che aveva riconosciuto il prof. Insom in un campione pilota del Lago Claudia. Questo del calanoide, ci riferisce la Galassi, è in sé un ritrovamento particolarmente interessante in quanto delle duemila specie conosciute nel mondo appartenenti all'ordine Calanoida solo nove sono stigobitiche. La specie di Frasassi, diafana e completamente cieca, è sicuramente uno stigobionte endemico di questa grotta. La si ritrova nei numerosi laghi freatici del complesso carsico, mai nell'epicarso *sensu lato* (ovvero in pozze di concrezione e di stilocidio sia temporaneo che permanente). È esclusivamente presente nei

laghi sulfidici dove occupa, allo stato attuale delle conoscenze, la sola zona planctonica che non è sulfidica ma che risente chiaramente delle condizioni chimiche e biologiche al contorno, che si instaurano nelle zone bentoniche profonde e costiere di questi laghi. Il nostro calanoide apparterebbe alla famiglia Diaptomidae ed è di piccole dimensioni, se confrontato con altri membri della stessa famiglia. È depigmentato e distintamente anoftalmico (privo di occhi), l'habitus corporeo è slanciato e la setolazione delle appendici ridotta.

L'unica sacca ovigera porta un numero di uova variabile da due a quattro, di enormi dimensioni, tanto da obliterare alla visione l'addome della femmina (**vedi figura 42C**).

Allo stato attuale il gruppo di ricerca dell'Aquila ha in corso uno studio di dettaglio finalizzato all'ideale collocazione della specie in uno dei generi noti della famiglia Diaptomidae. A un'indagine del tutto preliminare e che necessita di approfondimenti, il calanoide di Frasassi mostra alcune caratteristiche del genere *Stygodiaptomus*, ma solo il diretto confronto con materiale tipico del genere potrà avallare questa diagnosi preliminare. L'aspetto più enigmatico relativo a questo calanoide stigobitico è che non sono note altre specie stigobitiche per tutta l'Italia peninsulare e l'unica specie stigobitica italiana, *Trogloidiaptomus sketi*, è nota del solo Carso triestino-sloveno delle Alpi orientali. La popolazione di Frasassi è unica nel suo genere, non mostra affinità con la specie *T. sketi* e la sua maggiore generica affinità è riscontrabile con il genere *Stygodiaptomus*, del quale si annoverano attualmente tre sole specie a scala mondiale, nella penisola balcanica. Se poi si considera che il numero totale di calanoidi stigobitici noti al mondo sono complessivamente nove, questo rinvenimento assume una rilevanza biogeografica notevole.

Per ciò che riguarda i ciclopidi, la Galassi ci informa che da una visione preliminare dei campioni fin qui

raccolti pare ci possano essere una mezza dozzina di specie diverse tutte stigobitiche, inclusa la già discussa *Diacyclops cosanus*, altre già conosciute in altri ambienti del sottosuolo ed altre ancora probabilmente nuove ed uniche di Frasassi. Sta di fatto che i copepodi in generale ed i ciclopoidi in particolare, hanno un'incredibile capacità di adattamento ai più disparati ambienti acquatici, possono vivere negli interstizi dei sedimenti e addirittura penetrare in cavità ipogee attraverso le fratture della roccia.

Nella zona satura dell'acquifero di Frasassi, nel sedimento sulfidico del Pozzo dei Cristalli, la Galassi ha riscontrato la presenza di un particolare copepode, un arpacticoido appartenente alla famiglia Ameiridae, afferente al genere *Nitocrella*, in corso di studio. I copepodi arpacticoidi, a differenza degli altri, sono in gran parte bentonici, ovvero che vivono sui fondali marini o di bacini di acqua dolce. Infatti, secondi solo ai nematodi, gli arpacticoidi rappresentano il più grande gruppo della *meiofauna* (la fauna microscopica) dei sedimenti marini. Per questo adattamento all'ambiente bentonico, gli arpacticoidi hanno sviluppato un corpo allungato, quasi vermiforme, e le antenne del primo paio sono molto corte, mentre quelle del secondo paio sono tipicamente ramificate, come a dire che non hanno bisogno di grandi remi per navigare nell'acqua libera.

Dall'analisi preliminare dei numerosi campioni attualmente in studio nel laboratorio dell'Aquila una cosa certa è emersa: i copepodi sono praticamente dappertutto nel complesso carsico di Frasassi e sono tutti veri stigobionti. Non solo essi popolano in massa i laghi freatici (quelli della falda acquifera nella parte più bassa del complesso carsico), siano essi sulfidici o carbonatici, ma anche piccole pozze concrezionate ed effimere alimentate dal solo stillicidio e ubicate nei piani superiori della grotta, il che fa pensare che l'ingresso nell'ambiente ipogeo di questi straordinari animaletti sia avvenuto anche dall'alto attraverso

le fratture del Calcere Massiccio. Bisogna far presente che i copepodi che vivono all'esterno possono incistarsi in una cuticola che li mantiene e li protegge durante periodi di secca per poi "resuscitare" non appena vengono ristabilite le condizioni ambientali a loro ideali. Ciò non succede ai copepodi stigobitici semplicemente perchè a loro basta l'umidità della grotta per sopravvivere nel sedimento bagnato in uno stato di vita latente o *dormienza* e ciò spiegherebbe la presenza, in grotta, di copepodi anche in piccole pozze effimere. La biodiversità nascosta ancora da scoprire all'interno del sistema è plausibilmente di gran lunga maggiore di quella attualmente censita a livello del tutto preliminare. Ci vorrà del tempo prima di comprendere la biologia e la ripartizione specifica di questo importante gruppo di animali che vengono da molti considerati degli eccellenti bioindicatori in grado di fornire preziose informazioni circa lo stato di salute dell'ambiente ipogeo di Frasassi (e non solo).

### Anfipodi

L'animale acquatico più noto e caratteristico delle Grotte di Frasassi è l'anfipode *Niphargus ictus*, un malacrostaceo appartenente alla famiglia Niphargidae simile ad un gamberetto e lungo non più di due centimetri. In genere gli anfipodi, che includono oltre 8.000 specie, sono marini, sia pelagici (che nuotano nel mare aperto) che bentonici (che vivono esclusivamente sul fondo). Tuttavia ne esistono diverse specie non marine, come appunto il nostro *Niphargus ictus*, presenti in vari ambienti di acque dolci e salmastre. Pur non entrando nei dettagli anatomici e fisiologici di questi animali che godono di una certa complessità e diversità specifica, vogliamo esporre le nuove conoscenze che abbiamo acquisito sugli anfipodi di Frasassi nel corso di cinque anni di studi comprendenti le osservazioni eseguite dal vivo sia in grotta che in mesocosmo e in laboratorio.

Lo studio approfondito della bio-

66

**FIGURA 43** - Piccolo branco di *Niphargus ictus* raccolto lungo la sponda del laghetto sulfidico della Grotta Sulfurea. Foto di J. Macalady.

logia e fisiologia di questi anfipodi è stato portato avanti principalmente dalla zoologa prof. Betty Borowsky e dalla sua studentessa Minda Gowar-

del complesso carsico di Frasassi, sia laddove l'idrogeno solforato affiora in superficie (**figura 43**), sia dove la falda sulfidica si trova in profondità e gli



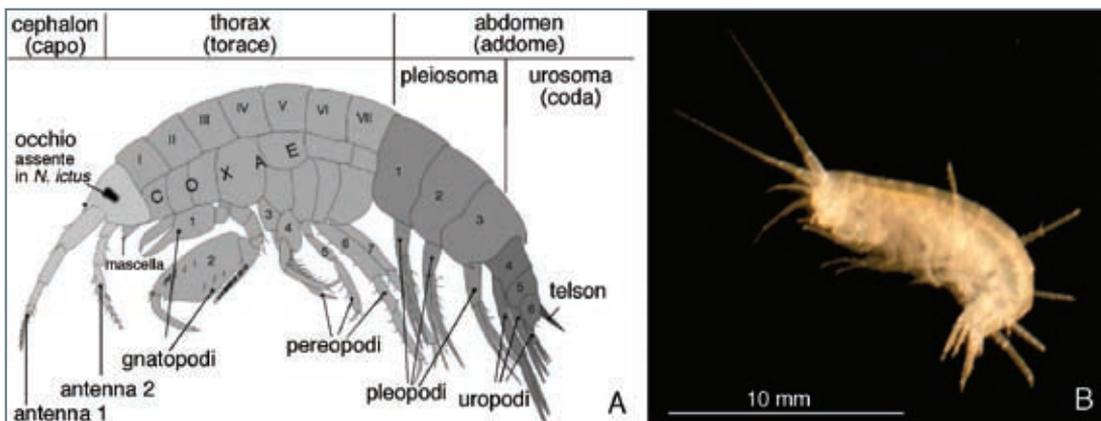
ty del Nassau Community College di New York in collaborazione con il prof. Gordan Karaman dell'Accademia delle Scienze del Montenegro, lo stesso che nel 1985 definì la specie *Niphargus ictus*. Contemporaneamente, la prof.ssa Sharmishtha Dattagupta e i suoi studenti Jan Bauermeister e Jean-François Flot dell'Università di Göttingen in Germania, si stanno occupando degli aspetti microbiologici e filogenetici di questi organismi applicando le tecniche di analisi genomica.

animali si vedono nuotare in branchi nell'acqua carbonatica superficiale. Sono diafani (bianchi) e quindi risaltano bene nelle pozze e nei laghi che in genere hanno uno sfondo scuro dovuto allo stato ridotto del fango sulfidico ricoperto da film batterici.

**FIGURA 44** - A) Schema anatomico di un anfipode (di B. Borowsky); B) macrofotografia di un adulto di *Niphargus ictus* attaccato con i pleopodi al vetro del mesocosmo di Coldigioco. Foto di A. Montanari.

Vediamo innanzi tutto come ci si presentano. I nostri anfipodi si possono vedere ad occhio nudo in praticamente tutti i laghi, pozze e rivoli ipogei

Il corpo degli anfipodi (**figura 44A, B**) è suddiviso in tre parti principali, il *cephalon* (capo), il *thorax* (torace) e l'*abdomen* (addome), a loro volta suddivisi in sette segmenti nel torace e sei nell'addome, da ognuno dei quali dipartono le appendici con funzioni diverse. Il capo è provvisto di due paia di antenne che hanno una funzione sensoriale, di un paio di occhi laterali, che però sono com-



pletamente assenti o degenerati negli anfibodi stigobionti, e di appendici boccali, le *maxillae* (mascelle). Da ognuno dei sette segmenti toracici si dipartono un paio di appendici articolate dette *pereopodi*, superiormente coperte da *coxae*, placchette chitino-se protettive. I primi quattro paia di pereopodi sono rivolti in avanti e i restanti tre rivolti all'indietro. Vengono detti *gnatopodi* le prime due paia di pereopodi che sono molto sviluppati nel *Niphargus ictus*: servono principalmente per raccogliere il cibo (sedimento organico, filamenti batterici) e portarlo verso le appendici boccali. Gli gnatopodi vengono anche usati da questi anfibodi a mo' di spazzole per la pulizia del corpo (*grooming*, fare la toletta). I restanti pereopodi servono per la locomozione sul fondo.

I sei segmenti dell'addome sono divisi in due parti: il *pleiosoma* costituito da tre segmenti con appendici biforcute che servono per il nuoto, e l'*urosoma*, con altrettanti appendici immobili, corte, piumate e disposte a ventaglio, che servono da timone. C'è poi un'appendice, il *telson*, posta sull'ultimo segmento dell'*urosoma*, la quale, oltre a coprire l'ano, ha la funzione di dispositivo per la fuga rapida. È un comportamento comune a molti crostacei quella di usare il telson per scattare velocissimamente all'indietro allorché minacciati da un predatore, il cosiddetto "colpo del gambero". Ictus, il nome specifico del nostro *Niphargus*, si riferisce proprio a questo colpo di coda.

Gli anfibodi si riproducono per via sessuata. Durante la riproduzione, l'anfipode maschio afferra la femmina, che in genere è leggermente più piccola, stringendola tra le zampe e facendosi trasportare in un comportamento chiamato *amplexus*. Lo sperma è trasferito da due minuscole protuberanze (*penes*) del maschio poste ventralmente al settimo segmento del *pereon* all'interno del dotto genitale della femmina posto centralmente tra la seconda e la quinta placca coxale. Dall'osservazione diretta dell'*amplexus* pare che la feconda-

zione avvenga internamente nell'ovidotto della femmina, la quale rilascia poi le uova in una tasca ventrale, una specie di marsupio, dove sono incubate durante lo sviluppo. Le uova non sono attaccate al corpo come avviene in altri crostacei ma sono libere in questa sorta di tasca posta tra le zampe. I piccoli appena nati assomigliano molto agli adulti e man mano che crescono essi cambiano periodicamente la loro pelle chitinoso in un processo detto *muta*, aiutandosi con le zampe come se si sfilassero una maglietta.

Nell'agosto del 2005 all'Osservatorio Geologico di Coldigioco, la prof.ssa Borowsky ha effettuato le prime osservazioni *in vitro* ed *in vivo* su una ventina di esemplari di *Niphargus ictus* prelevati al Lago Verde. In questa particolare colonia mancavano forme giovanili e larve. Nell'arco di una settimana la zoologa ha principalmente osservato le abitudini alimentari di questi anfibodi, studiando la produzione e la qualità delle feci dopo aver somministrato diversi tipi di cibo ad un certo numero di esemplari separati in recipienti Petri, come frammenti di film batterici, pezzetti di albume secco, detrito organico, ecc. Alcuni esemplari sono stati surgelati e sezionati. Il contenuto dell'apparato digerente è stato estratto dalla Borowsky e preparato per un'analisi dettagliata del DNA al laboratorio di microbiologia molecolare della prof.ssa Macalady in Pennsylvania. Questo particolare studio ha permesso di capire il modo di sostentamento di questi organismi nella zona solfurea della grotta.

È importante determinare la fonte del nutrimento del *Niphargus* per meglio comprendere il flusso bio-energetico del complesso carsico di Frasassi. La fonte alimentare principale per la gran parte degli anfibodi gammaridi sono piccole particelle che vengono o filtrate dall'acqua oppure brucate su superfici dure o ancora estratte dal sedimento fangoso. Molti di questi organismi si cibano anche di detrito organico e consumano notevoli quantità di cibo mordendo piccoli

frammenti di materia organica che trovano nel sedimento. Infatti, pezzetti di carne costituiscono, in genere, un'esca eccellente per molte specie di anfipodi.

Gli esemplari catturati al Lago Verde sono stati suddivisi in quattro gruppi di cinque animali ciascuno e messi in vasi da coltura in vetro con acqua mantenuta ad una temperatura costante di 13° C. Le osservazioni sono state poi eseguite ad intervalli di 12 ore per due giorni. Gli animali sono stati nutriti *ad libitum* (che significa cibo a volontà) come segue:

Coltura 1: filamenti batterici prelevati alla Sorgente Solfurea;

Coltura 2: albume secco di uovo di gallina;

Coltura 3: detrito dello strato superficiale del sedimento del Lago Verde;

Coltura 4: acqua dell'ambiente naturale filtrata (placebo senza nutrienti).

Negli anfipodi, la defecazione avviene tipicamente mentre l'animale mangia. Dunque, la quantità delle feci è una misura diretta della quantità di cibo consumato. Il numero e la lunghezza delle feci rilevate nella Coltura 3 erano sensibilmente maggiori di qualsiasi altra coltura. La Borowsky ha poi ripetuto lo stesso esperimento preparando le seguenti colture:

Coltura 5: filamenti batterici presi alla Sorgente Solfurea;

Coltura 6: detrito raccolto dallo strato sub-superficiale del sedimento naturale;

Coltura 7: acqua dell'ambiente naturale filtrata (placebo senza nutrienti).

Solo la coltura 3 ha prodotto un cospicuo numero di feci, mentre le altre hanno prodotto poco o nulla. Dun-

que sembra che il *Niphargus ictus* del Lago Verde si nutra di materiale organico che trova sullo strato superficiale del sedimento, preferendolo ad altri cibi organici.

I risultati di questi esperimenti preliminari sono interessanti ed inaspettati in quanto gli anfipodi studiati in altre cavità carsiche consumano materiali organici derivati dall'ambiente esterno (fogliame e frustoli vegetali, insetti morti, cadaveri di animali, ecc.) e trasportati in grotta dal flusso delle acque, ed infatti si regolano, in accordo con questi flussi, per iniziare il loro ciclo riproduttivo stagionale. In contrasto a ciò, gli anfipodi di Frasassi hanno completamente disdegnato anche dei pezzetti di carne bovina fresca (marchigiana D.O.C.) servita direttamente nel loro ambiente naturale.

È estremamente importante determinare cosa effettivamente gli anfipodi di Frasassi consumino per il loro sostentamento nutrizionale in differenti specchi d'acqua della grotta. Al Lago Verde, i solfobatteri oppure materiali organici detritici depositati sul sedimento possono costituire la fonte di cibo per i niphargi. Dalle osservazioni in coltura risulta chiaro che il *Niphargus ictus* si nutre prevalentemente di solfobatteri che raccoglie sulla superficie del sedimento melmoso usando gli gnatopodi. I risultati delle analisi isotopiche del carbonio e dell'azoto effettuate da Galdenzi e Sarbu (2000 - vedi **figura 12**) e da Mariani et al. (2007) supportano la deduzione della Borowsky che gli anfipodi del Lago Verde si nutrono di materiale organico prodotto dall'ecosistema chemiosintetico (solfobatteri) della grotta. In sintesi, gli anfipodi esterni ed anche alcune specie troglobitiche hanno tipicamente un ciclo riproduttivo annuale regolato da fenomeni ambientali come fotoperiodicità e/o disponibilità stagionale di cibo. Visto che i nostri anfipodi stigobionti consumano batteri chemiosintetici ed autotrofi, non dipenderebbero da questi stimoli periodici e il loro comportamento riproduttivo potrebbe es-

sere molto diverso dal “normale”.

Monitorando il mesocosmo giornalmente per diversi mesi ha permesso di confermare le osservazioni fatte in precedenza dalla Borowsky circa i comportamenti dei nostri anfipodi. Essi se ne stanno il più del tempo attaccati con i pereopodi al vetro dell'acquario (**figura 42B**) preferibilmente nelle zone più ossigenate del mesocosmo. Ogni tanto si staccano dal vetro e nuotando a pancia in su, usando le tre paia di pleopodi come mezzo di propulsione, raggiungono il fondale dove si capovolgono ed iniziano lì a perlustrarlo con un'andatura veloce ed una postura inclinata su un fianco. Fanno delle brevi soste probabilmente per mangiare e/o pulirsi con i gnatopodi. Raramente s'infossano nel fango o si nascondono sotto le pietre. Non reagiscono a suoni di alta frequenza, come quello che si genera percuotendo il vetro con una chiave od una moneta, ma reagiscono alle basse frequenze che si provocano bussando ripetutamente con il pugno la base dell'acquario. Allora sembrano scappare in un fuggi fuggi generale nuotando verticalmente verso l'alto fino ad aggrapparsi, con i pereopodi, al pelo dell'acqua. Non si vedono mai interagire tra di loro, nemmeno quando si incrociano mentre pascolano velocemente sul fondale, né sono stati mai sorpresi durante l'intimo atto dell'accoppiamento che la Borowsky aveva comunque osservato *in vitro* nell'agosto del 2005. Eppure i primi di dicembre del 2008 nacquero sei piccoli anfipodi probabilmente da un'unica madre (in genere le femmine che vivono all'esterno ne partoriscono molti di più, fino a venti alla volta). All'inizio di febbraio ne nacquero altri otto, e a giugno altri ancora. Alla nascita non raggiungono i due millimetri di lunghezza e dopo un anno esatto hanno raggiunto una lunghezza massima (dalla testa al telson) di circa otto millimetri.

Mentre tutto questo succedeva nel mesocosmo, proseguivano i campionamenti e le osservazioni periodiche in vari laghi della grotta. Innanzi-

tutto, si notò l'assenza di forme giovanili in tutti i laghi campionati tranne il Lago Stratificato che, a dispetto del nome, non presenta uno strato sulfidico al fondo. In questo lago ipogeo, anfipodi appena nati furono trovati solo nei campioni prelevati intorno al solstizio invernale. Non si sa ancora il motivo di ciò. È possibile che gli anfipodi migrino, al momento della riproduzione, in specchi d'acqua ben ossigenati e privi di idrogeno solforato che potrebbe infierire, con la sua tossicità, sui piccoli appena nati.

Un fatto strano accaduto al Lago Verde nell'ottobre del 2007 ed un incidente nel mesocosmo di Coldiggioco verificatosi esattamente un anno dopo, hanno evidenziato che le condizioni chimiche dell'ambiente naturale possono cambiare drasticamente nel tempo ed influire sul comportamento degli anfipodi (e probabilmente anche su altri organismi stigobitici). Al Lago Verde accadde che non si trovarono che alcuni anfipodi quando, in genere, se ne vedono a frotte. In più il lago era particolarmente sulfidico in quel periodo autunnale e presentava abbondanti mucillagini batteriche che galleggiavano. Forse i niphargi se ne erano andati perché l'acqua era diventata troppo sulfidica e/o anossica a causa di un'estate particolarmente secca ed un conseguente scarso ricambio vadoso.

Un anno dopo, il 30 ottobre del 2008, si ritornò al Lago Verde a prelevare dell'acqua sulfidica per il ricambio del mesocosmo. Arrivati sul posto, si scorsero subito gli anfipodi nuotare a frotte (erano tornati), ma l'orizzonte di acqua sulfidica si era approfondito di un paio di metri più del solito tanto che non fu possibile raccoglierla. Si dovette allora ripiegare alla Sorgente del Pescatore (**figura 21C**), di facile accesso, e prelevare 60 litri di acqua sulfidica per ricambiare il mesocosmo, cosa che in passato era stata già fatta un paio di volte senza tanti problemi. A quel punto successe un piccolo disastro. Una volta cambiata l'acqua e fatto decantare il fango, ci si accorse che lo strato d'acqua sulfidica, rico-

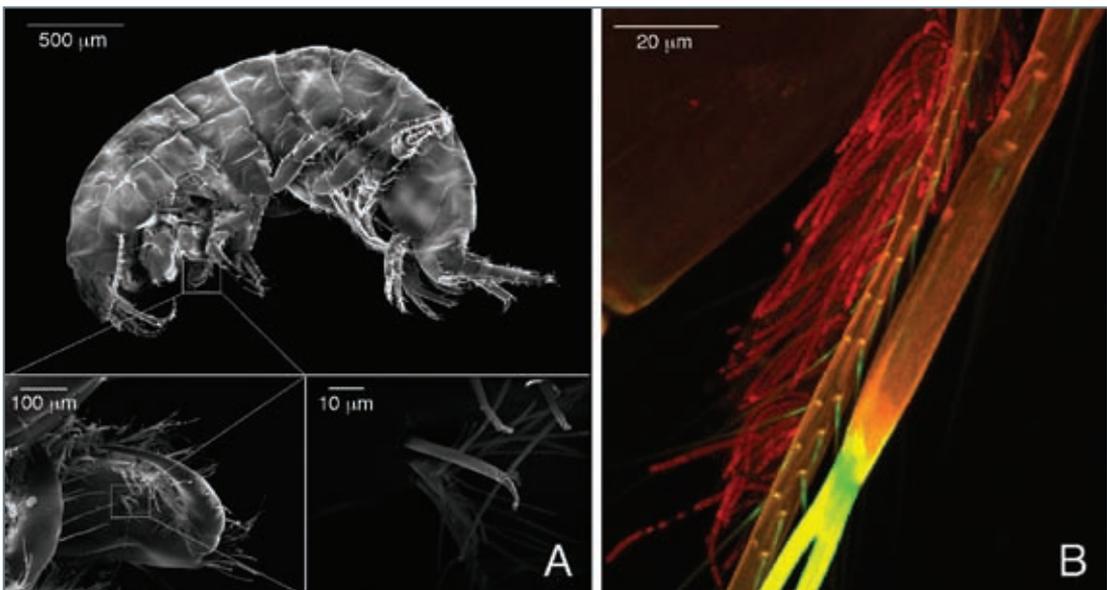
**FIGURA 45** - A) Immagini SEM di un esemplare giovane di *Niphargus ictus* del Lago Verde con ingrandimenti successivi del secondo gnatopodo mostranti filamenti del battere simbionte *Thiothrix*; B) immagine FISH di una colonia di *Thiothrix* ancorata ad un pelo pereopodico. Immagini di S. Dattagupta.

noscibile a vista in quanto più opaca dell'acqua ben ossigenata, aveva raggiunto la superficie dell'acquario invece di stratificarsi sul fondo, come di norma era successo in precedenza. Tutti gli anfipodi del mesocosmo si radunarono sotto il pelo dell'acqua e uno ad uno, nel giro di una settimana, morirono, probabilmente asfissati e/o intossicati dall'eccessiva concentrazione di  $H_2S$ . L'unico aspetto positivo di questo involontario incidente fu che, essendo radunati tutti in uno stesso posto, si poté fare la conta degli animali presenti nell'acquario. Eravamo partiti con sei adulti due anni prima ed ora ce n'erano 42, la maggior parte piccolissimi, probabilmente nati nella tarda estate. Si decise di non intervenire e magari, dopo che la tragedia si fosse consumata fino alla fine, di ricominciare con un nuovo mesocosmo. Ma gli stigobionti estremofili sono duri a morire e sei individui, un adulto originale (probabilmente un maschio) e cinque piccoli, quattro dei quali della generazione del gennaio 2007 (i giovanotti della situazione, insomma), sopravvissero la catastrofe ambientale e vivono tuttora.

L'esperienza che abbiamo appena raccontato ha rivelato dei fatti molto importanti circa l'ambiente sulfidico di Frasassi. Innanzi tutto,

non esiste una situazione idrochimica standard della falda freatica di Frasassi. A seconda delle precipitazioni e del ricambio vadoso, i laghi ipogei mutano la loro struttura stratificata e la concentrazione di idrogeno solforato. Apparentemente, ciò avviene anche alle acque delle sorgenti sulfidiche, ognuna delle quali ha una sua composizione chimica propria che però non è costante nel tempo. Di conseguenza, anche le colonie batteriche chemiosintetiche cambiano nel tempo e da luogo a luogo, come già visto in **figura 24**, e di conseguenza le popolazioni dei diversi organismi che dipendono dai batteri mutano. Gli anfipodi poi, che hanno la facoltà di nuotare rapidamente, fanno presto a spostarsi da uno specchio d'acqua all'altro in caso di emergenza.

Mentre si proseguiva con il monitoraggio del mesocosmo e dei laghi della grotta con periodiche escursioni speleologiche e campionamenti, al laboratorio di microbiologia molecolare dell'Università della Pennsylvania, Sharmishtha Dattagupta, allora ricercatrice in quell'istituto, fece una scoperta inattesa ed in un certo senso esclusiva. Osservando esemplari di *Niphargus ictus* al microscopio a scansione elettronica (SEM), si accorse che tra le zampe, ed in particolare



tra i peli degli gnatopodi (le appendici che servono per raccogliere il cibo ed indirizzarlo all'apparato boccale, **figura 45A**), erano presenti folte colonie di filamenti batterici (**figura 45B**). Con l'analisi del DNA risultò che si trattava di un'unica specie geneticamente quasi identica al *Thiothrix eikelboomii*. Avevamo visto nel capitolo riguardante i procarioni che il gruppo dei batteri *Thiothrix* è dominante nei biofilm piumati che si sviluppano in acque sulfidiche correnti, più ossigenate di quelle stagnanti dove, invece, i batteri dominanti sono i *Beggiatoa*. Il *Niphargus* si riscontra in tutti gli specchi d'acqua con entrambe le morfologie delle colonie batteriche, eppure si accollano solo una specie batterica. Per quale motivo? In poche parole, entrambi gli organismi, il battere e l'anfipodo, hanno bisogno di ossigeno per vivere. Solo che il battere ha bisogno dell'idrogeno solforato per esplicare il suo metabolismo chemiosintetico, mentre l'anfipodo ha bisogno dei batteri per nutrirsi. Così il nostro *Niphargus vive* si in un ambiente ossigenato dove può respirare ma si deve addentrare, diciamo in apnea, giù nell'ambiente sulfidico, quasi anaerobico e tossico, per mangiare. Allora il *Thiothrix eikelboomii* che rimane impigliato tra i peli degli gnatopodi dell'anfipode e che ha bisogno di ossigeno più di ogni altro consimile solfobattere, trova la convenienza di essere trasportato dall'anfipode in acque più ossigenate.

La presenza del *Thiothrix* fra le zampe del *Niphargus ictus* è stata verificata in tutte le differenti situazioni freatiche della grotta: al Lago Verde (bassissimo tasso di ossigeno ed alto tasso di  $H_2S$ ), al Pozzo dei Cristalli (alto  $H_2S$ , basso ossigeno), alla Grotta Solfurea e al Ramo Solfureo (alto ossigeno e basso  $H_2S$ ), al Lago Traverso (fortemente stratificato con l'orizzonte sulfidico concentrato in profondità) e al Lago Stratificato (ben ossigenato con totale assenza dell'orizzonte sulfidico). Il *Thiothrix* è stato rilevato anche tra le zampe degli anfipodi tenuti in cattività nel mesocosmo di

Coldigioco.

Nel Lago Verde e nel Lago Stratificato, non ci sono colonie batteriche di *Thiothrix* o per l'eccessiva scarsità di ossigeno nel primo caso o per l'assenza di idrogeno solforato nel secondo caso. Ciò ha fatto sorgere il dubbio che il rapporto fra *Thiothrix* e *Niphargus* non sia di tipo casuale, opportunistico o parassitico, bensì di tipo simbiotico. Fu così che la Dattagupta si è cimentata nell'analisi genomica del contenuto dello stomaco di diversi esemplari di *Niphargus* catturati nei vari laghi ipogei e preservati *in situ* in una soluzione di RNAlater. In tutti i casi, il *Thiothrix* era presente insieme agli altri tipi di batteri più o meno abbondanti nei diversi ambienti, ma è risultato essere l'unico battere nel caso del Lago Stratificato, dove di batteri non ce ne sono di nessun tipo. Da qui l'interpretazione che il *Niphargus* si nutra di un cibo che gli cresce addosso soprattutto nelle situazioni in cui di altro cibo non ce n'è a disposizione. Questo cibo di scorta è il battere *Thiothrix* che per campare deve aggrapparsi fra le zampe dell'anfipode e farsi mangiare. Una simbiosi perfetta. Il fatto eccezionale è che se da un lato la simbiosi tra un battere chemiosintetico autotrofo ed un animale è il fondamento di interi ecosistemi idrotermali negli abissi oceanici sin dalla comparsa degli eucarioti centinaia di milioni di anni fa, questo di Frasassi sembra essere il primo caso di tale simbiosi mai riscontrato in un ambiente terrestre (Dattagupta et al., 2009).

Durante il meeting "Biospeleo Pow-wow" tenutosi a Coldigioco nei primi di giugno del 2008, nel quale i vari ricercatori impegnati nelle indagini sugli stigobionti di Frasassi ebbero l'occasione di scambiarsi vedute e conoscenze in materia, la prof.ssa Betty Borowsky ne approfittò per effettuare un complesso esperimento di osservazione su una trentina di anfipodi prelevati al Pozzo dei Cristalli della Grotta del Fiume, con l'aiuto del marito Richard ed una sua studentessa, Minda Gowarty. Il test doveva

servire per verificare se il *Niphargus ictus* fosse o meno *fototassico*, ovvero sensibile alla luce. In grotta pare che i branchi di anfipodi si allontanano non appena gli speleologi si avvicinano al greto del lago con le loro luci accese. Sono forse spaventati dalle luci o dalle vibrazioni a bassa frequenza provocate dai passi degli speleologi? Nel mesocosmo di Coldigioco avevamo visto che gli anfipodi rispondono quasi immediatamente alle basse frequenze (onde che si propagano nell'acqua col battere del pugno sulla base dell'acquario). Più volte si era tentato di spiarli al buio nel mesocosmo usando una luce ad ultravioletti od una luce a bassissima intensità (come quella di un telefono cellulare), e sembrava che gli animali stessero il più del tempo fermi, attaccati alle pareti di vetro o seminascosti tra i sassi del fondo, ma effettivamente dopo un po' che la luce dell'acquario veniva accesa, gli animali sembravano divenire più attivi. Il paradosso sta nel fatto che il nostro *Niphargus ictus* è completamente privo di occhi.

La Borowsky ed i suoi collaboratori misero un certo numero di animali separati in scodelle di vetro pyrex dal diametro di 12,5 cm e profondità di 7 cm, con acqua dell'ambiente naturale ad una temperatura costante di 13 °C. Annotarono poi i tempi, le distanze e la direzione di movimento di ogni singolo individuo dal momento in cui, dopo un periodo di immobilità al buio di un minuto, veniva investito da un fascio concentrato di luce LED (atermica) prima dall'alto per 4 minuti e poi dal basso per altrettanti minuti. L'operazione fu poi ripetuta scambiando l'ordine, ovvero illuminando prima dal basso e poi dall'alto. Il test fu replicato decine di volte, annotando anche il modo e la postura del nuoto (verticale o capovolto) che l'animale assume dopo i primi due centimetri di distanza percorsa ed i risultati vennero analizzati statisticamente. Con la luce, il tempo medio di reazione, da fermo all'inizio del movimento, è stato di 12,2 secondi, mentre al buio in media gli animali stanno fermi per 47,4

secondi prima di muoversi. Il 62% degli animali hanno mostrato questo comportamento individuale. Presumibilmente, nell'ambiente naturale il numero degli individui che iniziano a muoversi in meno di 47,4 secondi dal momento dell'accensione della luce è superiore a causa di una reazione di gruppo (se ti muovi tu, mi muovo anch'io). Dunque, se da un lato l'ipotesi che questi anfipodi stigobionti possiedano una facoltà fototassica è supportata statisticamente, l'esperimento eseguito in laboratorio non dimostra, di per sé, che gli animali cerchino di allontanarsi dalla sorgente luminosa.

Comunque l'impressione è che ciò avvenga nell'ambiente naturale.

La fototassia è stata dimostrata in alcuni crostacei privi di occhi come l'*Oronectes australis packardii* (Li & Cooper, 2002) ed il *Niphargus aquilex* (Kureck, 1964). C'è da dire però che questi animali vivono in ambienti esterni illuminati dalla luce del sole. Il *Niphargus aquilex*, per esempio, vive nel sedimento per poi uscirne, giornalmente, alla ricerca di cibo o per accoppiarsi. Forse il nostro stigobionte *Niphargus ictus* ha mantenuto questa strategia che utilizza in grotta non tanto per andare verso la luce in cerca di cibo, quanto per starne lontano e rimanere nell'ambiente protetto e buio della grotta. Sarebbe dunque un organismo fototassico negativo (Gowarty et al., 2008).

Ma come fanno questi animali ciechi a percepire la luce? La Borowsky ci ha spiegato che essi, pur avendo completamente perso per atrofia l'intero apparato visivo, abbiano comunque mantenuto un neurone (una cellula nervosa) che, posta sotto il carapace, è sensibile ai fotoni.

Molto abbiamo imparato sul *Niphargus ictus* di Frasassi, come si nutre, come si accoppia, come si muove e come si sia adattato alla vita senza luce del mondo sotterraneo. Si tratta ora di andare ancora più a fondo e studiare le variazioni genetiche che possibilmente esistono tra diverse popolazioni di anfipodi nel vasto

**FIGURA 46** - A) I quattro morfotipi di *Niphargus* del complesso carsico di Frasassi. Foto di J. F. Flot (immagine della nuova specie *Niphargus* sp. 4 non disponibile); B) la loro distribuzione nei laghi della grotta. Mappa di J. Bauermeister.



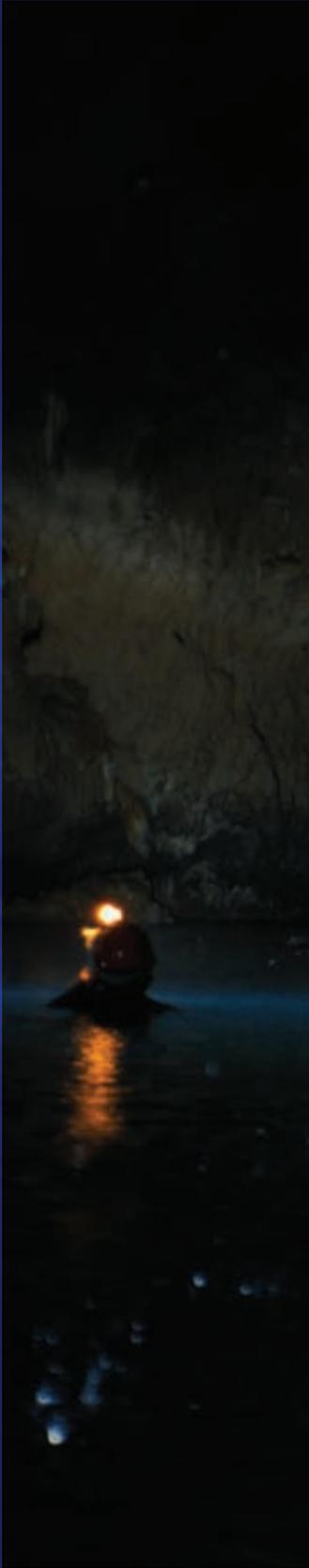
zoologi specialisti Betty Borowsky e Gordan Karaman. Quest'ultimi stanno ora indagando sulle caratteristiche biologiche e fisiologiche di queste specie che sembra siano endemiche ed uniche di Frasassi. Una di queste, il cui nome proposto dalla Borowsky e dal Karaman è *Niphargus frasassianus*, è morfologicamente ben distinta dal *Niphargus ictus*. Il *frasassianus* ha un corpo snello e allungato, e occupa siti dove l'acqua solfurea scorre, come nel ruscello sulfidico del Pozzo dei Cristalli, il Ramo Solfureo ed anche nel tunnel artificiale della Sorgente del Pescatore che anni fa veniva utilizzato come presa d'acqua per le Terme di San Vittore. Alcuni di questi animali sono stati catturati ed allevati nei mesocosmi di Coldigioco per un'osservazione diretta *in vivo* dei loro comportamenti. Ebbene, il *Niphargus frasassianus*, a differenza dell'*ictus*, non sa nuotare. Più che altro cammina su fondo e spesso s'infossa nel fango. È piuttosto nervoso e suscettibile, ed ha spesso rivelato un atteggiamento aggressivo nei confronti dei suoi consimili. Se spaventato, dimena forsennatamente il corpo ed il telson ma non riesce a nuotare libero nell'acqua con l'elegante stile dorso del cugino *Niphargus ictus*. Poco si sa del *Niphargus montanarius*, nome proposto dalla Borowsky e dal Karaman per una nuova specie rinvenuta nella piccola e strettissima grotta detta Il Bugianardo. Questa piccola grotta è l'unica fin ora conosciuta sul lato sinistro del Fiume Sentino che raggiunge la falda freatica e si sviluppa in gran parte all'interno della formazione cretacea della Maiolica, quindi ad est della faglia che delimita il versante nord-orientale del massiccio calcareo di Frasassi. Potrebbe dunque non essere in diretta comunicazione con il complesso carsico della Grotta del Fiume-Grotta Grande del Vento che si sviluppa in gran parte nel Calcarea Massiccio al di sotto di Monte Valmontagnana a sud-ovest della faglia.

Il *montanarius*, come il *frasassianus* e a differenza dell'*ictus*, è un

camminatore anziché un nuotatore ma è almeno il 25% più grande delle due altre specie. L'interessante è che *Niphargus montanarius* convive con *Niphargus ictus* (il nuotatore). Sembra che le due specie si spartiscano questo habitat, l'uno colonizzando l'ambiente bentonico del fondale e l'altro quello pelagico dell'acqua libera. Non c'è traccia del *Niphargus frasassianus* nel Bugianardo come non si è mai visto il *montanarius* nel complesso Grotta del Fiume-Grotta Grande del Vento. In pratica sembra che il *frasassianus* si sia sviluppato nelle cavità carsiche sul lato destro del Fiume Sentino, inclusa la Sorgente del Tunnel, mentre il *montanarius* si sia conquistato le cavità del lato sinistro (vedi mappa in **figura 46B**). C'è poi una quarta specie geneticamente diversa dalle altre tre di cui un solo paio di esemplari sono stati rinvenuti nel Lago Primo, nella regione del New Mexico della Grotta del Fiume.

L'animale, provvisoriamente chiamato *Niphargus* sp. 4 dagli scopritori Bauermeister e Flot di Göttingen, è geneticamente e morfologicamente simile al *montanarius* anche se più piccolo, e come lui è un camminatore. Nuovi campioni raccolti nei grandi laghi della regione del New Mexico permetteranno di definire meglio la distribuzione di questo *Niphargus* sp. 4 e la ripartizione ambientale che esso ha rispetto al consimile *Niphargus montanarius*. La ricerca sulla biologia, fisiologia e ripartizione ambientale dei niphargidi di Frasassi non può che continuare.





Le acque curative  
di Frasassi

---

### La medicina miracolosa dello zolfo

In una pagina web del dr. Aldo Zecca (2009) si legge che *“Le proprietà curative dello zolfo sono conosciute dall'uomo e dalla medicina dalla notte dei tempi: esso è particolarmente adatto là dove si vogliono curare le malattie bronchiali croniche, in virtù del fatto che ha una grossa capacità di promuovere l'espettorazione. Viene considerato poi un efficace purificatore e ricostituente, acne, psoriasi e seborrea conoscono spesso un miglioramento, quando vengano utilizzati sotto controllo medico prodotti a base di zolfo, perché esso svolge in questi casi la funzione di catalizzatore, e agisce svolgendo un'azione*

fosforo, che insieme (fosfato di calcio) costituiscono le ossa, lo zolfo è, in ordine di abbondanza, il terzo elemento solido presente nel corpo umano, di cui costituisce lo 0,25% della massa totale; non è poco se si considera che il corpo umano è costituito per il 70% di acqua (idrogeno e ossigeno), 3% di azoto, 1,5% di calcio, 1,2% di fosforo, 0,2% di potassio, meno dello 0,2% di cloro, 0,1% di sodio, e meno dello 0,05% di un certo numero di altri elementi chimici.

Da parecchi secoli lo zolfo puro allo stato elementare, anche oggi reperibile in farmacia e venduto in barrette cilindriche, viene utilizzato per la cura di torcicolli, periartriti e dolori cervicali, per semplice strofinamento sulla parte dolorante, oppure sciolto



assorbente. Il suo uso topico-locale-esterno può portare ad ottenere buoni risultati anche nella cura di alcune malattie parassitarie. Quando poi vi sono stati patologici la cui causa è insita in una funzione del ricambio deficitaria o comunque non normale, lo zolfo può intervenire con un effetto risolutivo, perché attiva i processi di ossidazione...”. Ciò è comprensibile se si considera che dopo il calcio ed il

nell'acqua per farne impacchi e pediluvi. Innumerevoli sono i prodotti a base di zolfo che vengono impiegati, come disinfettanti, contro affezioni batteriche o parassitarie. Esiste poi una molecola organica naturale, il metil-sulfonil-metano (MSM con formula  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_3$ ) presente all'interno di tutti gli organismi viventi, che agisce come sostanza biologicamente attiva in quanto facilmente assorbita dai

**FIGURA 47**  
Grotta del Fiume,  
Lago Stratificato.  
Foto di S. Mariani.

tessuti organici. L'MSM è una polvere priva di odore, bianca e cristallina, altamente solubile in acqua calda e in un'ampia varietà di solventi organici. Lo zolfo organico, biologicamente attivo, possiede incredibili proprietà terapeutiche e preventive. Esso presenta proprietà medicinali talmente complete, e basate su principi talmente evidenti, che la sua scoperta è normalmente annoverata fra i più importanti progressi che siano stati compiuti dalla medicina ortomolecolare, nella seconda metà del ventesimo secolo (vedi Vitanaturale, 2009). Insomma, lo zolfo contenuto nelle acque termali, minerale o organico che sia, puzza un po' ma serve e fa bene al corpo umano (Mari, 1981).

#### **Frasassi: un brodo primordiale**

Gli antichi Romani erano molto empirici: se una cosa era bella o buona o comunque funzionale, la coltivavano o la usavano senza chiedersi tanto il perché delle sue qualità. Avevano una particolare attrazione per le acque di fonte, di qualsiasi tipo di acqua naturale sgorgante dalla roccia, liscia o gassata, fredda o calda, leggera o mineralizzata e persino sulfidica, nonostante l'odore non gradevole di uova marce emanato dall'idrogeno solforato. Ad ogni fonte veniva associata una divinità, una ninfa, che veniva ringraziata e venerata. In particolare, le acque termali ricche di zolfo se non ti ammazzavano ti facevano bene, e i nostri antenati ne facevano spesso uso per la cura di tutte quelle affezioni che oggi sappiamo, su basi scientifiche, sono curabili con medicine a base di zolfo.

Un esempio classico è dato dalle famose terme di Saturnia, nella Maremma toscana, non distanti dal vulcano estinto del Monte Amiata. Nella pagina Web Tuttomaremma (2009) si apprende che *"Le Terme di Saturnia e le sue acque sulfuree che sgorgano dal sottosuolo con una portata di 800 litri al secondo ed una temperatura costante di 37° C, erano conosciute*

*già ai tempi degli Etruschi i quali avevano individuato nella sorgente virtù "miracolose". Successivamente, a partire dal 280 a.C., furono i Romani a trarre beneficio dalle Terme di Saturnia. Furono i primi a creare veri e propri edifici per lo sfruttamento terapeutico della sorgente; sono tutt'oggi visibili numerosi reperti a testimonianza dell'operato dei Romani...*

*Dal punto di vista scientifico, l'acqua di Saturnia è: "acqua minerale omeotermale sulfureo-carbonica, solfato-bicarbonato-alcantino terrosa" ed annovera tra le sue peculiarità la presenza di due gas disciolti quali l'idrogeno solforato e l'anidride carbonica. La composizione di quest'acqua racchiude il segreto della sua proprietà salutare efficace per la pelle, l'apparato respiratorio e muscolo-scheletrico" (vedi anche Mari, 1981).*

Un altro esempio, fra i tanti in Italia, di acqua solfurea con rinomate proprietà terapeutiche è quella delle Terme di Sirmione, sul Lago di Garda. L'utilizzo di questa sorgente di acqua termale che scaturisce dalla Fonte Boiola a 20 metri di profondità nel Lago di Garda con una temperatura di circa 70° C è relativamente recente e risale al tardo '800. È un'acqua minerale naturale sulfurea salso-bromoiodica, le cui proprietà antinfiammatorie, immuno-stimolanti, fluidificanti ed anticatarrali la rendono adatta alla detersione delle secrezioni catarrali del naso e della gola negli adulti e nei bambini e per la prevenzione e la cura delle affezioni alle prime vie aeree (vedi Cosmetici.shop.it, 2009). Sgorga alla sorgente batteriologicamente pura e viene venduta in farmacia al prezzo di circa 100 € al litro (più o meno quanto una buona bottiglia di Brunello di Montalcino).

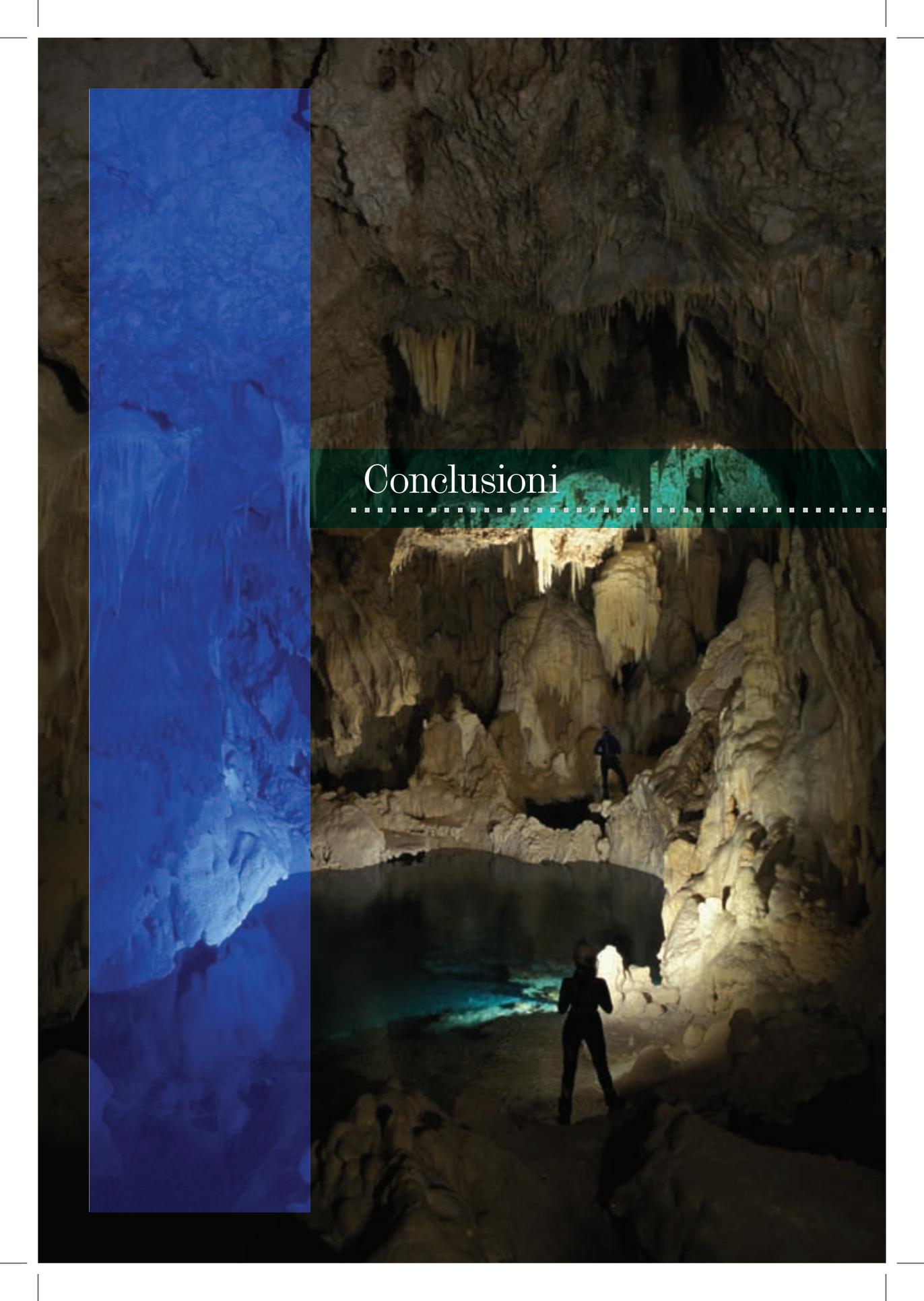
In entrambi i casi di Saturnia e Sirmione, si tratta di acque termali nel vero senso dell'aggettivo, ovvero che sgorgano calde in quanto generate in profondità dove vengono riscaldate dal gradiente termico della crosta terrestre. Che si può dire, invece, delle acque solfuree di Frasassi? Innanzi

tutto abbiamo visto che sono acque che sgorgano fredde in quanto generate a qualche centinaio di metri di profondità all'interno di una formazione di rocce sedimentarie, le Anidriti del Burano. Le proprietà terapeutiche dell'acqua solfurea di Frasassi erano conosciute sin dai tempi dei Romani. Dagli anni sessanta viene prelevata per presa diretta alla fonte, ubicata sulla riva sinistra del Fiume Sentino all'uscita orientale della Gola di Frasassi e, tramite una condotta sotterranea lunga circa 400 metri, fornisce l'impianto terapeutico delle Terme di San Vittore, nel villaggio omonimo. Nei manuali medici, l'acqua di San Vittore è descritta come minerale-solfureo-sodica.

A detta dei medici che la prescrivono, l'alto contenuto di zolfo è la caratteristica che garantisce a quest'acqua buone possibilità curative, cosa che accomuna tutte le acque solfuree, soprattutto per quanto riguarda una svariata serie di affezioni delle vie respiratorie, otiatriche, cutanee e reumo-artropatiche. Dai tempi che furono, c'è pure chi la beve direttamente alla fonte per curarsi affezioni del fegato o di tipo gastro-intestinale. Insomma, pare proprio vero che lo zolfo sia una medicina miracolosa.

Eppure l'acqua di San Vittore non è solo un'acqua minerale fatta di varie sostanze inorganiche in essa disciolte, tra cui lo zolfo nella forma di idrogeno solforato a cui viene attribuita la proprietà di principio attivo. Abbiamo visto che in grotta la falda sulfidica contiene una cospicua biomassa chemiosintetica (i solfobatteri e gli archea) che è alla base di un complesso ecosistema stigobitico. Insomma, non si può affermare che sia un'acqua batteriologicamente pura. Praticamente più che un'acqua minerale quella sulfidica di Frasassi è un brodo primordiale. Sorge dunque il sospetto che sì lo zolfo è l'origine chimica delle proprietà terapeutiche di questa come di qualsiasi altra acqua solfurea, ma che sia proprio il metabolismo degli organismi stigobionti che, elaborando l'idrogeno solforato,

producono tutta una serie di molecole organiche a base di zolfo (come il già accennato metil-sulfonil-metano) che agiscono in maniera efficace sulle deficienze biologiche e/o metaboliche del nostro organismo. In scienza, il sospetto può tradursi in ipotesi, e l'ipotesi sul carattere biologico delle acque curative di Frasassi incoraggia nuova ricerca.



## Conclusioni

Con questo libretto, abbiamo voluto svelare al pubblico le conoscenze acquisite negli ultimi anni sugli stigobionti del complesso carsico di Frasassi. Sono il risultato di ricerche scientifiche specialistiche ed interdisciplinari condotte da diversi gruppi di lavoro che hanno beneficiato anche del finanziamento pubblico della Regione Marche. Perseguito lo scopo divulgativo di questa pubblicazione, si è cercato di introdurre i lettori e le lettrici ad argomenti scientifici complessi ed estremamente specialistici, dall'inquadramento geologico dell'area di Frasassi, alle attuali conoscenze sull'evoluzione dell'universo e della vita sul nostro pianeta, dalla classificazione tassonomica a quella filogenetica degli esseri viventi, dalle tecniche di osservazione dal vivo a quelle dell'analisi della microbiologia molecolare, dalla descrizione delle forme viventi allo studio dei loro comportamenti e fisiologie. Questa pubblicazione è stata per noi anche un'occasione per mostrare al pubblico come una ricerca scientifica interdisciplinare si svolga in realtà. All'inizio si parte sempre da un quesito, a volte da un sospetto, da cui poi si prosegue secondo un semplice ma rigido metodo scientifico alla ricerca di una risposta coerente: 1) formulazione di un'ipotesi di lavoro; 2) ideazione di test analitici basati su una predizione dei possibili risultati; 3) verifica dell'ipotesi di partenza e discriminazione dei possibili risultati predetti sulla base di quelli ottenuti; 4) conclusione induttiva e formulazione di nuove ipotesi, di test, di analisi, ecc., e la ricerca continua.

Ciò che motiva la ricerca scientifica non è la fede, né tanto meno il denaro o la politica, quanto la curiosità. Eppure non si può negare che la conoscenza serva alla società umana, anzi si può tranquillamente affermare che il benessere della società dipende, in gran parte, dalla conoscenza del come, del quando e del dove dei fenomeni naturali. Nel nostro piccolo, a Frasassi, abbiamo contribuito ad ampliare un po' le conoscenze sulla

vita acquatica delle grotte e dell'ecosistema chemiosintetico autotrofo che si è sviluppato all'interno di esse. Quello che abbiamo raccontato è probabilmente solo la punta dell'iceberg di ciò che veramente, nella sua complessità, avviene all'interno dell'anticlinale di Valmontagnana-Frasassi. Per i ricercatori coinvolti (i curiosoni), la ricerca va avanti ma nel frattempo si è delineato anche un aspetto rilevante per la società: la possibilità (il sospetto) che le acque solfuree delle Terme di San Vittore debbano le loro indiscusse proprietà terapeutiche in parte proprio alla attività chemiosintetica degli organismi stigobionti che vivono all'interno della montagna. Il solo sospetto dovrebbe già far apprezzare l'importanza del mantenimento ed il monitoraggio dell'ambiente ipogeo naturale, anche in considerazione del fatto che la Grotta Grande del Vento è visitata, annualmente, da più di 300.000 persone. Concludiamo che conoscere la Natura è il *sine qua non* per rispettarla e per godere dei suoi benefici.



Referenze citate

Bodon M., Cianfanelli S., Manganelli G., Pezzoli E. & Giusti F., 2005. Mollusca Gastropoda Prosobranchia ed Heterobranchia Heterostropha. In: Checklist e distribuzione della fauna italiana. 10.000 specie terrestri e delle acque interne. Mem. Mus. Civ. St. Nat. Verona, 2° Serie: p. 79-81, 1 CD.

Bodon, Manganelli G. & Giusi F., 2001. A Survey of the European valvatiform hydrobiid genera, with special reference to *Hauffenia* Pollonera, 1988 (Gastropoda: Hydrobiida): *Malacologia*, v. 43 (1-2), p. 103-215.

Bodon M. & Cianfanelli S., 2002. Idrobiidi freatobi del bacino del fiume Magra (Gastropoda: Prosobranchia: Hydrobiidae). *Bollettino Malacologico*, v. 38 (1-4), p. 1-30.

Buonanno F., Bramucci M., Iio H. & Orteni C., 2005. Effects of climacostol on normal and tumoral mammalian cell lines. *Journal of Eukariotic Microbiology*, v. 52, p. 39S.

Buonanno F., Quassinti L., Bramucci M. & Orteni C., 2006. Antimitotic and cytotoxic activity of climacostol on tumoral mammalian cells *Journal of Eukariotic Microbiology*, v. 53, p.21S.

Buonanno F., Quassinti L., Bramucci M., Iio H. & Orteni C., 2006. Le molecole antitumorali dei protozoi ciliati: Università di Macerata, Facoltà di Scienze della Formazione, *Annali EUM* edizioni, pp. 373-392.

Buonanno F., Quassinti L., Bramucci M., Iio H. & Orteni C., 2008. The protozoan toxin climacostol inhibits growth and induces apoptosis of human tumor cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, v. 176, p. 151-164.

Buonanno F. & Orteni C., 2009. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by climacostol in human promyelocytic leukemia cells: *Journal of Eukaryotic Microbiology* ISBN/ISSN: 1066-5234, in stampa.

Cianfanelli S., Lori E. & Bodon M., 2007. Non-indigenous freshwater molluscs and their distribution in Italy. In Gherardi F.: *Biological invader in inland waters: profiles, distribution, and threats*. Springer, Dordrecht., Chapter five: p. 103-121.

Cosmetici.shop, 2009. L'acqua di Sirmione.  
<http://cosmetici.shop.it/sanitari/i-igiene-del-naso-e-della-gola/acqua-di-sirmione/>

Dattagupta S., Schaperdoth I., Montanari A., Mariani S., N. Kita, J. W. Valley & Macalady J. L., 2009. A recently evolved symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a cave-dwelling amphipod. *ISME Journal*, p. 1-9.

De Agostini, 1968. Gli animali invertebrati: *Enciclopedia delle Scienze*, edito dall'Istituto Geografico de Agostini, Novara, v. 1.

Erséus C., Wetzel M. J. & Gustavsson L., 2008. ICZN rules-a farewell to Tubificidae (Annelida, Clitellata), *Zootaxa*, v. 1744, p. 66-68.

Galassi D. M. P., Huys R. & Reid J. W., 2009. Diversity, ecology and evolution of groundwater copepods: *Freshwater Biology*, v. 54, p. 691-708.

Galdenzi S., 2004a. *Le Grotte di Frasassi*: Unione Tipografica Jesina, Jesi, p. 1-79.

Galdenzi S., 2004b. *Frasassi 1989-2004: gli sviluppi nella ricerca*: S. Galdenzi editore, Consorzio Frasassi, Genga, p. 1-160.

- Galdenzi S. & Maruoka T., 2003. Gypsum deposits in the Frasassi caves, Central Italy: *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 65, p. 111-125.
- Galdenzi S., Menichetti M., Sarbu S. M. & Rossi A., 1999. Frasassi caves: a biogenic hypogean karst?: in Audora P. (Ed.) "Proceedings of the European Conference Karst 99", Université de Provence, *Etudes de Géographie physique, travaux 1999, suppl. v. 28*, p. 101-106.
- Galdenzi S. & Sarbu S., 2000. Chemosintesi e speleogenesi in un ecosistema ipogeo: i rami sulfurei delle Grotte di Frasassi (Italia Centrale). *Le Grotte d'Italia*, v. 1, p. 3-18.
- Galdenzi S., Cocchioni M., Morichetti L., Amici V. & Scuri S., 2008. Sulfidic groundwater chemistry in the Frasassi caves, Italy. *Journal of Cave and Karst Studies*. v. 70, p. 94-107.
- Giusti F., Pezzoli E. & Bodon M., 1981. *Notulae malacologicae*, XXVIII. Primo contributo alla revisione del genere *Islamia* (Radoman, 1973) in Italia. *Lav. Soc. Malac. It., Atti V Conv. SMI*: p. 49-71.
- Gowarty N., Borowsky E. & Borowsky R., 2008. *Niphargus ictus* Karaman 1985, an eyeless cave amphipod, responds to light. 19th Symposium of Subterranean Biology, in Fremantle, Australia, September 21-26, 2008.
- Favilli L., Manganelli G. & Bodon M., 1998. La distribuzione di *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) in Italia e in Corsica (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Atti Soc. it. Sci. Nat. Museo civ. Stor. Nat. Milano*, v. 139, p. 23-55.
- Hegeman R. F., 2007. Microbial influence on carbonate dissolution in stratified Waters in the Frasassi cave system, Italy: Tesi di Laurea, The Pennsylvania State University, USA, p. 1-42.
- Jones D. S., 2006. Geomicrobiology of highly acidic, pendulous biofilms ("snottites") from the Frasassi Caves, Italy. Tesi di Laurea, Carleton College, Northfield, Minnesota (USA), p. 1-66.
- Kureck A., 1964. "Light Sensitivity in the Amphipode *Niphargus aquilex* Schellenbergi Karaman". *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 20(9) p. 523-524.
- Li & Cooper, 2002. The Effect of Ambient Light on Blind Crayfish: Social Interactions. *Journal of Crustacean Biology* 22: p. 449-458.
- Macalady J. L., Lyon E. H., Koffman B., Albertson L. K., Meyer K., Galdenzi S. & Mariani S., 2006. Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72 (8): p. 5596-5609.
- Macalady J. L., Jones D. S. & Lyon E. H., 2007. Extremely acidic, pendulous microbial biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology*, v. 9(6), p. 1402-1414.
- Macalady J. L., S. Dattagupta, I. Schaperdoth, G. K. Druschel, D. Eastman. 2008a. Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *ISME Journal*, v. 2: p. 590-601.
- Macalady J. L., Jones D. S., Schaperdoth I., Bloom D. & McCauley R., 2008b. Meter-long microbial ropes from euxinic cave lakes. *Eos Transactions. AGU*, v. 89 (53), Fall Meeting Supplement, Abstract B53C-0514.
- Mari P., 1981. *Idrologia Medica*: Galeano Editrice, Perugia, p. 1-93.

Mariani S., Mainiero M., Barchi M., van der Borg K., Vonhof H. & Montanari A., 2007. Use of speleologic data to evaluate Holocene uplifting and tilting: an example from the Frasassi anticline (northeastern Apennines, Italy): *Earth and Planetary Science Letters*, v. 257, p. 313-318.

Montanari A., Galdenzi S. & Rosetti G., 2002. "Gocce di Tempo: passeggiando fra sassi", guida geologica del Parco di Frasassi-Gola della Rossa, con CD audio di musica geofonica quaternaria: Osservatorio Geologico di Coldigioco, p. 1-95.

Parco Naturale della Gola della Rossa e di Frasassi, 2000. Il mondo sotterraneo: Comunità Montana dell'Esino e Frasassi e Parco Naturale della Gola della Rossa e di Frasassi (Ed.), p. 1-160.

Sarbu S. M., Galdenzi S., Menichetti M. & Gentile G., 2000. Geology and biology of Grotte di Frasassi (Frasassi Caves) in central Italy, an ecological multidisciplinary study of a hypogenic underground karst system. In: *Ecosystems of the world* (H. Wilkens, D.C. Culver, and W.F. Humphreys, Eds), Elsevier, New York, p. 359-378.

Tuttomaremma, 2009.

<http://www.tuttomaremma.com/termedisaturnia.htm>

Vitanaturale, 2009. Il miracolo del MSM.

<http://www.vitanaturale.it/news/>

Vlasceanu L., Sarbu S. M., Engel A. S. & Kinkle B. K., 2000. Acidic, cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiology Journal*, v. 17, p. 1-15.

Wikipedia, 2009.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Timeline\\_of\\_evolution](http://en.wikipedia.org/wiki/Timeline_of_evolution)

Zecca A., 2009. Le proprietà terapeutiche dello zolfo.

<http://www.aldozecca.net>

Le immagini fotografiche alle pagine II, IV, VI, VIII, X,  
10, 16, 29, 30, 75, 76, 80 e 82 sono di Sandro Mariani

Progetto grafico editoriale a cura della CplC  
[www.cplc.it](http://www.cplc.it)

Stampa Anibaldi Grafiche  
[www.anibaldi.it](http://www.anibaldi.it)

Finito di stampare nel mese di maggio 2010 - Anno Internazionale della Biodiversità



