



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato in Life Sciences and Biotechnologies

ciclo XXIX

Dallo scavo al Laboratorio

Applicazione di tecniche di biologia molecolare in contesti archeologici

Direttore

Prof. Leonardo A. Sechi

Tutor

Prof. Salvatore Rubino

Candidato

Emanuela Sias

A.A. 2016 / 2017

Abstract

This work joins different disciplines regarding the study of ancient DNA. In this thesis, it was applied and modified the protocol of sampling *in situ* and in the laboratory, based on the characteristics of the sample. During this work, several samples were collected from different sites of various dating and type, including 16 individuals, 40 samples from teeth and 237 samples from sediment. Ten samples from sediment and four from teeth were finally subjected to DNA extraction, library synthesis and next generation sequencing (NGS). Sequence data were processed via bioinformatics and results were analyzed considering the context. In the two samples from palazzo ducale, parasitological analysis were also performed, showing *Ascaris*, *Trichiuris*, *Dyphillobotrium* and *Dricocelium* genus. More accurate metagenomic analysis showed also *Acanthamoeba castellani*, confirmed *Trichuris trichiura* and identified the parasite *Ascaris* as *A. suum*. also, 18s rRNA sequencing showed *Hartmanella* sp. not confirmed by metagenomics. It is interesting the finding of *Kribella* sp. sequences with high similarity with the species *K. catacombae* (first described in a roman catacomb), in the sediments of the tombs. Future perspectives are a deeper sequencing of the metagenomes to reconstruct the genomes of the species already identified and other pathogens. This analysis will allow to evaluate the degradation of the DNA, a certain method to evaluate the antiquity of the species.

Indice

Sommario

Abstract	1
Indice	2
Sommario	2
Elenco tabelle	5
Elenco immagini	5
Capitolo 1. Introduzione	7
1.1 - Bioarcheologia e DNA antico	7
1.2. Analisi dell'aDNA	9
1.2.1 - <i>Metodo classico</i>	9
1.2.2 - <i>Sequenziamento di nuova generazione</i>	10
1.3 - Applicazioni dello studio del DNA antico	11
1.3.1 - <i>Paleomicrobiologia</i>	11
1.3.2 - <i>Studi evolucionistici</i>	16
1.4 - Altre applicazioni	17
Capitolo 2. Scopo del lavoro	19

Capitolo 3. Materiali e metodi	20
3.1 - Campionamento	20
3.2 - Siti archeologici oggetto di campionamento diretto	22
3.2.1 - <i>Sant'Antioco</i>	24
3.2.2 - <i>Monte Sirai</i>	24
3.2.3 - <i>Palmavera</i>	24
3.2.4 - <i>Mont'e Prama</i>	26
3.3 - Siti archeologici oggetto di campionamento indiretto	28
3.3.1 - <i>La Prisgiona</i>	28
3.3.2 - <i>Palazzo Ducale</i>	28
3.3.3 - <i>Monte Carru</i>	30
3.4 - Scavo dei vasi	30
3.5 - Analisi parassitologiche e microscopiche	33
3.6 - Estrazione di DNA da campioni di sedimento	34
3.7 - Taglio ed estrazione di DNA dai denti	34
3.8 - Preparazione libraries per NGS	35
3.9 - Sequenziamento	37
3.9.1 - <i>Metagenomica</i>	37
3.9.2 - <i>rRNA 16S e 18S</i>	37
3.10 - Analisi bioinformatiche	37
3.10.1 - <i>Metagenomica</i>	37
3.10.2 - <i>rRNA 16S e 18S</i>	38

Capitolo 4. Risultati	39
4.1 - Campioni prelevati	39
4.2 - Analisi parassitologiche e microscopiche	45
4.3 - Sequenziamento e analisi bioinformatiche	46
4.3.1 - <i>Monte Carru, Palmavera, Mont'e Prama</i>	46
4.3.2 - <i>Palazzo Ducale</i>	52
Capitolo 5. Discussione	55
Capitolo 6. Conclusioni	63
Capitolo 7. Prospettive future	65
Riferimenti bibliografici	67

Elenco tabelle

Tabella 4.1. Campioni di sedimento prelevati.	43
Tabella 4.2. Campioni sequenziati con Illumina NextSeq 500.	47
Tabella 4.3. Specie identificate nel campione di Mont'e Prama in seguito a sequenziamento con Illumina NextSeq 500 e allineate con i genomi disponibili in banca dati.	50
Tabella 4.4. Specie identificate nei campioni di Palazzo Ducale in seguito a sequenziamento con Illumina NextSeq 500 e allineate con i genomi disponibili in banca dati.	53

Elenco immagini

Figura 3.1. Strumenti sterili utilizzati per il prelievo dei campioni.	21
Figura 3.2. Abbigliamento utilizzato per il prelievo campioni sul campo.	21
Figura 3.3. Distribuzione spaziale dei siti oggetto di campionamento.	23
Figura 3.4. Prelievo campioni nel sito del "Cronicario" a Sant'Antioco.	25
Figura 3.5. Prelievo campioni nella necropoli di Monte Sirai.	25
Figura 3.6. Panoramica del complesso nuragico di Palmavera.	27
Figura 3.7. Panoramica della necropoli di Mont'e Prama.	27
Figura 3.8. Sezione delle cantine di Palazzo Ducale.	29
Figura 3.9. Scavo dei vasi sotto cappa a flusso laminare.	31
Figura 3.10. Scavo dei vasi de La Prisgiona.	31
Figura 3.11. Prelievo campione con Hydra Sponge.	32
Figura 4.1. La tomba 7 di Mont'e Prama durante lo scavo.	40

Figura 4.2. Scavo dei vasi di Palmavera eseguito in laboratorio.	41
Figura 4.3. Ciotola carenata della tomba E e olla dalla tomba B di Mont'e Prama	42
Figura 4.4. Parassiti dall'US 306 di Palazzo ducale.	45
Figura 4.5. Distribuzione della lunghezza dei frammenti ottenuta mediante FastQC.	48
Figura 4.6. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Mont'e Prama.	48
Figura 4.7. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Monte Carru.	49
Figura 4.8. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Palmavera.	50
Figura 4.9. Heatmap dei campioni costruita con ClustVis.	51
Figura 4.10. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Palazzo Ducale.	53

Introduzione

La seguente tesi si inserisce nel vasto settore della ricerca in campo bioarcheologico, focalizzandosi sugli innumerevoli apporti che la biologia molecolare può fornire nel risolvere molteplici interrogativi in campo archeologico.

1.1 Bioarcheologia e DNA antico

La bioarcheologia è lo studio dei resti biologici reperiti in contesti archeologici e rappresenta la convergenza di diversi metodi e discipline tra cui archeologia, biologia molecolare, patologia, genetica, anatomia, storia della medicina, microbiologia, biochimica, archeozoologia, antropologia e archeobotanica. Attraverso l'utilizzo di tecnologie biomolecolari avanzate, la bioarcheologia consente lo studio dell'informazione genetica contenuta anche in minime tracce di DNA ed è alla base del crescente incremento di studi sul DNA antico (ancient DNA, aDNA). Il termine DNA antico viene utilizzato per indicare le molecole di DNA che si conservano nel materiale biologico di epoca storica o preistorica (Llamas *et al.*, 2016). Generalmente viene considerato tale il DNA estratto da campioni biologici di almeno 70 anni (Bowman, Rühli, 2016).

L'adna è degradato a causa di una serie di processi chimici ed enzimatici che iniziano a verificarsi appena l'individuo cessa di vivere. Infatti, dopo il decesso, i meccanismi di riparazione cellulare smettono di funzionare provocando l'esposizione del DNA ad una serie di fattori che ne possono determinare la totale distruzione, tra cui le nucleasi intracellulari nonché funghi e batteri che si diffondono nei tessuti in decomposizione. Esistono però condizioni particolari, come il rapido congelamento o essiccamento dei tessuti dopo la morte, che inibiscono questi processi prima della distruzione completa di tutto il DNA endogeno dell'organismo (Dabney, Meyer e Pääbo, 2013). In questi casi, altri fattori come temperatura, pH, processi idrolitici e ossidativi, limitano il tempo in cui il DNA sopravvive nei tessuti. A causa di questi fattori, il DNA endogeno estratto da campioni antichi è esiguo e degradato in corti frammenti. Al tempo stesso, il materiale genetico estratto da un campione antico è contaminato da DNA esogeno proveniente da microrganismi ambientali o da persone che abbiano manipolato il campione. Inoltre, presenta lesioni ossidative e legami intramolecolari che possono bloccare la replicazione da parte della polimerasi e quindi impedire molte forme di analisi. Ancora, le basi azotate che costituiscono la molecola di DNA possono andare incontro alla perdita idrolitica di gruppi amminici, con conseguente misincorporazione da parte della polimerasi. Infatti, il prodotto di deaminazione della citosina (C), l'uracile (U), viene letto come timina (T) dalla DNA polimerasi, risultando nell'incorretta inserzione di T al posto di C, o di adenina (A) al posto di guanina (G) a seconda dell'orientamento in cui le molecole sono sequenziate (Lindahl, 1993). Le estremità sporgenti a singola elica della molecola di DNA sono soggette a maggiore deaminazione e quindi saranno caratterizzate da una più alta frequenza di misincorporazione. Dal

momento che la percentuale di misincorporazioni è correlata all'età del campione, questa caratteristica può essere utilizzata per riconoscere l'aDNA dai contaminanti moderni durante l'analisi delle sequenze (Vai *et al.*, 2016).

1.2. Analisi dell'aDNA

1.2.1 Metodo classico

Lo studio dell'aDNA è piuttosto recente e il primo lavoro, pubblicato nel 1984, descrive l'estrazione di DNA da un frammento di muscolo e da tessuto connettivo appartenenti al quagga (*Equus quagga*), una specie estinta della famiglia degli equidi i cui resti erano conservati nel museo di Storia naturale di Mainz in Germania (Higuchi *et al.*, 1984). Nel 1985 venne pubblicato il primo lavoro sull'aDNA umano estratto dalla mummia di un bambino egizio risalente a 2400 anni fa (Pääbo, 1985), che venne però successivamente considerato come frutto di una contaminazione (Cooper e Wayne, 1998). Questi primi studi hanno evidenziato che il materiale genetico sopravvissuto in campioni antichi era principalmente batterico o fungino, mentre il DNA endogeno, presente in bassissima concentrazione, era rappresentato da frammenti corti e danneggiati di regioni presenti in copie multiple come il DNA mitocondriale (mtDNA) (Willerslev e Cooper, 2005). Nella seconda metà degli anni ottanta la ricerca nel campo della biologia molecolare ha subito una significativa svolta grazie all'introduzione della tecnica della reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction, PCR), che ha determinato anche il rapido aumento del numero e della tipologia di studi sull'aDNA attraverso il cosiddetto metodo classico, basato sull'amplificazione delle regioni di interesse tramite PCR, clonazione dell'amplificato e sequenziamento col metodo Sanger. Nonostante i vantaggi di questa tecnica, che consente di

amplificare e studiare persino singole molecole di DNA, già dai suoi primi utilizzi si capì che la grande potenza di amplificazione della PCR poteva aumentare significativamente la contaminazione da parte di DNA moderno (Pääbo e Wilson, 1988). Come conseguenza, uno dei maggiori problemi negli studi sull'aDNA è rappresentato da falsi positivi derivanti da contaminazioni in laboratorio (Willerslev e Cooper, 2005). Per tentare di risolvere questo problema è stata messa a punto la tecnica di "suicide PCR", che prevede che una coppia di primers venga utilizzata una sola volta nello stesso laboratorio (Raoult *et al.*, 2000). Il metodo classico, l'unica strategia disponibile fino al 2005, è ancora il miglior approccio se si devono studiare frammenti di aDNA definiti con una lunghezza minima di 60 bp (Vai *et al.*, 2016).

1.2.2 Sequenziamento di nuova generazione

A partire dal 2005, le ricerche nel campo dell'aDNA hanno subito una svolta rivoluzionaria grazie al sequenziamento di nuova generazione (next-generation sequencing, NGS). Le piattaforme ad alta processività usate in questa tecnica permettono infatti di ottenere dati di miliardi di frammenti di DNA da una singola corsa di sequenziamento, con una riduzione sostanziale dei costi rispetto al metodo Sanger. Con questa tecnologia è possibile sequenziare anche le più corte molecole di DNA, che spesso costituiscono la maggior parte del materiale endogeno nei campioni antichi (Llamas *et al.*, 2016). Inoltre, dato che le estremità delle molecole di DNA non vengono modificate durante la preparazione del campione, è possibile osservare le loro caratteristiche originali, come la lunghezza e la possibile degradazione, e quindi riconoscere le molecole di aDNA e separarle dai possibili contaminanti moderni. Prima di essere sequenziati con NGS, i campioni di DNA devono

essere convertiti in una library attraverso l'aggiunta di adattatori che permettono di amplificare tutte le molecole con primers universali, e di index che vengono assegnati univocamente ad ogni campione e permettono di sequenziare insieme diversi campioni (Vai *et al.*, 2016).

Le libraries possono essere sequenziate direttamente, oppure può essere effettuato un arricchimento della componente endogena o di particolari regioni di interesse tramite ibridazione, avendo così a disposizione un maggior numero di sequenze da campioni contenenti livelli molto bassi di DNA e riducendo in maniera consistente i costi per il sequenziamento di un intero genoma (Carpenter *et al.*, 2013).

1.3. Applicazioni dello studio del DNA antico

Lo studio dell'aDNA può avere differenti applicazioni: dallo studio filogenetico di animali estinti e non, all'identificazione delle linee evolutive degli esseri viventi, l'identificazione di rapporti di parentela, la determinazione su base molecolare del sesso di individui rinvenuti negli scavi archeologici. Può essere di fondamentale ausilio nello studio delle pandemie del passato, per ricostruire le linee evolutive dei microrganismi.

1.3.1 Paleomicrobiologia

La paleomicrobiologia è un filone di ricerca che studia le comunità microbiche (batteri, virus e parassiti) in campioni antichi (Drancourt e Raoul, 2005; Zink *et al.*, 2002). Questo filone di ricerca rappresenta un nuovo approccio per lo studio delle malattie infettive, il loro verificarsi, la frequenza e l'interazione ospite-patogeno nel corso dei secoli e nelle varie popolazioni. In particolare, lo studio del DNA antico microbico contribuisce in modo signifi-

cativo alla comprensione della trasmissione e della diffusione di malattie infettive, fornendo importanti informazioni per l'evoluzione e i rapporti filogenetici di agenti patogeni umani o animali. Inoltre, questi studi possono suggerire nuovi modelli evolutivi e indicare il percorso di trasmissione delle malattie tra umani e animali.

Gli studi paleomicrobiologici hanno avuto inizio nel 1993 con il ritrovamento di *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in campioni scheletrici antichi (Spigelman e Lemma, 1993). Successivamente, numerosi studi hanno permesso di identificare *Mycobacterium* in resti umani antichi. Infatti, *M. tuberculosis* e *M. leprae* sono stati rinvenuti in un individuo ritrovato in una tomba collettiva nei pressi di Gerusalemme databile tra 2000-2050 anni fa (Matheson *et al.*, 2009). Sequenze di DNA di *M. tuberculosis* sono state rilevate anche in un campione di tessuto polmonare prelevato dal corpo di una donna morta apparentemente di tubercolosi nel 1797 e sepolta in una cripta (Chan *et al.*, 2013). Ricerche mirate alla ricostruzione del genoma del *M. tuberculosis complex* per ricostruire la storia evolutiva di questo patogeno hanno permesso di datare la sua origine a circa 70 mila anni fa (Comas *et al.*, 2013). Inoltre, è stato dimostrato che il genoma di *M. tuberculosis* ottenuto da scheletri umani risalenti a 1000 anni fa rinvenuti in Perù presentava un'omologia maggiore con il *M. tuberculosis* che infetta i mammiferi pinnipedi rispetto a quello umano, facendo ipotizzare che i mammiferi marini possano aver giocato un ruolo nella diffusione della tubercolosi attraverso l'Oceano (Bos *et al.*, 2014).

M. tuberculosis è stato il fulcro di un lavoro condotto su ossa e denti di individui provenienti dalla Gran Bretagna e dall'Europa e che abbracciano un arco cronologico compreso tra 2000 e 100 anni fa: l'individuazione del DNA

di questo batterio aggiunge sicuramente informazioni importanti sulla distribuzione temporale e geografica del micobatterio e afferma di aver utilizzato per l'estrazione del DNA antico campioni ossei che presentassero tracce di evidenti lesioni legate alla tubercolosi (Müller *et al.*, 2014).

Sono state individuate anche 14 sequenze del genoma di *M. tuberculosis*, in rappresentanza di 12 genotipi distinti, dal DNA antico ottenuto da resti umani di 200-300 anni fa in Ungheria (Kay *et al.*, 2015).

Anche *Yersinia pestis* (*Y. pestis*) è stata oggetto di svariate ricerche, una ha permesso di identificare con certezza questo patogeno come la causa della pandemia di peste che sterminò fino a un terzo della popolazione dell'Europa occidentale nel corso del XIV secolo (Raoult *et al.*, 2000) e una seconda ha individuato la cosiddetta "peste di Giustiniano" che divampò tra il VI e l'VIII secolo (Harbeck *et al.*, 2013).

Sono poi stati effettuati studi che hanno permesso di individuare *Brucella* sp. in resti scheletrici rinvenuti nell'antica città di Butrinto in Albania, suggerendo come la brucellosi fosse endemica in quest'area almeno dal Medioevo (Mutolo *et al.*, 2012). Inoltre, *Brucella melitensis* è stata rinvenuta in seguito alle analisi di un nodulo calcificato prelevato da uno scheletro di 450-550 anni fa proveniente dal villaggio medievale di Geridu, in Sardegna (Kay *et al.*, 2014).

Recentemente è stato ricostruito anche il genoma del *Vibrio cholerae*, partendo da un campione prelevato dall'intestino di un individuo morto di colera nel 1849 a Philadelphia (Devault *et al.*, 2014).

Gli studi sui parassiti hanno riguardato *Plasmodium falciparum*, agente eziologico della malaria, che venne individuato nei tessuti di una mummia egiziana risalente a circa 4000 anni fa (Nerlich *et al.*, 2008) e, insieme a *M.*

tuberculosis, in teste mummificate provenienti dalla necropoli di Abusir el Meleq nel Fayum (Lalremruata *et al.*, 2013).

Sono stati effettuati studi anche su altri parassiti come la *Leishmania*, identificata in crani provenienti da un cimitero del Cile (Costa *et al.*, 2009).

Molti studi sui parassiti sono stati condotti sul colon di individui mummificati o sui coproliti (feci essiccate), che possono inoltre fornire informazioni di carattere genetico e sulle abitudini alimentari di animali o esseri umani del passato. L'analisi dei coproliti provenienti da tre sepolture individuate vicino alla Grand Place di Nivelles, in Belgio, ha portato ad individuare uova di *Trichuris trichiura* e di *Ascaris lumbricoides* (Rácz *et al.*, 2015). Uova di *Enterobius vermicularis* sono state ritrovate in coproliti umani provenienti da un sito archeologico del Cile, risalente a 1550-1150 anni fa (Araujo *et al.*, 1985).

Uova del parassita intestinale *Trichuris trichiura* vennero identificate nel colon di Ötzi (Dickson *et al.*, 2000), la mummia rinvenuta in buono stato di conservazione nel 1991 sulle Alpi dell'Ötztal e riconducibile cronologicamente al 3350 e il 3100 a. C. Successivamente, attraverso lo studio di campioni di ileo e di colon, i ricercatori riuscirono a ricostruire il suo ultimo pasto (Rollo *et al.*, 2002). Uova di *Ascaris sp.*, *Trichuris sp.* e *Fasciola sp.* sono state identificate anche da campioni ambientali prelevati da un insediamento del periodo vichingo a Viborg, in Danimarca, datato al 1018-1030 d.C. (Søe *et al.*, 2015). L'analisi del DNA estratto da campioni di feci umane di più di 2000 anni, provenienti dal sito di Hinds Cave, Texas, ha dimostrato l'affiliazione di questi individui con i nativi americani contemporanei e ha permesso di ricostruirne la dieta (Poinar *et al.*, 2001). L'analisi del DNA estratto

da coproliti prelevati dal sito di Gypsum Cave nel Nevada e datati circa 11000-20000 e 28500 anni fa, ha evidenziato la presenza di sequenze di mtDNA identiche a quelle ottenute da un osso appartenente ad una specie estinta, il bradipo terricolo di Shasta (*Nothrotheriops shastensis*), permettendo inoltre di individuare tredici famiglie o ordini di piante che facevano parte della dieta del bradipo (Hofreiter *et al.*, 2000).

In un recente studio l'analisi del DNA estratto da campioni di sedimento provenienti da differenti contesti e datazioni, dal Neolitico (7200 anni fa) alla prima guerra mondiale, ha permesso di identificare la presenza di parassiti gastrointestinali anche in assenza delle loro uova (Côté *et al.*, 2016). Inoltre, in un coprolite di 450-550 anni fa rinvenuto in Belgio, sono stati identificati tramite microscopia e metagenomica parassiti intestinali come *Trichuris* e diversi ascaridi, differenti specie batteriche tra cui patogeni come *Bartonella* e *Bordetella* oltreché differenti specie di piante (Appelt *et al.*, 2014a).

Anche le ricerche condotte sui virus presenti nei materiali archeologici o geologici ha subito un significativo incremento. Molti virus, come ad esempio i retrovirus, possono entrare nei genomi dei loro ospiti; la presenza di sequenze retrovirali in genomi ospitanti è stata notata già alla fine degli anni sessanta (Katzourakis, 2013). La comunità virale di un coprolite del XIV secolo rinvenuto in Belgio è stata analizzata integrando la microscopia elettronica con la metagenomica, individuando sequenze che mostravano omologie per fagi comunemente presenti anche nelle feci moderne e nel suolo (Appelt *et al.*, 2014b).

Recentemente è stato pubblicato uno studio sulla ricostruzione del genoma di un antico ceppo del virus del vaiolo rinvenuto nella mummia di un bambino lituano (300-307 anni fa) (Duggan *et al.*, 2016).

1.3.2 Studi evoluzionistici

I primi studi evoluzionistici erano basati sull'analisi del mtDNA di animali estinti, e solo a partire dal 2000 vennero realizzati i primi lavori sul DNA nucleare (Hofreiter *et al.*, 2001).

Sono state condotte ricerche sul mtDNA del tilacino, lupo marsupiale australiano estinto, dimostrandone il legame stretto con i marsupiali carnivori australiani (Thomas *et al.*, 1989; Krajewsky *et al.*, 1997). Gli studi sul DNA estratto da due molari di mammut (*Mammuthus primigenius*) provenienti da un deposito di permafrost in Alaska e conservati nel museo di Storia Naturale di New York suggerì che questi fossero più simili agli elefanti asiatici piuttosto che a quelli africani (Greenwood *et al.*, 1999). Altri studi hanno riguardato le diverse popolazioni di orsi delle caverne (*Ursus spelaeus*), presenti in Europa e in Asia occidentale fino alla fine dell'ultima glaciazione circa 10000 anni fa (Hofreiter *et al.*, 2002), il leone delle caverne (*Panthera spelaea*) vissuto tra il nord dell'Eurasia e parti del Nord America (Ersmark *et al.*, 2015), il bue muschiato in tutto il tardo Pleistocene (Campos *et al.*, 2010), il cavallo selvatico russo (Schubert *et al.*, 2014).

Si svolsero ricerche sulla variazione del patrimonio genetico umano rispetto a quello delle grandi scimmie (Kaessmann e Pääbo, 2002; Ebersberger *et al.*, 2002).

Le ricerche più importanti condotte nel campo dell'evoluzione umana riguardarono l'uomo di Neanderthal, un ominide oggi estinto che abitò l'Eu-

ropa e l'Asia occidentale da circa 300000 a 30000 anni fa convivendo con gli esseri umani moderni. Le analisi effettuate su un osso di Neanderthal ritrovato nel 1856 in Germania permisero l'individuazione di una fino ad allora sconosciuta sequenza di mtDNA che non rientrava nelle variazioni degli esseri umani moderni (Kriings *et al.*, 1997). Successivamente si cercò di caratterizzare il patrimonio genetico del mtDNA dell'uomo nell'Europa preistorica (Di Benedetto *et al.*, 2000). Vennero effettuati studi sull'uomo di Cro-magnon, in particolare su un individuo di 28000 anni rinvenuto nella grotta Paglicci, in Italia. Lo studio del suo mtDNA permise di individuare una sequenza ancora comune in Europa ma che differiva radicalmente da quelle del Neanderthal, a lui quasi contemporaneo, dimostrando una continuità genealogica attraverso 28000 anni, dal Cro-Magnon fino agli europei moderni (Caramelli *et al.*, 2008).

È stato sequenziato anche il genoma di un ominide rinvenuto nella grotta di Denisova nel sud della Siberia, dimostrando che apparteneva ad una popolazione, successivamente definita 'Denisova', che condivideva un'origine comune con gli uomini di Neanderthal ma che aveva una storia evolutiva distinta sia dai Neanderthal che dagli esseri umani moderni (Reich *et al.*, 2010).

1.4 Altre applicazioni

Il DNA antico può essere utilizzato anche per individuare rapporti di parentela, come nel caso dello studio effettuato sulla cosiddetta "tomba del sudario", una sepoltura del I secolo d.C. scoperta nell'Akeldama, Israele. Lo studio sul mtDNA degli inumati deposti nella tomba ha indicato la presenza di rap-

porti di parentela, suggerendo l'interpretazione della sepoltura come di una tomba di famiglia (Matheson *et al.*, 2009).

Studi di filogenesi sono stati realizzati anche su resti archeobotanici come nello studio effettuato sui semi di *Vitis vinifera* provenienti da diversi siti archeologici europei e inquadrabili cronologicamente tra i 2600 e i 1700 anni (Manen *et al.*, 2003).

Sono inoltre stati compiuti studi sull'evoluzione del microbioma orale tramite l'estrazione del DNA dal calculus dentale. Infatti milioni di microbi orali sono intrappolati e conservati all'interno di questa matrice mineralizzata, compresi gli agenti patogeni. Questo la rende una fonte importantissima di informazioni per ricostruire vari aspetti della dieta del passato ma anche per ottenere informazioni sullo stato di salute degli individui (Weyrich *et al.*, 2015).

Infine, sono state eseguite ricerche mirate all'individuazione del contenuto di vasi provenienti da diversi contesti archeologici. In particolare, lo studio di anfore recuperate da un relitto e riconducibili al periodo classico-ellenistico, ha permesso di dimostrare che questi vasi, generalmente considerati contenitori per il trasporto di vino e olio, contenevano in realtà anche diversi altri prodotti tra cui spezie, erbe aromatiche, legumi, noci (Foley *et al.*, 2012).

Scopo del lavoro

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di studiare, attraverso analisi bioarcheologiche, campioni prelevati da diversi siti archeologici della Sardegna, seguendo dove possibile l'intero percorso dei campioni, dal prelievo durante lo scavo archeologico fino alle analisi in laboratorio e all'elaborazione dei dati. In particolare, sono stati studiati denti e campioni di terreno prelevati da latrine e vasi ceramici. Lo scopo della prima parte del lavoro è stato quello di mettere a punto ed applicare un protocollo per ridurre le contaminazioni da DNA moderno durante il prelievo dei campioni in fase di cantiere archeologico. Lo scopo della seconda parte è stato quello di estrarre il DNA utilizzando le dovute precauzioni per evitare contaminazioni in laboratorio ed ottenere sequenze di DNA antico autentiche. Il fine ultimo è stato quello di descrivere la diversità procariotica ed eucariotica presente nei campioni analizzati, con particolare attenzione all'individuazione di microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo e per gli animali, rapportando i dati ottenuti dalle sequenze di DNA con quelli archeologici e contestualizzandoli con i rispettivi siti di provenienza e con la tipologia dei campioni analizzati per avere una visione completa di ciascun contesto.

Materiali e metodi

3.1 Campionamento

Una delle maggiori problematiche legate allo studio dell'adDNA è quella legata alla contaminazione dei campioni con DNA moderno che si può verificare durante le fasi di scavo archeologico. Per questo motivo la parte iniziale di questa tesi è stata dedicata alla delineazione di linee guida da applicare nella fase di prelievo campioni in diversi contesti archeologici, in modo da ridurre il più possibile le contaminazioni ambientali e da parte degli operatori. Innanzitutto sono stati selezionati gli strumenti da utilizzare nello scavo ed è stato messo a punto un protocollo per la loro pulizia e sterilizzazione. La pulizia preliminare prevedeva l'immersione per 24h in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5-10%, il risciacquo con acqua ultrapura, l'immersione in DNA cleaner (Diatech pharmacogenetics) per 5 minuti, l'asciugatura in stufa a 50°C. Una volta asciutti gli strumenti sono stati riposti in buste autosigillanti (Securline) e sterilizzati. Gli strumenti metallici sono stati sterilizzati in autoclave mentre quelli non sterilizzabili come i pennellini sono stati irradiati con raggi UV per almeno un'ora (fig. 3.1).

Durante le attività di scavo e di prelievo campioni, al fine di ridurre la contaminazione dei campioni da parte degli operatori, sono stati indossati tute



Figura 3.1. Strumenti sterili utilizzati per il prelievo dei campioni.



Figura 3.2. Abbigliamento utilizzato per il prelievo campioni sul campo.

monouso Tyvek®(DuPont™) mascherine N95 (3M), copriscarpe, cuffie e doppi guanti. Nei mesi estivi, a causa delle temperature troppo elevate, le tute Tyvek sono state sostituite da camici chirurgici o coprimaniche in associazione con guanti extra lunghi, come illustrato in figura 3.2.

I campioni prelevati sono stati riposti all'interno di provette o sacchetti sterili opportunamente etichettati indicando data, sito, area, settore, unità stratigrafica e numero progressivo del campione. Inoltre, su un apposito quaderno sono state annotate tutte le informazioni possibili relative allo scavo, compresi gli operatori che l'hanno effettuato, gli strumenti utilizzati, la tipologia di abbigliamento indossato, le condizioni meteorologiche e, per ogni campione raccolto, la quota assoluta e il posizionamento spaziale.

Nel caso della raccolta di campioni di sedimento sono stati prelevati anche campioni esterni all'area oggetto di studio da utilizzare come controllo negativo.

I campioni di sedimento sono stati trasportati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari mentre i resti ossei sono stati conservati in un'apposita stanza presso il Centro di Conservazione e Restauro dei Beni Culturali della Soprintendenza Archeologia, Belle Arti e Paesaggio per le province di Sassari, Olbia-Tempio e Nuoro, con sede a Li Punti (Sassari).

3.2 Siti archeologici oggetto di campionamento diretto

La scelta dei siti oggetto di studio, tutti situati in Sardegna, è stata effettuata prediligendo "contesti chiusi" per garantire il più possibile la protezione dei campioni da contaminazioni ambientali.

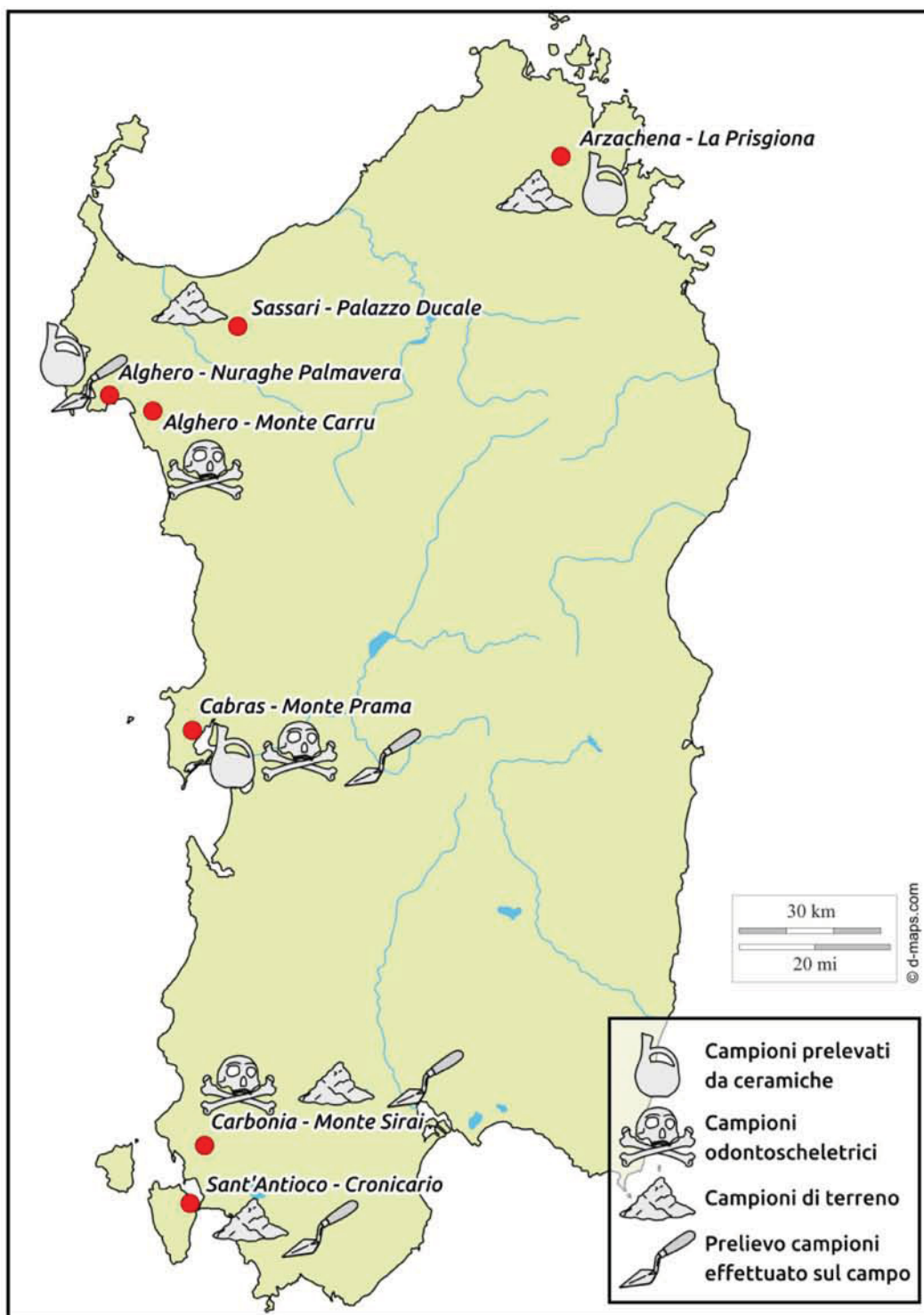


Figura 3.3. Distribuzione spaziale dei siti oggetto di campionamento.

3.2.1 Sant'Antioco

Nel luglio 2015 si è svolta la campagna di scavo nell'antico abitato di Sant'Antioco, denominato "Cronicario", un sito pluristratificato con fasi di differenti periodi cronologici. Sono state infatti individuate fasi abitative romane (II a.C-II d.C) che coprivano una serie di ambienti di età arcaica (VIII-VII a.C), a loro volta edificati sui resti di un villaggio di età prenuragica ascrivibile alla facies eneolitica di sub-Ozieri (2009-2007 a.C.) (Unali, 2013) (fig. 3.4).

3.2.2 Monte Sirai

Sempre a luglio 2015 si è svolta la campagna di scavo del sito di Monte Sirai, fondato dai Fenici di Sulky o dai primi coloni stanziati a Portoscuso attorno al terzo quarto dell'VIII sec. a.C. ed abbandonato sul finire del II sec. a.C. Il sito, che si estende per una vasta area, è costituito da una Necropoli e dall'Acropoli; dalle indagini archeologiche condotte su quest'ultima è stato possibile fissare i limiti cronologici di frequentazione del sito. La necropoli, oggetto di indagini archeologiche già dagli anni 80, ha restituito sepolture del periodo arcaico finale e della prima età punica, con rare attestazioni relative al periodo tardo punico e romano-repubblicano (Guirguis, 2010) (fig. 3.5).

3.2.3 Palmavera

Il complesso nuragico di Palmavera, situato nel comune di Alghero (SS) e inquadrabile cronologicamente tra il Bronzo medio ed il I Ferro, è costituito da un Mastio a cui fu aggiunto successivamente un Bastione che racchiudeva



Figura 3.4. Prelievo campioni nel sito del "Cronicario" a Sant'Antioco.



Figura 3.5. Prelievo campioni nella necropoli di Monte Sirai.

una torre secondaria, un cortile ed un corridoio con nicchie. Queste costruzioni sono poste al centro di un Antemurale marginato da quattro torri-capanne e dalla capanna delle riunioni, intorno al quale si distribuiscono le numerose capanne del villaggio (Moravetti, 1992). Il sito fu oggetto di indagini archeologiche già a partire dai primi anni del novecento. Il prelievo campioni è stato effettuato nel villaggio, in particolare nella capanna 42, un vano di forma circolare realizzato con grossi blocchi calcarei di diametro interno di circa 5,10-5,20m (Moravetti *et al.*, 2014). Il prelievo è stato effettuato in due differenti campagne di scavo, la prima realizzata nel 2014 e la seconda nel 2015 (fig. 3.6).

3.2.4 Mont'e Prama

Nel 2014 è stata effettuata la campagna di scavo nel sito archeologico di Mont'e Prama, nel comune di Cabras (OR), costituito da una vasta necropoli inquadrabile cronologicamente al I Ferro e interessato da indagini archeologiche già dagli anni settanta. In particolare sono state scavate sedici sepolture di due differenti tipologie, otto a pozzetto semplice, sormontate da un tumulo di pietre (A-I) e otto coperte da una lastra monolitica (1-8). Si tratta di sepolture singole, in giacitura primaria, con l'inumato deposto in posizione verticale (Carenti *et al.*, 2015) (fig. 3.7).



Figura 3.6. Panoramica del complesso nuragico di Palmavera (Alghero, SS).



Figura 3.7. Panoramica della necropoli di Mont'e Prama.

3.3 Siti archeologici oggetto di campionamento indiretto

In alcuni casi, i campioni raccolti provenivano da scavi precedentemente realizzati.

3.3.1 La Prisgiona

Il villaggio della Prisgiona (Arzachena) si sviluppa, in maniera molto estesa, all'esterno del muraglione delimitante l'area del nuraghe; è costituito da capanne di forma circolare o a settori di cui si conservano in buono stato gli alzati. Allo stato attuale delle indagini archeologiche la cronologia assoluta di vita del villaggio lo colloca tra la seconda metà del XIII e gli inizi dell'VIII secolo a.C. (1260-790 a.C.) (Antona, 2013).

3.3.2 Palazzo Ducale

Palazzo Ducale, oggi sede del Comune di Sassari, è situato nel centro storico cittadino. Fu realizzato tra il 1775 e il 1804 ed abbandonato verso la metà del secolo (Cau *et al.*, 2004). L'edificio fu oggetto di una prima indagine archeologica già nel 1995, in seguito ripresa e completata nel 2005.

Come mostrato in fig. 3.8, è presente un'ampia cantina (vano 6) in cui, nell'angolo NO, è situato un pozzo nero scavato nella roccia. In questo ambiente (D) utilizzato come discarica, i rifiuti confluivano tramite due latrine (A) collegate ad esso tramite canali scavati nella roccia. I rifiuti domestici, oltre che dall'accesso in alto mediante le due latrine, venivano scaricati presumibilmente anche da un'altra apertura di forma triangolare (B). Il pozzo nero, soggetto a periodici svuotamenti tramite rimozione delle lastre litiche dal piano pavimentale della cantina (C), al momento dello scavo si presenta-

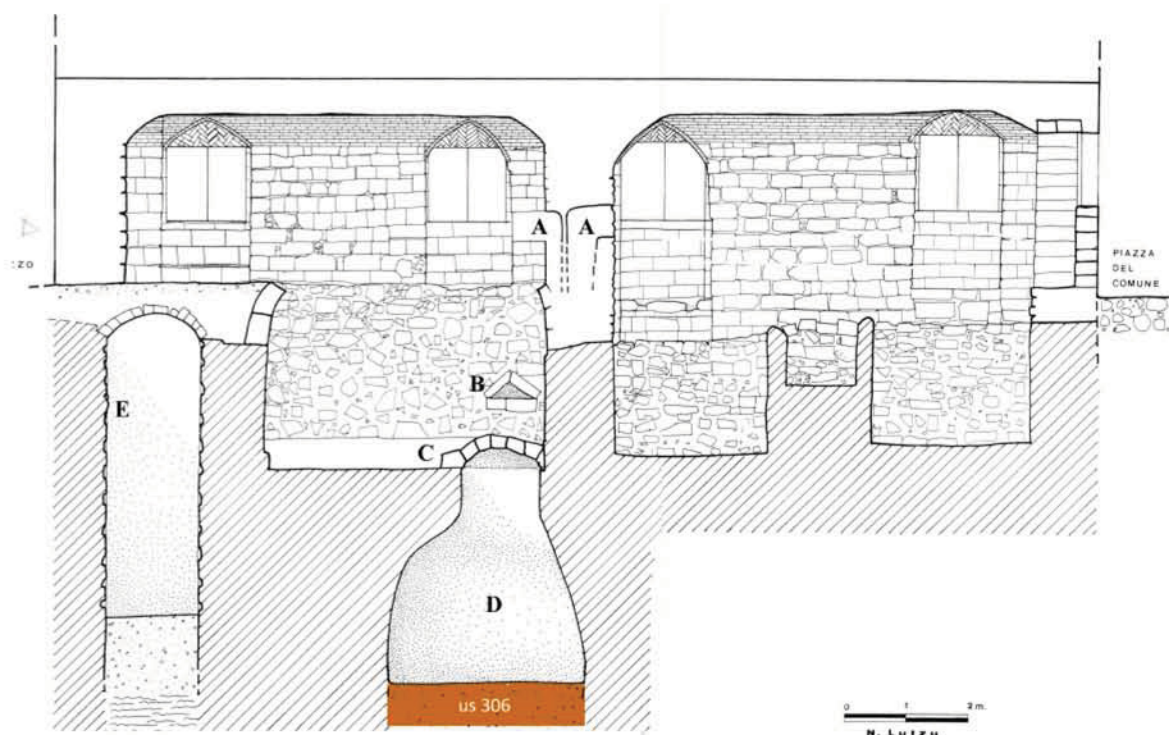


Figura 3.8. Sezione delle cantine di Palazzo Ducale (Sassari). Immagine Soprintendenza archeologia belle arti e paesaggio per le province di Sassari Olbia Tempio e Nuoro.

va vuoto fino a circa due terzi della profondità. Il deposito era sostanzialmente omogeneo e in gran parte costituito da resti biologici, che sono stati campionati in cantiere e conservati nei laboratori della Soprintendenza in vista di studi specialistici. Nella sezione sottostante è inoltre presente un ambiente (E) di piccole dimensioni, dotato di un pozzo. Il riempimento, scavato integralmente, ha restituito resti vegetali e poche ossa animali, vetri, oggetti da farmacia, due pistole con il calcio di legno, e ceramiche databili entro la prima metà dell'Ottocento. L'analisi dei reperti ceramici, vitrei e metallici permette di datare l'ultimo uso del pozzo nero nei primi decenni dell'Ottocento (Fiori e Rovina 2013).

3.3.3 Monte Carru

La necropoli di Monte Carru è situata alle pendici del rilievo di Monte Carru nel comune di Alghero (SS). Si tratta di una vasta area sepolcrale riferibile cronologicamente ad un periodo che va dal I al III secolo d.C, in piena epoca romano-imperiale, con tracce di frequentazione anche in epoca repubblicana (I secolo a.C). Sono state individuate circa 350 sepolture di cui 181 ad incinerazione e 104 ad inumazione di differenti tipologie (Rovina, La Fragola, 2008).

3.4 Scavo dei vasi

Una parte del lavoro, effettuata in laboratorio, ha riguardato lo scavo ed il prelievo di sedimento dal materiale ceramico proveniente da scavi archeologici effettuati senza l'intervento dei bioarcheologi. Quando le dimensioni del vaso lo permettevano, il prelievo è stato realizzato sotto cappa a flusso laminare (fig 3.9). Solo tre vasi, tutti provenienti dal sito della Prisgiona, erano troppo grandi per poter essere inseriti all'interno di una cappa ed il prelievo è stato effettuato in una stanza appositamente allestita presso il Centro di Conservazione e Restauro dei Beni Culturali (fig 3.10).

Il contenuto di tutti i vasi è stato scavato in maniera stratigrafica, prelevando campioni dalle diverse unità stratigrafiche (US) individuate e, quando presente, dal materiale sedimentario adeso alla parete esterna. Una volta asportato il riempimento, è stata messa a punto una metodica innovativa per recuperare il materiale adeso alla superficie del fondo e delle pareti, che presumibilmente potesse conservare resti degli alimenti che erano contenuti nel vaso. A questo scopo, si è pensato di utilizzare il kit commerciale



Figura 3.9. Scavo dei vasi sotto cappa a flusso laminare.



Figura 3.10. Scavo dei vasi de La Prigionia.

Hydra-Sponge (3M, St. Paul, Minnesota, USA), contenente una spugna sterile preinumidita con 10 ml di acqua peptonata tamponata, guanti sterili e sacchetto sterile per il trasporto della spugna. Questi kit, solitamente utilizzati per la rilevazione delle contaminazioni microbiche negli stabilimenti di produzione di alimenti, garantiscono un maggior recupero di eventuali microrganismi presenti sulla superficie campionata rispetto ai tamponi di cotone preinumiditi (Ibba *et al.*, 2013). Una volta effettuato il prelievo le spugne, sigillate negli appositi sacchetti, sono state conservate a -20°C fino al successivo lavaggio, effettuato con 50 ml di 1X PBS - 0.05% Tween 20, mediante lo strumento Stomacher. Il liquido di lavaggio è stato recuperato e centrifugato per ottenere un pellet di circa 1 grammo da cui estrarre il DNA (fig. 3.11).



Figura 3.11. Prelievo campione con Hydra Sponge.

3.5 Analisi parassitologiche e microscopiche

Sui campioni di sedimento proveniente dal pozzo nero di Palazzo Ducale sono state effettuate analisi parassitologiche secondo la classica tecnica della microscopia. Per disaggregare il campione e reidratare le eventuali uova di parassiti, 1gr di sedimento è stato risospeso per 24 h in 20 ml di una soluzione di fosfato trisodico all'1% e sodio cacodilato triidrato 0,2 M, secondo la metodica di Callen e Cameron (1960). Successivamente, il materiale ottenuto è stato trattato con HCl al 30% per sciogliere i carbonati di calcio presenti nel campione e permettere il riconoscimento delle uova di parassiti (Warnock e Reinhard, 1992).

Una volta lavato l'HCl con acqua distillata ed aver centrifugato a 3000 rpm per 10 min, il campione è stato risospeso in 5 ml di glicerolo e sono stati allestiti i vetrini, visionati con microscopio ottico con ingrandimento di 100X e 400X (Leica ICC50 HD).

Le uova sono state identificate in base alle loro caratteristiche ed alla morfometria (Ash, Orihel, 1990), in accordo con le misure e le forme standard riportate in letteratura (Confalonieri *et al.*, 1988). È stato effettuato anche uno studio ultrastrutturale del sedimento, osservandolo in maniera diretta con un microscopio elettronico a scansione (SEM), Low Vacuum FEI Quanta 200 SEM Zeiss EVO senza effettuare ulteriori trattamenti.

3.6 Estrazione di DNA da campioni di sedimento

L'estrazione del DNA dai campioni di sedimento e dal pellet ottenuto dai lavaggi delle Hydra-Sponge è stata effettuata utilizzando E.Z.N.A.® Kit (Omega Bio-Tek, Georgia, USA) specifico per l'estrazione del DNA dal suolo, secondo il protocollo del fornitore. Brevemente, 1gr di sedimento è stato omogenato e trattato in un tampone contenente detergenti. Acidi umici, proteine, polisaccaridi e altri contaminanti sono stati precipitati dopo un ciclo di riscaldamento-raffreddamento e ulteriormente rimossi mediante uno speciale reagente per la rimozione di inibitori. Il DNA è stato poi purificato mediante colonnine a scambio ionico.

3.7 Taglio ed estrazione di DNA dai denti

I denti, dopo essere stati accuratamente analizzati per individuare la presenza di eventuali fratture o lesioni sono stati detersi con una soluzione di ipoclorito di sodio al 10%. Successivamente sono stati tagliati in senso longitudinale utilizzando una lama diamante pretrattata con soluzioni sterilizzanti.

L'estrazione di DNA dai denti è stata effettuata utilizzando un protocollo ottimizzato per il recupero di frammenti corti di DNA (Dabney *et al.*, 2013) con minori modifiche. 50g di polvere ottenuta dall'interno dei denti sono stati risospesi in 1ml di extraction buffer (0.45M EDTA, 0.25 mg/mL Proteinasi K, 0.05% Tween-20). La sospensione è stata vortexata e lasciata sul rotatore a 37° per circa 18h. Dopo aver centrifugato i campioni, il surnatante è stato trasferito in provette a cui sono stati aggiunti 10ml di Binding Buffer (5 M idrocloruro di guanidina, 40% isopropanolo, 0.05% Tween-20)

e 400 µl di 3M Acetato di Sodio, pH 5.2. Il contenuto è stato trasferito in colonnine MinElute (Quiagen) e purificato secondo il protocollo.

3.8 Preparazione delle *libraries* per il sequenziamento di nuova generazione

Il DNA estratto dai denti e dai campioni di sedimento è stato quantificato con il fluorimetro Qubit usando il kit dsDNA high sensitivity assay (Life Technologies, Carlsbad, California). Aliquote dei DNA estratti comprese tra 10 e 150 ng sono state convertite in double strand (ds) libraries utilizzando il kit NEBNext® DNA LibraryPrep Master Mix Set for Illumina® (New England Biolabs), secondo il protocollo di Wales *et al.* (2015). Tutte le incubazioni sono state condotte tramite PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research). Brevemente, le estremità delle molecole di DNA sono state rese piatte (blunt ended) utilizzando NEBNext End Repair Enzyme Mix, costituito da T4 polynucleotide kinase e T4 DNA polymerase. Dopo incubazione a 12°C per 20 min seguiti da 37°C per 15 min, le reazioni sono state purificate con MinElute PCR purification Kit (Qiagen), riducendo al minimo la velocità delle centrifugate per minimizzare la perdita dei frammenti più corti di DNA. Adattatori compatibili con Illumina (IS1_adapter P5.F, IS2_adapter P7.F, IS3_adapter P5+P7.R) sono stati prodotti secondo il protocollo di Meyer e Kircher (2010) e legati al blunt ended DNA usando NEBNext Quick T4 DNA Ligase. Le reazioni sono state incubate a 20°C per 20 min e purificate con QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Le interruzioni ancora presenti nelle molecole sono state riempite utilizzando l'enzima Bst DNA Polymerase, Large Fragment (New England Biolabs), con incubazione a 65°C per 20 min seguiti da 80°C per 20 min. A questo punto, per determinare il numero di

molecole presenti nelle libraries e decidere il numero di cicli necessari nella successiva PCR per l'incorporazione degli index, è stata eseguita una PCR quantitativa (qPCR). Ogni reazione di 20 μ l conteneva 10 μ l di Fluocycle II Sybr Master Mix (Euroclone), 0.4 μ l (0.2 μ M) dei primers IS7 e IS8 e 1 μ l di ogni standard e delle libraries diluite 1:100. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) con le seguenti condizioni: 95°C per 10 min, seguiti da 40 cicli a 95°C per 30 s, 60°C per 30 s e 72°C per 30 s. Gli standard utilizzati erano stati precedentemente preparati amplificando il DNA di pUC19 con i primers CL105 e CL106 secondo il protocollo di Gansauge e Meyer (2013). I valori dei cicli soglia e le concentrazioni delle libraries sono stati determinati utilizzando il software Bio-Rad CFX Manager. A questo punto, le libraries sono state amplificate e "indicizzate" in reazioni da 100 μ l contenenti 50 μ l di NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR master mix, 2 μ l (200 nM) di ogni indexing primer P5 e P7 e 20 μ l di ogni library. Le reazioni sono state condotte tramite PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research) con le seguenti condizioni: 98°C per 30 sec, seguiti da 8-14 cicli a 98°C per 10 sec, 60°C per 30 sec, 72°C per 40 sec, e da un'estensione finale a 72°C per 5 min. Le libraries sono state purificate con QIAquick PCR purification kit (Qiagen) ed è stata eseguita una qPCR con NEBNext Library Quant Kit for Illumina® (New England Biolabs) per determinarne la concentrazione.

3.9 Sequenziamento

3.9.1 Metagenomica

Le libraries sono state sequenziate presso l'University of East Anglia (Norwich, UK), utilizzando la piattaforma Illumina NextSeq 500 con la modalità paired-ends (2x150 bp).

3.9.2 rRNA 16S e 18S

Il DNA estratto da un campione di sedimento proveniente da Palazzo Ducale è stato inoltre amplificato con i primers universali 27F (AGAGTTTGA-TYMTGGCTCAG) e 1391R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) per i geni dell'rRNA ribosomale (rRNA) 16S (Rochelle, 2001) e con i primers universali 18S-82F (GAAACTGCGAATGGCTC) e Ek-516r (ACCAGACTTGCCCTCC) (Casamayor *et al.*, 2002; Lepère *et al.*, 2006) per i geni dell'rRNA 18S. Le reazioni di PCR sono state condotte usando Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies) tramite PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research). Gli amplificati sono stati purificati con DNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research) e sono stati sequenziati presso Porto Conte Ricerche Srl (Alghero, Italia) utilizzando la piattaforma Illumina HiScanSQ con la modalità paired-ends (2x100bp).

3.10 Analisi Bioinformatiche

3.10.1 Metagenomica

Le sequenze paired-ends ottenute sono state filtrate e unite mediante Trimmomatic versione 0.36 (Bolger *et al.*, 2014) e la dimensione delle sequenze è stata analizzata mediante il programma FastQC (<http://www.bioinforma->

tics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) per verificare che la frammentazione fosse compatibile con l'età dei campioni.

Le sequenze metagenomiche sono inoltre state analizzate con MetaPhlan versione 2.0 (Truong *et al.*, 2015) e l'output è stato usato per costruire una hetmap mediante il software online ClustVis (Metsalu e Vilo, 2015).

Infine, le sequenze paired-ends dei campioni provenienti da Palazzo Ducale sono state allineate con il software Bowtie2 versione 2.2.4 (Langmead e Salzberg, 2012) contro i parassiti: *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Diphyllobothrium latum*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Acanthamoeba castellanii* str. Neff e *Kribella catacumbae*. Le sequenze eventualmente allineate sono state assemblate con Velvet versione 1.2.10 (Zerbino e Birney, 2008). I contigui ottenuti dall'assemblaggio sono stati allineati con BLAST contro i database nucleotide collection (nr/nt) o whole genome shotgun contigs (WGS) per verificare la specificità dell'allineamento e sono stati considerati positivi nel caso di similarità maggiore o uguale al 99%.

3.10.2 rRNA 16S e 18S

Le sequenze paired-ends sono state unite e filtrate mediante Usearch (Edgar, 2010) con i seguenti parametri: fastq_truncqual 15, fastq_minovlen 8, fastq_maxdiffs 0 and fastq_minlen 100. L'OTU picking è stato effettuato con QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010) usando i database GreenGenes 13_8 o Silva release 111 (rispettivamente per il 16S e il 18S).

Risultati

4.1 Campioni prelevati

Campioni ossei, ceramici e di sedimento sono stati prelevati da sette siti archeologici di diversa tipologia: abitato e necropoli.

I campioni ossei comprendevano i resti di 16 individui rinvenuti in ciascuna delle sepolture di Mont'e Prama e 40 denti provenienti da 33 differenti individui della necropoli di Monte Carru.

I resti ossei rinvenuti nelle sepolture di Mont'e Prama erano in cattivo stato di conservazione, conservavano solo i tessuti compatti ed erano quasi totalmente privi di quelli spugnosi. Il materiale scheletrico prelevato è stato trasportato presso il Centro di Restauro dei Beni Culturali dove è stato oggetto di uno studio antropologico realizzato in collaborazione con il Museo Nazionale Preistorico Etnografico Luigi Pigorini (fig. 4.1). Questo tipo di indagine ha evidenziato che i sedici individui, di età compresa tra i 15 e i 30 anni, erano un gruppo fortemente omogeneo da un punto di vista demografico (giovani e giovani adulti). È stato possibile determinare il sesso di 9 individui, tutti diagnosticati come maschili, mentre per i rimanenti 7 non è stato possibile per mancanza di caratteri diagnostici. Le informazioni ottenute sono alla base di futuri studi biomolecolari.



Figura 4.1. La tomba 7 di Mont'e Prama durante lo scavo.

Il prelievo dei denti dagli individui di Monte Carru è stato effettuato presso i laboratori di Anatomia Umana del Dipartimento di Scienze Biomediche dove gli individui erano stati trasportati per poter eseguire lo studio antropologico. Il campionamento è stato effettuato prediligendo i canini e gli incisivi superiori; se questi erano in cattivo stato di conservazione e presentavano lesioni o radici spezzate sono stati prelevati canini e incisivi inferiori e solo come ultima scelta molari o premolari superiori e inferiori.

I campioni ceramici prelevati comprendevano 6 vasi interi provenienti da Palmavera, 2 frammentati rinvenuti all'interno di altrettante tombe a Mont'e Prama e 5 frammenti ceramici, di cui 4 rinvenuti all'interno del vaso PLV 209 e 1 all'interno del vaso PLV 2 di Palmavera (tab. 4.1; fig 4.2). I frammenti rinvenuti a Mont'e Prama, databili tra il Bronzo Finale e la Prima età del Ferro (Unali, 2015), erano posizionati sotto le gambe dell'inumato nella tomba E e, sempre sotto l'inumato, a contatto col fondo e la parete della fossa, nella tomba B (Carenti, Sias e Panico, 2015). Il successivo restauro presso il Centro di Restauro dei Beni Culturali ha restituito un'intera ciotola carenata e un'olla frammentaria (tab 4.1; fig 4.3).

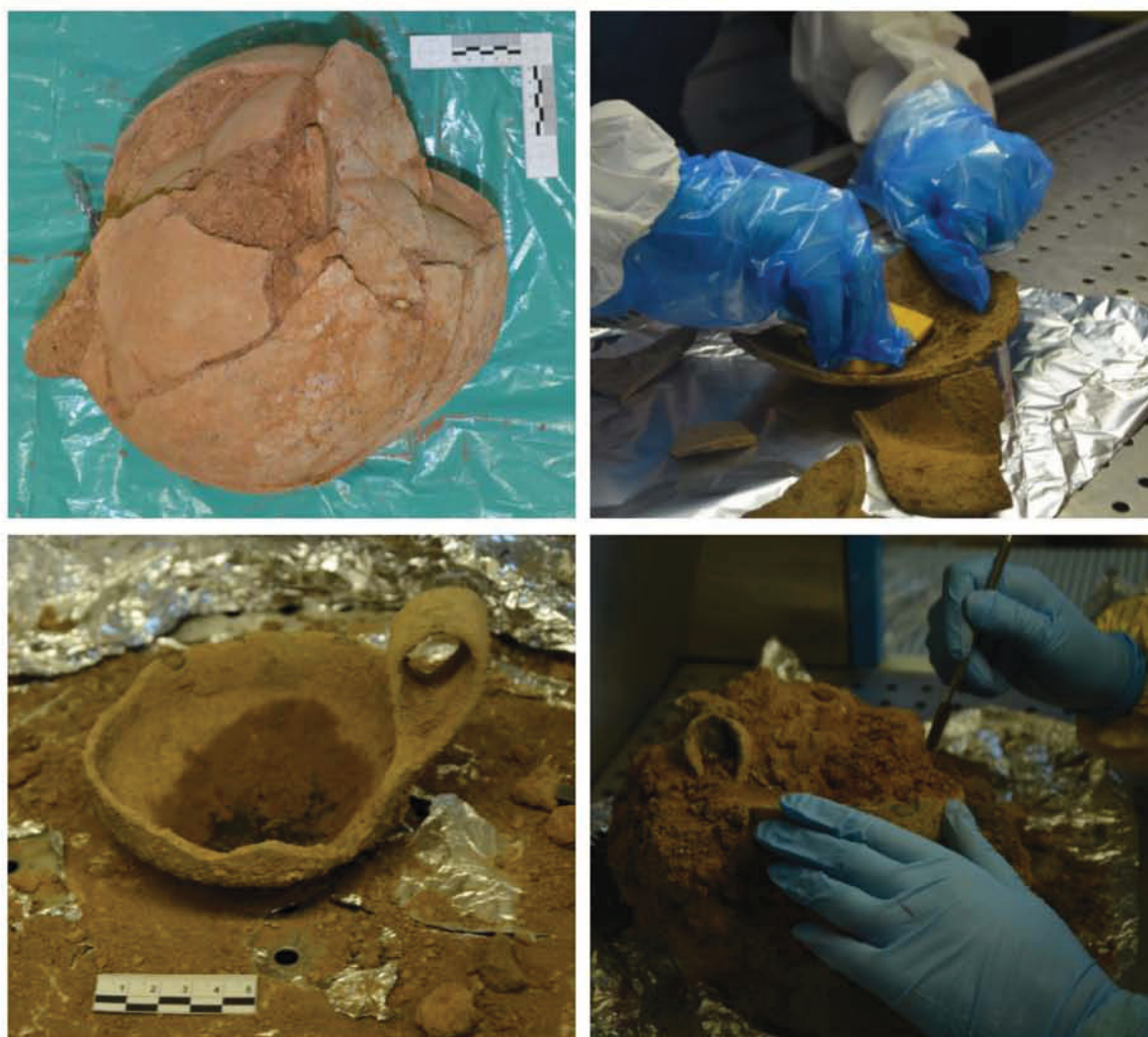


Figura 4.2. Scavo dei vasi di Palmavera eseguito in laboratorio.

Lo scavo di questi vasi ha portato al prelievo di 34 campioni di sedimento (tab 4.1), comprendenti un campione prelevato con la spugna per ogni vaso o frammento. Altri 45 campioni sono stati prelevati da 3 olle intere provenienti dalla Prisgiona e conservati presso il Centro di Restauro dei Beni Culturali (Tab 4.1)



Figura 4.3. Ciotola carenata della tomba E (alto) e olla dalla tomba B (basso) di Mont'e Prama: a sinistra durante lo scavo e a destra sezioni dei vasi (disegni tratti da A. Unali, 2015)

Oltre a quelli prelevati dai vasi, sono stati prelevati altri 158 campioni di sedimento, di cui 70 dal sito di Monte Sirai, 12 da Sant'Antioco, 74 da Mont'e Prama e 2 da Palazzo Ducale (tab 4.1).

Tabella 4.1. Campioni di sedimento prelevati.

N. Campioni	Provenienza	Descrizione
2	Palazzo Ducale	Pozzo Nero, US 306
2	S. Antioco, Cronicario	pozzo strada A
10	S. Antioco Cronicario	pozzo settore III
4	Acropoli, Monte Sirai	US 190 vano C 42 β
15	Necropoli, Monte Sirai	Tomba 343
13	Necropoli, Monte Sirai	Tomba 344
13	Necropoli, Monte Sirai	Tomba 345
11	Necropoli, Monte Sirai	Tomba 346
9	Necropoli, Monte Sirai	Tomba 347
5	Necropoli, Monte Sirai	Tomba 349
1	Monte Prama	Tomba 1
5	Monte Prama	Tomba 2
5	Monte Prama	Tomba 3
6	Monte Prama	Tomba 4
8	Monte Prama	Tomba 5
4	Monte Prama	Tomba 6
6	Monte Prama	Tomba 7
8	Monte Prama	Tomba 8
4	Monte Prama	Tomba A
2	Monte Prama	Tomba B
4	Monte Prama	Tomba C

Tabella 4.1. Continua.

N. Campioni	Provenienza	Descrizione
2	Monte Prama	Tomba D
5	Monte Prama	Tomba E
4	Monte Prama	Tomba F
4	Monte Prama	Tomba G
6	Monte Prama	Tomba I
1	Monte Prama	olla, Tomba B
1	Monte Prama	ciotola carenata, Tomba E
7	Palmavera, Capanna 42	ciotola carenata PLV 770
4	Palmavera, Capanna 42	vaso attingitoio PLV 177
3	Palmavera, Capanna 42	vaso a collo, PLV 150
4	Palmavera, Capanna 42	vaso PLV 108
3	Palmavera, Capanna 44	vaso PLV 209
2	Palmavera, Capanna 44	vaso PLV 209/2
2	Palmavera, Capanna 44	vaso PLV 209/3
1	Palmavera, Capanna 44	vaso PLV 209/6
1	Palmavera, Capanna 44	vaso PLV 209/7
3	Palmavera, Capanna 8	vaso PLV 2
2	Palmavera, Capanna 8	vaso PLV 2/2
19	La Prisgiona, Nicchia 2	olla 01
8	La Prisgiona, Nicchia 2, Vano 2	olla 02
18	La Prisgiona, Vano 17	olla 03

4.2 Analisi parassitologiche e microscopiche (Palazzo Ducale)

L'analisi microscopica effettuata sui campioni di sedimento provenienti dal pozzo nero di Palazzo Ducale (US 306) ha permesso l'identificazione di numerose uova di parassiti, che presentavano una colorazione ambrata. Sono stati identificati le uova dei Nematodi *Trichuris trichiura* (32.4 mm x 52.4

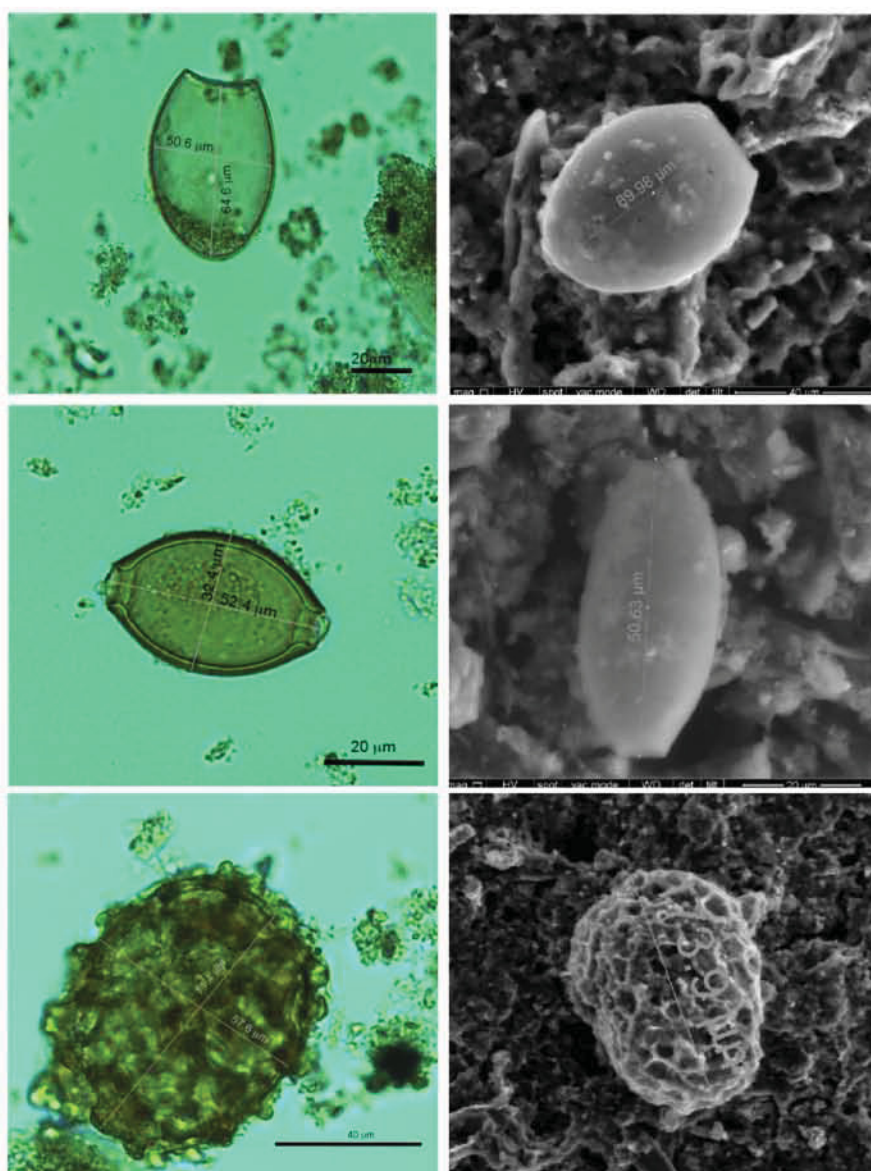


Figura 4.4. Parassiti dall'US 306 di Palazzo ducale. *Diphyllobothrium* (alto), *Trichuris* (centro) e *Ascaris* (basso). A sinistra immagini al microscopio ottico, a destra immagini al SEM.

EMANUELA SIAS, *Dallo scavo al Laboratorio. Applicazione di tecniche di biologia molecolare in contesti archeologici.*
Tesi di Dottorato in Life Sciences and Biotechnologies, Università degli Studi di Sassari.

mm) e *Ascaris* sp. (71.4 mm x 57.6 mm) e dei Platelminti del genere *Diphyllobothrium* (50.6 mm x 64.4 mm) e *Dicrocoelium dendriticum* (41.2 mm x 61.7 mm). Sia le dimensioni che la forma sono state confermate anche dall'analisi al SEM (fig 4.4).

Il parassita maggiormente rappresentato era *T. trichiura*, seguito da *Ascaris* e *Diphyllobothrium* sp. Sono state inoltre identificate spore fungine del genere *Trichodelitschia*.

4.3 Sequenziamento e analisi bioinformatiche

Tra i numerosi campioni prelevati sono stati selezionati 14 campioni da analizzare tramite metagenomica. Questi comprendevano 4 denti, 8 campioni di sedimento prelevato da 5 diversi vasi e 2 campioni di sedimento prelevati dal pozzo nero di Palazzo Ducale (tab 4.2). Per questi ultimi due campioni è stato inoltre effettuato il sequenziamento degli rRNA 16S e 18S. Il sequenziamento con Illumina ha prodotto da 1651092 a 9418743 sequenze paired end (rispettivamente per US 306-1 e T116).

La lunghezza media dei frammenti di DNA sequenziati era di 100 bp nei campioni di sedimento proveniente da Palazzo Ducale, di 80-85 bp in quelli provenienti da Mont'e Prama, di 70-75 bp nei campioni provenienti dai vasi di Palmavera e di 60-69 bp nei denti di Monte Carru (fig 4.5).

4.3.1 Monte Carru, Palmavera, Mont'e Prama

Il sequenziamento e le successive analisi bioinformatiche dei dodici campioni prelevati da Monte Carru, Palmavera e Mont'e Prama hanno permesso di identificare numerosi microrganismi, in prevalenza ambientali (figg. 4.6, 4.7, 4.8).

Tabella 4.2. Campioni sequenziati con Illumina NextSeq 500.

Nome campione	Descrizione	Provenienza	concentrazione DNA estratto (ng/µl)	ng di DNA usati per library	cicli di amplificazione per indexing	numero di sequenze x 2 reads ottenute con Illumina
US 306-1	Sedimento pozzo nero	US 306 Palazzo Ducale	24,6	123	11	1651092
US 306-2	Sedimento pozzo nero	US 306 Palazzo Ducale	28,7	114,8	12	2162586
MPB	Sedimento prelevato con la spugna dal fondo del vaso	olla, Monte Prama	0,562	16,86	13	5799145
MPE	Sedimento prelevato con la spugna dal fondo del vaso	ciotola carenata, Monte Prama	0,863	25,89	13	5235117
PLV 770-03	Sedimento esterno al fondo del vaso	ciotola carenata PLV 770, Palmavera	1,08	32,4	14	7303581
PLV 770-05	Sedimento interno al fondo del vaso	ciotola carenata PLV 770, Palmavera	1,17	35,1	14	5735600
PLV 770-06A	Sedimento prelevato con la spugna dal fondo del vaso	ciotola carenata PLV 770, Palmavera	0,892	24,87	14	5230154
PLV 177-03	Sedimento interno al fondo del vaso	vaso attingitoio PLV 177, Palmavera	3,66	109,8	12	5570414
PLV 177-04	Sedimento prelevato con la spugna dal fondo del vaso	vaso attingitoio PLV 177, Palmavera	0,507	15,21	14	4985154
PLV 150-03	Sedimento prelevato con la spugna dal fondo del vaso	vaso a collo PLV 150, Palmavera	4,12	123,6	14	1968842
T116	Dente	Individuo Monte Carru	0,344	10,32	14	9418743
T221	Dente	Individuo Monte Carru	2,78	55,6	14	9086127
T175	Dente	Individuo Monte Carru	3,29	65,8	14	8520389
T226	Dente	Individuo Monte Carru	4,04	60,6	14	9044957

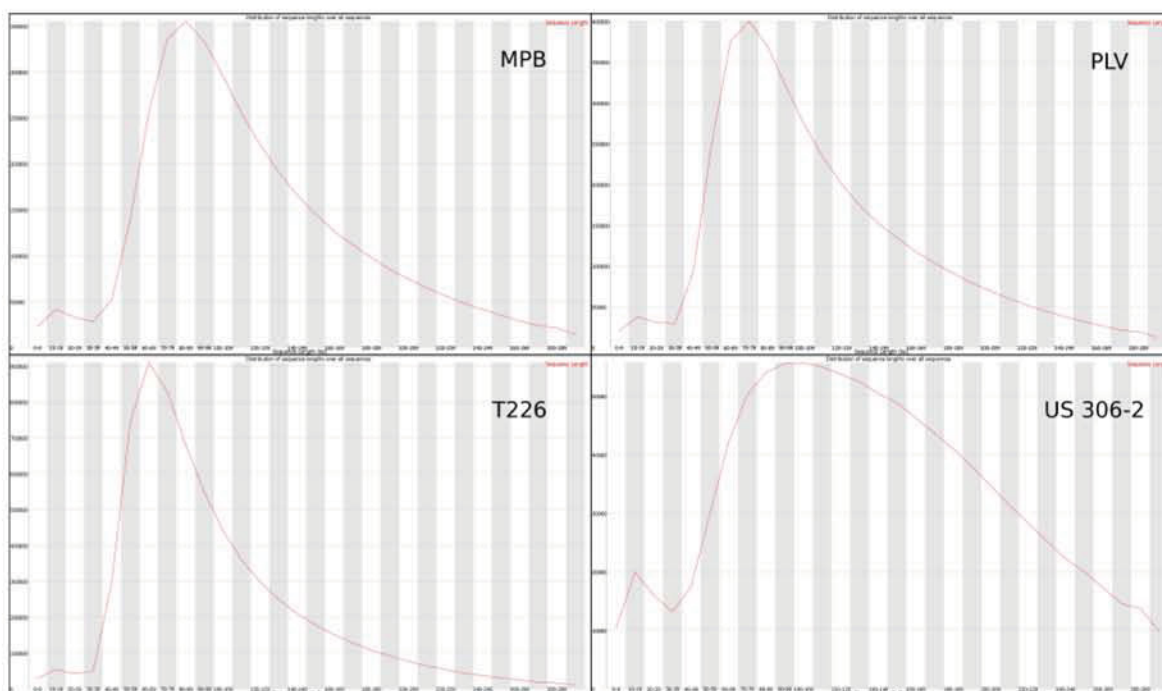


Figura 4.5. Distribuzione della lunghezza dei frammenti ottenuta mediante FastQC.

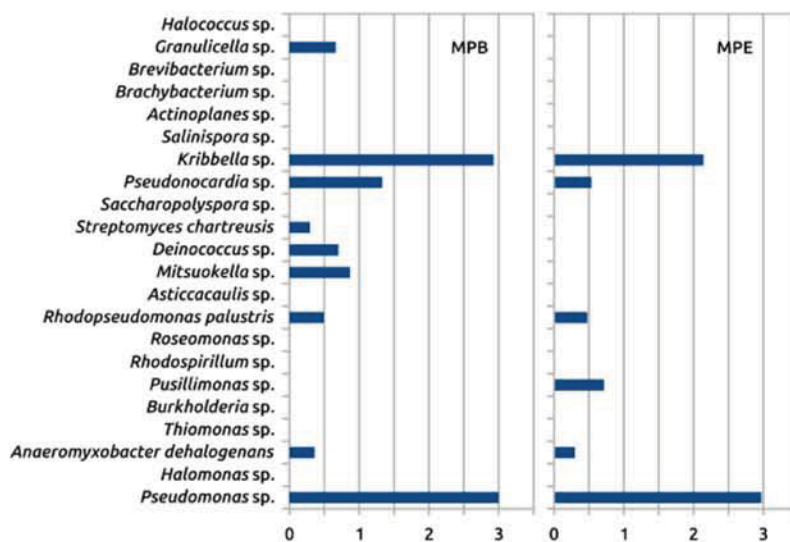


Figura 4.6. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Mont'e Prama. Nell'asse delle X è rappresentata la percentuale di ogni specie (espressa come logaritmo naturale).

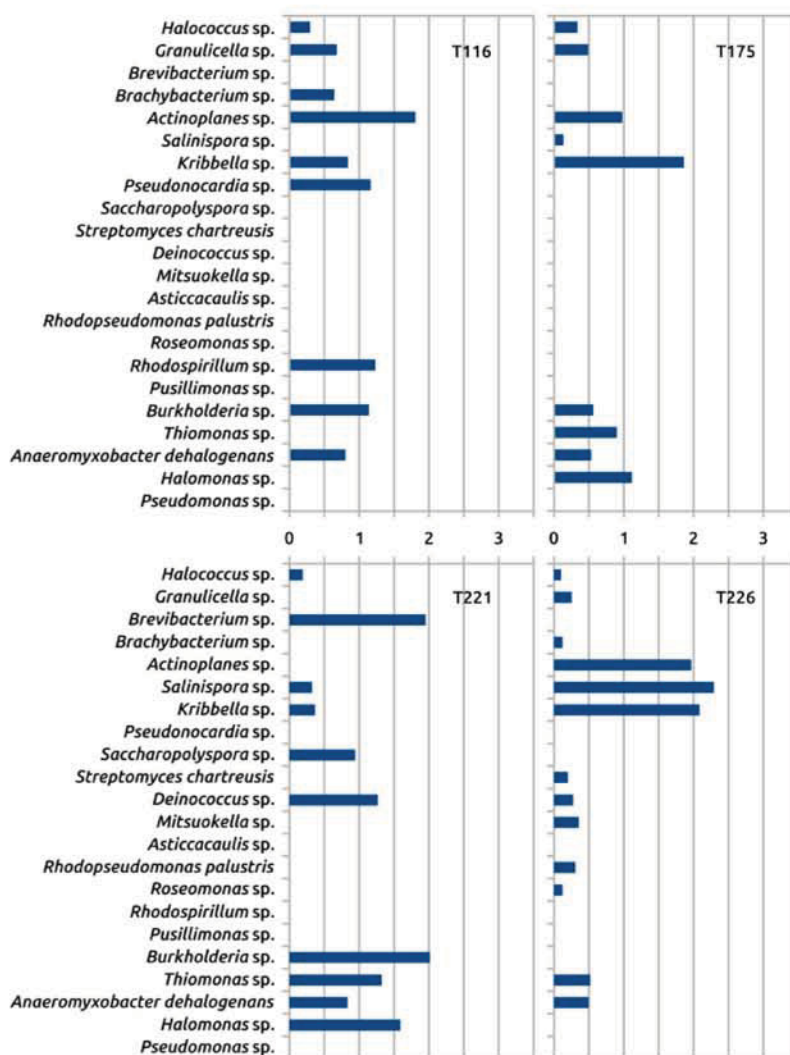


Figura 4.7. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Monte Carru. Nell'asse delle X è rappresentata la percentuale di ogni specie (espressa come logaritmo naturale).

In tutti i campioni ad eccezione del PLV 150-03 è stata evidenziata la presenza di *Kribella* sp. (18-0.2%). Nei campioni di Mont'e Prama e in alcuni di Palmavera (PLV 770-06A, PLV 177-03, PLV 177-04) è stata inoltre rilevata la presenza di *Pseudomonas* sp. (31-4%), totalmente assente nei campioni di Monte Carru. La maggiore presenza di *Pseudomonas* era nel campione PLV 770-06A (fig. 4.8). Il successivo assemblaggio e allineamento delle sequenze ottenute ha consentito di confermare nel campione MPB il genere *Kribella*,

Tabella 4.3. Specie identificate nel campione di Mont'e Prama in seguito a sequenziamento con Illumina NextSeq 500 e allineate con i genomi disponibili in banca dati.

Specie	Paired reads	Contigui	Risultato	Accession number	similarità
<i>Kribbella catacumbae</i> DSM 19601	10110	4783	<i>Kribbella catacumbae</i>	AQUZ01000000	94-99%

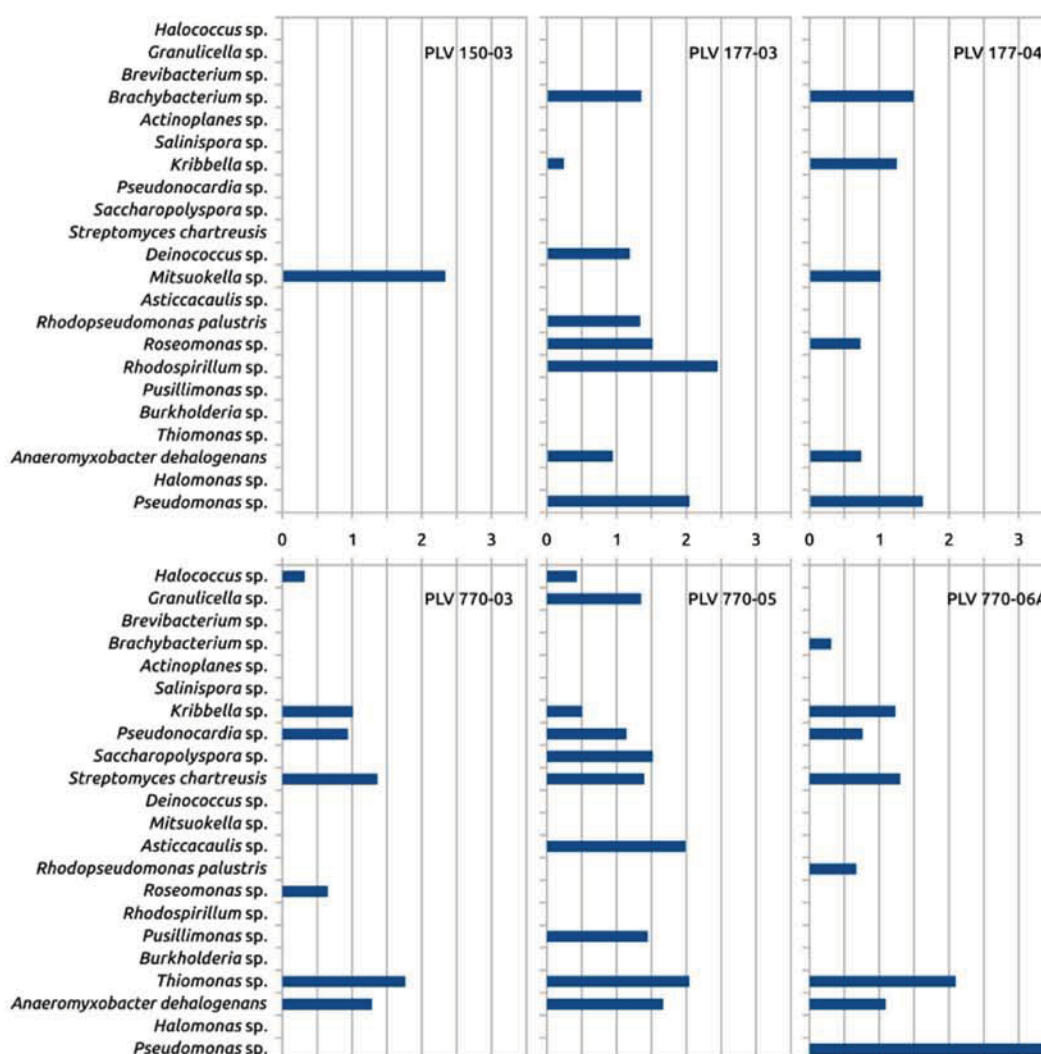


Figura 4.8. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Palmavera. Nell'asse delle X è rappresentata la percentuale di ogni specie (espressa come logaritmo naturale).

che è risultata essere della specie *catacumbae* (tab. 4.3). Questa analisi ha permesso di individuare anche sequenze eucariotiche che sono risultate però non specifiche.

Le tassonomie ottenute mediante MetaPhlan, filtrate a livello di genere sono state utilizzate per creare un grafico heatmap mediante il software ClustVis (fig. 4.9). L'analisi mostra una clusterizzazione in base al contesto, con una suddivisione dei prelievi dai denti in due cluster.

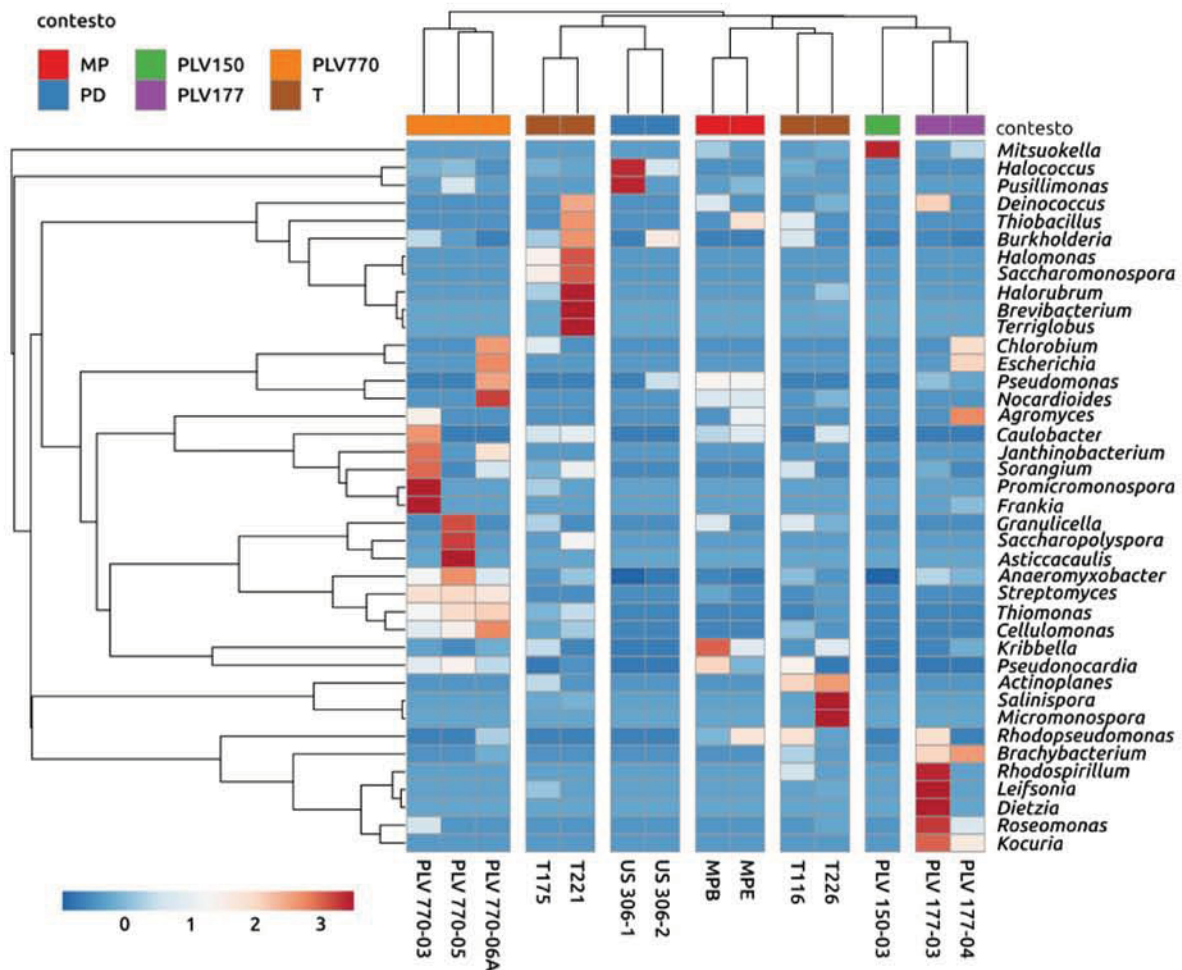


Figura 4.9. Heatmap dei campioni costruita con ClustVis. L'analisi è stata effettuata scegliendo la suddivisione in 6 cluster. I contesti sono MP: Mont'e Prama, PD: Palazzo Ducale, PLV: Palmavera e T: denti provenienti da Monte Carru. Clustering gerarchico. Le distanze pairwise sono rappresentate mediante una scala di colori.

4.3.2 Palazzo Ducale

Il sequenziamento degli rRNA18S, effettuato sul campione US 306-1 proveniente dal pozzo nero di Palazzo Ducale ha prodotto 128500 sequenze con una lunghezza media di 126 bp e un contenuto di GC del 49,7%.

L'analisi ha permesso l'identificazione di 314 unità tassonomiche operazionali (OTU). Le OTU più rappresentate sono state identificate come famiglia dei Nematodi Trichuridae, 34%, dei funghi, 18%, super gruppo SAR (Stramenopila, Alveolata, Rhizaria), 13% dei mammiferi, 9% di Archeoplastida (costituito principalmente da piante) e 8% di Amoebozoa (tra cui principalmente *Acanthamoeba* e *Hartmannella*).

Nello specifico, per quanto riguarda la componente fungina individuata, il 2% era rappresentato dalla classe degli Eurotiomycetes a cui appartengono il genere *Penicillium* e *Aspergillus*. L'1% era rappresentato dal genere del *Sordariomycetes*. Nel 13% del super gruppo SAR facevano parte il subphylum Endomyxa e quello degli Heterokonta o Stramenopiles. Circa il 13% degli eucarioti identificati appartenevano alla classe dei Mammalia e l'8% erano invece Streptophyta.

Il sequenziamento degli amplificati per rRNA 16S ha restituito 130000 sequenze con una lunghezza media di 126 bp e un contenuto di GC del 58%. Le analisi effettuate con QIIME hanno permesso di individuare 736 OTU; queste comprendevano principalmente i phyla dei Proteobacteria (49%), Acidobacteria (14%), Gemmatimonadetes (10%), Nitrospirae (7%), Actinobacteria (7%) e Firmicutes (5%).

Sono stati individuati, all'interno dei phyla, batteri prevalentemente ambientali, come i Gemmatimonadetes, Syntrophobacteriaceae e Rhodospirillaceae.

Il phylum maggiormente rappresentato all'interno delle OTU è stato quello dei Proteobacteria; questo comprende una grande varietà di agenti patogeni, come *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter* e *Yersinia*.

Il sequenziamento del metagenoma dei campioni US 306-1 e US 306-2 ha permesso di individuare la presenza di *Halococcus* sp., in entrambi, di *Pusillimonas* sp., nel campione US 306-1, di *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Anaeromyxobacter* della specie *A. dehalogenans* nel campione 306-2 (fig. 4.10).

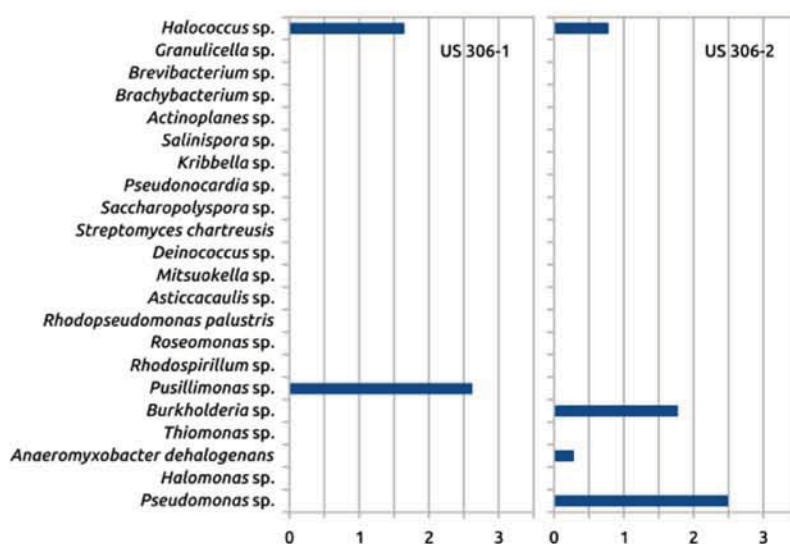


Figura 4.10. Analisi tassonomica mediante metaPhlan dei campioni prelevati da Palazzo Ducale. Nell'asse delle X è rappresentata la percentuale di ogni specie (espressa come logaritmo naturale).

Tabella 4.4. Specie identificate nei campioni di Palazzo Ducale in seguito a sequenziamento con Illumina NextSeq 500 e allineate con i genomi disponibili in banca dati.

Specie	Paired reads	Contigui	Risultato	Accession number	similarità
<i>Trichuris trichiura</i>	102	34	<i>Trichuris trichiura</i>	SAMEA3138987	99%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	0	<i>Ascaris suum</i> ASU_somatic	SAMN01096044	100%
<i>Acanthamoeba castellanii</i> str. Neff	71	50	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	AHJI00000000	99%

Grazie ai risultati ottenuti allineando le sequenze al genoma dei singoli parassiti ed in seguito assemblandole, è stato possibile confermare la presenza dei parassiti *Trichuris trichiura* e *Acanthamoeba castellanii*, entrambi con una similarità del 99% rispetto alle sequenze in banca dati. Inoltre, due sequenze sono state allineate al genoma di *Ascaris suum*, identificato con la microscopia come *Ascaris* sp. poiché morfologicamente indistinguibile a livello di specie (tab. 4.4).

Discussione

Uno degli obiettivi della presente tesi è stato quello di applicare, durante le operazioni di scavo archeologico, un protocollo per ridurre la contaminazione dei campioni con DNA moderno. Infatti, nonostante siano state stabilite linee guida per il prelievo dei campioni (Allentoft, 2013), ogni scavo è differente da un altro non solo per contesto o datazione, ma anche per una serie di elementi legati all'organizzazione del cantiere, alla sua collocazione geografica, alle condizioni meteorologiche, a tutto ciò che si verifica nell'ambiente circostante ed alle risorse disponibili. Le modalità di prelievo campioni utilizzate per le ricerche condotte in questa tesi si sono dimostrate in accordo con le linee guida recentemente pubblicate (Llamas *et al.*, 2016). In particolare, nello scavo effettuato nel sito di Mont'e Prama sono stati applicati in maniera scrupolosa tutti gli accorgimenti stabiliti in fase di progettazione dell'intervento. Per quanto riguarda invece il prelievo campioni effettuato a Monte Sirai, le alte temperature estive hanno portato ad un adattamento del protocollo, infatti le tute in Tyvek sono state sostituite da camici ad uso chirurgico e da coprimaniche. Nel sito di Palmavera invece, sono state utilizzate entrambe le soluzioni. Il lavoro svolto ha dimostrato l'importanza di una stretta collaborazione tra archeologi e biologi durante

tutte le fasi, come confermato da Llamas *et al.* (2016). La collaborazione è risultata infatti fondamentale sia per la progettazione delle strategie d'intervento e il loro adattamento agli imprevisti, che per l'elaborazione finale dei dati. La fase di prelievo campioni ha impegnato una parte consistente del presente lavoro. Infatti sono stati effettuati 4 diversi scavi archeologici, la cui tempistica è stata notevolmente rallentata dall'applicazione dei protocolli per ridurre le contaminazioni. Questa fase è continuata anche in laboratorio per quanto riguarda lo scavo dei vasi.

È stato dunque prelevato un numero consistente di campioni, comprendenti 237 campioni di sedimento, 40 denti e i resti ossei di 16 individui. A causa dei costi molto elevati del sequenziamento di nuova generazione, non è stato possibile analizzarli tutti, considerando anche che spesso non è sufficiente effettuare un unico sequenziamento per campione ma è necessario ripeterlo per ottenere maggiori informazioni. È stata dunque effettuata una selezione, concentrandosi in particolare su 2 campioni di sedimento prelevati dal pozzo nero di Palazzo Ducale, 8 prelevati da vasi di Palmavera e Mont'e Prama e 4 denti prelevati da individui di Monte Carru.

La lunghezza media delle sequenze di DNA ottenute, compresa tra circa 69 e 100 bp, era compatibile con le dimensioni standard indicate per il DNA antico, che non devono superare 100-150 bp (Llamas *et al.*, 2016; Bouwman e Rühli, 2016). È interessante notare che le sequenze di lunghezza maggiore provenivano da Palazzo Ducale, il sito cronologicamente più recente tra quelli analizzati e caratterizzato da un ambiente chiuso, riparato dai fenomeni atmosferici e sbalzi di temperatura, tutti fattori che potrebbero aver rallentato la degradazione del DNA. Lo studio dei campioni prelevati da Palazzo Ducale è parso interessante in quanto la precisa conoscenza del conte-

sto, in questo caso un pozzo nero, ha permesso di focalizzare le analisi sulla ricerca di parassiti. Un'analisi preliminare dei campioni tramite microscopia ha consentito di evidenziare la presenza di uova dei Nematodi *T. trichiura* e *Ascaris* e dei Platelmini del genere *Diphyllobothrium* e *Dicrocoelium dendriticum*. La presenza di questi parassiti è stata attestata in numerosi studi condotti su latrine, frammenti di colon o coproliti (Rácz *et al.*, 2015; Appelt *et al.*, 2014) e rappresenta un ottimo indicatore per ottenere informazioni sulle condizioni igieniche e sullo stato di salute delle popolazioni del passato (Côté *et al.*, 2016). Le uova di parassiti si conservano bene in luoghi umidi (Bouchet *et al.*, 2003), come riscontrato nel pozzo di Palazzo Ducale. Le infezioni da nematodi intestinali che rappresentavano un problema già nel passato, sono ancora oggi tra le più comuni infezioni per gli esseri umani in tutto il mondo, principalmente nei Paesi in Via di Sviluppo e rappresentano, un importante problema di salute pubblica (Ahmadi Jouybari *et al.*, 2016). L'*Ascaris* sp. si trasmette per via oro-fecale ed è quindi associato a scarse condizioni igieniche, e la contaminazione fecale di cibo e acqua (Mitchell *et al.*, 2011). Il Platelmina *Diphyllobothrium*, responsabile di patologie umane tramite il consumo di pesce crudo o poco cotto, è stato individuato in associazione con *Ascaris* sp. dall'analisi del materiale rinvenuto all'interno di un pozzo nero in uso nel XIII sec. durante il periodo crociato ad Israele (Mitchell *et al.*, 2011). Infatti gli studi archeozoologici effettuati sul materiale rinvenuto nell'unità stratigrafica da cui provenivano i nostri campioni avevano evidenziato la presenza di resti ittici. Inoltre la presenza di vertebre di tonno ha fatto ipotizzare anche un consumo di pesce fresco, senza dimenticare che gli abitanti del palazzo erano anche i proprietari di una famosa tonnara installata sull'isola dell'Asinara (Wilkins, 2001).

Anche l'identificazione del parassita *Dicrocoelium dendriticum* risulta molto interessante poiché infetta ovini e bovini, due mammiferi da secoli fondamentali per l'economia della Sardegna. Questo parassita, che colpisce principalmente il fegato dei ruminanti, è stato identificato nel 2003 in uno studio condotto su un significativo numero di capi ovini sardi (Sanchez-Andrade *et al.*, 2003). Le uova di questo parassita sono state individuate in vari contesti archeologici tra cui una sepoltura riconducibile cronologicamente al 2600-2200 a.C. situata a sud-ovest dell'Iran (Mowlavi *et al.*, 2015). Uova di *Dicrocoelium dendriticum* sono state identificate anche nel fegato di un individuo mummificato rinvenuto nei Paesi Bassi e ascrivibile cronologicamente al periodo romano insieme a uova di *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Il rinvenimento delle uova di *D. dendriticum* nel fegato ha portato ad accertare la presenza di un'infezione, la prima provocata dal *D. dendriticum* nota negli esseri umani (Searcey *et al.*, 2013).

La presenza di un'alta percentuale del DNA di *Trichuris trichiura* è stata confermata con il sequenziamento dei geni per l'rRNA 18S, che ha inoltre evidenziato la presenza di DNA di due Amoebozoae: l'*Acanthamoeba*, associata spesso con malattie intestinali e l'*Hartmannella* che potrebbe essere associata direttamente con malattie umane oculari. Non è stato invece rilevato il DNA di *D. dendriticum*, *Ascaris* sp. e del Platelminata del genere *Diphyllobothrium*.

Acanthamoeba castellanii è stata individuata anche in un coprolite del XIV secolo rinvenuto all'interno di un barile in Belgio (Appelt *et al.*, 2014a). Inoltre, l'analisi dell'rRNA 18s ha identificato i seguenti funghi: Euscomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Sordariomycetes, Saccharomycetes, Plectomycetes, Pezizomycetes, Zygomycota, and Basidiomycota.

In questa tesi l'identificazione della specie *A. castellanii* è stata possibile grazie alla metagenomica, che però non ha rilevato la presenza dell'*Hartmannella*. Il sequenziamento tramite metagenomica ha permesso di confermare il DNA di *Ascaris* e ha reso possibile determinarne la specie. Nello specifico non si tratta del comune *A. lumbricoides* individuato molto frequentemente nei lavori di paleoparassitologia ma della specie ad esso strettamente correlata *A. suum*, che causa infezione nei maiali. Infatti, l'individuazione di segni di macellazione sui resti faunistici rinvenuti in altre aree di scavo del palazzo ha suggerito che la macellazione avvenisse *in loco* e che caprini e maiali molto giovani venissero consumati interi (Baldino et al., 2008).

Mentre la distinzione tra gli adulti *A. lumbricoides* e *A. Suum* può essere effettuata sulla base di caratteri morfologici, non vi è ancora un metodo conveniente per discriminare le uova delle due specie (Loreille e Bouchet, 2003), evidenziando l'importanza dell'utilizzo dei nuovi metodi di sequenziamento in associazione con la classica microscopia in particolare in contesti archeologici.

Gli studi condotti sul sedimento del pozzo nero di Palazzo Ducale hanno permesso di conoscere e descrivere una componente eucariotica e procariotica, estremamente coerente con il contesto analizzato. Nonostante fosse un palazzo della borghesia locale e quindi un ambiente privilegiato, vi risiedeva sicuramente anche il personale della servitù, le cui condizioni igieniche potevano essere spesso precarie in linea con le abitudini dominanti in quel periodo. Integrando le informazioni ottenute dalle analisi con i dati storici e archeologici in nostro possesso è stato possibile aggiungere nuovi tasselli fondamentali per poter ricostruire la vita all'interno del palazzo. Ad esem-

pio, fonti storiche evidenziano che a Sassari, in quel periodo fossero presenti in gran quantità orti in cui venivano coltivati spinaci, verze, rape, prezzemolo, fagioli e piselli, e fosse abitudine consumare insalata cruda (Bardarzellu, 1993). Un'ulteriore abitudine vigente in quel periodo tra i sardi era quella, in assenza di ospiti, di cibarsi di cose ordinarie anche poco cotte (Bardarzellu, 1993). Il significativo consumo di ortaggi e di cibo poco cotto potrebbe essere messo in relazione con la presenza di parassiti intestinali rinvenuti nel sito.

Altre informazioni utili per poter interpretare e confermare i dati ottenuti ci vengono forniti dalle indagini archeozoologiche condotte su altre aree di scavo all'interno del palazzo che hanno permesso di evidenziare come la dieta fosse molto varia con consumo di carni rosse, pollame, uova e pesci (Baldino *et al.*, 2008; Wilkens 2012).

Nonostante l'obiettivo principale di questa ricerca fosse legato principalmente all'individuazione della popolazione eucariotica presente nel sedimento, sono state effettuate anche analisi per identificare i batteri presenti.

I risultati dell'rRNA 16s hanno permesso di individuare un'elevata diversità microbica caratterizzata dalla presenza dei seguenti phyla: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, and Chloroflexi. I dati ottenuti sono risultati in linea con quelli ottenuti, grazie al 16s, in uno studio condotto su un coprolite in cui i phyla batterici maggiormente rappresentati erano: Proteobacteria (58,12%), Gemmatimonadetes, (15,18%), Actinobacteria (6,96%) e Bacteroidetes (5,10%) (Appelt *et al.*, 2014a)

Una parte di questo lavoro ha riguardato l'analisi dei campioni di sedimento provenienti da vasi, rinvenuti in differenti campagne di scavo archeologico.

L'obiettivo principale era quello di individuarne il contenuto, dato che allo stato attuale non risultano studi sull'argomento basati sulla metagenomica. Questa tipologia di indagine infatti, viene generalmente effettuata analizzando le caratteristiche molecolari e isotopiche dei lipidi conservate nel materiale ceramico (Craig *et al.*, 2011), e recentemente sono stati utilizzati approcci di proteomica basati sulla spettrometria di massa per analizzare resti di cibo (Hong *et al.*, 2012).

L'analisi del DNA estratto dai vasi ha riguardato il sito di Palmavera e quello di Mont'e Prama. Nel primo caso i contenitori ceramici sono stati rinvenuti all'interno di fosse ricavate nel piano pavimentale di una capanna, nel secondo all'interno di due tombe. Per questi ultimi in particolare è apparso interessante e inusuale il rinvenimento di due sole forme ceramiche in due diverse sepolture della stessa tipologia e la totale assenza nelle altre. Per questa tipologia di campioni, durante le ricerche condotte per questa tesi, è stata messa a punto una metodica innovativa e sperimentale mirata alla cattura della componente sedimentaria adesa al fondo dei vasi e volta a aumentare la probabilità di assorbire il DNA endogeno. Rispetto ai precedenti lavori che utilizzavano lame per raschiare la ceramica dalla superficie interna dei vasi (Foley *et al.*, 2012), in questo studio sono state infatti utilizzate delle Hydra sponges che hanno permesso di raccogliere tutto il sedimento presente senza arrecare alcun danno ai reperti. Questo rappresenta un elemento di importanza fondamentale quando si lavora con materiale archeologico poiché ovviamente diventa più complicato ottenere le autorizzazioni necessarie nel momento in cui qualunque tipologia di reperto debba essere distrutto anche solo parzialmente. Durante le varie fasi di questa tesi è stato possibile constatare le difficoltà presenti nell'analisi di campioni di sedi-

mento e di denti, soprattutto per la presenza consistente di microrganismi ambientali.

Nel caso dei vasi, le sequenze ottenute dall'analisi metagenomica non hanno fornito, allo stato attuale della ricerca, elementi per risalire al contenuto del materiale ceramico analizzato. Questo è molto probabilmente dovuto al fatto che il campione di partenza era costituito da sedimento, con una componente microbica ambientale preponderante. L'analisi del DNA estratto dai denti non ha evidenziato la presenza dei principali patogeni usualmente identificati in questo tipo di campioni e anche in questo caso si è rilevata la presenza di batteri ambientali. Questo aspetto è stato evidenziato in molti lavori, in particolare è stato sottolineato che in un estratto di aDNA sono presenti meno del 1-5% di frammenti di DNA endogeni, mentre la maggior parte risulta essere DNA esogeno ambientale, composto da una significativa componente microbica (batteri, funghi, virus, alghe, protozoi e metazoi) (Llamas et al., 2016). L'analisi comparativa ha infatti evidenziato l'omologia tra i campioni provenienti dallo stesso sito, e nel caso di Palmavera, tra quelli prelevati dallo stesso vaso.

Durante questa fase d'indagine è emersa nella maggioranza dei campioni la presenza di *Kribbella* sp, le cui sequenze successivamente allineate e confrontate su blast hanno determinato un'omologia del 94-99% con la specie *K. catacumbae*, legata agli ambienti ipogei e isolata per la prima volta nelle catacombe di San Callisto a Roma (Urzi et al., 2008).

I campioni di sedimento e i denti verranno nuovamente processati mediante un nuovo sequenziamento mirato ad approfondire lo studio della componente procariotica ed eucariotica.

Conclusioni

In conclusione nonostante i numerosi campioni prelevati e analizzati, da questa tesi sono emerse anche le numerose difficoltà affrontate ed in parte risolte durante le varie fasi della ricerca, a partire dalle prime fasi d'indagine, come il prelievo campioni, sino alle analisi e alla lettura dei dati. Alquanto complessa si è rivelata la scelta dei campioni da prelevare e le modalità da adottare per ridurre la contaminazione con il DNA esogeno. Infatti si è dovuto tenere conto già in fase di progettazione, dei numerosi imprevisti che si possono verificare in un cantiere archeologico soprattutto se questo si sviluppa nell'arco di svariati mesi.

Ulteriori difficoltà sono emerse dalle analisi effettuate sui campioni di sedimento, infatti in questa fase preliminare non è stato possibile individuare il contenuto dei vasi rendendo necessari ulteriori studi. Al contrario per quanto riguarda il sito di Palazzo Ducale l'unione delle differenti tecniche applicate per lo studio del contesto ha permesso di ottenere dei risultati molto interessanti. Integrando infatti le informazioni ottenute grazie all'applicazione di tecniche di biologia molecolare con la microscopia è stato possibile fornire un contributo per la ricostruzione del "microcosmo" del sito. Un ulteriore aspetto che si è cercato di mettere in evidenza con questa tesi è

quello dell'importanza per questa tipologia di studi dell'interazione di figure professionali appartenenti a diversi ambiti e settori di ricerca. Infatti solo con la lettura di un sito da prospettive diverse, si può arrivare ad ottenere un'interpretazione completa e maggiormente dettagliata del contesto analizzato.

Prospettive future

Da questo lavoro è emersa l'importanza di effettuare ulteriori approfondimenti. In primo luogo si procederà con la realizzazione di un ulteriore sequenziamento mirato ad ottenere maggiori sequenze di DNA per ricostruire il genoma del *Trichiuris* nei campioni prelevati a Palazzo Ducale. Questo potrebbe infatti permetterci di inquadrare la specie, individuata nei campioni analizzati, nella filogenesi del *Trichiuris*. Un ulteriore sequenziamento e analisi più specifiche per individuare la componente eucariotica, potrebbero fornire maggiori informazioni nell'individuazione dei contenuti dei vasi. Sarà probabilmente necessario procedere con un arricchimento delle sequenze d'interesse a seconda del probabile contenuto ipotizzato dagli archeologi sulla base delle tipologie ceramiche.

Per quanto riguarda i campioni prelevati da Mont'e Prama l'obiettivo principale è quello di estrarre ed analizzare tramite sequenziamento di nuova generazione il materiale genetico prelevato durante lo scavo sia per confermare il sesso degli inumati già determinati che per individuarlo nei rimanenti. Inoltre verranno effettuati studi per determinare eventuali rapporti di parentela e per individuare la presenza di eventuali agenti patogeni non identificabili dallo studio antropologico che possano aver causato ma-

lattia negli individui. La stessa tipologia d'indagine verrà applicata sul significativo numero di campioni di denti prelevati dagli inumati di Monte Carru, in modo da avere a disposizione un numero di campioni statisticamente significativo. Per i campioni di sedimento di Monte Sirai e Sant'Antioco le analisi verranno effettuate nel primo caso per cercare di ricostruire il paleoambiente e nel secondo per individuare la funzione dei pozzi. In entrambi i casi si procederà con analisi parassitologiche che coinvolgeranno anche i sedimenti provenienti dalle sepolture di Mont'e Prama.

Riferimenti bibliografici

Ahmadi Jouybari T., Najaf Ghobadi K., Lotfi B., Alavi Majd H., Ahmadi N. A., Rostami-Nejad M., Aghaei A. 2016. Evaluating Effect of albendazole on *Trichuris trichiura* infection: a systematic review article, *Iran Journal of Parasitology* 11 (4): 441-447.

Allentoft M. E. 2013. Recovering samples for ancient DNA research. Guidelines for the field archaeologist, *Antiquity* 87 (338).

Antona A. 2013. *Arzachena pietre senza tempo*, Sassari.

Appelt S., Armougom F., Le Bailly M., Robert C., Drancourt M. 2014a. Polyphasic analysis of a Middle Age coprolite microbiota, Belgium, *PloS One* 9 (2): e88376.

Appelt S., Fancello L., Le Bailly M., Raoult D., Drancourt M., Desnues C. 2014b. Viruses in a 14th-Century Coprolite, *Applied and Environmental Microbiology* 80 (9): 2648-2655.

Araujo A. J. G., Ferreira L. F., Confalonieri U. E., Nuñez L., Ribeiro Filho B. M. 1985. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 141-143.

- Ash L. R., Orihel T. C. 1990. *Atlas of human parasitology*. Chicago.
- Baldino B., Carenti G., Grassi E., Orgolesu T., Secchi F., Wilkens B. 2008. L'economia animale dal Medioevo all'Età Moderna nella Sardegna nord occidentale, *Sardinia, Corsica et Baleares Antiquae* 6: 109-161.
- Bardarzellu G. (ed.) 1993. *Francesco D'Austria-Este. Descrizione della Sardegna, 1812*. Cagliari.
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30 (15): 2114-2120.
- Bos K. I., Harkins K. M., Herbig A., Coscolla M., Weber N., Comas I., Forrest S. A., Bryant J. M., Harris S. R., Schuenemann V. J., Campbell T. J., Majander K., Wilbur A. K., Guichon R. A., Wolfe Steadman D. L., Cook D. C., Niemann S., Behr M. A., Zumarraga M., Bastida R., Huson D., Nieselt K., Young D., Parkhill J., Buikstra J. E., Gagneux S., Stone A. C., Krause J. 2014. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis, *Nature* 514: 494-497.
- Bouchet F., Guidon N., Dittmar K., Harter S., Ferreira L. F., Miranda Chaves S., Reinhard K., Araújo A. 2003. Parasite Remains in Archaeological Sites, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (suppl. 1): 47-52.
- Bouwman A., Rühli F. 2016. Archaeogenetics in evolutionary medicine, *Journal of Molecular Medicine* 94 (9): 971-977.
- Callen E. O., Cameron T. W. M. 1960. A prehistoric diet revealed in coprolites, *New Scientist* 8 (190): 35-40.

Campos P. F., Willerslev E., Sher A., Orlando L., Axelsson E., Tikhonov A., Aaris-Sørensen K., Greenwood A. D., Kahlke R.-D., Kosintsev P., Krakhmalnaya T., Kuznetsova T., Lemey P., MacPhee R., Norris C. A., Shepherd K., Suchard M. A., Zazula G. D., Shapiro B., Gilbert M. T. P. 2010. Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics, *PNAS* 107 (12): 5675-5680.

Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7 (5): 335-336.

Caramelli D., Milani L., Vai S., Modi A., Pecchioli E., Girardi M., Pilli E., Lari M., Lippi B., Ronchitelli A., Mallegni F., Casoli A., Bertorelle G., Barbujani G. 2008. A 28,000 Years Old Cro-Magnon mtDNA Sequence Differs from All Potentially Contaminating Modern Sequences, *PLoS One* 3 (7): e2700.

Carenti G., Sias E., Panico B. 2015. Lo scavo delle tombe, in Ranieri G., Zucca R. (eds.), *Mont'e Prama I. Ricerche 2014* (Sardegna archaeologica. Scavi e ricerche 12). Sassari, pp. 178-184.

Carpenter M. L., Buenrostro J. D., Valdiosera C., Schroeder H., Allentoft M. E., Sikora M., Rasmussen M., Gravel S., Guillén S., Nekhrizov G., Leshtakov K., Dimitrova D., Theodossiev N., Pettener D., Luiselli D., Sandoval K., Moreno-Estrada A., Li Y., Wang J., Gilbert M. T., Willerslev E., Greenleaf W. J., Bustamante C. D. 2013. Pulling out the 1% whole-genome capture for the targeted enrichment of ancient DNA sequencing libraries, *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 852-864.

Casamayor E. O., Massana R., Benlloch S., Øvreås L., Díez B., Goddard V. J., Gasol J. M., Joint I., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C. 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern, *Environmental Microbiology* 4 (6): 338-348.

Cau P., Cugia C., Valentini M. (eds.) 2004. *Palazzo Ducale*. Sassari.

Chan J. Z.-M., Serjeant M. J., Lee O. Y.-C., Minnikin D. E., Besra G. S., Pap I., Spigelman M., Donoghue H. D., Pallen M. J. 2013. Metagenomic analysis of Tuberculosis in a mummy, *New England Journal of Medicine* 369 (3): 289-290.

Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., Yeboah-Manu D., Bothamley G., Mei J., Wei L., Bentley S., Harris S. R., Niemann S., Diel R., Aseffa A., Gao Q., Young D., Gagneux S. 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans, *Nature Genetics* 45 (10): 1176-1182.

Confalonieri R, Barbiano di Belgiojoso G, Banfi G, Ferrario F, Bertani T, Pozzi C., Casanova S., Lupo A., De Ferrari G., Minetti L. 1988. Light chain nephropathy: histological and clinical aspects in 15 cases. *Nephrology Dialysis Transplantation* 3 (2): 150-156.

Cooper A., Wayne R. 1998. New uses for old DNA, *Current Opinion in Biotechnology* 9 (1): 49-53.

Costa M. A., Matheson C., Iachetta L., Llagostera A., Appenzeller O., Petraglia M. D. 2009. Ancient Leishmaniasis in a Highland Desert of Northern Chile, *PloS One* 4 (9): e6983.

Côté N. M. L., Daligault J., Pruvost M., Bennett E. A., Gorgé O., Guimaraes S., Capelli N., Le Bailly M., Geigl E.-M., Grange T. 2016. A New High-Throughput Approach to Genotype ancient human gastrointestinal parasites, *PloS One* 11 (1): e0146230.

Craig O. E., Steele V. J., Fischer A., Hartz S., Andersen S. H., Donohoe P., Glykou A., Saul H., Jones M., Koch E., Heron C. P. 2011. Ancient lipids reveal continuity in culinary practices across the transition to agriculture in Northern Europe, *PNAS* 108 (44): 17910-17915.

Dabney J., Knapp M., Glockea I., Gansauge M.-T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., García N., Pääbo S., Arsuaga J. L., Meyer M. 2013. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments, *PNAS* 110 (39): 15758-15763.

Dabney J., Meyer M., Pääbo S. 2013. Ancient DNA damage, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7): 1-7.

Devault A. M., Golding G. B., Waglechner N., Enk J. M., Kuch M., Tien J. H., Shi M., Fisman D. N., Dhody A. N., Forrest S., Bos K. I., Earn D. J. D., Holmes E. C., Poinar H. N. 2014. Second-pandemic strain of *Vibrio cholerae* from the Philadelphia Cholera Outbreak of 1849, *New England Journal of Medicine* 370: 334-340.

Di Benedetto G., Nasidze I. S., Stenico M., Nigro L., Krings M., Lanziger M., Vigilant L., Stoneking M., Pääbo S., Barbujani G. 2000. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps, *European Journal of Human Genetics* 8 (9): 669-677.

Dickson J. H., Oeggl K., Holden T. G., Handley L. L., O'Connell T. C., Preston T. 2000. The omnivorous Tyrolean Iceman: colon contents (meat, cereals, pollen, moss and whipworm) and stable isotope analyses, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1843-1849.

Drancourt M., Raoul D. 2005. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives, *Nature Reviews* 3 (1): 23-35.

Duggan A. T., Perdomo M. F., Piombino-Mascoli D., Marciniak S., Poinar D., Emery M. V., Buchmann J. P., Duchêne S., Jankauskas R., Humphreys M., Golding G. B., Southon J., Devault A., Rouillard J.-M., Sahl J. W., Dutour O., Hedman K., Sajantila A., Smith G. L., Holmes E. C., Poinar H. N. 2016. 17th century variola virus reveals the recent history of Smallpox, *Current Biology* 26 (24): 3407-3412.

Ebersberger I., Metzler D., Schwarz C., Pääbo S. 2002. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees, *American Journal of Human Genetics* 70 (6): 1491-1497.

Edgar R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics* 26 (19): 2460-2461.

Ersmark E., Orlando L., Sandoval-Castellanos E., Barnes I., Barnett R., Stuart A., Lister A., Dalén L. 2015. Population demography and genetic diversity in the Pleistocene cave lion, *Open Quaternary* 1 (1): 1-15.

Fiori M., Rovina D. 2013. Palazzo Ducale, in Rovina D., Fiori M. (eds.), *Sassari. Archeologia urbana*. Ghezzano, pp. 172-187.

Foley B. P., Hansson M. C., Kourkoumelis D. P., Theodoulou T. A. 2012. Aspects of ancient Greek trade re-evaluated with amphora DNA evidence, *Journal of Archaeological Science* 39 (2): 389-398.

Gansauge M.-T., Meyer M. 2013. Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA, *Nature Protocols* 8 (4): 737-748.

Greenwood A. D., Capelli C., Possnert G., Pääbo S. 1999. Nuclear DNA sequences from Late Pleistocene megafauna, *Molecular Biology and Evolution* 16 (11): 1466-1473.

Guirguis M. 2010. *Necropoli fenicia e punica di Monte Sirai. Indagini archeologiche 2005-2007* (Studi di Storia antica e di Archeologia, 7). Ortacesus.

Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D. M., Birdsell D., Parise K. L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J. M., Scholz H. C. 2013. *Yersinia pestis* DNA from Skeletal Remains from the 6th Century AD Reveals Insights into Justinianic Plague, *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003349.

Higuchi R., Bowman B., Freiburger M., Ryder O. A., Wilson A. C. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family, *Nature* 312: 282-284.

Hofreiter M., Capelli C., Krings M., Waits L., Conard N., Münzel S., Rabeder G., Nagel D., Paunovic M., Jambresić G., Meyer S., Weiss G., Pääbo S. 2002. Ancient DNA Analyses Reveal High Mitochondrial DNA Sequence Diversity and Parallel Morphological Evolution of Late Pleistocene Cave Bears, *Molecular Biology and Evolution* 19 (8): 1244-1250.

Hofreiter M., Poinar H.N., Spaulding W.G., Bauer K., Martin P. S., Possnert G., Pääbo S. 2000. A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation, *Molecular Ecology* 9 (12): 1975-1984.

Hofreiter M., Serre D., Poinar H. R., Kuch M., Pääbo S. 2001. Ancient DNA, *Nature Reviews. Genetics* 2 (5): 353-359.

Hong C., Jiang H., Lü E., Wu Y., Guo L., Xie Y., Wang C., Yang Y., 2012. Identification of Milk Component in Ancient Food Residue by Proteomics, *PloS One* 7 (5): e37053.

Ibba M., Cossu F., Spanu V., Viridis S., Spanu C., Scarano C., De Santis E. P. L. 2013. *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plants: evaluation of *Listeria monocytogenes* environmental contamination in two cheese-making plants using sheep's milk. *Italian Journal of Food Safety* 2 (2): 109-112.

Kaessmann H., Pääbo S. 2002. The genetical history of humans and the great apes, *Journal of Internal Medicine* 251 (1): 1-18.

Katzourakis A. 2013. Paleovirology: inferring viral evolution from host genome sequence data, *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368: 20120493.

Kay G. L., Sergeant M. J., Giuffra V., Bandiera P., Milanese M., Bramanti B., Bianucci R., Pallen M. J. 2014. Recovery of a medieval *Brucella melitensis* genome using shotgun metagenomics, *mBio* 5 (4): e01337-14.

Kay G. L., Sergeant M. J., Zhou Z., Chan J. Z.-M., Millard A., Quick J., Szikossy I., Pap I., Spigelman M., Loman N. J., Achtman M., Donoghue H. D., Pallen M. J. 2015. Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe, *Nature Communications* 6: 6717.

Krajewsky C., Buckley L., Westerman M. 1997. DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264 (1383): 911-917.

Krings M., Stone A., Schmitz R. W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S. 1997. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans, *Cell* 90 (1): 19-30.

Lalremruata A., Ball M., Bianucci R., Welte B., Nerlich A. G., Kun J. F., Pusch C. M. 2013. Molecular identification of falciparum malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt), *PloS One* 8 (4): e60307.

Langmead B., Salzberg S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nature Methods* 9: 357-359.

Lepère C., Boucher D., Jardillier L., Domaizon I., Debroas D. 2006. Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin), *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4): 2971-2981.

Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.

Llamas B., Valverde G., Fehren-Schmitz L., Weyrich L. S., Cooper A., Haak W. 2016. From the field to the laboratory: controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era, *Science and Technology of Archaeological Research* 3 (1): 1-14.

Loreille O., Bouchet F. 2003. Evolution of Ascariasis in Humans and Pigs: a Multi-disciplinary Approach, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (suppl. 1): 39-46.

Manen J.-F., Bouby L., Dalnoki O., Marivalb P., Turgayd M., Schlumbaum M. 2003. Microsatellites from archaeological *Vitis vinifera* seeds allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars, *Journal of Archaeological Science* 30 (6): 721-729.

Matheson C. D., Vernon K. K., Lahti A., Fratpietro R., Spigelman M., Gibson S., Greenblatt C. L., Donoghue H. D. 2009. Molecular exploration of the first-century *Tomb of the Shroud* in Akeldama, Jerusalem, *PloS One* 4 (12): e8319.

Metsalu T., Vilo J. 2015. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap, *Nucleic Acids Research* 43 (1): 566-570.

Meyer M., Kircher M. 2010. Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing, *Cold Spring Harbor Protocols* 2010 (6): 1-3.

Mitchell P. D., Anastasiou E., Syon D. 2011. Human intestinal parasites in Crusader Acre: evidence for migration with disease in the Medieval period, *International Journal of Paleopathology* 1: 132-137.

Moravetti A. 1992. *Il complesso nuragico di Palmavera*. Sassari.

Moravetti A., Doro L., Alba E. 2014. Nuraghe Palmavera (Alghero, Prov. Di Sassari), in Miari M. (ed.), *Notiziario di Preistoria e Protostoria 1.IV. Neolitico ed età dei metalli – Sardegna e Sicilia*. Firenze, pp. 98-100.

Mowlavi G., Mokhtarian K., Makki M. S., Mobedi I., Massoumian M., Nasser R., Hoseini G., Nekouei P., Mas-Coma S. 2015. *Dicrocoelium dendriticum* found in a Bronze Age cemetery in western Iran in the pre-Persepolis period: The oldest Asian palaeofinding in the present human infection hottest spot region, *Parasitology International* 64 (5): 251-255.

Müller R., Roberts C. A., Brown T. A. 2014. Biomolecular identification of ancient *Mycobacterium tuberculosis Complex* DNA in Human Remains From Britain and Continental Europe, *American Journal of Physical Anthropology* 153 (2): 178-189.

Mutolo M. J., Jenny L. L., Buszek A. R., Fenton T. W., Foran D. R. 2012. Osteological and molecular identification of Brucellosis in ancient Butrint, Albania, *American Journal of Physical Anthropology* 147 (2): 254-263.

Nerlich A. G., Schraut B., Dittrich S., Jelinek T., Zink A. R. 2008. *Plasmodium falciparum* in Ancient Egypt, *Emerging Infectious Diseases* 14 (8): 1317-1319.

Pääbo S. 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA, *Nature* 314: 644-645.

Pääbo S., Wilson A. C. 1988. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts, *Nature* 334: 387-388.

Poinar H. N., Kuch M., Sobolik K. D., Barnes I., Stankiewicz A. B., Kuder T., Spaulding W. G., Bryant V. M., Cooper A., Pääbo S. 2001. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans, *PNAS* 98 (8): 4317-4322.

Rácz S. E., Porcu de Araujo E., Jensen E., Mostek C., Morrow J. J., Van Hove M. L., Bianucci R., Willems D., Heller F., Araújo A., Reinhard K. J. 2015. Parasitology in an archaeological context: analysis of medieval burials in Nivelles, Belgium, *Journal of Archaeological Science* 53: 304-315.

Raoult D., Aboudharam G., Crubézy E., Larrouy G., Ludes B., Drancourt M. 2000. Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death, *PNAS* 97 (23): 12800-12803.

Reich D., Green R. E., Kircher M., Krause J., Patterson N., Durand E. Y., Viola B., Briggs A. W., Stenzel U., Johnson P. L. F., Maricic T., Good J. M., Marques-Bonet T., Alkan C., Fu Q., Mallick S., Li H., Meyer M., Eichler E. E., Stoneking M., Richards M., Talamo S., Shunkov M. V., Derevianko A. P., Hublin J.-J., Kelso J., Slatkin M., Pääbo S. 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia, *Nature* 468: 1053–1060.

Rochelle P. A. (eds.) 2001. *Environmental molecular microbiology: protocols and applications*. Poole.

Rollo F., Ubaldi M., Ermini L., Marota I. 2002. Ötzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps, *PNAS* 99 (20): 12594-12599.

Rovina D., La Fragola A. (eds.) 2008. *La morte i riti gli oggetti. La necropoli romana di Monte Carru (Alghero)*. Catalogo della mostra, Alghero.

Sanchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suarez J. L., Arias M., López C., Morrondo P., Scala A. 2003. Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy), *Preventive Veterinary Medicine* 57 (1-2): 1-5.

Schubert M., Jónsson H., Chang D., Der Sarkissian C., Ermini L. *et alii* 2014. Prehistoric genomes reveal the genetic foundation and cost of horse domestication, *PNAS* 111 (52): 5661-5669.

Searcey N., Reinhard K. J., Egarter-Vigl E., Maixner F., Piombino-Mascoli D., Zink A. R., van der Sanden W., Gardner S. L., Bianucci R. 2013. Parasitism of the Zweeloo Woman: Dicrocoeliasis evidenced in a Roman period bog mummy, *International Journal of Paleopathology* 3 (3): 224-228.

Søe M. J., Nejsum P., Fredensborg B. L., Kapel C. M. 2015. DNA typing of ancient parasite eggs from environmental samples identifies human and animal worm infections in Viking-age settlement, *Journal of Parasitology* 10 (1): 57-63.

Spigelman M., Lemma E. 1993. The use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons, *International Journal of Osteoarchaeology* 3: 137-143.

Thomas R. H., Schaffner W., Wilson A. C., Pääbo S. 1989. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf, *Nature* 340: 465-467.

Truong D. T., Franzosa E. A., Tickle T. L., Scholz M., Weingart G., Pasolli E., Tett A., Huttenhower C., Segata N. 2015. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling, *Nature Methods* 12: 902-903.

Unali A. 2013. *Sulky*. (Sardegna archeologica. Guide e itinerari 54). Sassari.

Unali A. 2015. Ceramica nuragica dalle tombe, in Ranieri G., Zucca R. (eds.), *Mont'e Prama I. Ricerche 2014* (Sardegna archaeologica. Scavi e ricerche 12). Sassari, pp. 292-294.

Urzi C., De Leo F., Schumann P., 2008. *Kribbella catacumbae* sp. nov. and *Kribbella sancticallisti* sp. nov., isolated from whitish-grey patinas in the catacombs of St Callistus in Rome, Italy, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (9): 2090-2097.

Vai S., Lari M., Caramelli D. 2016. DNA Sequencing in Cultural Heritage, *Topics in Current Chemistry* 374: 8.

Wales N., Carøe C., Sandoval-Velasco M., Gamba C., Barnett R., Samaniego J. A., Madrigal J. R., Orlando L., Gilbert M. T. 2015. New insights on single-stranded versus double-stranded DNA library preparation for ancient DNA, *Biotechniques* 59 (6): 368-371.

Warnock P. J., Reinhard K. J. 1992. Methods for extracting pollen and parasite eggs from latrine soils, *Journal of Archaeological Science* 19 (3): 261-264.

Weyrich L. S., Dobney K., Cooper A. 2015. Ancient DNA analysis of dental calculus, *Journal of Human Evolution* 79: 119-124.

Wilkens B. 2001. I resti faunistici del palazzo Ducale di Sassari nel quadro della Sardegna postmedievale, in AA. VV., *Dal mondo antico all'età contemporanea. Studi in onore di Manlio Brigaglia*. Roma, pp. 325-345.

Wilkens B. 2012. *Archeozoologia. Il Mediterraneo, la storia, la Sardegna*. Sassari.

Willerslev E., Cooper A. 2005. Ancient DNA, *Proceedings of the Royal Society B* 272: 3-16.

Zerbino D. R., Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs, *Genome Research* 18: 821-829.

Zink A. R., Reischl U., Wolf H., Nerlich A. G. 2002. Molecular analysis of ancient microbial infections, *FEMS Microbiology Letters* 213 (2): 141-147.