

LE FOVAL DELLA GROTTA ZINZULUSA IN PUGLIA (SE-ITALIA)

SUMMARY

The clay-slime vermiculations, termed “foval” (from italian “Formazioni Vermicolari Argillo-Limose), are speleothemes of still obscure origin. In the Zinzulusa cave (Pu 107, SE-Italy) fovals are very abundant, scattered on all vertical and horizontal rock surfaces, including those of calcitic speleothemes (stalactites and stalagmites). Fovals with different texture complexity (c1-c4, according to the classification proposed in this paper), with or without halo, were found. The foval study took into consideration both morphological (inclination, perimeter, area, length, thickness, diameter, and colour) and microbiological characteristics. Microbiological analysis revealed the fungus *Geotrichum* sp. as dominant organism, besides several bacteria of clinical interest (*Shigella* sp., *Campylobacter concisus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. hafniae*, *Pseudomonas sutzeri*, *P. aeruginosa*, *Ancalomicrobium adetum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Maraxella lacunata*, *M. osloensis*). *Geotrichum*-cultures suggest that this organism is responsible for the vermicular effect: in fact, *Geotrichum* produces a thick mucus aggregating clay particles; in addition, the colonies show a tendency to develop linearly according to a dendritic pattern, thus being considered as precursors of the most common foval morphology. These data support the hypothesis of biologic origin for the Zinzulusa foval complex.

INTRODUZIONE

Agli speleologi è ben noto il fenomeno delle cosiddette “formazioni vermicolari argillo-limose” (da cui l’acronimo “foval”) note anche come “vermicoliti di grotta” (PARENZAN, 1960). La denominazione di “vermicolazioni” appare, peraltro, non sempre appropriata, giacché talune di queste formazioni si possono presentare, come semplici insiemi di macule. Vi è stato qualche tentativo di classificare le foval in base sia alla presunta origine (RENAULT, 1953a), (Tab. 1) che alle diverse texture con cui si presentano (PARENZAN, 1960), (Tab. 2). La classificazione del Parenzan, tuttavia, per quanto efficace sul piano descrittivo, utilizza talvolta una terminologia che può dare adito ad interpretazioni non rispondenti alla realtà: ad

FAMIGLIE	FORME DI CORROSIONE	FORME DI DEPOSITO
I - Vermicolazioni da ruscellamento	a) Vermicolazioni di corrosione dei ciottoli sahariani	b) Vermicolazioni di calcite
II - Vermicolazioni strutturali	a) Stiloliti b) Vermicolazioni alveolari	c) Dendriti di manganese d) Vermicolazioni argillose

Tab. 1 - Classificazione delle vermicolazioni sec. RENAULT (1963a).

RAGGRUPPAMENTO	TOPOLOGIA
1° Gruppo Maculazioni argillo-limose	1) Macule puntiformi (<i>pimple-like spots</i>) 2) Macule plachiformi (<i>plate-like spots</i>) 3) Macule bollose (<i>bubble-like spots</i>) 4) Macule irregolari, ellissoidi o allungate (<i>irregular, ellipsoidal or elongated spots</i>)
2° Gruppo Vermicolazioni argillo-limose	5) Vermicolazioni grosse (pelle di leopardo) (<i>large vermiculations "leopard skin"</i>) 6) Vermicolazioni allungate, semplici o anastomizzate (pelle di tigre) (<i>linear, elongated, single or anastomising vermiculations, "tiger skin"</i>) 7) Vermicolazioni a geroglifici (<i>hieroglyphic vermiculations</i>) 8) Vermicolazioni dendritiche (<i>dendritic vermiculations</i>) 9) Vermicolazioni di "montmilk" (<i>montmilk vermiculations</i>) 10) Vermicolazioni non rientranti nelle precedenti (<i>others vermiculations</i>)

Tab. 2 - Classificazione dei fenomeni vermicolari sec. PARENZAN (1960).

esempio, la denominazione delle foval descritte come "a pelle di leopardo" (*leopard skin*) fa pensare a strutture grosso modo tondeggianti e che andrebbero classificate tra le "maculazioni" argillo-limose, mentre l'Autore le fa rientrare nel gruppo delle "vermicolazioni" argillo-limose. Esistono delle formazioni, inoltre, che sullo stesso substrato e a distanze molto ravvicinate si comportano, da un lato, come "vermicolazioni a geroglifici", dall'altro come "vermicolazioni dendritiche", perciò difficili da classificare in modo categorico nell'una o nell'altra categoria: infatti, le "vermicolazioni dendritiche" sono, in realtà, forme semplicemente meno complesse di quelle "a geroglifici" per il minor numero di ramificazioni ed anastomosi. In definitiva, le classificazioni delle foval esistenti in letteratura si presentano poco chiare, il che suggerisce l'opportunità di una terminologia quanto più oggettiva ed uniforme possibile. Allo scopo di individuare correttamente le varie tipologie di foval, si propone il seguente schema di classificazione in cui le foval vengono suddivise in quattro classi sulla base del livello di complessità texture (Tab. 3):





Classe 1 (foval c1): tondeggianti a contorno regolare con dimensioni, spessore e colore variabili. Rapporto dei diametri ortogonali all'incirca unitario ($d_1/d_2 = 1$). Corrispondono alle maculazioni puntiformi, plachiformi e bollose della classificazione del Parenzan. Possono rientrare in questa classe anche le vermicolazioni "a pelle di leopardo".

Classe 2 (foval c2): ellissoidali o allungate senza ramificazioni. L'asse maggiore (d_1) è almeno 2 volte quello minore (d_2): $d_1 \geq 2d_2$. Corrispondono alle macule irregolari, ellissoidali o allungate ed alle vermicolazioni lineari, allungate e semplici della classificazione del Parenzan.

Classe 3 (foval c3): allungate con almeno una ramificazione. Non presentano, nell'aspetto generale, anastomosi. Corrispondono alle vermicolazioni dendritiche della classificazione del Parenzan. Possono includere anche le "tiger skin vermiculations".

Classe 4 (foval c4): molto allungate con numerose ramificazioni che si anastomizzano tra loro, formando texture molto complesse e corrispondenti alle vermicolazioni a geroglifici della classificazione del Parenzan.

Questo schema – volutamente sintetico – è in qualche modo riduttivo in quanto non tiene

Classe	Texture model	Descrizione	Corrispondenza con la XX classificazione X sec. Parenzan X
1 <i>foval c1</i>		- foval tondeggianti ($d_1/d_2 = 1$) - contorno regolare	1° gruppo: <i>macule puntiformi</i> <i>pacule plachiformi</i> <i>macule bollose</i> 2° gruppo <i>vermicolazioni a pelle di leopardo</i>
2 <i>foval c2</i>		- foval ellissoidali o allungate ($d_1/d_2 > 1$) - assenza di ramificazioni - contorno abbastanza regolare	1° gruppo <i>macule irregolari, ellissoidali o allungate</i> 2° gruppo <i>vermicolazioni lineari, allungate e semplici</i>
3 <i>foval c3</i>		- foval allungate - una o poche ramificazioni - contorno regolare - rare anastomosi	2° gruppo <i>vermicolazioni dendritiche</i>
4 <i>foval c4</i>		- foval molto allungate - molte ramificazioni - numerose ramificazioni - numerose anastomosi	2° gruppo <i>vermicolazioni a geroglifici</i>

Tab. 3 - Classificazione delle formazioni vermicolari argillo-limose (foval) proposta nel presente lavoro.

che si presenta normalmente più scuro rispetto al substrato (Fig. 1). Spesso è ben visibile un'area più chiara intorno al *core*, a contorno piuttosto regolare, l'alone (*halo*, h), che di solito manca nei casi in cui lo spazio interfoval (*si*) è esiguo o del tutto assente. Ciò avviene, ad esempio, nel caso in cui delle foval c4 si presentano molto ravvicinate tra loro pur conservando la propria individualità. Si propone di indicare la presenza di *halo* aggiungendo il suffisso "h" alla relativa classe (es.foval c4-h).

Il fenomeno in oggetto si presenta piuttosto diffuso nelle regioni a clima temperato, mentre non si rileva dalla letteratura presenza di foval in grotte dell'area intertropicale. Peculiare delle foval è la notevole variabilità di forme, colore e consistenza. Infatti, si presentano normalmente di consistenza pastosa per l'elevato tenore d'umidità ($W_{H_2O} > 45\%$), mentre si considerano fossili le foval dall'aspetto molto più esile ed a bassa idratazione ($W_{H_2O} < 30\%$). Il colore è in relazione con un complesso di fattori generalmente legati alla natura del substrato ed alla composizione mineral-organica delle concrezioni. Di norma, le foval più idratate si presentano più scure di quelle secche; sono anche note unità di colore bianco-giallastro: esse si formano su rocce soggette a forte corrosione superficiale nonché, abbastanza raramente, su latte di monte (*montmilk*). Foval bruno-nerastre si presentano

conto delle dimensioni, dello spessore, del colore e della composizione delle foval: fattori che, peraltro, si ritiene debbano essere piuttosto correlati con la genesi delle foval e, naturalmente, con il substrato su cui esse si sono originate. Pur considerando la grande variabilità delle foval, è tuttavia possibile individuare delle caratteristiche in comune più o meno evidenti. La parte più visibile, che si distingue nettamente dal substrato, è il nucleo o *core* (c)

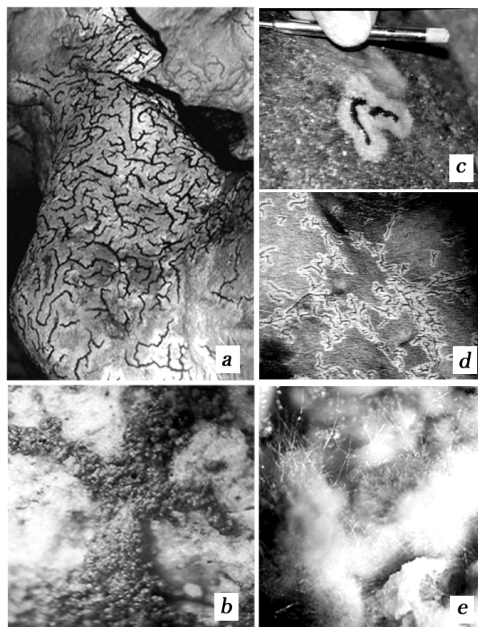


Fig. 1 - Aspetti tipici delle foval della grotta Zinzulusa. a: foval c3 su parete concrezionata (foto G. Ciccarese); b: particolare ingrandito di una foval c3 (x20); c: caratteristica foval c2-h; d: gruppo di foval c3-h (stazione Zi-2); e: filamenti vegetativi di *Geotrichum* su foval c3 (x 70).

ricche di Mn e Fe, mentre quelle rossicce devono il loro colore ad una concentrazione di sali ferrosi. Il colore verdastro di molte foval è da correlare alla presenza di cianobatteri normalmente assenti nella zona afotica delle grotte, ma presenti con estese colonie in corrispondenza di aree illuminate artificialmente.

La grotta Zinzulusa (Pu 107. 40° 00' 40" N, 05° 58' 44" E. Castro, LE) è una cavità costiera di eccezionale interesse biospeleologico e di rilevante valore archeologico, da qualche tempo oggetto di intensa fruizione turistica. Altrettanto eccezionale vi si presenta il fenomeno delle foval, che appaiono distribuite piuttosto uniformemente su volte e pareti di tutta la grotta. Sono presenti foval appartenenti a tutte e quattro le classi precedentemente definite, con o senza *halo* e in vari stadi di maturazione, dalle forme giovanili a quelle fossili. Questa particolare condizione si è presentata favorevole per uno studio sistematico delle formazioni con l'obiettivo principale di verificare l'ipotesi dell'origine biologica delle foval, avanzata per la prima volta da ANELLI *et al.* (1967) sulla base dei risultati delle analisi microbiologiche effettuate su alcune foval delle grotte di Castellana (BA), e in seguito sostenuta da risultanze (CAMASSA, 1997) relative ad una cavità artificiale della Gravina di Ginosa (TA).

MATERIALE E METODI

Siti di campionamento

La grotta Zinzulusa è stata suddivisa in sette siti di osservazione e raccolta. I siti sono stati siglati Zi-n ($n = 0 \dots 6$) a partire dall'ingresso (vestibolo) della grotta fino alla parte più interna corrispondente al Cocito (Fig. 2). Ad esclusione della stazione Zi-0 in cui penetra, seppur con debole intensità, la luce solare, e delle stazioni Zi-2 e Zi-6, prive di illuminazione, le altre (Zi-1, Zi-3, Zi-4 e Zi-5) possono essere definite zone disfotiche per la presenza di lampade a radiazione luminosa calda che illuminano la grotta con un fotoperiodo abbastanza regolare durante il giorno. Infatti, le ore di luce corrispondono all'intervallo tra apertura e chiusura al pubblico della cavità: 8h/die nel periodo estivo (15.VII - 15.IX) e 6 h/die nel resto dell'anno.

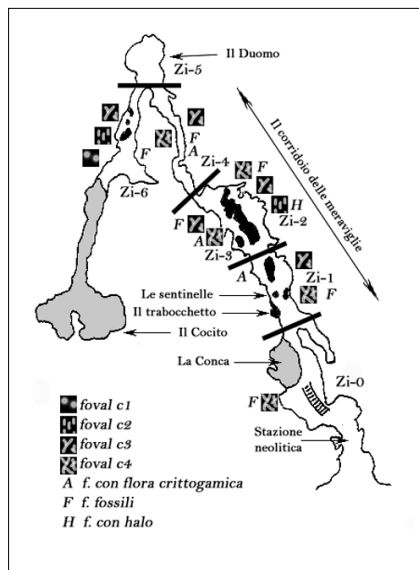


Fig. 2 - Posizione dei siti di campionamento nella Zinzulusa.

Il campionamento è stato eseguito con lo scopo di sottoporre il materiale sia ad uno studio della morfologia microscopica che ad analisi microbiologiche, per cui si è applicato il protocollo standard di prelievo con materiale sterile (spatoline monouso e tamponi in fibra di dacron). Parte dei campioni è stata conservata in flaconcini di vetro, parte introdotta direttamente in terreno liquido d'arricchimento (brodo triptosio Liofilchem®) e altra parte, infine, seminata direttamente su terreni solidi malt agar, Sabouraud e TSI. In ogni stazione è stato effettuato il prelievo sia di materiale fovalico (*core*, eventuale *halo* e spazio interfoval) che di substrato esterno, privilegiando per il campionamento aree normalmente non raggiungibili dai visitatori. La stazione Zi-2, in particolare, è stata individuata in un'area totalmente interdotta ai turisti. Da essa si è inoltre prelevato un frammento già distaccato di roccia di 25 x 20 x 8 cm con qualche foval da esaminare integra al c3 microscopio. Il campione è stato tenuto in un contenitore

di polistirolo espanso umidificato mediante una spugna imbevuta di acqua distillata sterile, e trasportato in laboratorio avendo cura di non danneggiare la superficie della roccia concrezionata a foval.

Piccole quantità di materiale sono state prima pesate e successivamente stemperate in acqua distillata sterile ($w_{\text{H}_2\text{O}}/w_{\text{foval}} = 1$), quindi osservate al microscopio ottico sia a luce normale (ingr. 200x e 400x) che a contrasto di fase (ingr. 400x). Il conteggio dei nematodi è stato eseguito mediante camera di Neubauer (ingr. 20x).

Il campione di roccia è stato esaminato 24 h dopo il prelievo con uno stereomicroscopio a vari ingrandimenti e subito conservato in termostato a 18°C ad umidità controllata (RH > 85%) per due mesi, quindi lasciato in un apposito contenitore di polistirene (temperatura: 15 - 30°C; RH = 35 - 50%) per altri 12 mesi.

Le parti di foval introdotte in brodo triptosio sono state conservate in stufa termostata a 36°C per 24h e poi inseminate sui terreni di Sabouraud, Malt Agar, Trypticase Soy Agar e PDY a temperature differenziate di 20°, 24° e 36°C per 15 gg, con controllo ogni 24 h. I campioni solidi sono stati sospesi in piccole quantità di acqua distillata sterile o di soluzione di Ringer, e quindi seminati su agar. Il Trypticase Soy Agar (Sigma®) e il terreno di Sabouraud (Liofilchem®) sono stati preparati seguendo le procedure standard a partire dai prodotti liofilizzati. Il Malt agar è stato preparato aggiungendo il 2.0% di estratto di malto (Difco®), 2.0% di glucosio (Sigma®), 0.1% di peptone (VWR®) e 1.0% di agar (VWR®). L'agar PDY è stato ottenuto aggiungendo 1.25 g/L di peptone (VWR®), 1.25 g/L di estratto di lievito (Sigma®) e 3.0 g/L di glucosio (Sigma®). Tutti i terreni in fase liquida sono stati sterilizzati per 15 minuti sotto pressione di 15 psi in autoclave e distribuiti in capsule di Petri profonde 1.0 cm e di diametro di 10.0 cm. La solidificazione è stata eseguita in ambiente sterile sotto cappa a flusso laminare.

La colorazione dei flagelli è stata eseguita mediante applicazione agli strisci batterici, per 5 min, di mordenzante preparato aggiungendo 2.0 ml di acido tannico al 20% a 2.0 ml di soluzione satura di HgCl_2 , a 5.0 ml di soluzione satura di NaCl e a 0.4 ml di soluzione alcolica satura di fucsina basica. I vetrini sono stati lavati in acqua corrente, colorati con la carbofucsina acida di Ziehl-Neelsen per 5-10 minuti, nuovamente lavati con acqua, lasciati asciugare ed esaminati al microscopio ottico con obiettivo ad immersione (cf. BAILEY *et al.*, 1974). Per la colorazione di Gram è stato usato il kit della VWR®.

Per l'osservazione dei batteri con i relativi flagelli e la lettura degli strisci colorati col metodo di Gram è stato utilizzato un microscopio binoculare Zeiss® Ultralux. Le misure sono state effettuate con oculare micrometrico Zeiss® 10x, previamente tarato con vetrino micrometrico, utilizzando come obiettivo un 100x ad immersione in olio di cedro. I contenitori dei campioni sono stati trattati con alcool isopropilico al 70% e lasciati asciugare sotto cappa a flusso laminare.

L'identificazione dei ceppi batterici e fungini è stata effettuata in base all'esame macroscopico delle colonie (colore, lucentezza, forme), al rilevamento dei caratteri microscopici dei batteri (colorazione di Gram, presenza di capsula, morfologia, motilità, dimensioni), alla tipizzazione biochimica su Triple Sugar Iron (TSI) in Rosso Metile - Voges Proskauer liquido, nitrate medium liquido, agar fenilalanina, agar citrato, urea medium liquido (cf. BAILEY *et al.*, 1974). Per la tipizzazione batterica sono stati adoperati: TSI, TSI gas, TSI butt, TSI slant, TSI H_2S , citrato, catalasi, indolo, rosso metile, fenilalanina, ureasi, Voges Proskauer, riduzione dei nitrati, ossidasi. L'agar TSI a becco di clarino è stato inseminato per infissione con un ago da inoculo. La crescita delle colonie è stata riportata nel database annotando l'eventuale

viraggio del colore nell'area dell'inoculo e l'eventuale produzione di gas e di sulfidi. La produzione della catalasi è stata determinata aggiungendo una o due gocce di H_2O_2 al 3.0 % su una piccola area della cultura; l'eventuale sviluppo di effervescenza indica risultato positivo. Il test dell'ossidasi di Kovacks è stato effettuato ponendo su carta da filtro con un'ansa sterile, una colonia isolata e trattandola con una goccia di tetrametyl-para-phenelendiamine dihydrochloride in soluzione (0.1 g per 10 ml di acqua distillata).

I dati relativi alle reazioni biochimiche dei microrganismi isolati sono stati resi disponibili all'interno di un database consultabile via Internet (www.well.com/user/peter/peter.html) usando la seguente notazione: len = lunghezza, mm; wid = larghezza, mm; dia = diametro, mm; ind = indolo, +, -; enc = capsula, +, -; mot = motilità, +, -; ure = ureasi, +, -; cit = citrato, +, -; cat = catalasi, w + ++ +++ -; nit = riduzione dei nitrati, +, -; nit = riduzione dei nitriti, ++, -; phe = fenilalanina, +, -; mrd = rosso metile, +, -; kov = Kovacks oxydase, w + -; vog = Voges Proskauer, +, -; g = Colorazione di Gram, +, -; r = rods; c = cocchi; b = bacilli; v = vibroni; f = filamenti; s = spirilli. +, risultato positivo; -, risultato negativo; w, reazione variabile; /, inclinazione; ^, osservazione microscopica.

Una volta che l'organismo è stato codificato in un formato standard, è stato possibile effettuare una comparazione immediata con un gran numero di organismi di altre grotte memorizzati nel database.

L'analisi comparata della collezione microbiologica della Zinzulusa con la flora microbica presente in altre grotte è stata effettuata attraverso l'utilizzo del software *compare.bas* pure disponibile sullo stesso sito Internet di uno degli autori (P.F.). Il calcolo dell'indice di biodiversità delle foval è stato eseguito mediante l'applicazione del software BioDiversity (cf. COLWELL *et al.*, 1994).

Tutte le analisi morfometriche delle foval sono state eseguite su documentazione fotografica. Le immagini sottoposte a calcolo provengono sia da fotografie d'archivio, sia da acquisizione diretta su pellicola e su supporto digitale (DV). In ogni caso tutti i documenti fotografici sono stati convertiti in uno dei formati grafici (tif, bmp, gif, jpg) compatibili con il software utilizzato per l'analisi. Successivamente le immagini sono state sottoposte ad *image processing* con Adobe® Photoshop 5.0 allo scopo di aumentarne la leggibilità, mediante la regolazione della luminosità, del contrasto e della paletta cromatica. A ciascun campione è stato applicato il *cropping* digitale non simmetrico per l'eliminazione delle aree non destinate ad analisi (zone d'ombra, aree non a fuoco, substrati non piani, oggetti estranei).

Il rilevamento dei dati morfometrici è stato realizzato con procedimento digitale mediante il software di calcolo SPSS® Sigmascan Pro 5.0. Previa taratura del sistema di rilevamento dimensionale delle immagini, si è proceduto a determinare i seguenti parametri: area del *core* (S_c), area dell'eventuale *halo* (S_h), inclinazione media (δ_m), asse maggiore (d_1), asse minore (d_2), perimetro (p) (Fig. 3).

RISULTATI

La distribuzione delle varie classi di foval nella Zinzulusa è risultata in linea con la situazione nota per altri ambienti carsici ipogei. È stata rilevata assenza di foval in Zi-0, tranne qualche sporadico caso di foval fossili. A partire da Zi-1 fino a Zi-6 e ad eccezione della stazione Zi-5, le foval sono risultate presenti ovunque e appartenenti principalmente alle classi c3 (circa 60%) e c4 (circa 30%). Foval c1 e c2 sono state rinvenute solo in Zi-6 ed eccezionalmente nella stazione Zi-2 dove presentano il caratteristico *halo*. In quest'ultima stazione il fenomeno dell'*halo* è apparso molto ben rappresentato anche su foval c3.

La presenza di illuminazione nei siti Zi-1, Zi-3 e Zi-4 ha stimolato lo sviluppo di una notevole flora crittogamica che ha praticamente contaminato le foval, conferendo loro il caratteristico colore verdastro molto più evidente a livello del *core* che negli spazi interfoval.

Nella stazione Zi-6, interdetta ai visitatori e costantemente priva di illuminazione, sono state rinvenute diffusamente foval c3 mature (fossili) di colore giallastro, esili e di consistenza friabile (poco idratate, formatesi su roccia poco concrezionata e con una spiccata corrosione superficiale). Su una delle rare concrezioni calcitiche presenti, appena al di sopra del Cocito, è stata rilevata la presenza di una ristretta zona a foval c1 che degradano verso i lati formando in sequenza foval c2 e c3. Le maculazioni tondeggianti della suddetta

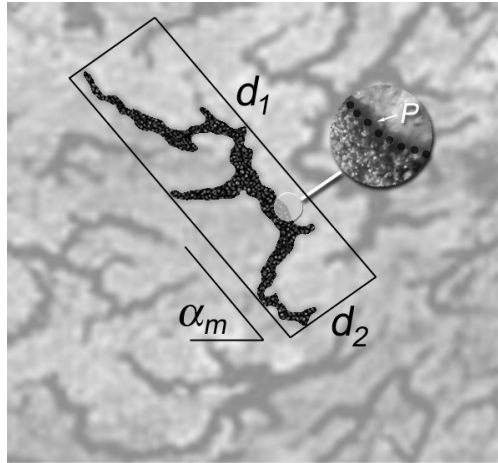


Fig. 3 - Indicazione dei principali parametri morfologici rilevati in una unità fovalica. a: inclinazione media; d_1 : diametro maggiore; d_2 : diametro minore; s: superficie.

stazione, analizzate con SigmaScan, possono essere classificate come foval c1 ($N = 58$, *media* (d_1/d_2) = 0.930 ± 0.390 DS), risultano di piccole dimensioni ($N = 58$, $S_c = 0.840 \text{ cm}^2 \pm 0.442$ DS) e sono tutte prive di *halo*. Le foval c2 hanno il diametro maggiore mediamente più grande di quasi 4 volte rispetto a quello minore ($N = 58$, *media* (d_1/d_2) = 3.59 ± 1.406 DS) con area proporzionalmente più grande rispetto alle foval c1 ($N = 58$, $S_c = 3.571 \pm 2.270$ DS). La lunghezza (L) delle ramificazioni è pari a $L = 5.834 \text{ cm} \pm 2.631$ DS ($N = 591$) (Tabella 4).

Media +/- DS

Foval	d_1/d_2	S_c	P
c1	0.930 ± 0.390	0.840 ± 0.442	0.3152 ± 0.961
c2	3.59 ± 1.406	3.571 ± 2.270	15.186 ± 8.890
c3	–	16.661 ± 19.861	65.446 ± 70.909
c4	–	59.320 ± 25.412	128.35 ± 96.55

Tab. 4 - Analisi morfologica delle foval. ($N = 58$, ad eccezione delle foval c3 in cui $N = 64$). d_1/d_2 : rapporto tra i diametri maggiore e minore; P: perimetro; S_c : area del *core*.

È stata evidenziata l'esistenza di un orientamento preferenziale per le foval di classe superiore a 1 che mediamente risultano inclinate di un angolo $\alpha_m = 130.997 \pm 28.754$ DS ($N = 482$, *range* = $0.0 - 180.0$).

Per quanto riguarda il fenomeno dell'*halo* l'analisi morfologica delle foval c2 della stazione Zi-2, ha messo in evidenza una stretta correlazione tra la sua area e quella del *core* ($r = 0.891$; $P < 0.001$) (Fig. 5).

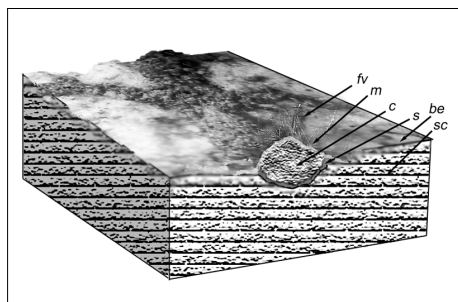


Fig. 4 - Sezione trasversale di una foval. *be*, zona di bioerosione; *c*, core; *fv*, filamenti vegetativi; *m*, strato di muco; *s*, solcatura; *sc*, substrato calcitico.

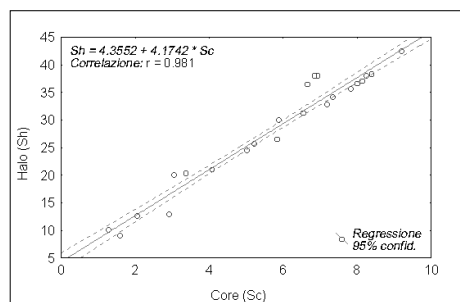


Fig. 5 - Correlazione tra area del core (S_c) e area dell'halo (S_h) di foval C2 ($Sh = 4.3553 + 4.1742 \times Sc$, $r = 0.981$, $P < 0.001$).

tati meno umidificati e privi, comunque, dei filamenti vegetativi. Tra le particelle del core è stata notata la presenza di rare macroforme organiche interpretabili come vestigia di esoscheletri chitinosi. Lungo i bordi del core, inoltre, è apparsa ben evidente una solcatura profonda pochi mm e caratterizzata da una superficie granulare facilmente asportabile con ago da dissezione. Dopo conservazione a temperatura ambiente per 12 mesi e in ambiente secco, le foval sono risultate, ad un esame microscopico, composte da masserelle di particelle facilmente disgregabili per perdita della coesione dovuta alla scarsa idratazione. La rete ifale era ancora presente ma presentava forti segni di degenerazione caratterizzati da un viraggio del colore a nero intenso.

L'analisi comparata della biochimica batterica ha evidenziato un alto indice di similarità con quella relativa ad altre tre grotte americane (Lechuguilla Cave nelle montagne di Guadalupe, New Mexico; Howe Caverns, una grotta turistica dello stato di New York; una piccola grotta in Arizona; P. FEBBRORIELLO, comunic. pers.). Una determinazione dei microrganismi è stata possibile solo per un gruppo limitato di microrganismi per i quali si disponeva di un quadro identificativo completo di riferimento (*Shigella* sp., *Campylobacter concisus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. hafniae*, *Pseudomonas sutzeri*, *P. aeruginosa*, *Ancalomicrobium adetum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella lacunata*, *M. osloensis*). Il fungo *Geotrichum* sp. è stato identificato sulla base delle artrospore rettangolari visibili allo stato germinativo (cf. BAILEY, 1974); le sue cellule sono abbastanza tipiche e si presentano di dimensioni $4 \times 8 \mu\text{m}$. Sono state effettuate numerose colture del fungo prima di identificarlo come *Geotrichum* sp., in quanto le colonie si presentavano morfologicamente variabili. Un interessante dato relativo a queste colture, e che sarà discusso più oltre, consiste nell'osservazione che, se coltivato su

L'analisi microscopica ha messo in evidenza una larga componente organica costituita prevalentemente da microrganismi con una netta predominanza dei miceti (ife settate, spore, aleurospore). Nei campioni di foval di tutte le stazioni sono stati evidenziati, inoltre, alcuni elementi di derivazione animale, tra cui deiezioni (probabilmente di *Troglophilus*), residui di ecdisi (Isopoda, Diptera) e squame (Lepidoptera). In Zi-3 e solo su foval illuminate dalle lampade ad emissione calda e fortemente contaminate dalla flora algale, sono stati rinvenuti (XI.2000), mediante lettura con camera di Neubauer, nematodi rabditoidi con presenza variabile ma sempre elevata ($x = 89 \text{ nem/mg} \pm 1.3 \text{ DS}$; $P < 0.01$) corrispondenti ad una densità media (D_m) pari a $244 \text{ nem/cm}^2 \pm 11.6 \text{ DS}$ ($P < 0.01$). Nei campioni raccolti nello stesso sito l'anno successivo (VIII.2001) non sono più stati rinvenuti nematodi.

Analizzate al microscopio, le foval integre hanno rivelato un core composto da un particellato piuttosto omogeneo, fortemente imbibito, a tratti di consistenza mucosa e caratterizzato dalla presenza di espansioni ifali che si irradiano verso gli spazi interfoval (Fig. 4). Questi ultimi sono risul-

terreno di Sabouraud, il fungo mostra una tendenza a sviluppare colonie secondo un pattern di accrescimento dicotomico (struttura dendritica), il che riflette a livello microscopico la struttura dei filamenti vegetativi, i quali si dispongono coassialmente alla direzione di crescita.

DISCUSSIONE

Il primo dato che emerge da questa indagine è la notevolissima diffusione del fenomeno vermicolare nella grotta Zinzulusa. La quasi totalità delle superfici rocciose, concrezionate o non, risulta essere ricoperta da foval, principalmente di classe 3. La costante presenza di forme microbiche, rappresentate principalmente da funghi del genere *Geotrichum*, denota un'attività biologica con formazione di prodotti metabolici acidi (lattico e succinico), che si suppone siano i diretti responsabili della bioerosione superficiale (*furrowed stones* sec. GOLUBIC *et al.*, 1975). Il ruolo dei microrganismi nei processi di aggressione della roccia è noto da tempo, attraverso l'osservazione che funghi e cianobatteri intervengono attivamente nel ciclo biogeochimico del CaCO_3 negli ambienti continentali ed in particolar modo in quello lacustre (SCHNEIDER, 1977) provocando fenomeni vermicolari dall'aspetto molto simile a quello delle foval, con o senza un orientamento preferenziale (CIABATTI *et al.*, 1981).

L'analisi microscopica e quella macroscopica effettuata sulle rocce *in situ* hanno evidenziato che la presenza di microrganismi non è circoscritta alle aree del *core* e dell'eventuale *halo*, ma si estende su gran parte della superficie nuda sia delle rocce che degli speleotemi. Questa situazione suggerirebbe l'esistenza di una distribuzione della comunità microbica notevolmente estesa nell'ambiente di grotta, ma le massime densità di popolazione del *Geotrichum* si registrano proprio in corrispondenza delle foval-unità, mentre gli altri germi si rinvergono, oltre che sulle foval, anche negli spazi interfoval, sul suolo e sui depositi argillosi praticamente di tutte le stazioni. La distribuzione relativa dei vari microrganismi mostra che mentre i batteri d'interesse per la patologia umana possono indicare uno stato d'inquinamento mediato dai visitatori o dalle acque di percolazione, e sarebbero quindi di provenienza alloctona, il *Geotrichum*, più concentrato nelle foval, può essere considerato come il principale responsabile dell'effetto vermicolare. Nella Zinzulusa sono state isolate anche forme microbiologiche (funghi e batteri) diverse da quelle tipizzate, ma di cui ancora si ignora l'identità. Ulteriori analisi microbiologiche potranno evidenziare qualche specie ancora non descritta o ceppi mutanti di specie note. Tuttavia, il fatto che esista una distribuzione ben definita di questi microrganismi e che *Geotrichum* sia strettamente legato alle foval, suggerisce l'origine autoctona del fenomeno e quindi avvalorare l'ipotesi biogenetica – già espressa da altri autori – delle foval. Infatti, sia PARENZAN (1960) che ANELLI *et al.* (1967) avevano già ipotizzato la natura biologica delle vermicolazioni e ricerche microbiologiche erano già state predisposte dall'Anelli allo scopo di associare la presenza di qualche microrganismo al fenomeno vermicolare. Tali studi permisero di isolare il fungo *Mucor racemosus* come organismo dominante in tutti i depositi vermicolari delle Grotte di Castellana, condizione che fece attribuire a quest'organismo un ruolo determinante nella fovalgenesi. Le foval studiate dall'Anelli e quelle qui considerate della Zinzulusa, sono morfologicamente dello stesso tipo (f. c3 e f. c3-h) ma le analisi microbiologiche hanno dato risultati diversi. Non si può escludere che il *Mucor racemosus* – trattandosi di una specie ubiquitaria e molto frequente negli ambienti umidi ipogei insieme ad altre muffe – possa essere rinvenuto anche al di fuori delle unità di foval e, verosimilmente, anche con la stessa abbondanza. In effetti, i funghi *Mucor* e *Aspergillus* furono riscontrati, insieme ad una grande quantità di materiale organico, quali microrganismi dominanti in foval c1 di una cavità artificiale, scavata nella calcarenite pleistocenica della Gravina di Ginosa - TA; (CAMASSA, 1997). In quell'occasione si ritenne che i processi fovalgenetici

dovessero essere imputabili proprio a quelle due muffe, ma le analisi microbiologiche furono meno approfondite di quelle attuali e non estese al substrato esterno alle foval. Non è possibile stabilire, quindi, se *Mucor* e *Aspergillus* siano direttamente e massicciamente implicati nella genesi di quelle foval o se la loro presenza nelle stesse fosse, semplicemente, espressione di una loro generalizzata presenza in quell'ambiente ipogeo.

In base a quanto descritto circa la morfologia del *Geotrichum* coltivato in laboratorio, è verosimile che la modalità di crescita osservata *in vitro* si verifichi anche in condizioni naturali, sia pure con differenze legate alla molteplicità dei fattori in gioco. La crescita in laboratorio, infatti, avviene su un terreno solido di coltura che ha proprietà ben diverse dal substrato calcitico delle grotte, quali la consistenza del terreno, la disponibilità di nutrienti e – fattore non trascurabile – la diversità microbica che concorre alla genesi delle foval. Oltre a ciò, anche alcuni fattori fisici, tra cui principalmente la temperatura e l'umidità relativa potrebbero intervenire nella formazione delle foval. Le colture di *Geotrichum*, in laboratorio, sono state eseguite su un unico ceppo capostipite, precedentemente isolato dal pool di microrganismi presenti nelle foval, a temperature differenziate di 24° e 36°C, in ambiente secco e con un tenore di CO₂ non controllato. Si tratta, pertanto, di condizioni ambientali molto diverse da quelle naturali della grotta, ma nei laboratori dell'ISBioS di Latiano e in quelli del Research Support Group di Torrington CT. (USA) si sta sviluppando, in contemporanea, una tecnica di coltura multiparametrica che permetta la crescita del fungo in condizioni di simulazione dell'ambiente di grotta, nel tentativo di ottenere delle foval in tempi molto più brevi rispetto a quanto avviene in condizioni naturali.

Le analisi morfometriche effettuate sulle foval di classe superiore a 1 hanno evidenziato che esse si dispongono secondo un orientamento preferenziale, ovvero lungo un asse inclinato di un angolo di 102 - 160° circa rispetto al piano orizzontale, il che fa ritenere che durante i processi di accrescimento delle foval, queste siano fortemente influenzate dalla gravità. Le deviazioni dalla verticale potrebbero essere altresì condizionate da fattori prevalentemente litologici, come il grado di asperità della superficie e preesistenti discontinuità quali fratture e stiloliti (*line markers*). Un altro dato sperimentale concorre a suffragare l'ipotesi della crescita geopeta delle foval: il *Geotrichum* coltivato su una piastra di agar Sabouraud lasciata in posizione verticale per alcuni giorni a temperatura di 36°C, mostra la tendenza a formare colonie allungate verso il basso, mentre risultano più rare le espansioni ifali che si irradiano, secondo il modello dicotomico, verso la direzione opposta. Ciò sembra dovuto all'abbondante muco (che ha, evidentemente, una sua massa e un suo peso) prodotto dal fungo: muco che, colando verso il basso, trascina con sé i filamenti vegetativi. Qualcosa di simile potrebbe verificarsi in natura allorquando il *Geotrichum*, crescendo, produce grandi quantità di muco che viene veicolato lungo le discontinuità della roccia. È a questo livello che si producono le tipiche solcature all'interno delle quali si accumulano i prodotti dei processi bioerosivi formando il *core* delle foval. Sperimentalmente si è visto, altresì, che il fenomeno colturale precedentemente descritto non si verifica con altri tipi di funghi, in particolare le muffe dei generi *Mucor* (*M. mucedo*, *M. racemosus*) e *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*), avendo questi organismi prodotto colonie perfettamente circolari anche in piastre di agar posizionate verticalmente.

I risultati qui ottenuti evidentemente rafforzano l'ipotesi di un'origine fondamentalmente biologica delle foval, anche se non si può escludere che certe formazioni vermicolari si siano potute formare attraverso meccanismi diversi, di natura esclusivamente chimica o fisica (BARR, 1957; MONTORIAL-POUS, 1958; WARWICK, 1959; FORD, 1962; RENAULT, 1963a, 1963b;

BINI, 1975; BINI *et al.*, 1978; CAMASSA, 2003). Né si può escludere che le stesse foval della Zinzulusa si siano originate con il concorso di fattori non biologici, in particolare climatici. In effetti, un dato da non sottovalutare è la mancanza di foval giovani nella stazione Zi-0, ovvero in quella zona della grotta soggetta ad escursioni di temperatura, luminosità ed umidità decisamente più elevate che in quelle più interne, mentre vi sono state osservate tracce di foval fossili sulla cui genesi non è possibile formulare al momento alcuna ipotesi.

L'ipotesi magnetica dei fenomeni vermicolari delle grotte non trova riscontro nel caso della Zinzulusa, per la totale assenza di ferrobatteri a cui è stata talvolta attribuita l'origine delle foval (CIGNA, 1991). In quanto al ruolo che la constatata, notevole biodiversità microbica può aver avuto nella genesi dell'intero complesso fovalico della Zinzulusa, il quadro identificativo è ancora lontano da una conoscenza ottimale, in grado di aggiungere ulteriori tasselli all'impianto fovalgenetico discusso.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Pro Loco di Castro per le facilitazioni concesse in ordine allo svolgimento della ricerca; inoltre, Gaetano Ciccarese per l'immagine di foval riprodotta in Fig. 1A, i collaboratori dell'ISBioS, Giulio Pino D'Astore, Maria Laguercia, Benigno Mosca ed in particolare Antonio Ariani (Direttore Scientifico dell'ISBioS) per la revisione critica di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- ANELLI F., GRANITI A., 1967 – Aspetti microbiologici nella genesi delle vermicolazioni argillose delle Grotte di Castellana (Murge di Bari). *Le Grotte d'Italia*, Ser 4, Vol. I: 131-138.
- BAILEY W.R., E.G. SCOTT., 1974 – *Diagnostic Microbiology*. The Mosby Company, Sant Louis: 363-403.
- BARR T.C.J., 1957 – A possible origin for cave vermiculations. *NSS News*, 15: 34-35.
- BINI A., 1975 - Le "vermicolazioni argillose" della Grotta Zelbio (2037 LoCo). *Il Grottesco*, 36: 5-14.
- BINI A., CAVALLI G.M., GORI S., 1978 – A critical review of hypothesis on origin of vermiculations. *Int. Journ. Spel.* 10, 1:11-33.
- CAMASSA M., 1997 – Osservazioni biologiche in una grotta artificiale di Ginosa: ruolo delle foval nell'ecosistema cavernicolo. *Thalassia Salentina*, 23 (Suppl): 189-192.
- CAMASSA M., 2003 – Food resources. *Encyclopedie of Caves and Karst Sciences* - Fitzroy Dearbone Ed. London: 367-370.
- CIABATTI M., FERRARI A., RABBI E., 1981 – Ruolo dei microrganismi nell'attacco delle rocce carbonatiche e nella precipitazione della calcite in ambiente lacustre (Lago di Terlago - Trentino). *Le Grotte d'Italia*, Ser. 4, 9: 29-48.
- CIGNA A.A., 1991 – Ipotesi di un'origine magnetica dei depositi vermicolari. *Le Grotte d'Italia*. Atti XVI Cong. Naz. Spel. 4, 15: 51-58.
- COLWELL R.K., CODDINGTON A., 1994 – Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Phil. Trans. Roy. Soc. (Ser. B)*, 345: 101-118.
- FORD T.P., 1962 – Further notes on the origin of vermiculations. *Newsletter Cave Res. Group Great Britain*, 84: 20-22.
- GOLUBIC S., PERKINS R. D., LUCAS K. J., 1975 – Boring microorganisms and microborings in carbonate substrates. Frey R.W. (Ed.), *The study of trace fossils*, Springer Verlag, Berlin: 229-259.

- MONTORIAL POU S J., 1967 – On the origin of clay vermiculations. 2^d Int. Congr. Speleol., 1:389-395.
- PARENZAN P., 1960 – Concerning the clayish-slimy formations termed vermicular. Mem. V. Rass. Spel. It. (Int. Symp. of Speleol., Varenna, 3-6 oct. 1960): 1-7.
- PERNA S., POZZI R., 1959 – Osservazioni su alcuni fenomeni concrezionari della Grotta del Fiume (Ancona). Rass. Spel. It. 11, 1: 3-17.
- RENAULT P., 1953 – Dépôts vermiculés d'argile de décalcification. Actes I Congr. Intern. Spéléol., Paris, 2: 364-369.
- RENAULT P., 1963a – Vermiculations argileuses. Spelunca Bull., 1: 25-28.
- RENAULT P., 1963b – Vermiculations argileuses, corrosion sous remplissage. Spelunca Mémoires, 3: 48-54.
- SCHNEIDER J., 1977 – Carbonate construction and decomposition by epilithic and endolithic micro-organisms in salt- and freshwater. Flugel E. (ed.), Fossil algae - Recent results and developments, Springer Verlag, Berlin: 248-260.
- SNEATH P.H.A., 1984 – Numerical Taxonomy. Holt J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, 1: 5-7.
- WARWICK G.T., 1959 – Vermiculations in Poole's cavern, Buxton. Newsletter Cave Res. Group Great Britain, 79/80: 14-17.