Workshop

Accademia dei Lincei
Palazzo Corsini (Roma)
5 Aprile 2023

BIOSCIENZE
NEI BENI CULTURALI

Workshop: BIOSCIENZE NEI BENI CULTURALI

Accademia dei Lincei - Palazzo Corsini (Roma)

5 aprile 2023

Sommario

PRESENTAZIONE - Chiara Alisi e Antonio Sgamellotti 4

BIOMONITORAGGIO 5

- Introduzione alla sessione di Biomonitoraggio - Antonio Sgamellotti 6
- Analisi magnetiche e chimiche di foglie e licheni per delineare e ridurre l'impatto del particolato atmosferico inquinante nei beni culturali - Aldo Winkler et al. 7
- Studio della componente biogena sulle pareti di Villa Farnesina - Chiara Anselmi et al. 15

BIODIAGNOSTICA 19

- Introduzione alla sessione di Biodiagnostica - Gennaro Marino 20
- Paleoproteomica: lo studio delle proteine "antiche" - Leila Birolo e Gennaro Marino 21
- Paleogenomica e Beni Culturali - David Caramelli 23

BIODETERIORAMENTO 33

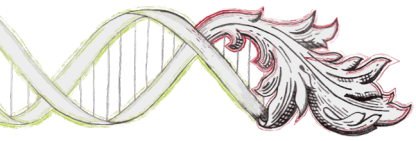
- Introduzione alla sessione di Biodeterioramento - Clara Urzì 34
- Alcune considerazioni sulla necessità di utilizzare normative per lo studio e la conservazione del patrimonio culturale. Metodi di controllo del biodeterioramento tramite prodotti naturali - Clara Urzì 35
- Caratterizzazione di biofilm fototrofi di monumenti lapidei e loro controllo attraverso l'uso di oli essenziali come biocidi - Laura Bruno 37
- Uso di oli essenziali e idrolati per il trattamento di biodeteriogeni fungini di dipinti antichi - Maura Di Vito et al. 41
- Green and long-lasting biocides: coupling natural substances and nanotechnologies / Biocidi verdi e di lunga durata: accoppiamento di sostanze naturali con nanotecnologie - Giulia Caneva e Flavia Bartoli 47

BIOPULITURA 51

- Introduzione alla Sessione Biopulitura - Giancarlo Ranalli 52
- La collezione microbica ENEA come strumento per un restauro sostenibile - Flavia Tasso et al. 53
- Gel biocidi a base di polivinil alcol per la pulitura e la disinfezione dei beni culturali - Vanessa Rosciardi e Piero Baglioni 58
- Probiotici per i beni culturali: la sfida del Biocleaning - Pilar Bosch Roig 62
- Biocleaning of historical iron artworks: innovative green gels amended with microbial derivatives - Arianna Passaretti et al. 66

TAVOLA ROTONDA: Il parere dei restauratori 69

- Introduzione alla tavola rotonda – Il parere dei restauratori - Marco Ciatti 70
- Sistemi di pulitura bio-based: nuove prospettive e sfide per la conservazione delle opere d'arte - Lorenza D'Alessandro 71
- Restauro Sostenibile- Riflessioni - Guy Devreux 72
- Il recupero di un'antica tecnologia: la mucillagine del fico d'inda e il peperoncino - Fernanda Falcon Martinez 73
- L'impiego di sostanze di origine naturale nelle sperimentazioni dell'Opificio delle Pietre Dure - Monica Galeotti 74
- Riflessioni sul biorestauro: punti di forza e problemi applicativi - Eleonora Gioventù 75
- Il "Parco Green" per una gestione sostenibile degli interventi di restauro - Alessandro Lugari 76
- Esperienze di Restauro sostenibile e integrazione dei criteri ambientali nelle attività del Parco Archeologico del Colosseo - Fiorangela Fazio 77
- Alcuni spunti per promuovere un restauro sostenibile - Chiara Scioscia Santoro 78
- La biopulitura del sarcofago del monumento funebre a Lorenzo duca di Urbino, Sagrestia nuova - Museo delle Cappelle Medicee, Firenze - Marina Vincenti 79



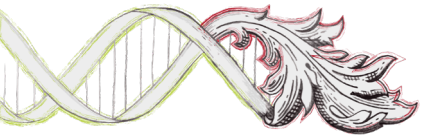
PRESENTAZIONE

Il nostro Patrimonio culturale - passato e presente- può essere considerato una risorsa non rinnovabile e come tale va preservato e conservato. Dalla Carta di Venezia in avanti, i criteri di conservazione sono stati reinterpretati nell'ottica di individuare strategie più sostenibili di Conservazione e Restauro. I cambiamenti necessari per venire incontro a queste esigenze richiedono un ripensamento della ricerca scientifica e tecnologica per il patrimonio culturale, come espresso dal Ministero della Cultura, con la volontà di recepire i 17 obiettivi per lo sviluppo sostenibile dell'Agenda 2030 e le missioni del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR). La risposta alle nuove urgenze viene dall' approccio interdisciplinare che ha cambiato il paradigma della Scienza della Conservazione, riconoscendo la necessità di una comprensione olistica e di una cura ed un uso sostenibili del patrimonio artistico-culturale.
In questo dialogo interdisciplinare tra Scienze e Restauro, accanto alla Chimica e alla Fisica, la crescente attenzione data alla sostenibilità ambientale ha contribuito ad accelerare la ricerca innovativa nel campo della Biologia, in particolare delle biotecnologie, con lo sviluppo di nuove metodologie e prodotti per il restauro.

Questo Workshop è stato concepito come un'occasione di incontro tra scienziati e restauratori, professionisti di discipline diverse ma con obiettivi comuni. La giornata ha raccolto i più recenti contributi della ricerca biologica applicata alla Conservazione e Restauro dei Beni Culturali, per poi discuterne i vantaggi e individuarne le criticità insieme ai restauratori, destinatari di queste ricerche. Gli atti qui raccolti vogliono conservare la memoria di una giornata piena di passione e di incontri.

Chiara Alisi, Antonio Sgamellotti

Link al convegno, con registrazione video
https://www.lincei.it/it/manifestazioni/bioscienze-nei-beni-culturali-convegno



BIOMONITORAGGIO

Introduzione alla sessione di Biomonitoraggio

Antonio Sgamellotti

La prima sessione del workshop riguarda il biomonitoraggio che nei contributi è stato declinato sotto diversi aspetti.
Il biomonitoraggio magnetico che attraverso bioindicatori come le foglie degli alberi, restituisce informazioni sulla quantità e sull'origine della componente antropica del particolato atmosferico, studiandone le proprietà magnetiche. Tali studi sono stati condotti in contesti museali inseriti in aree fortemente urbanizzate, impiegando foglie per il monitoraggio esterno e trapianti lichenici per il monitoraggio all'interno delle sale.
Lo studio, a partire dagli studi innovativi effettuati a Villa Farnesina e nei suoi giardini, ha interessato il lato Palatino del Parco Archeologico del Colosseo, la Collezione Peggy Guggenheim di Venezia e musei selezionati di Buenos Aires, con lo scopo di indagare, in diversi contesti urbani, il ruolo dei licheni nel controllo delle polveri atmosferiche, e quello delle foglie nella fornitura di servizi ecosistemici di protezione ambientale, attraverso la loro azione di ritenzione degli inquinanti.
Altro esempio di esempio di biomonitoraggio è stato lo studio del microbioma presente sulle pareti di Villa Farnesina per caratterizzarne la popolazione batterica e fungina attraverso l'estrazione di DNA ambientale.
Tale studio, è finalizzato ad una caratterizzazione del microbioma delle pareti della Villa attraverso campionamenti stagionali per individuare le variazioni nella popolazione batterica e fungina ed il ruolo della matrice –in questo caso lapidea- su cui il microbioma si sviluppa. La caratterizzazione del microbioma fornisce informazioni sull'ambiente circostante la Villa, attraverso la presenza di alcune specie specifiche di batteri e funghi patogeni e non, fornendo ulteriore supporto ed integrazione alle proprietà magnetiche già illustrate.

Analisi magnetiche e chimiche di foglie e licheni per delineare e ridurre l'impatto del particolato atmosferico inquinante nei beni culturali

Winkler, A.[1], Loppi, S.[2], Grifoni, L.[1,2], Boldrighini, F.[3], Chaparro, M.A.E.[4], Di Lella, L. A.[2], Lapenta, V.[5], Marte, F.[6], Pensabene Buemi, L.[7], Russo, A.[3], Spagnuolo, L.[1], Strano, G.[3], Tascon, M.[6], Sgamellotti, A.[5]

[1] Istituto Nazionale di Geofisica e Vulcanologia, Roma, Italia
[2] Università di Siena, Dipartimento di Scienze della Vita, Itali
[3] Parco Archeologico del Colosseo, Roma, Italia a
[4] Centro de Investigaciones en Física e Ingeniería del Centro de la Provincia de Buenos Aires, UNCPBA-CONICET, Tandil, Argentina
[5] Accademia Nazionale dei Lincei, Roma, Italia
[6] Centro de Estudios sobre Patrimonios y Ambiente, CEPyA, National University of General San Martín, Buenos Aires, Argentina
[7] Collezione Peggy Guggenheim, Venezia

1 Riassunto

Vengono presentati i risultati degli studi di biomonitoraggio chimico e magnetico in contesti di beni culturali appartenenti ad aree fortemente urbanizzate, relativi al progetto CHIOMA (Cultural Heritage Investigations and Observations: a Multidisciplinary Approach). Tali indagini sono state svolte in contesti urbani molto diversi: il Parco Archeologico del Colosseo a Roma, la Collezione Peggy Guggenheim a Venezia e musei selezionati di Buenos Aires. Lo scopo era quello di indagare il ruolo del biomonitoraggio con foglie e licheni nel controllo e nella riduzione delle polveri atmosferiche inquinanti.

We present the results of the chemical and magnetic biomonitoring studies in contexts of cultural heritage belonging to highly urbanized areas, related to the CHIOMA project (Cultural Heritage Investigations and Observations: a Multidisciplinary Approach). These investigations were carried out in very different urban contexts: the Colosseum Archaeological Park in Rome, the Peggy Guggenheim Collection in Venice and selected museums in Buenos Aires. The aim was to investigate the role of biomonitoring with leaves and lichens in the control and reduction of polluting atmospheric dust.

2 Introduzione

Il patrimonio culturale è fortemente insidiato dal particolato atmosferico (PM), che crea, sulle superfici, strati scuri, abrasione e deterioramento, con conseguente perdita artistica. In Winkler et al. (2022) è stato introdotto l'utilizzo di tecniche di biomonitoraggio chimico e magnetico per la conservazione preventiva di Villa Farnesina (Roma, Italia), impiegando foglie e licheni come bioaccumulatori di particolato atmosferico, le cui proprietà magnetiche derivano da particelle ferrimagnetiche simili alla magnetite, spesso associate a metalli in traccia, di cui i veicoli a motore, e particolarmente gli impianti frenanti, rappresentano la principale sorgente (Winkler et al., 2020).
L'esposizione lichenica, che ha dimostrato il modesto impatto delle polveri automobilistiche sulle logge affrescate, è stata preceduta dal campionamento delle foglie delle piante presenti all'esterno della Villa e all'interno dei suoi giardini storici, per delinearne il ruolo nella rimozione degli inquinanti atmosferici. Infatti, le foreste urbane e le infrastrutture verdi forniscono importanti servizi ecosistemici, limitando la diffusione e l'impatto nocivo del PM sul patrimonio culturale sito in contesti urbani.
Lo studio di Villa Farnesina ha fatto da prodromo a un progetto di ricerca multidisciplinare avviato di recente (CHIOMA - Cultural Heritage Investigations and Observations: a Multidisciplinary Approach), che coinvolge Istituti di ricerca internazionali, Università, Musei e operatori culturali nella valutazione e mitigazione dell'impatto del PM veicolare sul patrimonio culturale sito in dei contesti urbani.
Vengono qui mostrati i primi risultati delle indagini di biomonitoraggio chimico e magnetico condotte presso il Parco Archeologico del Colosseo, la Collezione Peggy Guggenheim di Venezia, il Museo Nacional de Bellas Artes (MNBA) e il Museo Histórico Nacional di Buenos Aires (MHN), ottenuti attraverso misure su foglie di piante arboree e arbustive ed esponendo per tre mesi trapianti lichenici, nel loro comune ruolo di bioaccumulatori di polveri metalliche inquinanti.

3 Metodi: analisi chimiche e magnetiche

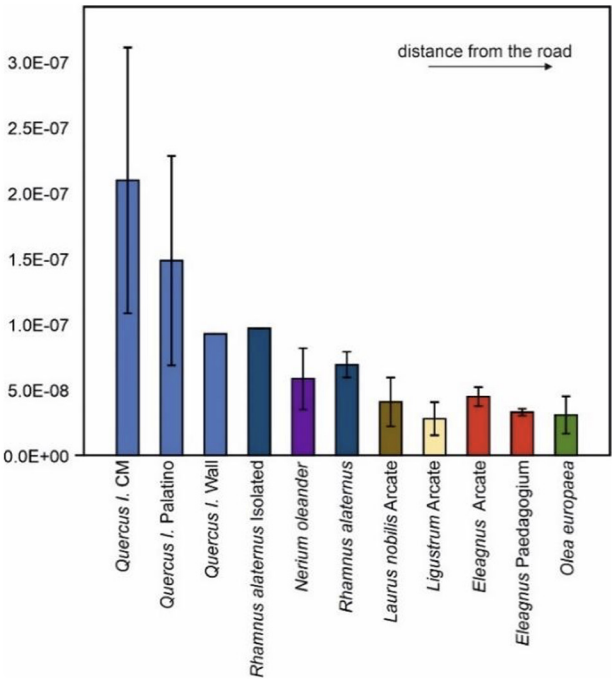
I campioni di foglie e i trapianti lichenici, a seguito dell'esposizione, sono stati essiccati a 40 °C e disposti in appositi portacampioni, per valutarne la suscettività magnetica di massa (χ) e, come proprietà di isteresi magnetica, la forza coercitiva (Bc), la coercitività della rimanenza (Bcr), la magnetizzazione rimanente di saturazione (Mrs) e la magnetizzazione di saturazione (Ms), determinando queste ultime per unità di peso. Sono stati inoltre ricavati, su campioni selezionati, i diagrammi FORC (First Order Reversal Curves), per delineare le distribuzioni del campo magnetico di interazione (Bu) e della coercitività magnetica dei campioni.
La granulometria magnetica dei campioni è stata confrontata con quella della magnetite teorica con i rapporti di isteresi Mrs/Ms vs. Bcr/Bc nel "Day plot" (Dunlop et al. 2002 a, b).
Le proprietà d'isteresi sono state misurate con un magnetometro VSM Lakeshore 8604; la suscettività magnetica con un Agico KLY5. Le misure di suscettività magnetica in-situ sono state effettuate con strumenti ZH SM30.
La quantificazione del contenuto di elementi in traccia è stata effettuata mediante spettrometria di massa (ICP-MS, Sciex Elan 6100, Perkin Elmer) e a emissione ottica (ICP-OES, Optima 2000 DV, Perkin Elmer) dopo avere opportunamente solubilizzato i campioni tramite attacco acido.

4 Risultati e discussione

4.1 Colle Palatino e Via dei Cerchi

Il Parco archeologico del Colosseo è inserito in un contesto metropolitano complesso, caratterizzato dalla coesistenza di aree fortemente antropizzate e verde urbano. Per definire l'impronta del traffico veicolare sulla zona archeologica, a luglio 2021, è stato effettuato un primo test pilota, attraverso campionamenti mirati di lecci a Via dei Cerchi e sulle pendici meridionali del Palatino (Winkler et al, 2023). In data 5 luglio 2022, è stato effettuato un ulteriore, e più denso, campionamento fogliare, che ha riguardato 36 esemplari di alberi e siepi, tra cui 13 lecci su Via dei Cerchi, di cui 9 sul lato del Circo Massimo e 4 sul lato del Palatino. Il lato del Circo Massimo è adibito, per quasi tutta la sua lunghezza, a parcheggio, con le automobili separate dal marciapiede da una pista ciclabile di recente costruzione (Fig. 1).
All'interno del Palatino sono stati campionati 3 ligustri, 3 allori e 4 eleagni in prossimità delle Arcate Severiane, 2 oleandri, 3 alaterni disposti sulla recinzione sul lato San Gregorio, un ulteriore alaterno a metà quota tra Via dei Cerchi e area archeologica, 4 eleagni in prossimità del Paedagogium e un leccio prospiciente via dei Cerchi, nella zona dei servizi igienici. Inoltre, sono stati campionati 3 olivi nel tragitto tra Arco di Tito e Palatino. La quota topografica dei campioni sul Palatino può essere indicativamente stimata a 30 m.

Figura 1: Campionamenti fogliari tra Via dei Cerchi e Palatino, luglio 2022: Quercus ilex L. (azzurro), Laurus nobilis L. (marrone) , Nerium oleander L. (viola), Ligustrum vulgare L. (giallo), Rhamnus alaternus L. (blu), Olea europaea L. (verde), Eleagnus x ebbingei Limelighy (rosso)



In figura 2, sono riportati i valori medi di χ, per sito e specie campionata: in media, la suscettività magnetica di olivi e alberi presso Arcate Severiane e Paedagogium si assesta su circa il 20% del valore medio di via dei Cerchi, indipendentemente dalla specie arborea: si suppone che tale valore possa rappresentare il contributo magnetico di background, dovuto principalmente a polveri atmosferiche naturali e/o suoli. La suscettività magnetica dei campioni di alaterno e di leccio prelevati in prossimità dei servizi, di alaterni e oleandri sul bordo del Palatino è risultata intermedia tra quella di Via dei Cerchi e delle Arcate/Paedagogium. A Via dei Cerchi, i valori di χ sul lato Palatino risultano mediamente inferiori a quelli riscontrati lungo il Circo Massimo, probabilmente per lo stazionamento dei veicoli in prossimità dell'incrocio con Via dell'Ara Massima di Ercole.

Figura 2: Istogramma dei valori medi di suscettività magnetica di massa, rappresentati per sito e specie. I lecci indicati "CM" sono stati campionati sul lato Circo Massimo di Via dei Cerchi, quelli "Palatino" sul lato opposto della strada. I "baffi" (whiskers) rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% della suscettività magnetica media del sito

Dai cicli d'isteresi sono stati ricavati i parametri utili a collocare le medie per specie e sito nel "Day Plot" (Fig. 3). Non vengono evidenziate, come emissioni prevalenti, quelle da freni veicolari; prevalgono bensì componenti attribuibili a miscele di sorgenti emissive combuste, da abrasione e naturali, corrispondenti a mix di polveri stradali, PM e suoli, anche in considerazione di fattori logistici, quali, per via dei Cerchi, l'interposizione di una pista ciclabile tra sede stradale e marciapiede.

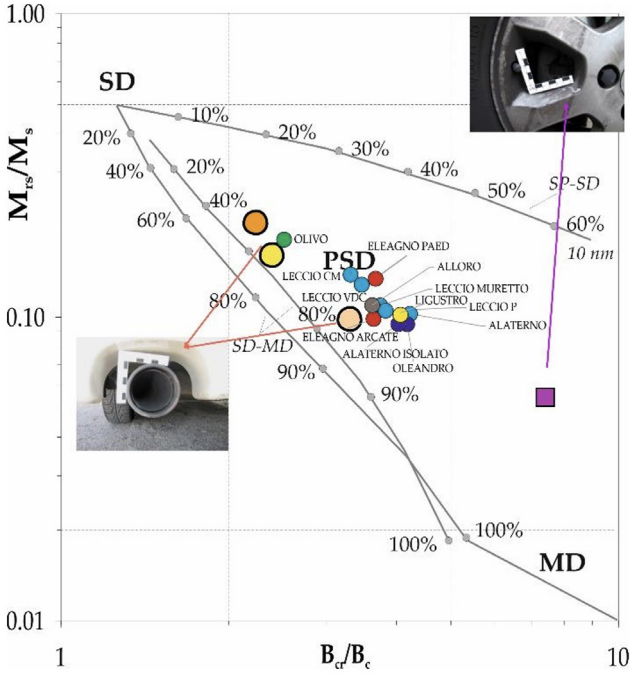


Figura 3: "Day plot" dei rapporti di isteresi mediati per sito, computati per le foglie campionate a Via dei Cerchi e in area Palatina, riportati insieme ai punti medi per diversi tipi di particolati magnetici esausti (i cerchi in arancione, giallo e rosa) e freni veicolari (il quadrato porpora), calcolati da Sagnotti et al. 2009. I campi SD (singolo dominio), PSD (pseudo-singolo dominio) e MD (multidominio) e le linee teoriche di tendenza per la miscelazione di granuli di magnetite SD-MD e SP-SD (SP, superparamagnetiche) sono da Dunlop 2002 a, b.

Il 28 febbraio 2023 è stato effettuato un nuovo sopralluogo dell'area, finalizzato alla pianificazione di un design di esposizione lichenica nell'area della Schola Praeconum, che si affaccia su Via dei Cerchi. Inoltre, sono stati raccolti alcuni esemplari arbustivi di lecci a via dei Cerchi, che hanno messo in luce importanti accumuli di materiale a scaglie, intensamente magnetico, di presumibile origine automobilistica e/o legata al manto stradale, rinvenuti anche a quote superiori – circa 3 m – sulla chioma dei lecci del lato Circo Massimo.

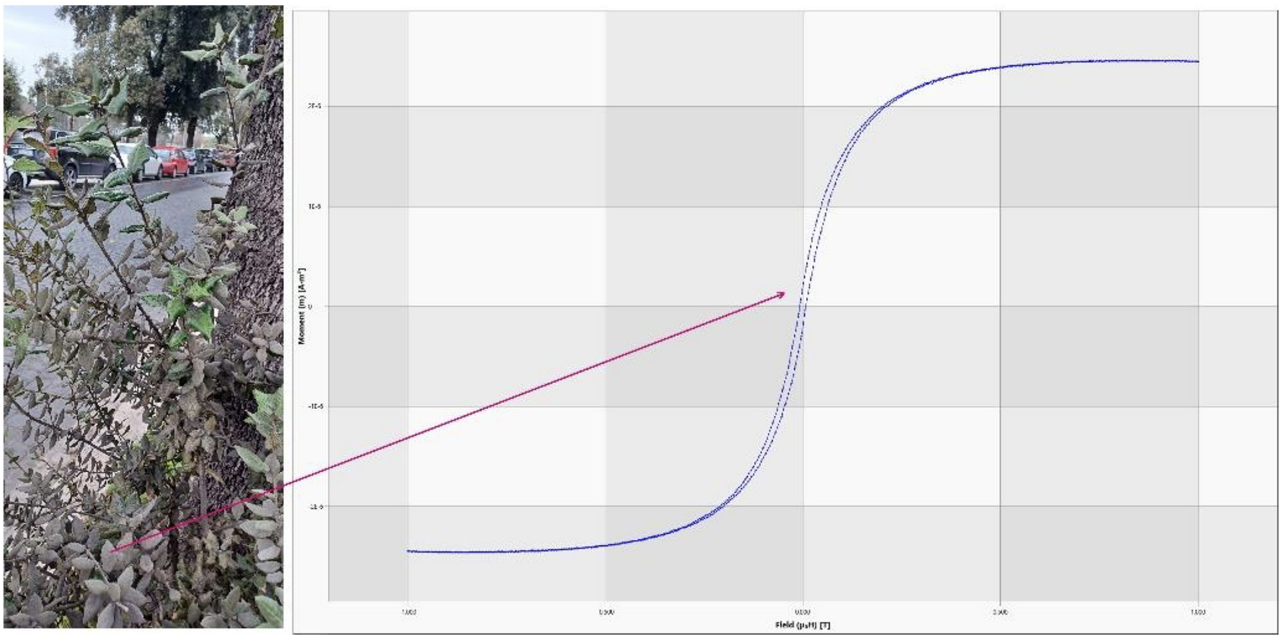


Figura 4.: Ciclo di isteresi magnetica di foglie campionate da un arbusto di leccio affiorante su Via dei Cerchi, ricoperto di scaglie di colore antracite, fortemente magnetiche

Come fase conclusiva del lavoro, il 23 marzo 2023 sono stati esposti i trapianti di lichene *Evernia prunastri* (L.) Ach. secondo il design visibile in fig. 5, pianificato per delineare l'influenza della distanza dalla strada degli accumuli di metalli in traccia e particolato metallico.

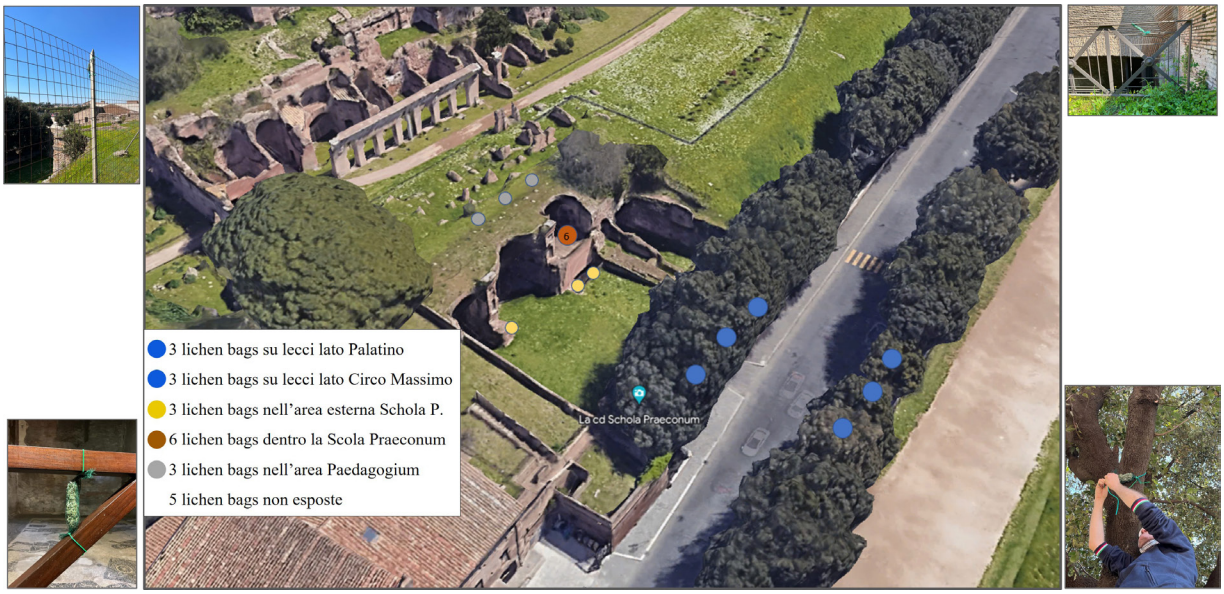


Figura 5: Trapianti lichenici esposti all'esterno e all'interno della Schola Praeconum, affacciata su Via dei Cerchi

Le analisi chimiche, operate su foglie selezionate da tutte le categorie di campione già menzionate, hanno confermato la dipendenza degli accumuli elementari dalla collocazione su strada o Palatino, con concentrazioni almeno doppie per tutti gli elementi, tranne Zn, nei campioni di Via dei Cerchi, rispetto a quelle dal Palatino (Fig. 6). L'abbondante concentrazione di Sb, tracciante dei freni veicolari, dimostra la rilevante presenza di componenti non esauste, per quanto non evidenziate dal "Day Plot". Gli accumuli di Al hanno evidenziato la presumibile compresenza di componenti legate ai suoli.

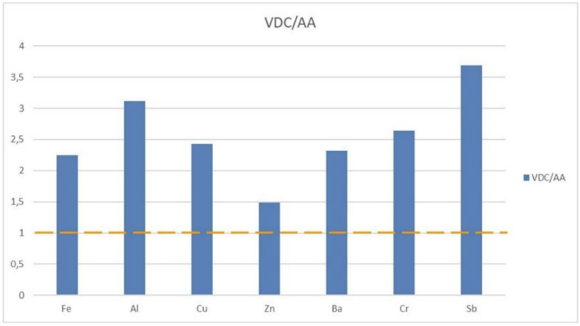


Figura 6: Concentrazioni chimiche elementari riscontrate a Via dei Cerchi (VDC), normalizzate ai valori dei campioni dal Palatino (Area Archeologica, AA). Tutti gli elementi, tranne Zn, risultano a concentrazione più che doppia, rispetto a quella riscontrata sulle foglie su Via dei Cerchi

4.2 Collezione Peggy Guggenheim, Venezia

La collezione Peggy Guggenheim di Venezia rappresenta un contesto museale inserito in un ambito urbano acquatico, con caratteristiche peculiari di mobilità. Il campionamento di *Pittosporum tobira* (Thunb.) W.T. Aiton ssp e l'esposizione del lichene *Evernia prunastri* L. Ach. sono stati curati, a novembre 2022, individuando nel Canal Grande la principale sorgente emissiva limitrofa, da cui delineare gli accumuli di particolato inquinante in funzione della distanza, secondo lo schema in Fig. 7

A febbraio 2023, in un periodo di persistenti condizioni metereologiche caratterizzate da alta pressione atmosferica, sono stati ricampionati gli arbusti di Pitosforo e recuperati i trapianti lichenici. Le foglie di pitosforo hanno messo in risalto valori particolarmente modesti di suscettività magnetica, comunque evoluti, nell'arco di tre mesi, da prevalentemente diamagnetici a paramagnetici.

Per quanto riguarda i trapianti lichenici, la suscettività magnetica dei campioni esposti all'esterno della Collezione Peggy Guggenheim è risultata, in media, pressoché doppia di quella delle bags

Figura 7: A sinistra, campionamenti di pitosfori (indicati con P e numero progressivo) ed esposizioni licheniche (CG – Canal Grande; ME – Muro Esterno; ES – Esterno Sale; S1 – Sala 1; S2 – Sala 2; TI – Tigli Esterni; T – Terrazzo); in rosso, i campioni di pitosforo e licheni sul terrazzo. A destra, lichen bag esposto su "Lo Studio", di Pablo Picasso.

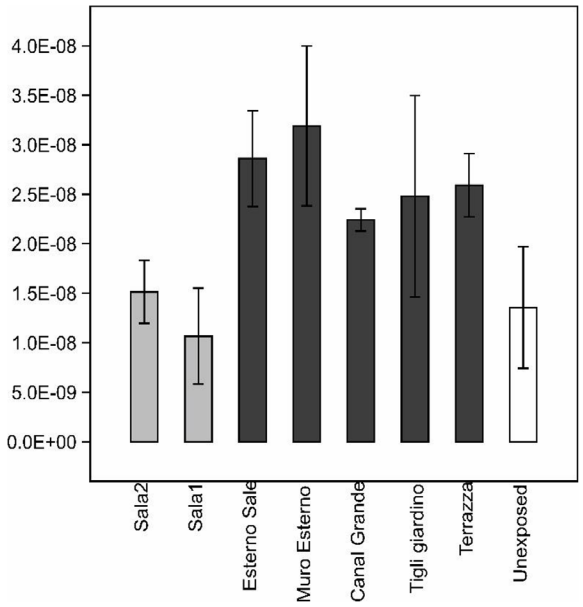


Figura 8: Suscettività media di massa per sito, espressa in m³/kg, per i trapianti esposti in aree indoor (grigio chiaro), outdoor (grigio scuro) e unexposed (bianco). I "baffi" (whiskers) rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% della suscettività magnetica media del sito.

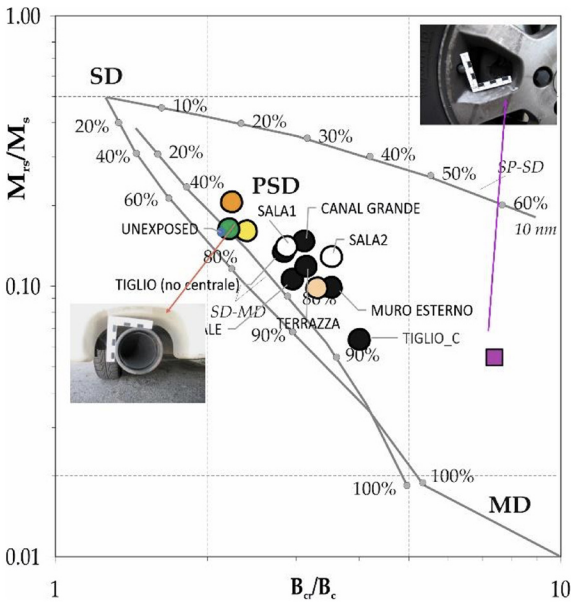


Figura 9: "Day plot" dei rapporti di isteresi mediati per sito, computati per i licheni trapiantati all'esterno (nero) e all'interno (bianco) della Collezione Peggy Guggenheim, comparati ai punti medi di diversi tipi di particolati magnetici esausti (vd. didascalia di Fig. 3).

esposte all'interno delle sale, rimaste, a loro volta, in linea con i valori dei campioni unexposed (Fig. 8)

Nel "Day Plot", i campioni unexposed si collocano, in media, in una posizione compatibile con quella delle miscele di magnetite teorica SD (60%) e MD (40%); i campioni, dopo l'esposizione, sono migrati nella zona centrale tipica delle emissioni combuste e/o dovute a impatto ambientale modesto, comunque confermando l'irrilevante impatto delle emissioni non esauste.
Si precisa altresì che nelle media di Fig. 8 e nel "Day plot" di Fig. 9 è stato escluso ed estrapolato, rispettivamente, il trapianto lichenico collocato sul tiglio in posizione centrale rispetto all'ingresso della Collezione, risultato aberrante per valori di magnetismo e concentrazioni elementari. I rapporti tra le concentrazioni elementari dei campioni esposti e quelle dei campioni unexposed sono riportati in Fig. 10: spicca, per le sale indoor, quella di Zn e, per i siti outdoor, quella di Sb. In questo caso, escludendo che la presenza di Sb possa essere legata ad emissioni da freni, coerentemente con quanto osservato nel "Day plot", si suppone che la sua abbondanza sia legata all'ampio utilizzo che viene fatto di questo elemento nelle vetrerie artistiche diffuse in tutto il territorio. La presenza di zinco indoor si fa invece risalire all'utilizzo di ZnO, solitamente impiegato nelle tinture murarie e nei filtri di protezione delle opere.

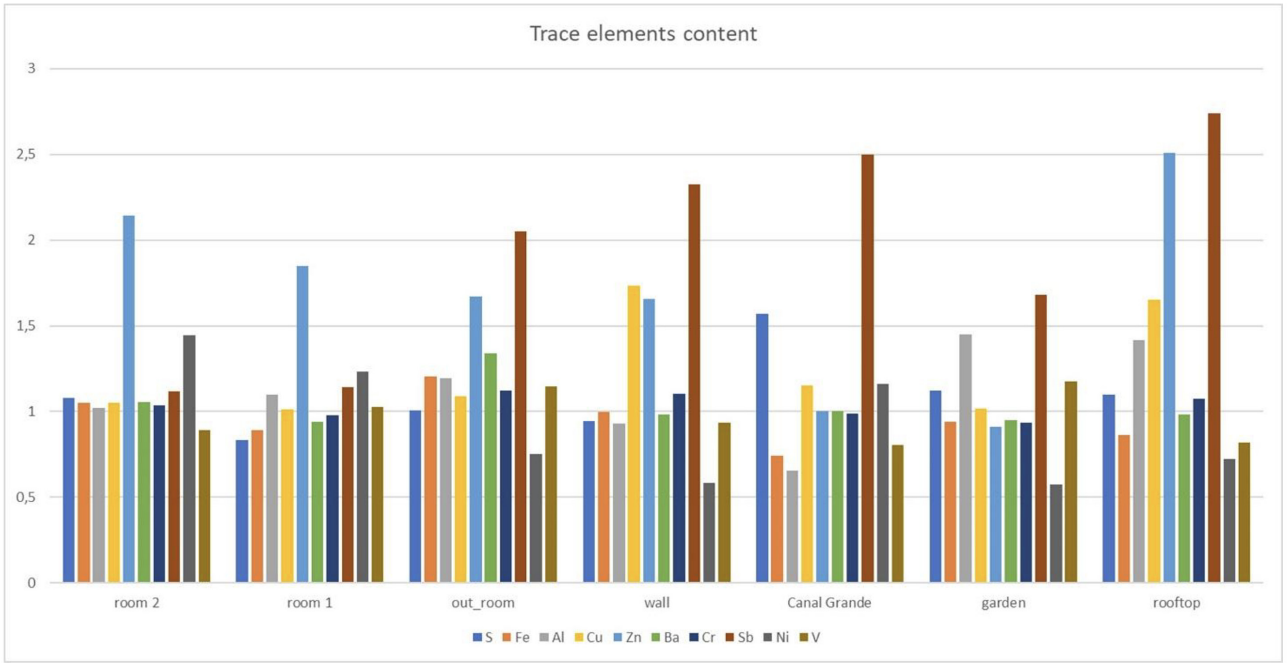
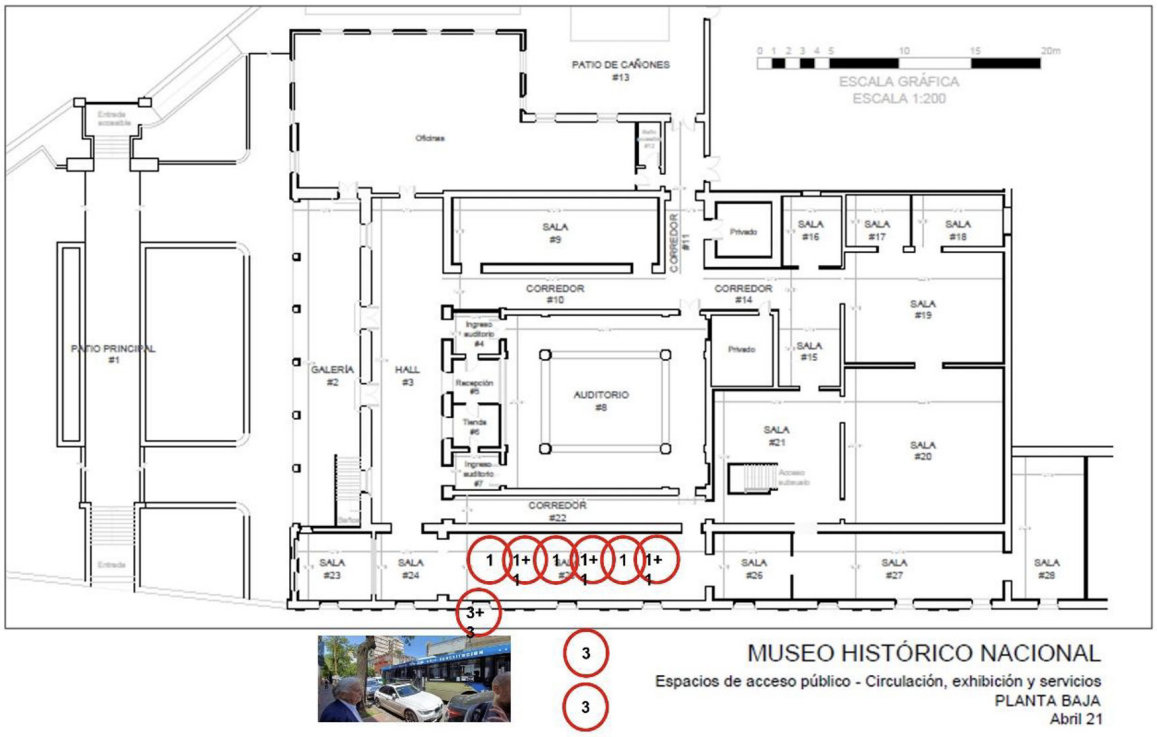


Figura 10: Concentrazioni elementari medie per sito di esposizione lichenica alla Collezione Guggenheim di Venezia, normalizzate a quelle dei campioni unexposed: in area indoor, spicca la concentrazione di Zn, in azzurro. In aree outdoor, quella di Sb, in marrone.

4.3 Museo Nacional de Bellas Artes e Museo Histórico Nacional, Buenos Aires

A Buenos Aires, i campionamenti fogliari sono stati effettuati il 29 novembre 2022, presso la strada Defensa, in prossimità di MHN, dove sono stati campionati 6 esemplari di *Fraxinus americana* L., e presso la Avenida del Libertador, ove sorge MNBA, con il campionamento di 9 alberi della specie locale *Jacaranda mimosifolia* D.Don
Nei giorni immediatamente successivi, i licheni sono stati esposti presso le aree indoor e outdoor di entrambi i musei; lo schema di campionamento è rappresentato in Fig. 11; nella maggior parte dei siti sono stati esposti sia licheni fruticosi di provenienza italiana - *E. prunastri* – che esemplari foliosi argentini con corteccia - *Parmotrema sp.* - per raffrontarne le capacità di bioaccumulo a parità di collocazione e tempo di esposizione, e con l'ulteriore scopo di stabilire un protocollo comune di misurazioni magnetiche.
Per quanto riguarda i valori di suscettività magnetica delle foglie di Jacaranda, i massimi valori sono stati riscontrati sugli alberi disposti sul lato della Avenida del Libertador opposto rispetto a quello del MNBA, in prossimità del cui ingresso, peraltro, è stato misurato il valore massimo di χ, tra i campioni prelevati nel suo stesso marciapiede. I campioni prelevati a circa 13 m di distanza dalla strada sono risultati, in media, 4.8 volte inferiori, per i valori di χ, rispetto a quelli su strada.
Le foglie di frassino americano campionate a MHN sono risultate generalmente meno intense, in un contesto di strada



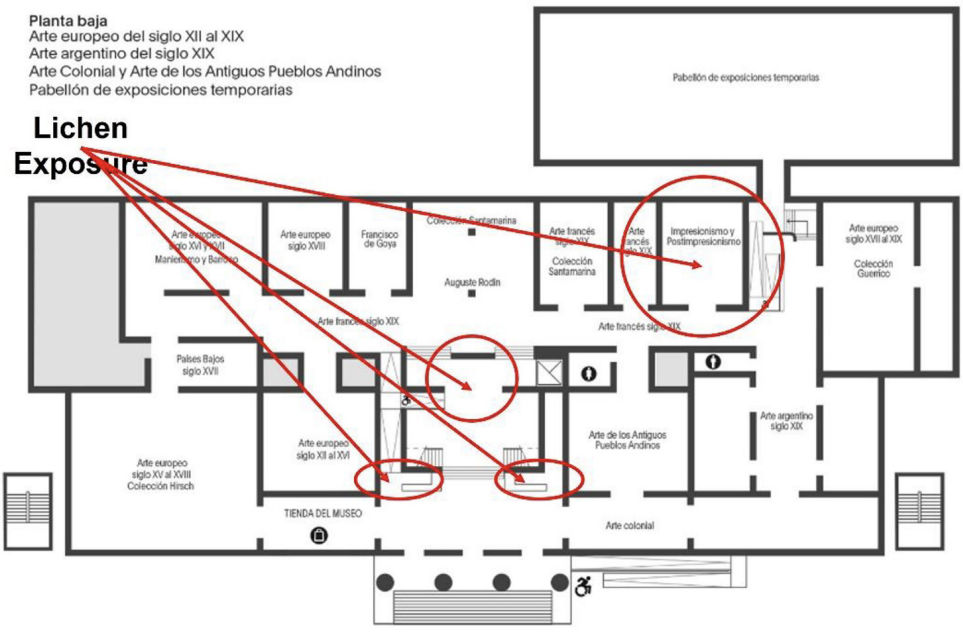


Figura 11: Esposizioni licheniche al MHN e nelle aree indoor del MNBA, Buenos Aires.

più stretta ma nondimeno trafficata, specialmente nelle ore diurne, mettendo in rilievo la possibile minore capacità di ritenzione del PM, rispetto alla Jacaranda (Fig. 12).

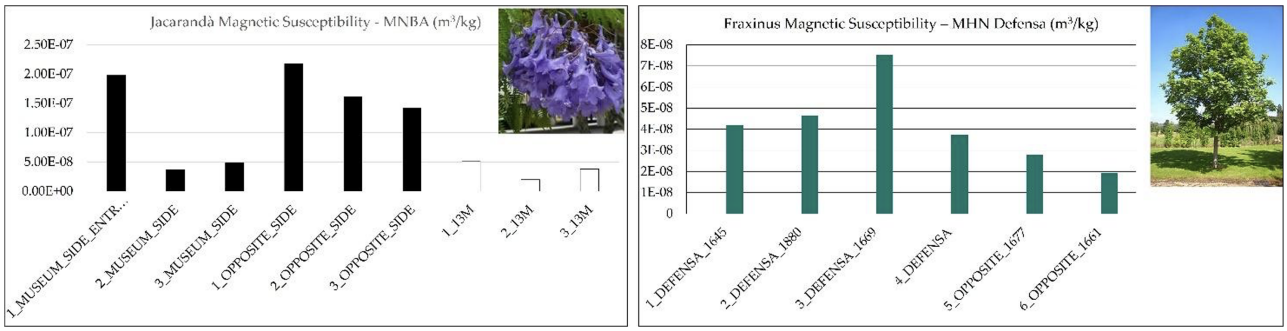


Figura 12: Suscettività magnetica delle foglie di Jacaranda, presso MNBA, e di Frassino americano, presso MHN.

Per quanto riguarda il "Day Plot" (Fig. 13), è emerso un comportamento tipico da traffico veicolare, con predominio di componenti magnetiche assimilabili a prodotti da frenatura per le foglie esposte su strada nel MNBA, e collocazione verso i settori da traffico moderato per i campioni di foglia prelevati a 13 m dalla sede stradale per MNBA e nei pressi di MHN.

Sui licheni del genere *Parmotrema sp.*, sono stati inoltre determinati i valori della suscettività magnetica differenziale di volume in situ (Δκis), calcolati come la differenza tra valori post e pre-esposizione. Tali valori sono rappresentati in fig. 14, mediati per sito di esposizione, secondo il metodo in Chaparro, 2021.

Dai valori di Δκis, emerge la chiara influenza della vicinanza dalla sede stradale sul bioaccumulo di particolato magnetico, la cui stima varia da 32 e 424 µg passando dalla sala Impressionismo – la più lontana dalla strada – a siti esterni, secondo il metodo in Chaparro, 2021.

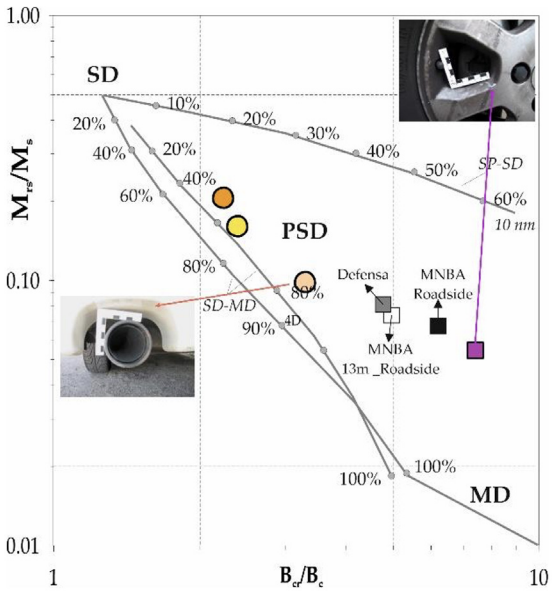


Figura 13: "Day plot"dei rapporti di isteresi mediati per sito, computati per le foglie di Fraxinus americana campionate nei pressi del MHN (in grigio) e per la specie Jacaranda Juss campionata vicino al MNBA, presso la Avenida del Libertador (in nero) e a 13 m di distanza, in bianco. I punti migrano, in funzione della distanza dalla strada e dell'entità dei bioaccumuli, da prevalenza di componenti da freni, a posizioni intermedie, tipiche di contaminazioni modeste (per i simboli, vd. didascalia di Fig. 3).

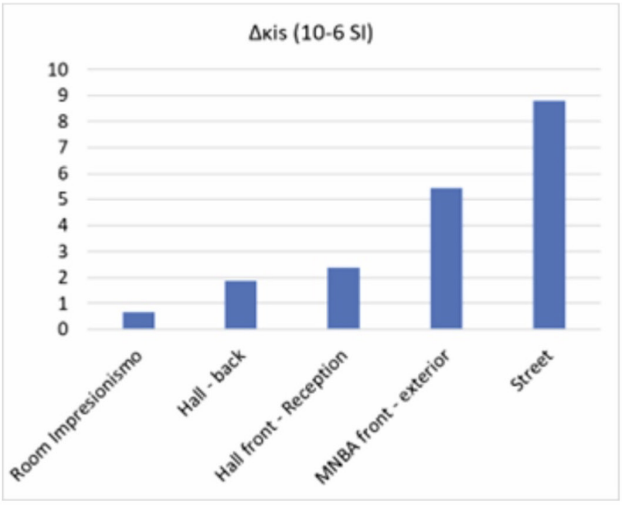


Figura 14: A sinistra, valori di suscettività differenziale di volume per sito di campionamento fogliare, in 10-6 SI, disposti al diminuire della distanza dalla strada. A destra, fase di esposizione lichenica su "Portrait d'Ernest Hoschedé et sa fille Marthe", di Edouard Manet.

5. Conclusioni

I primi risultati derivanti dall'applicazione di tecniche di biomonitoraggio magnetico e chimico a contesti museali collocati in area urbana indicano le principali conclusioni riportate di seguito:

1. In ambiti da traffico veicolare, la distanza dalla sede stradale è il principale fattore che influenza i valori di suscettività magnetica delle foglie, come riscontrato sia al Parco Archeologico del Colosseo che ai Musei Nacional de Bellas Artes e Histórico Nacional di Buenos Aires. Le importanti differenze di bioaccumulo intercorse tra le foglie di diverse specie mettono in evidenza le sostanziali differenze nella fornitura di servizi ecosistemici di protezione ambientale. L'interpretazione del "Day Plot" è risultata maggiormente articolata, dipendendo dal contesto emissivo: ai Musei di Buenos Aires, è stato possibile riscontrare la consueta prevalenza di emissioni da freni nei siti stradali. Di converso, a Via dei Cerchi e al Palatino, la posizione dei campioni ha messo in luce componenti magnetiche attribuibili a molteplici componenti emissive, siano esse polveri naturali, road dust e PM veicolare.
2. In attesa di misurare i trapianti lichenici esposti al Parco Archeologico del Colosseo e ai Museo di Buenos Aires, si riportano gli esiti delle esposizioni presso la Collezione Guggenheim di Venezia, in cui i parametri dipendenti dalla concentrazione di minerali magnetici sono risultati doppi rispetto a quelli dei siti indoor, a loro volta in linea con i campioni unexposed. Il "Day plot", a Venezia, ha messo in evidenza componenti presumibilmente da combustione, in un contesto di impatto ambientale moderato. A Buenos Aires, le prime misure operate su specie licheniche locali hanno mostrato una ottima dipendenza dei bioaccumuli dalla distanza della sede stradale, che ha permesso di stimare la variabilità degli accumuli tra strada e interno del museo in oltre un ordine di grandezza, in unità di massa.
3. Le analisi chimiche integrano in maniera sostanziale quelle magnetiche, che, a loro volta, sono rapide e a basso costo. A Venezia, gli accumuli di Zn, per i trapianti lichenici indoor, e di Sb, per quelli outdoor, hanno consentito di riconoscere nelle tinture murarie, nei filtri per l'aria e nella lavorazione artistica dei vetri le presumibili sorgenti emissive, in un contesto di accumulo metallico modesto e non significativo a livello generale. Al Parco Archeologico del Colosseo, le analisi chimiche hanno confermato gli importanti bioaccumuli sulle foglie di Via dei Cerchi, rispetto a quelle sul Palatino, già riscontrati con metodi magnetici. Dal punto di vista del riconoscimento delle sorgenti, le analisi chimiche possono fornire chiavi di lettura fondamentali quando le analisi magnetiche, quali il "Day plot", risultano di interpretazione complessa o non univoca.
4. L'uso di metodologie integrate e multidisciplinari è decisamente consigliato per delineare il ruolo di piante e licheni nel controllo e nella riduzione del particolato atmosferico inquinante in contesti museali inseriti in aree urbane complesse.

6. Bibliografia

1) A. Winkler, F. Boldrighini, T. Contardo, V. Lapenta, S. Loppi, A. Russo, G. Strano, A. Sgamellotti. Inquinamento Atmosferico e Magnetismo delle Polveri Sottili nella Villa e nei Giardini, in Atti dei Convegni Lincei, 349 (2023)

2) A. Winkler, T. Contardo, V. Lapenta, A. Sgamellotti, S. Loppi. Assessing the impact of vehicular particulate matter on cultural heritage by magnetic biomonitoring at Villa Farnesina in Rome, Italy. Sci. Total Environ., 823, 153729 (2022)

3) A. Winkler, T. Contardo, T., A. Vannini, S. Sorbo, A. Basile, S. Loppi. Magnetic Emissions from Brake Wear are the Major Source of Airborne Particulate Matter Bioaccumulated by Lichens Exposed in Milan (Italy). Appl. Sci., 10, 2073 (2020)

4) D. J. Dunlop, Theory and application of the Day plot (MRS/MS versus HCR/HC) 1. Theoretical curves and tests using titanomagnetite data. J. Geophys. Res., 107 (2002)

5) D. J. Dunlop, Theory and application of the Day plot (MRS/MS versus HCR/HC) 2. Application to data for rocks, sediments, and soils. J. Geophys. Res. 107 (2002)

6) M.A.E. Chaparro, Airborne particle accumulation and loss in pollution-tolerant lichens and its magnetic quantification. Environ. Pollut. 288, 117807 (2021)

7). L. Sagnotti, J. Taddeucci, A. Winkler, A. Cavallo, Compositional, morphological, and hysteresis characterization of magnetic airborne particulate matter in Rome, Italy, Geochem. Geophys. Geosyst., 10 (8) (2009), 10.1029/2009GC002563

Studio della componente biogena sulle pareti di Villa Farnesina

Chiara Anselmi[1], Claudia Mattioni[1], Antonio Sgamellotti[2,3], Paola Pollegioni[1]

[1] Istituto CNR di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri, CNR-IRET, via G. Marconi2, 05010 Porano (TR), Italia
[2] Istututo CNR di Scienze e Tecnologie Chimiche, CNR-SCITEC, via Elce di Sotto 8, 06123, Perugia, Italia
[3] Accademia Nazionale dei Lincei, via della Lungara 10/230, 00165 Roma, Italia.

Keywords: Microbioma, Villa Farnesina, Popolazioni batteriche, Alpha- e Beta-diversity, Matrice lapidea

Riassunto

Di seguito vengono esposti i risultati preliminari di uno studio condotto sulle pareti di Villa Farnesina con la finalità di caratterizzarne la popolazione batterica e fungina. Da una prima elaborazione dei dati raccolti, emerge che il tipo di matrice da cui viene estratto il DNA ambientale influenza i *phyla* batterici ivi presenti, più di quanto non faccia l'ambiente circostante.
Le pareti della villa mostrano tra loro una similarità in termini di *phyla* batterici determinata da luce e temperatura. Infatti in estate tre pareti su quattro –quelle più esposte all'irradiazione solare e quindi ad una temperatura maggiore- risultano molto simili tra loro, mentre la parete nord risulta la più differente dalle altre sia in estate che in inverno.
L'impatto del traffico veicolare in prossimità di due delle quattro pareti, non rappresenta un fattore di correlazione tra i *phyla* batterici presenti sulle stesse ma ne influenza piuttosto la biodiversità che comunque in inverno – su queste due pareti- risulta non equamente distribuita.
In estate, a causa di un maggiore rimescolamento dell'aria, si assiste ad un equilibrio nella distribuzione delle popolazioni batteriche.
La parete nord sia in estate che in inverno emerge come quella con una maggiore differenza in termini di *phyla* e di specie batteriche.

The preliminary results of a study conducted on the walls of Villa Farnesina to characterize the bacterial and fungal population are presented below. From an initial elaboration of the collected data, it emerges that the type of matrix from which the environmental DNA is extracted influences the bacterial *phyla* which are present, more than the surrounding environment.
The main similarity factors between the walls of the villa for the bacterial *phyla* are light and temperature. In fact, in summer three out of four walls - those most exposed to solar radiation and therefore with a higher temperature - are closely similar, while the north wall is the most different from the others both in summer and in winter.
The impact of vehicular traffic near two of the four walls does not represent a correlation factor between the bacterial *phyla* present on them but rather affects their biodiversity which, in any case, in winter - on these two walls - is not equally distributed.
In summer, due to the greater mixing of the air, there is a balance in the distribution of bacterial populations.
The north wall in both summer and winter emerges as the most different from the others with a relatively low diversity of *phyla* and bacterial species.

Introduzione

Il presente studio, i cui risultati preliminari vengono qui di seguito esposti, prende le mosse da uno precedente vòlto ad indagare la composizione delle comunità batteriche e fungine in dipendenza del livello di inquinamento da attività antropica. Lo studio precedente è stato condotto su tre siti della città di Roma caratterizzati da differente attività antropica. Per ogni sito, la popolazione batterica e fungina è stata analizzata su tre matrici biologiche differenti: filtro PM10, superficie fogliare e pavimentazione stradale [(1)].
L'attuale studio ha una triplice finalità:

- valutare una matrice diversa da quelle acquisite nello studio precedente per confrontarne le caratteristiche di popolazione batterica e fungina;
- valutare una matrice che possieda caratteristiche costanti nel tempo per individuare i fattori che maggiormente influenzano la composizione della popolazione batterica e fungina;
- valutare la variazione della popolazione batterica e fungina al variare delle stagioni per individuare una tendenza nella variazione delle medesime.

Per il presente studio è stato scelto un edificio storico nella città di Roma e ne è stata studiata la popolazione batterica e fungina presente sulle pareti esterne, effettuando due campionamenti; uno in inverno ed uno in estate.
L'edificio scelto è la Villa Farnesina, sede di rappresentanza dell'Accademia Nazionale dei Lincei che possiede - per la sua ubicazione- caratteristiche proprie sia di un'area verde che di un'area esposta al traffico. Infatti, come si vede dalla Fig.1, due lati della Villa sono esposti al traffico veicolare seppure di intensità differente: il Lungotevere Farnesina ad est e via della Lungara ad ovest. I lati nord e sud sono invece caratterizzati da ampi spazi di vegetazione.
Gli esempi di studio di comunità batteriche e fungine su matrici lapidee in letteratura hanno una casistica così varia per ubicazione geografica e tipologia del supporto che risulta difficoltoso disporre di termini di comparazione. Inoltre la mancanza di campionamenti ripetuti, in particolare al variare delle stagioni, preclude qualsiasi interpretazione della composizione del microbioma lapideo in dipendenza delle condizioni di luce e temperatura.

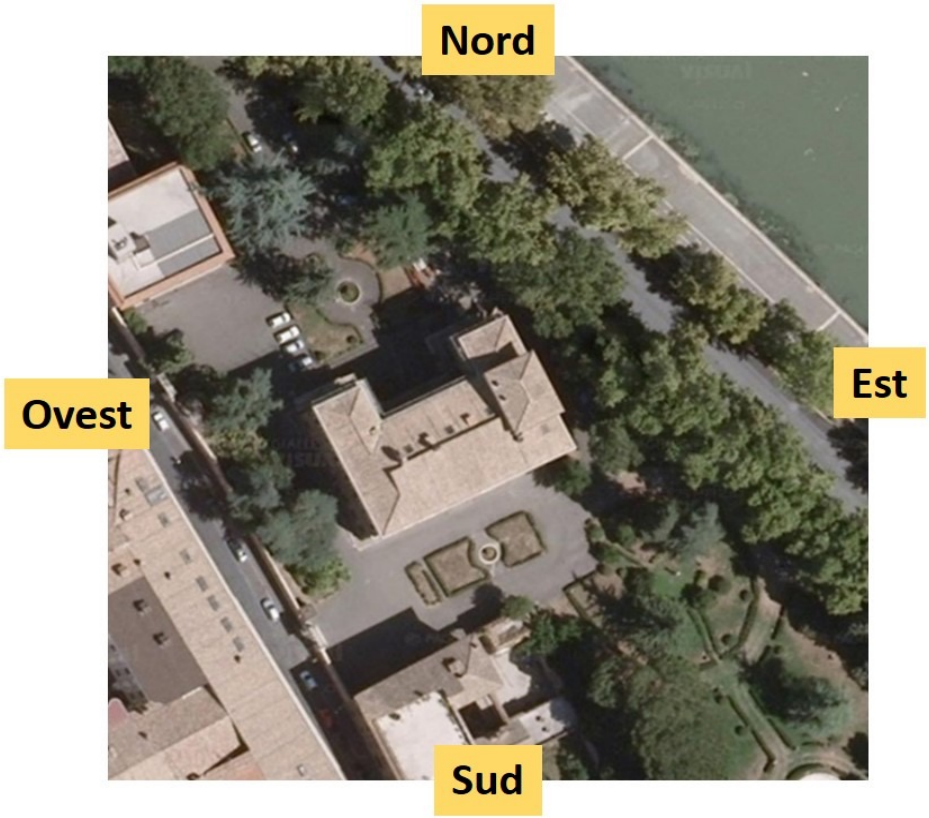


Figura 1. Veduta aerea di Villa Farnesina con evidenziata l'orientazione delle pareti.

La scelta di studiare il microbioma delle pareti di un edificio con campionamenti stagionali consente di disporre di una matrice lapidea con caratteristiche "fisse" come l'ubicazione e l'alternanza di temperatura ed illuminazione, per riuscire ad ipotizzare una tendenza nella composizione del microbioma presente.
Per distinguere meglio le eventuali variazioni nelle comunità batteriche e fungine si è scelto di condurre i campionamenti in estate ed inverno per studiarne le caratteristiche in condizioni molto differenti di temperatura ed illuminazione. Di seguito vengono esposti i primi risultati ottenuti sulle comunità batteriche.

2 Materiali e metodi

Sono stati condotti due campionamenti sulle quattro pareti di Villa Farnesina in due differenti periodi (febbraio e luglio 2022).
Ogni campionamento è stato condotto raccogliendo, in una provetta da 50ml, il particolato depositato sulla superficie di ciascuna delle pareti mediante un pennello. Il pennello e la provetta, differenti per ciascuna parete sono stati precedentemente sterilizzati mediante raggi UV. Le provette raccolte sono state poste in una borsa termica a 4°C e poi processati entro 3 giorni dal campionamento. L'estrazione del DNA ambientale da ciascun campione ed il successivo 16S / ITS metabarcoding analisi sono state effettuate secondo il protocollo riportato in Pollegioni et al. [(1)]. Il materiale raccolto sulla parete sud in inverno non si è rivelato sufficiente ad ottenere informazioni sul microbioma ivi presente.

3 Risultati e discussione

Nella figura 2a è riportata la variazione, dall'inverno all'estate, dell'abbondanza relativa dei *phyla* batterici presenti sulle pareti di Villa Farnesina. Dal confronto con il precedente lavoro (Fig 2b) si nota anzitutto che la composizione delle comunità batteriche sulle pareti di Villa Farnesina è differente da ciascuna di quelle campionate nello studio precedente e che ogni tipologia di matrice sembra essere caratterizzata da una peculiare composizione di popolazioni batteriche.

Nel passaggio da inverno ad estate, sulle pareti di Villa Farnesina aumenta globalmente il numero di *phyla* batterici presenti, passando da una media di 27.33±7.01 ad 30.5±3.32. Inoltre si osserva un aumento in abbondanza relativa dei Proteobacteria, ed una diminuzione dei Cyanobacteria seguita da una sostanziale sparizione di Tenericutes. Se si analizza l'effetto della variazione stagionale –da inverno ad estate- su ogni singola parete, si nota una riduzione in abbondanza relativa di Cyanobacteria, una distribuzione più omogenea di Actinobacteria e Proteobacteria ed una sparizione di Tenericutes.
Considerando la singola stagione (Fig.3), in inverno si rileva la presenza di Tenericutes con una abbondanza relativa variabile tra il 3 ed il 6% sulle pareti Ovest ed Est rispettivamente e si osserva una maggiore presenza di Cyanobacteria sulle pareti Nord (~26%) ed est (~27%). In estate non si rilevano Tenericutes in nessuna delle quattro pareti e i Cyanobacteria diminuiscono ovunque tranne sulla parete Nord (~27%). Sempre in estate si assiste ad un generalizzato aumento in numero dei *phyla* batterici ed una omogeneità nella loro distribuzione e abbondanza relativa tra le quattro pareti analizzate. La parete nord si differenzia maggiormente in termini di abbondanza e tipologia di *phyla* batterici,

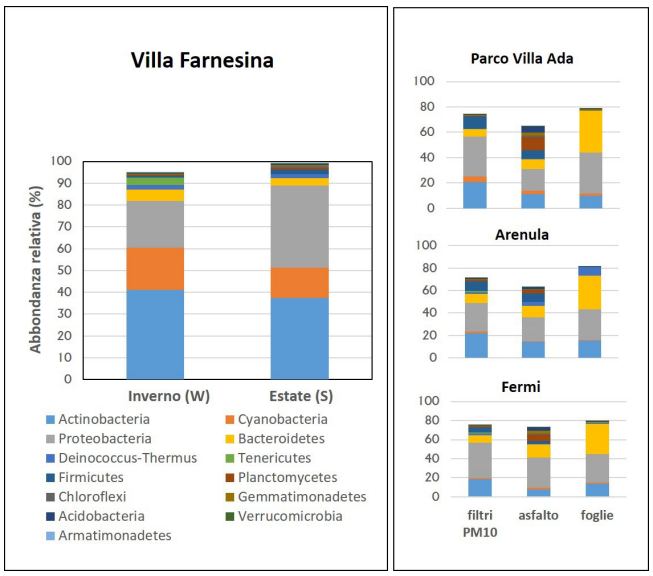


Figura 2. a) Variazione stagionale delle comunità batteriche presenti sulle pareti di Villa Farnesina. b) Variazione delle comunità batteriche (phyla) presenti su tre tipi di matrici, campionate in tre siti di Roma (Villa Ada, Arenula, Piazzale Fermi).

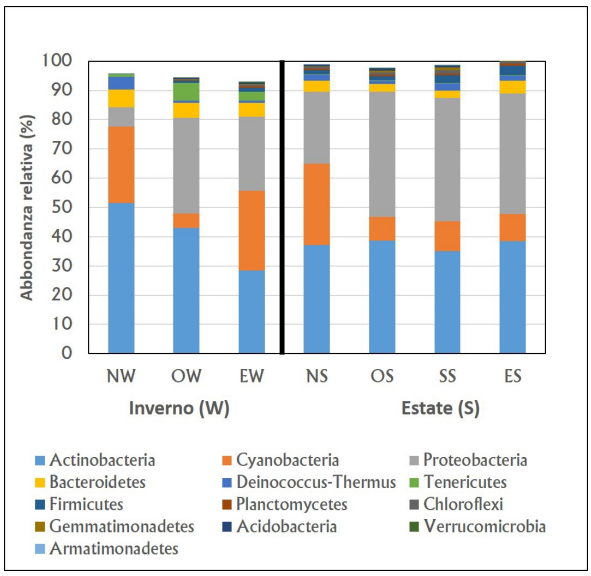


Figura 3. Variazione stagionale delle comunità batteriche (phyla) presenti sulle singole pareti di Villa Farnesina (NW=Nord Inverno; OW=Ovest Inverno; EW=Est Inverno; NS=Nord Estate; OS= Ovest Estate; SS= Sud Estate; ES=Est Estate).

caratteristica questa che in inverno risulta molto più evidente.
Alla luce di queste variazioni si può ipotizzare che la maggiore ricchezza in termini di *phyla* batterici e la maggiore omogeneità tra le pareti riscontrate in estate sia dovuta ad un maggiore risollevamento dell'aria - meno umida e più secca- che, sottoposta ad una aumentata circolazione, equilibra tra loro le pareti in termini di tipologia ed abbondanza relativa delle popolazioni batteriche. Allo stesso modo si può ipotizzare una preferenza dei Cyanobacteria per ambienti umidi e poco illuminati come si evince dalla loro abbondanza, in inverno, sulle pareti nord ed est, e dalla loro drastica diminuzione - tranne sulla parete nord- in estate. Anche i Tenericutes, che spariscono completamente in estate, sembrano essere correlati alle basse temperature ed elevate umidità con una preferenza per il traffico veicolare dal momento che le pareti dove compaiono in quantità maggiore, sono quelle ad esso esposte.
Nella matrice riportata in Fig 4 è rappresentata la beta-diversity (Bray-Curtis distance), cioè il grado di relazione tra i campioni analizzati – in questo caso le pareti della Villa- per i *phyla* batterici rinvenuti. Come atteso, è presente una forte similarità, in estate, tra le pareti Sud, Est e Ovest, cioè: in estate, le comunità batteriche presenti sulle pareti Sud, Est e Ovest sono molto simili tra loro per tipologia ed abbondanza relativa. La parete Nord si caratterizza come differente dalle altre sia in estate che in inverno.
La differenza tra la parete Nord e le pareti Sud, Est e Ovest è più evidente in inverno, indicando quindi in luce e temperatura i principali fattori che determinano la tipologia e la diversità delle popolazioni batteriche. Questa evidenza è in accordo - e fornisce ulteriore supporto- con quanto emerso dalle misure di suscettività magnetica condotte sulla cortina arborea che circonda la Villa Farnesina [2]. Da tali misure è emersa la capacità degli alberi presenti nel giardino della Villa di schermare in maniera efficace il particolato proveniente dal traffico intenso del Lungotevere Farnesina che si trova sul lato est della Villa e tale schermo risulta così efficiente che, dai nostri dati, il traffico non costituisce un fattore di correlazione tra le pareti. Risultati parzialmente contrastanti emergono considerando la ricchezza in termine di specie batteriche presenti.

	NW	EW	NS	OW	OS	SS	ES
NW	0	0.281	0.226	0.346	0.4	0.413	0.404
EW	0.281	0	0.108	0.258	0.291	0.281	0.269
NS	0.226	0.108	0	0.259	0.219	0.21	0.207
OW	0.346	0.258	0.259	0	0.161	0.208	0.181
OS	0.4	0.291	0.219	0.161	0	0.055	0.056
SS	0.413	0.281	0.21	0.208	0.055	0	0.035
ES	0.404	0.269	0.207	0.181	0.056	0.035	0

Figura 4. Matrice indicante la beta- diversity (Bray-Curtis distance) per phylum delle pareti di Villa Farnesina (NW=Nord Inverno; OW=Ovest Inverno; EW=Est Inverno; NS=Nord Estate; OS= Ovest Estate; SS= Sud Estate; ES=Est Estate). In rosso sono evidenziate le correlazioni, in giallo le differenze.

La figura 5 riporta la alpha diversity, cioè la quantificazione della abbondanza e della diversità di specie batteriche presenti sulle pareti, attraverso il calcolo di tre indici, numero di specie osservate (Observed), Chao1 e Shannon.

Dall'analisi di questi indici si nota in inverno:

- un decremento nella ricchezza di specie sia a livello numerico che di abbondanza (tre indici) per ogni singola parete rispetto all'estate, in accordo con quanto già visto in fig.2;
- una più alta diversità delle specie batteriche presenti (Shannon) nelle pareti esposte al traffico (Est e Ovest);
- la più alta diversità di specie sia a livello numerico che di abbondanza (Chao1 ed Shannon) solo per la parete Est, quella esposta al traffico più intenso del Lungotevere Farnesina con presenza anche di specie a bassa abbondanza relativa, in confronto con la parete Ovest -esposta al traffico di via della Lungara- caratterizzata da un numero inferiore di specie (Chao1) ma con una abbondanza relativa più alta ed omogenea (Shannon).

Samples	Observed	Chao1	Shannon
NW	1275	2028.377	3.75664
OW	1164	1601.659	4.88134
EW	2544	3592.057	4.99301
NS	2253	2979.592	5.03626
OS	3220	4416.742	5.44032
SS	2508	3342.953	5.46745
ES	3203	4271.897	5.65050

Figura 5. Tabella che mostra i coefficienti di Alpha-diversity (Observed, Chao1, e Shannon index) per le specie batteriche presenti sulle pareti di Villa Farnesina (NW=Nord Inverno; OW=Ovest Inverno; EW=Est Inverno; NS=Nord Estate; OS= Ovest Estate; SS= Sud Estate; ES=Est Estate).

In estate analogamente:

- una elevata diversità delle specie batteriche presenti (Shannon) per ogni parete studiata;
- un maggior numero di specie presenti (Observed e Chao1) sulle pareti esposte al traffico (Est ed Ovest).

Indipendentemente dalla stagione, non possiamo escludere che il risollevamento di polveri stradali dovuto al traffico veicolare particolarmente intenso presso il Lungotevere possa in parte influenzare la ricchezza in specie batteriche presenti nelle due pareti Est ed Ovest della palazzina Farnesina.

Conclusioni

I risultati preliminari emersi dallo studio della componente biogena delle pareti di Villa Farnesina mostrano che la distribuzione dei *phyla* batterici è ampiamente dipendente dalla tipologia di matrice considerata più che dall'ambiente circostante. Infatti la matrice lapidea oggetto di questo studio è caratterizzata da popolazioni batteriche differenti da quelle riscontrate in un nostro precedente studio su tre matrici non lapidee e differenti tra loro, campionate in tre aree di Roma a differente impatto antropico.
In estate si riscontra una maggiore omogeneità nei *phyla* batterici delle pareti Est, Ovest e Sud.
Il fattore correlante più forte tra le pareti risulta essere il binomio luce+temperatura che prevale rispetto al traffico veicolare e vale per *phylum* e specie. La parete Nord risulta essere la meno correlata con le altre sia in inverno che in estate. Sulla parete Est si riscontra una maggiore ricchezza di specie, soprattutto in estate, dovuta al risollevamento delle polveri unito al traffico veicolare.
Il traffico veicolare presente sui lati Est e Ovest di Villa Farnesina non costituisce fattore di correlazione tra queste due pareti, ma il suo impatto si percepisce nella maggiore diversità di *phyla* e di specie che caratterizzano le pareti ad esso esposte.

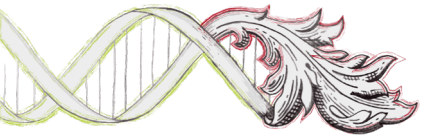
Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare la dott.ssa Virginia Lapenta e tutto lo staff della Villa Farnesina per il supporto e la collaborazione

Bibliografia

1) Pollegioni, P.; Mattioni, C.; Ristorini, M.; Occhiuto, D.; Canepari, S.; Korneykova, M.V.; Gavrichkova, O. Diversity and Source of Airborne Microbial Communities at Differential Polluted Sites of Rome. Atmosphere 2022, 13, 224. https://doi.org/10.3390/atmos13020224

2) Winkler A., Contardo T., Lapenta V., Sgamellotti A., Loppi S. Assessing the impact of vehicular particulate matter on cultural heritage by magnetic biomonitoring at Villa Farnesina in Rome, Italy. Sci Total Environ. 2022 Jun 1;823:153729. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153729



BIODIAGNOSTICA

Introduzione alla sessione di Biodiagnostica

Gennaro Marino

La sessione di Biodiagnostica di questo simposio si è articolata in tre presentazioni, affidate a tre specialisti a livello internazionale, riguardanti la genomica e la proteomica: due discipline che, benché di recente applicazione, hanno acquisito un ruolo significativo nella diagnostica dei beni culturali. I metodi di genomica, a parte il successo che hanno riscontrato negli studi del "DNA antico, stanno assumendo anche notevole rilevanza nell'individuare i microrganismi responsabili di biodeterioramento. La proteomica, che ormai viene largamente impiegata nell'identificazione delle proteine presenti nei manufatti artistici, riveste oggi particolare interesse per lo sviluppo di approcci sempre meno invasivi e per l'impego di tecniche di imaging anche al fine di creare delle vere e proprie mappe del materiale proteico presente nell'opera.

Paleoproteomica: lo studio delle proteine “antiche”

Leila Birolo[1], Gennaro Marino[1,2]

[1] Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II
[2] Dipartimento di Scienze Umanistiche, Università Suor Orsola Benincasa, Napoli

Keywords: Paleoproteomics, ancient proteins, mass spectrometry, LC-MSMS, microinvasive analysis.

1. Riassunto

Lessons from the past. Recent developments in mass spectrometry have made it possible to adapt proteomics to the study of ancient proteins, which are now the focus of numerous palaeoproteomics projects aimed not only at increasing knowledge, but also at providing molecular details that may be useful in increasingly informed restoration interventions. While, at the beginning of this century, the pressing question was whether it was possible to identify proteins in such a complex and degraded context as artworks or archaeological artefacts, the current challenges lie in characterising the chemical changes associated with the degradation process and in understanding the networks of interactions with the other components present, both inorganic and organic in nature. On the other hand, methodological developments require us to move in the direction of analyses that are less and less invasive to meet the pressing and justified demands of the cultural heritage world.

Lezioni dal passato. I recenti sviluppi della spettrometria di massa hanno consentito di adattare la proteomica allo studio delle proteine antiche, che sono oggi al centro di numerosi progetti di paleoproteomica volti non solo ad accrescere la conoscenza, ma anche a fornire dettagli molecolari che possano risultare utili in interventi di restauro sempre più consapevoli. Mentre, all’inizio di questo secolo, la domanda pressante era se fosse davvero possibile identificare le proteine in un contesto così complesso e degradato quale quello delle opere d’arte o dei reperti archeologici, le sfide attuali sono nella caratterizzazione delle modifiche chimiche connesse con il processo degradativo e nella comprensione delle reti di interazioni con le altre componenti presenti, di natura tanto inorganica quanto organica. D’altra parte, lo sviluppo metodologico ci impone di andare nella direzione di analisi che siano sempre meno invasive per venire incontro alle pressanti e giustificate richieste del mondo dei beni culturali.

2. Introduzione

La conservazione del nostro patrimonio culturale è di importanza essenziale per mantenere in vita il passato, che determina ciò che siamo, da dove veniamo e il percorso dell’umanità nei secoli. L’analisi chimica da sempre svolge un ruolo attivo e cruciale nella conservazione del patrimonio culturale, aiutando il suo passaggio alle nuove generazioni. La caratterizzazione molecolare di reperti archeologici e di manufatti artistici aiuta a rispondere a domande cruciali quali quando e come una specifica opera è stata realizzata, nonché a comprendere i processi degradativi nel tempo. Tuttavia, la chimica è chiamata a confrontarsi anche con sfide importanti quali quelle di rendere non invasiva l’indagine analitica, districandosi nella complessità e varietà del materiale artistico, sia per composizione che per l’incombere dei processi degradativi.
La spettrometria di massa è una tecnica analitica che ha assunto negli anni un ruolo sempre più rilevante nel campo della diagnostica dei beni culturali per la sua sensibilità ed accuratezza nelle risposte risolutive ed efficaci. Negli ultimi venti anni la chimica delle proteine e la spettrometria di massa si sono evolute e adattate per l’analisi di campioni nel campo dei beni culturali, tanto che è stato coniato il termine paleoproteomica, ad indicare la proteomica applicata al mondo delle proteine antiche (1, 2). Le proteine sono una classe di molecole di grosso interesse per la loro intrinseca resistenza agli insulti del tempo, offrendo la possibilità di andare indietro nel tempo oltre un limite precedentemente impensabile. La paleoproteomica è complementare ad una vasta gamma di altre indagini (geochimiche, di microscopia, chimico-fisiche, etc.), la cui combinazione può fornire un quadro completo e sempre più esaustivo della storia di campioni antichi.

3. Metodologia

Strategie di proteomica classica su MALDI-TOF e LC-MSMS in combinazione con metodologie di chimica delle proteine utilizzate su campioni artistici e reperti archeologici di varia natura che spaziano da dipinti a colle per il restauro a frammenti ossei.

4. Risultati e Discussione

La ricerca presentata ha avuto come focus lo sviluppo di nuovi strumenti analitici per l’analisi di proteine in tracce in opere d’arte e oggetti sorpassando gli attuali limiti in sensibilità ed invasività, affrontando alcune delle sfide analitiche della proteomica applicata ai beni culturali, e l’utilizzo delle più avanzate tecniche di spettrometria di massa per analizzare a livello molecolare il degrado in proteine antiche.
I progressi della spettrometria di massa (MS) hanno consentito di adattare i metodi allo studio delle molecole antiche in reperti archeologici e opere d’arte. Le informazioni che si possono ottenere aiutano a conoscere materiali antichi fornendo nuove prospettive storiche e aiutano la conservazione del patrimonio artistico.
È ormai possibile identificare proteine con estrema sensibilità. Tuttavia, le strategie classiche sono ancora relativamente invasive. Nella prospettiva di ridurre al minimo questo limite tecnologico, abbiamo messo a punto un metodo micro-invasivo per l’analisi delle proteine che sfrutta proteasi immobilizzate su film di acetato di cellulosa per digerire in situ proteine in superfici pittoriche senza rimuovere il campione dall’opera. I peptidi rilasciati sono poi analizzati mediante

spettrometria di massa per consentire l'identificazione delle proteine presenti. La peculiarità del metodo consiste nel fatto che, differentemente da altri film o resine simili, è l'unico metodo che estrae peptidi dal campione e non proteine per essere poi digerite enzimaticamente per fornire i peptidi necessari per la loro identificazione. Tra i vantaggi di questo film bioattivo si può annoverare il fatto che può essere utilizzato senza rimuovere l'opera d'arte o il reperto archeologico. Inoltre, non sono necessarie specifiche capacità tecniche per il campionamento: i film possono essere forniti secchi, inumiditi prima dell'uso e facilmente posti a contatto con l'opera da analizzare. Il campionamento può essere effettuato dagli stessi restauratori o curatori museali: i film possono essere conservati e i peptidi recuperati dopo, prima dell'analisi via MS (3).
Il film funzionalizzato con proteasi sviluppato per digerire in situ superfici pittoriche per l'identificazione di leganti pittorici a base proteica (3), è stato successivamente sperimentato con successo anche su altri materiali quali oggetti in avorio, carta e fotografie trattate con albume (4), lasciando quindi intravedere ulteriori possibilità di utilizzo nel vasto ed eterogeneo campo dei beni culturali.
Fin qui abbiamo descritto come la proteomica possa essere utile per l'identificazione del materiale a base proteica in un reperto archeologico o in un'opera d'arte, ma la proteomica può essere utile anche nella comprensione dei processi di degradazione e quindi dello stato di conservazione di un oggetto artistico o di un reperto.
Risultati entusiasmanti sono stati recentemente ottenuti a tal riguardo sia nella caratterizzazione di colle animali utilizzate nel campo del restauro (5), che nello studio di reperti archeologici eccezionali quali frammenti ossei umani delle vittime dell'eruzione di Pompei ed Ercolano del 79 d.C. (6).
È infatti possibile identificare l'origine animale delle colle, anche quando in miscela, dall'individuazione di peptidi specie-specifici, nonché distinguere colle di ossa da colle di pelle, per la presenza, solo in quest'ultime, di collagene di tipo III, quasi del tutto assente nel tessuto osseo dove si identifica in maniera assolutamente preponderante collagene di tipo I. Il differente trattamento per estrarre il collagene dalle ossa o dalle pelli si riflette anche nell'abbondanza relativa di modifiche chimiche quali la deammidazione, che può essere quantificata a partire dall'analisi LC-MSMS degli idrolizzati triptici del collagene, e che è significativamente più abbondante in colle da pelli. Questo dato, che corrisponde ad un aumento di specie cariche (per ogni aspartico e glutammico in luogo di asparagina e glutammina, rispettivamente, c'è l'introduzione di una ulteriore carica negativa nella molecola), potrebbe essere implicato anche nelle differenti proprietà reologiche e nelle performance delle diverse preparazioni delle colle animali.
Lo studio delle modifiche chimiche identificate nel collagene estratto da frammenti ossei di vittime dell'eruzione del 79 d.C. di Pompei ed Ercolano (6) ha dimostrato che tale analisi può rivelare interessanti dettagli del destino post mortem dei resti ossei: l'entità e la varietà delle modifiche dipende fortemente dalle condizioni in cui si trovano i corpi, tanto che nei campioni provenienti da Pompei, dove il tessuto molle si è degradato nel tempo, si possono osservare più modifiche che non nei campioni di Ercolano, nei quali, a fronte del rapidissimo consumarsi della carne, tanto rapido che la cenere si è depositata direttamente sugli scheletri, si osserva una minore abbondanza delle classiche modifiche chimiche.
I risultati da noi ottenuti dimostrano come sia complesso, ma anche estremamente interessante ed informativo, il processo di degrado del materiale proteico.

5. Conclusioni

Esperimenti chimici sono da sempre usati per comprendere le proprietà delle opere d'arte in termini di resistenza al tempo, cambi nel colore e degradazione, per decifrare le ricette dei nostri antenati per creare capolavori che hanno resistito ai secoli nella prospettiva di preservare tali capolavori.
I progressi tecnologici nella chimica analitica e l'esplosione delle tecniche di spettrometria di massa (MS) hanno portato allo sviluppo di nuovi metodi adattati allo studio delle biomolecole in oggetti dei beni culturali. I risultati presentati hanno dimostrato come in poco più di un decennio si è passati dalla domanda se si era in grado di identificare le proteine in un contesto complesso come quello di un reperto archeologico o di un'opera d'arte, a cominciare a decifrare le preziose informazioni di come il complesso contesto modifica le molecole proteiche. Tuttavia, le sfide tecniche e metodologiche sono ancora enormi considerata la enorme complessità e varietà dei campioni e le quantità spesso ridotte disponibili per le analisi, specialmente quando si è alla ricerca delle modifiche chimiche indotte dal tempo, dagli agenti atmosferici o dal trattamento imposto per la preparazione dei materiali stessi.

6. Bibliografia

(1) S. Dallongeville, N. Garnier, C. Rolando, C. Tokarski, Proteins in Art, Archaeology, and Paleontology: From Detection to Identification. Chem. Rev. 116, pp 2–79, (2015).

(2) C. Warinner, K. Korzow Richter, M.J. Collins. Paleoproteomics. Chem. Rev., 122, pp. 13401–13446, (2022).

(3) P. Cicatiello, G. Ntasi, M. Rossi, G. Marino, P. Giardina, L. Birolo. Minimally Invasive and Portable Method for the Identification of Proteins in Ancient Paintings. Anal. Chem., 90, pp 10128–10133, (2018).

(4) G. Ntasi, D.P Kirby, I. Stanzione, A. Carpentieri, P. Somma, P. Cicatiello, G. Marino, P. Giardina, L. Birolo, A Versatile and User-Friendly Approach for the Analysis of Proteins in Ancient and Historical Objects. J. Proteomics 231, pp. 104039-104047, (2021).

(5) G. Ntasi, S. Sbriglia, R. Pitocchi, R. Vinciguerra, C. Melchiorre, L. Dello Ioio, G. Fatigati, E. Crisci, I. Bonaduce, A. Carpentieri, G. Marino, L. Birolo. Proteomic Characterization of Collagen-Based Animal Glues for Restoration. J. Proteome Res., 21, pp. 2173–2184 (2022).

(6) G. Ntasi, I. R. Palomo, G. Marino, F. Dal Piaz, E. Cappellini, L. Birolo, P. Petrone. Molecular Signatures Written in Bone Proteins of 79 AD Victims from Herculaneum and Pompeii. Sci. Rep., 12 (1), pp. 1–15 (2022).

Paleogenomica e Beni Culturali

David Caramelli

Dipartimento di Biologia, Università di Firenze via del Proconsolo 12-50122 Firenze, Italia

Keywords: DNA antico , Paleogenomica, New Generation Sequencing, Beni Culturali.

Riassunto

Negli ultimi tre decenni, l'analisi del DNA su campioni degradati si è rivelata un importante strumento di ricerca in antropologia, archeozoologia, evoluzione molecolare e genetica delle popolazioni. L'applicazione su temi quali la determinazione dell'origine delle specie di oggetti preistorici e storici, l'identificazione individuale di personaggi famosi, la caratterizzazione di campioni particolari importanti per ricostruzioni storiche, archeologiche o evoluzionistiche, conferisce alla paleogenetica un ruolo importante anche per la valorizzazione del patrimonio culturale. Un rapidissimo miglioramento delle metodologie negli ultimi anni ha portato a una rivoluzione che ha permesso di recuperare anche genomi completi da campioni altamente degradati con la possibilità di tornare indietro nel tempo fino a 400.000 anni per campioni provenienti da regioni temperate e 700.000 anni per resti in permafrost e di analizzare materiale ancora più recente che ha subito duri trattamenti biochimici. Qui si propone una rassegna sui diversi approcci metodologici finora utilizzati per l'analisi molecolare di campioni degradati e la loro applicazione su alcuni casi di studio.

1. DNA antico: una panoramica

Circa trent'anni fa furono pubblicati i primi risultati del recupero di materiale genetico da campioni antichi [1,2]. Da quel momento, uno sviluppo rivoluzionario nei metodi, nonché un miglioramento nella conoscenza delle caratteristiche del DNA degradato, ha portato il DNA antico (aDNA) ad una chiara affermazione come strumento di indagine in diversi campi scientifici, archeologici e storici. Antropologia, archeozoologia, evoluzione molecolare, genetica della conservazione e delle popolazioni, medicina legale, archeologia e storia sono le discipline che beneficiano dell'analisi dell'aDNA. Gli obiettivi di queste analisi possono essere diversi e avere diverse applicazioni. Il confronto genetico tra diversi gruppi umani nello spazio e nel tempo, l'analisi della parentela tra gli individui nelle necropoli, la firma genetica di patogeni possono aiutare a discernere i legami biologici o culturali tra le comunità, comprendere i modelli sociali e ricostruire lo stato di salute delle popolazioni del passato. Sui resti faunistici o floristici, l'analisi della variabilità genetica passata può avere un ruolo importante negli attuali approcci alla conservazione e alla ricostruzione dei processi di domesticazione. La storia evolutiva delle specie può essere ricostruita con maggiore accuratezza utilizzando esemplari del passato insieme a quelli moderni, e anche l'evoluzione dei geni può essere seguita alla ricerca della loro variazione tra diverse forme viventi ed estinte. L'identificazione di personalità importanti attraverso il confronto del profilo genetico con quello ottenuto dai discendenti è un altro obiettivo per il quale l'analisi genetica è indispensabile. L'analisi dell'aDNA può anche consentire l'identificazione di specie di strumenti o oggetti organici indeterminati. Nonostante il suo nome, il DNA antico in realtà non si riferisce a un particolare periodo di tempo. Il campione più antico finora analizzato è rappresentato da un esemplare di osso di ominide datato circa 400.000 anni da una grotta in Spagna [3] a un esemplare di osso di equide di 700.000 anni conservato nel permafrost [4]. Ma anche esemplari molto ravvicinati nel tempo possono presentare un elevato grado di degradazione del DNA dovuto a trattamenti di trasformazione del materiale e possono richiedere lo stesso approccio metodologico di quelli più antichi. La ricerca sull'aDNA soffre di alcuni problemi dovuti alla degradazione del materiale genetico a causa di processi biochimici avvenuti nel tempo o ai trattamenti a cui sono stati sottoposti i campioni. Fattori come la temperatura, il pH e processi come l'idrolisi e l'ossidazione, hanno portato il DNA alla frammentazione in brevi filamenti, principalmente per depurinazione [5], e ad una diminuzione della quantità di materiale genetico endogeno come conseguenza finale [6]. Nel frattempo, il campione si arricchisce di DNA esogeno proveniente da microrganismi ambientali o da persone che manipolano il campione, il che implica che il materiale genetico totale recuperato è dovuto a una miscela di diverse fonti biologiche da cui i ricercatori devono separare la componente originaria endogena. [7]. Anche lesioni ossidative [8] e crosslink intermolecolari possono rendere le molecole di DNA non più disponibili per le fasi analitiche [6]. Inoltre, le basi azotate che costituiscono la molecola del DNA possono essere influenzate dalla perdita idrolitica del gruppo amminico e questa modificazione può produrre misincorporazioni [6]. I prodotti di deaminazione della citosina (uracile) e della guanina (xantina) causano inserzioni errate delle basi (T invece di C e A invece di G) quando nuovi filamenti di DNA vengono sintetizzati da una DNA polimerasi [8-10]. Queste incorporazioni errate si verificano con frequenze più elevate all'estremità dei filamenti di DNA [7], poiché i singoli filamenti sporgenti all'estremità del frammento sono caratterizzati da un tasso di deaminazione più rapido [5,7]. È stata osservata una correlazione tra la percentuale di molecole di DNA con misincorporazioni e l'età del campione (ad eccezione dei campioni sottoposti a condizioni ambientali estreme) [11] e questo pattern può essere utilizzato per riconoscere le antiche molecole degradate da quelle moderne contaminanti quando analizzare i dati di sequenza [12,13]. Per ottenere risultati affidabili, nonostante la degradazione e la possibile contaminazione dei campioni, l'analisi genetica deve essere eseguita seguendo i criteri stringenti proposti per gli studi sul DNA antico [14]. I metodi per l'analisi dipendono dal materiale di partenza e dallo scopo della ricerca: diversi tipi di tessuti o tracce biologiche richiedono diversi approcci sperimentali per l'estrazione del DNA, e l'obiettivo genetico determina quale metodologia può essere la più appropriata tra la cosiddetta Prima Generazione o quelli di New Generation Sequencing (NGS) che verranno spiegati nei prossimi paragrafi.

2. Estrazione del DNA

Uno dei metodi di estrazione più utilizzati è il protocollo basato su fenolo-cloroformio [15]. Questo metodo separa le miscele di molecole in base alla loro solubilità differenziale, portando le proteine all'isolamento in una fase organica separata da una soluzione acquosa contenente DNA. Nel tempo sono stati sviluppati diversi protocolli di estrazione al fine di ottimizzare il recupero del DNA da particolari materiali degradati. Gli ultimi studi hanno dimostrato che l'uso esclusivo di EDTA e proteinasi K per la digestione e il legame del DNA alla silice tramite guanidina tiocianato o cloridrato per la purificazione rappresenta la migliore strategia per recuperare il materiale genetico in termini di quantità e qualità [16,17]. Soprattutto per i campioni degradati in cui il DNA è altamente frammentato, questo protocollo è associato all'uso di colonne di silice commerciali, al fine di recuperare anche frammenti di DNA molto brevi che potrebbero rappresentare la maggior parte del materiale endogeno [18,19]. Questi metodi sono stati testati soprattutto su campioni ossei, poiché questo è il materiale più disponibile da cui solitamente viene recuperato l'aDNA. Per altri materiali di partenza, come tessuti molli, tracce di sangue, peli e materiali vegetali, sono disponibili gli stessi protocolli e kit di estrazione commerciali, ma sono vantaggiosi approcci personalizzati con diverse impostazioni per la digestione al fine di ottimizzare la lisi cellulare e il rilascio di DNA (vedi [20] per esempi, [21] per l'estrazione da peli, [22] da piante, [23] da tessuti mummificati). Dopo che il DNA è stato estratto, sono possibili diversi approcci per selezionare le regioni genomiche di interesse e ottenere la loro sequenza. Poiché il DNA degradato è spesso presente in basso numero di copie, un'amplificazione della regione bersaglio rappresenta la migliore strategia da seguire. Fino al 2005 l'amplificazione delle regioni bersaglio veniva eseguita mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), quindi i prodotti ottenuti venivano solitamente clonati e sequenziati con il metodo di sequenziamento di Sanger. Questo rappresenta il cosiddetto "approccio classico" nel campo dell'aDNA, ed è ancora il migliore se l'obiettivo è studiare frammenti di DNA definiti con una lunghezza minima di circa 60 bp. Se invece il target è rappresentato da un gran numero di frammenti di DNA da studiare in parallelo, o interi genomi, la strategia migliore è quella di utilizzare le cosiddette metodiche di "Next Generation Sequencing", affermate negli ultimi dieci anni nella ricerca aDNA , insieme all'arricchimento del bersaglio mediante ibridazione. Vedere la Figura 1 per una vista schematica dei passaggi sperimentali.

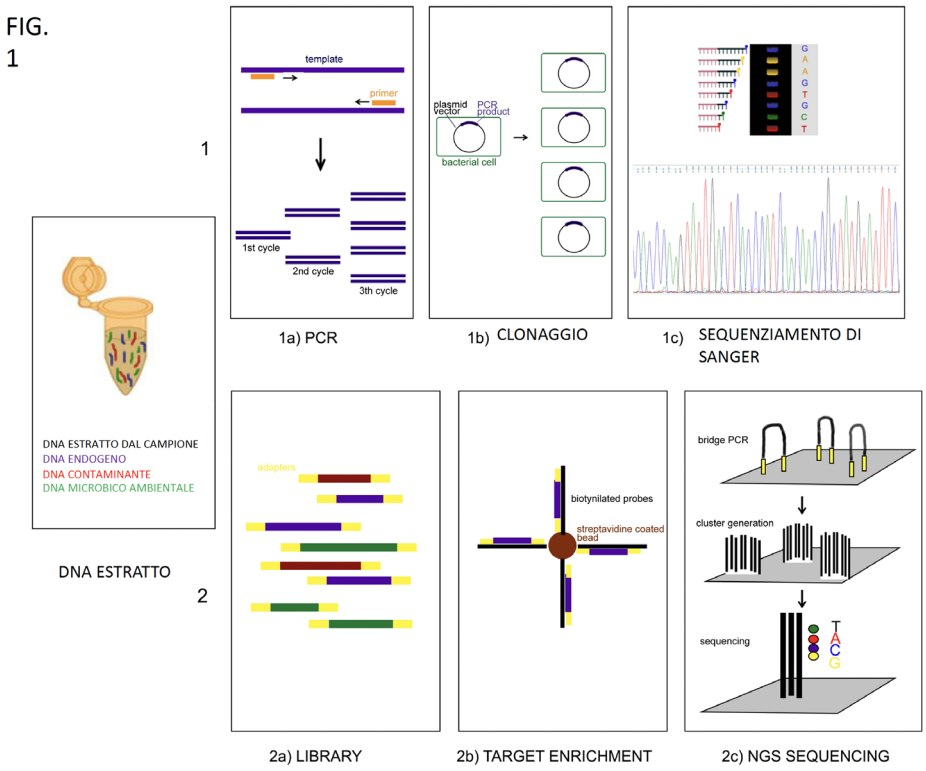


Figura 1: flusso di lavoro di laboratorio per l'analisi del DNA. Il primo step sperimentale è rappresentato dall'estrazione del DNA. In un campione degradato la soluzione di DNA ottenuta può essere costituita da molecole di diversa origine biologica: il cosiddetto DNA endogeno proveniente dal campione e solitamente degradato, eventuali molecole contaminanti provenienti da persone che hanno maneggiato il campione, e DNA microbico ambientale. Sono possibili due diversi approcci metodologici: 1) "approccio classico" basato su Polymerase Chain Reaction (PCR) e metodi di First Generation Sequencing (Sequenziamento di Sanger) e 2) approccio di New Generation Sequencing (NGS). Nel primo caso, 1a) il DNA bersaglio viene selezionato e amplificato mediante PCR, dove il DNA stampo viene denaturato nei due filamenti e i primer (in arancione) consentono alla DNA polimerasi di sintetizzare nuovi filamenti complementari. Dopo cicli termici ripetuti automatizzati, una crescita esponenziale del numero di copie del modello lo rende disponibile per le successive fasi sperimentali. 1b) Il clonaggio consiste nell'isolamento di una singola molecola proveniente da un prodotto di PCR in un vettore plasmidico che viene inserito in una cellula batterica e replicato con essa. 1c) Il sequenziamento di diversi cloni ottenuti da un prodotto di PCR consente di confrontare diverse molecole originali del campione e di comprenderne la composizione molecolare evidenziando possibili misincorporation dovute a danni al DNA e possibili contaminazioni. Seguendo l'approccio NGS, 2a) viene preparata una libreria legando degli adattatori (oligonucleotidi con una sequenza universale) alle molecole di DNA originali. 2b) è possibile eseguire l'eventuale arricchimento di particolari regioni al fine di aumentare la quantità target e renderla più disponibile per il sequenziamento. L'arricchimento del bersaglio in soluzione mediante l'uso di sonde di DNA biotinilato e sfere rivestite di streptavidina è mostrato come esempio [39]. 2c) Il sequenziamento NGS consiste in una prima fase chiamata Bridge PCR in cui le molecole della libreria vengono appaiate alla cella a flusso e amplificate mediante PCR utilizzando primer universali complementari agli adattatori durante la cosiddetta generazione di cluster. I cluster clonali ottenuti rappresentano il substrato per il sequenziamento quando, ad ogni ciclo di sequenziamento, viene determinata una nuova posizione nucleotidica leggendo il segnale fluorescente di ciascun dNTP marcato in modo fluorescente.

3. Approccio classico

L'approccio classico basato sulla selezione del bersaglio e l'amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR), ancora utile per alcune applicazioni, era l'unico disponibile da dieci anni. Poiché la ricerca sull'aDNA presenta difficoltà tecniche a causa delle possibili quantità minime e della natura degradata del DNA sopravvissuto e del rischio di contaminazione, è necessario seguire criteri particolari per autenticare i risultati. Gli standard per l'analisi con approccio classico sono stati riassunti da Cooper e Poinar nel 2000 [24]: area di lavoro fisicamente isolata, amplificazioni di controllo, comportamento molecolare appropriato, riproducibilità, clonazione, replicazione indipendente, conservazione biochimica, quantificazione, resti associati (Tabella 1).

Criteri per l'analisi dell'aDNA secondo Cooper e Poinar (2000) [24]	
Area di lavoro fisicamente isolate	Il laboratorio aDNA deve essere dedicato esclusivamente all'analisi dei campioni degradati e le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione devono essere fisicamente separate per evitare possibili contaminazioni dei campioni con DNA moderno o DNA amplificato
Controlli di Amplificazione	I controlli negativi sono necessari in ogni fase sperimentale per verificare l'assenza di contaminazione nei reagenti e nell'ambiente di lavoro
Comportamento molecolare appropriato	L'amplificazione di lunghi frammenti di DNA non è prevista da campioni degradati e se si è verificata è probabilmente dovuta a contaminazione. La sequenza ottenuta dovrebbe avere senso filogenetico.
Reproducibilità	Il risultato dovrebbe essere ottenuto da diversi estratti del campione.
Clonaggio	Poiché un campione degradato può essere rappresentato da una miscela di DNA proveniente da fonti diverse, il sequenziamento diretto del prodotto PCR può produrre sequenze disturbate a causa della sovrapposizione di segnali diversi o sequenza della fonte biologica più rappresentata che potrebbe non rappresentare la componente endogena del campione . La clonazione dei prodotti dell'amplificazione nel vettore batterico consente di analizzare la complessità molecolare del campione, verificando eventuali contaminazioni e misincorporations di sequenza dovute a danni al DNA.
Repliche indipendenti	I risultati devono essere ottenuti in modo indipendente almeno due volte in diversi laboratori.
Preservazione Biochimica	Altre analisi (come la racemizzazione degli amminoacidi) possono confermare la possibilità di conservazione del DNA nel campione.
Quantificazione	La quantificazione del DNA nel campione può essere eseguita mediante PCR competitiva o quantitativa (RT-PCR) per confermare la presenza di materiale genetico.
Reperti associati	L'analisi, ad esempio, dei resti faunistici associati al campione può confermare la possibilità di conservazione del DNA e può rappresentare un modo per controllare possibili contaminazioni umane moderne.

Tabella 1 Criteri standard per l'analisi dell'aDNA richiesti con l'approccio classico

3.1 Amplificazione del DNA mediante reazione a catena della polimerasi

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata scoperta nel 1981 e ha rappresentato una rivoluzione per la biologia molecolare [25]. Questo metodo permette una replicazione in vitro di frammenti di DNA, simulando quella che avviene in vivo nella cellula e amplificando esponenzialmente il target durante cicli termici ripetuti automatizzati. Necessita di una coppia di primer, oligonucleotidi con sequenza complementare all'inizio e alla fine del frammento di interesse, da cui parte l'amplificazione con l'estensione di un nuovo filamento di DNA complementare a quello originario grazie all'attività dell'enzima DNA polimerasi . Il DNA amplificato può quindi essere visualizzato mediante elettroforesi e può essere disponibile per il sequenziamento.

3.2 Clonaggio

Il DNA ottenuto da un campione antico può essere rappresentato da una miscela di molecole con origini diverse: DNA endogeno e contaminante proveniente dall'ambiente o dalle persone che hanno maneggiato il campione. Per questo motivo è necessaria la clonazione dei prodotti PCR per analizzare la composizione del campione. Il clonaggio consiste nell'inserire singole molecole ottenute mediante PCR in un vettore plasmidico che verrà prelevato da una cellula batterica e replicato con essa. In questo modo singole molecole di un prodotto di PCR possono essere isolate e sequenziate indipendentemente, consentendo di confrontarle tra loro e verificare se provengono da diverse fonti biologiche e/o portano segnali di danni molecolari (Figura 2).

3.3 Sequenziamento di Sanger

Il metodo di sequenziamento sviluppato da Sanger nel 1977 è stato l'unico utilizzato per 30 anni ed è oggi considerato una tecnologia di "prima generazione". Si basa sulla sintesi di un modello di DNA complementare utilizzando inibitori di terminazione della catena. La reazione di sequenza coinvolge la DNA polimerasi e sia i 2-deossinucleotidi trifosfati (dNTP) che i 2,3-dideossinucleotidi (ddNTP), questi ultimi rappresentano gli inibitori di terminazione della catena. Vengono generati frammenti nidificati marcati con fluorescenza, che terminano in diversi punti della molecola di DNA originale [26]. Dopo la reazione di sequenziamento, è necessaria un'elettroforesi capillare per separare i frammenti nidificati in base alla dimensione e un raggio laser provoca la fluorescenza dei coloranti sui frammenti. La sequenza dei segnali di fluorescenza viene registrata da un dispositivo di rilevamento ottico che produce un grafico a quattro colori poiché ogni base nitrosa emette un colore diverso. Un software converte il segnale di fluorescenza in dati digitali: un cromatogramma che può essere tradotto in una sequenza di basi nitrose. Per i campioni degradati, dopo la clonazione dei prodotti di PCR, è necessario sequenziare diversi cloni (ciascuno derivante da una singola molecola del prodotto

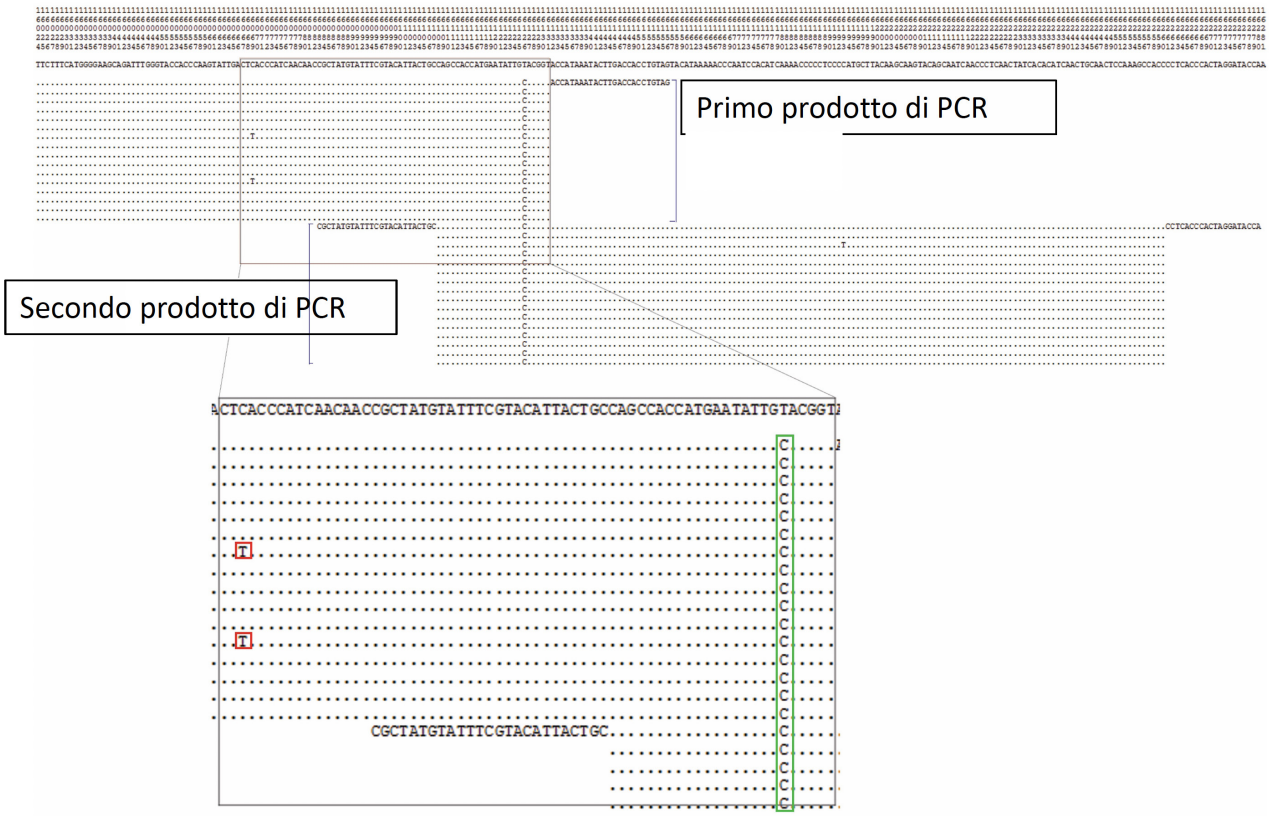


Figura 2: Esempio di allineamento di cloni da diversi prodotti PCR. Le sequenze di cloni di due diverse PCR sono allineate tra loro e rispetto alla sequenza di riferimento. Le due PCR sono progettate per amplificare due frammenti parzialmente sovrapposti. Vengono sequenziati sedici cloni per ciascun prodotto di PCR. Dall'alto: i numeri da 16024 a 16281 rappresentano le posizioni nucleotidiche di un frammento della regione ipervariabile mitocondriale I (HVRI); la sequenza nucleotidica al di sotto delle posizioni è la sequenza di riferimento utilizzata per confrontare e descrivere la sequenza del campione; sequenze di cloni dove i nucleotidi identici alla sequenza di riferimento sono indicati con punti; per il primo clone sono indicate le sequenze dei primer utilizzati per le PCR. Nel riquadro ingrandito sono evidenziate in rosso le tipiche misincorporazioni da C a T, mentre in verde è evidenziata una mutazione nucleotidica confermata in tutti i cloni e in diversi prodotti di PCR.

di PCR). Dal confronto di diversi cloni è possibile evidenziare le differenze nucleotidiche, che possono essere dovute a misincorporations o alla presenza di diverse fonti biologiche [27]. Una sequenza di consenso che rappresenta quella endogena originale può quindi essere costruita dalle sequenze di cloni selezionate tenendo conto di possibili incorporazioni errate e contaminazioni da parte di ricercatori noti che hanno maneggiato il campione [28].

4. Sequenziamento di nuova generazione

Dal 2005, i metodi di Next Generation Sequencing (NGS) sono stati applicati alla ricerca dell'aDNA [29-31], sequenziando il genoma nucleare di un mammut e di un uomo di Neanderthal. NGS ha rappresentato una rivoluzione rispetto al metodo classico basato sulla PCR per diversi motivi. Prima di tutto, le piattaforme di sequenziamento ad alto rendimento utilizzate in NGS generano dati da miliardi di frammenti di DNA per corsa di sequenziamento, con una sostanziale riduzione dei costi rispetto al metodo Sanger automatizzato [32]. Quindi, la preparazione del campione per NGS permette di osservare le caratteristiche originarie delle molecole di DNA, come la loro lunghezza e l'eventuale degradazione, trasformando in un vantaggio ciò che rappresentava un problema nel metodo classico. Infatti, le molecole di DNA più corte non sono rilevabili dalla PCR, perché il metodo richiede che l'intera sequenza di primer (che sono solitamente di circa 20 bp ciascuno) sia presente prima e dopo la regione target, determinando che solo le molecole con una lunghezza minima di 50 bp sono disponibile per essere selezionato. Ma in un campione degradato, la maggior parte del materiale endogeno potrebbe essere rappresentato da molecole di DNA molto corte. Anche il modello di danno può essere riconoscibile da NGS, perché le estremità originali delle molecole non vengono modificate durante la preparazione del campione. L'analisi del pattern di danno può essere utilizzata per valutare lo stato antico delle sequenze, consentendo di separarle da possibili contaminanti moderni. Sono disponibili diverse piattaforme di sequenziamento, con diverse procedure per la preparazione del templato, il sequenziamento e l'imaging [33], ma quella più utilizzata nel campo dell'aDNA è la tecnologia Illumina/Solexa principalmente per la sua capacità di sequenziare frammenti più corti.

4.1 Preparazione della libreria

I campioni di DNA devono essere convertiti in libreria prima di essere sequenziati con NGS. La libreria consiste in una raccolta di frammenti di DNA preparati mediante legatura dell'adattatore e tagmentazione. Gli adattatori sono rappresentati da oligonucleotidi con sequenza nucleotidica nota che permettono di immortalare e amplificare tutte le molecole presenti nella libreria con primer universali. La tagmentazione consiste nell'aggiungere una breve sequenza nota univocamente assegnata a ciascun campione (codice a barre o indice), che permette di riconoscerlo anche se sequenziato in pool insieme ad altri campioni [34]. Esistono kit commerciali pronti all'uso per la preparazione delle librerie, ma per i campioni altamente degradati è stato sviluppato un protocollo personalizzato al fine di ottimizzare i risultati e

avere la possibilità di regolare ogni fase della preparazione in base alla qualità del singolo campione. Il primo protocollo personalizzato è stato pubblicato da Meyer e Kircher nel 2010 [35] per la preparazione di librerie a doppio filamento per piattaforme Illumina e consisteva in fasi separate di riparazione dell'estremità smussata delle estremità delle molecole, legatura dell'adattatore e pcr di indicizzazione per l'aggiunta codici a barre a ciascun campione. Nel 2013 un nuovo protocollo per la preparazione di librerie a filamento singolo ha dimostrato una maggiore capacità di recuperare sequenze endogene più brevi e di ottenere una maggiore proporzione di DNA endogeno rispetto all'ambiente [36]. Consiste in una preparazione della libreria eseguita legando un oligonucleotide adattatore biotinilato alle estremità 3 'del DNA denaturato al calore e l'immobilizzazione su sfere rivestite di streptavidina dei filamenti risultanti che vengono poi copiati con una polimerasi prima di attaccare un secondo adattatore mediante smusso- terminare la legatura [37]. Le Librerie possono anche essere costruite utilizzando gli enzimi uracile-DNA-glicosilasi (UDG), che scinde le citosine deaminate (uracili), e Endo VIII, che taglia i siti abasici risultanti, riducendo il tasso di errori del DNA antico [38]. Questo approccio può essere utile per evitare errori di interpretazione durante l'analisi della sequenza a causa di incorporazioni errate. Ma le misincorporazioni rappresentano anche un modo per riconoscere le molecole antiche da quelle contaminanti moderne. Per questo motivo è stato sviluppato un recente protocollo in cui la libreria è parzialmente trattata con UDG [39], con le molecole risultanti che non presentano più nucleotidi danneggiati se non alle basi terminali che rimangono disponibili per la stima dell'autenticità del DNA. Le librerie possono essere sequenziate direttamente con un cosiddetto approccio shotgun che consiste nel sequenziare l'intera libreria che rappresenta tutti i componenti molecolari del campione. Ma di solito l'alto contenuto di DNA microbico rende antieconomico il sequenziamento di campioni antichi. Per questo motivo sono stati sviluppati metodi per l'arricchimento del target al fine di aumentare la frazione target endogena disponibile per il sequenziamento rispetto a quella esogena.

4.2 Arricchimento del target

I metodi per l'arricchimento del target sono disponibili e possono essere utilizzati sia durante la preparazione della libreria che successivamente per la selezione di particolari frammenti di interesse. La prima strategia consiste nell'incorporazione preferenziale di molecole caratterizzate da danni tipici del DNA antico durante la preparazione della libreria [40]. La seconda consiste nell'utilizzare un set di sonde, complementari al target, per catturare le molecole di interesse mediante ibridazione in soluzione [41] o su microarray [42]. L'obiettivo potrebbe essere l'intero genoma mitocondriale (vedi [3,43,44] per esempio), genomi batterici patogeni [45-47], SNP nucleari [48], esomi [42,49], cromosomi [50] o intero genoma nucleare [51-53].

4.3 Sequenziamento

Il sequenziamento su piattaforme Illumina consiste in un primo passaggio chiamato generazione di cluster. Un pool di librerie viene caricato in una cella a flusso in cui i frammenti di DNA vengono catturati da oligonucleotidi complementari all'adattatore della libreria. Quindi un'amplificazione a ponte produce cluster clonali originati da una singola molecola di DNA originale. I cluster sono necessari per amplificare il segnale emesso dai nucleotidi durante il sequenziamento, in modo da renderlo rilevabile. Durante il sequenziamento, ad ogni ciclo di sequenziamento vengono incorporati dNTP reversibili legati al terminatore complementari al modello. Ad ogni ciclo viene aggiunto un singolo nucleotide marcato in modo fluorescente, la cella a flusso viene sottoposta a imaging e viene registrata l'emissione di ciascun cluster. Avendo ciascuna base una particolare emissione di lunghezza d'onda, i segnali fluorescenti possono essere tradotti in una sequenza di basi.

4.4 PCR e NGS

La PCR è ancora la procedura più efficiente per selezionare selettivamente una regione del DNA target. Infatti, tra i metodi per l'arricchimento sulle librerie, nessuno ha un'efficienza del 100% per il recupero del target. Per questo motivo, la PCR dovrebbe comunque rappresentare la strategia migliore quando il target è un frammento o un insieme di frammenti ben definito. I prodotti di PCR possono essere convertiti in librerie e sequenziati mediante approccio NGS al fine di ottenere un numero elevato di sequenze e una risoluzione più elevata che può aiutare a trovare quantità anche molto basse di DNA endogeno.

5. Analisi dei dati

I dati di sequenza ottenuti con il metodo Sanger sono rappresentati da cromatogrammi e sono disponibili diversi software per visualizzarli ed esplorarli. Le sequenze convertite in un formato basato su testo (fasta) possono essere utilizzate per l'allineamento con le sequenze di riferimento al fine di evidenziare eventuali differenze nucleotidiche e descrivere il motivo della sequenza del campione. Nell'aDNA, poiché ogni prodotto di PCR viene solitamente clonato, è necessario un primo allineamento e confronto tra i cloni per produrre la sequenza di consenso finale del campione. L'allineamento è il passaggio fondamentale per ogni analisi, sia per confrontare i campioni tra loro o con un database, sia per creare alberi filogenetici o reti e per eseguire analisi genetiche funzionali, evolutive o di popolazione. I software per l'allineamento delle sequenze sono ad esempio Blast [54] (per l'allineamento a coppie), Clustal [55], Muscle [56] e Mafft [57] (per l'allineamento multiplo). Per i dati NGS su aDNA, sono state sviluppate alcune pipeline specifiche. Gli strumenti per un'analisi dei dati primari sono stati proposti da Kircher nel 2012 [58] considerando che i dati NGS per campioni di DNA antico possono includere errori di sequenziamento e artefatti, danni, sequenze chimeriche e ambiguità durante l'allineamento a causa della breve lunghezza delle molecole. Per la mappatura rispetto ai genomi di riferimento, è stato sviluppato Mapping Iterative Assembler (MIA) [43] tenendo conto dell'accumulo di incorporazioni errate alle estremità delle sequenze e ottimizzando la mappatura per letture brevi e dati di bassa qualità. Dopo la mappatura, è necessario un controllo di autenticazione delle sequenze per verificare che siano originate dalla componente endogena del campione e non provengano da contaminanti. Il tipico pattern di misincorporation rappresenta uno degli strumenti per verificare l'autenticità del risultato, anche se particolari condizioni diagenetiche possono produrre un livello di danno variabile in campioni della stessa età [59]. MapDamage [60] e pmdtools [13] sono software che stimano e descrivono

il pattern di misincorporation (Figura 3), quest'ultimo permettendo di filtrare anche sequenze con segnali di danno. Gli strumenti per stimare i livelli di contaminazione in un campione si basano sul confronto tra i profili delle sequenze e la variazione nota tra le popolazioni o le specie [61-63] e sono stati sviluppati finora per i dati mitocondriali. Per i dati nucleari la contaminazione potrebbe non riflettere la stessa situazione osservata per il mitocondrio [64], e l'analisi dei livelli di ererozigosi sui cromosomi sessuali può rappresentare una fonte informativa [64,65]. Il pacchetto Paleomix proposto nel 2014 [66] integra in un'unica rimozione dell'adattatore della pipeline [67], la mappatura rispetto ai genomi di riferimento mediante Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [68] o Bowtie [69], la rimozione del duplicato PCR [70], la caratterizzazione di e risarcimento per danno post mortem da parte di MapDamage [60], chiamata SNP e inferenza filogenomica di massima verosimiglianza, e profila anche il contenuto metagenomico dei campioni. Schmutzi è un software che analizza la contaminazione, la frequenza di deaminazione e la distribuzione della lunghezza delle molecole e deduce la sequenza del genoma endogeno anche in presenza di elevata contaminazione [71].

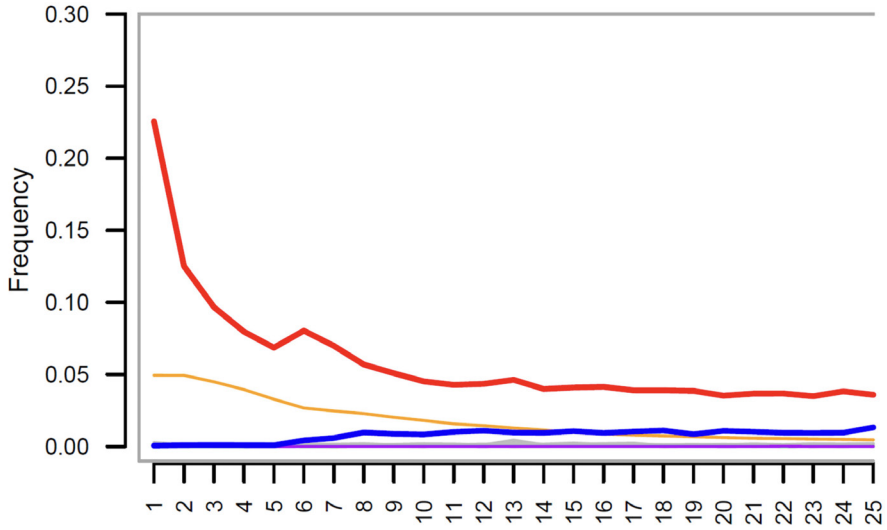


Figura 3: Esempio di grafico del modello di misincorporation ottenuto con il software MapDamage. Percentuale di frequenza delle sequenze con sostituzioni nucleotidiche nelle prime 25 posizioni della sequenza in un campione umano medievale. La linea rossa rappresenta le sostituzioni da C a T e la loro frequenza aumenta verso la fine della molecola, in uno schema tipico per l'aDNA.

6. Applicazioni

I metodi precedentemente descritti sono aperti ad un'ampia gamma di applicazioni nel campo dei beni culturali, a causa della variabilità dei materiali e dei possibili argomenti. I materiali possono appartenere ad un arco temporale di pochi anni fino alla preistoria. Le ossa sono gli esemplari più studiati poiché sono abbondanti nei siti archeologici e talvolta quelli con la migliore conservazione della componente genetica, ma sono stati pubblicati con successo anche studi su altri tipi di materiali. Alcuni casi di studio sono descritti nei paragrafi successivi.

6.1 Origine della specie di materiale sconosciuto

Uno degli interrogativi che le tecniche di analisi dell'aDNA possono aiutare a risolvere è da quale organismo (animale o vegetale) derivi un artefatto, uno strumento o un materiale. Tale determinazione può essere definita a diverso livello tassonomico e talvolta anche a livello individuale, a seconda della variabilità genetica (e della sua conoscenza) della specie, potendo comprendere il luogo di origine dell'individuo nei casi in cui sia presente una struttura filogeografica definita per il marcatore genetico analizzato. Come riassunto in Burger et al. 2000 [72] esistono tre gruppi importanti di materie prime: collagene, contenuto di vasi, recipienti e altri contenitori, leganti, colle e oli. Il DNA è stato recuperato con successo da papiri egizi [73], manoscritti ellenici [74], da campioni di cuoio moderni e medievali [75] così come un campione di cuoio dal rivestimento della testa del martello di un pianoforte creato nel 1802 simile a quello usato da Beethoven [76]. I dati genetici sono stati ottenuti da gambali in pelle neolitici [77], lana di pecora [78] e residui su strumenti di pietra [79]. Con l'approccio classico, i marcatori genetici amplificabili mediante PCR comunemente utilizzati per l'identificazione delle specie sono i geni dell'RNA ribosomiale del citocromo b, 12s e 16 del mitocondrio, eventualmente seguiti dalla determinazione della regione mitocondriale D-loop per l'analisi della variabilità intraspecifica e dell'assegnazione individuale. Pangallo et al. ha proposto una strategia basata sulla PCR per l'identificazione della pelle animale utilizzata per la produzione di pergamene storiche [80] anche se la complessità del profilo genetico di questo tipo di campioni è stata attestata contemporanea poiché inchiostro e colle animali sono probabilmente utilizzati durante la produzione di pergamene introducendo molteplici fonti biologiche da diverse specie e/o individui [81]. Un recente studio basato sull'approccio NGS focalizzato sullo stesso tipo di campioni di provenienza inglese settentrionale del XVII e XVIII secolo, ha dimostrato che questo materiale è un substrato altamente adatto per analisi di aDNA su larga scala permettendo di identificare l'origine della specie e di utilizzare questi dati per ottenere informazioni sul bestiame storico grazie all'alta risoluzione della metodologia NGS [82]. Il DNA è stato recuperato anche dai dipinti, determinando l'origine delle colle animali attraverso l'analisi del DNA mitocondriale [83]. Pochi lavori pubblicati sono disponibili anche su materiali conservati in diversi tipi di contenitori: un vaso atzeco rivelato contenere DNA di una vite con un agente farmacologico ancora utilizzato dagli indiani d'America [72]. Tracce di derrate alimentari sono state rilevate anche in un recipiente celtico di pelle animale [72]. Dal residuo all'interno di uno dei primi vasi da vino dell'antico Egitto, datato al 3000 a.C., è stata trovata la più antica testimonianza di Saccharomyces cerevisiae associata alle attività umane per la fermentazione del vino [84].

6.2 Identificazione personale

L'analisi del DNA ha permesso l'identificazione personale dei resti di personaggi famosi confrontando il loro profilo genetico con i discendenti presunti. Nel 2012 è stato trovato uno scheletro nel presunto luogo di riposo del re Riccardo III. Le analisi NGS, basate su cattura di ibridazione su array e PCR, dei resti scheletrici hanno permesso di ottenere un genoma mitocondriale completo che mostrava una corrispondenza perfetta con il profilo di un parente vivente e una sostituzione a base singola rispetto a un secondo parente. Gli SNP del cromosoma Y sono stati determinati e differivano dai parenti di linea maschile probabilmente a causa di un evento di falsa paternità in qualsiasi generazione intermedia. Gli SNP fenotipici ottenuti dal sistema HIrisPlex [85] hanno predetto il colore dei capelli e degli occhi coerente con l'aspetto del re in un primo ritratto con la conclusione statistica che le prove che i resti fossero quelli di Riccardo III erano schiaccianti [86]. Un altro caso di resti attribuiti a un re è rappresentato da un fazzoletto intinto nel presunto sangue del re francese Luigi XVI. Il genoma completo è stato sequenziato mediante approccio NGS e il profilo ottenuto non sembrava compatibile con l'ascendenza nota del re né con la descrizione del re per alcuni tratti fenotipici [87]. Anche se i discendenti non sono disponibili per un confronto, l'aDNA può rivelare informazioni utili per la caratterizzazione dei resti. Un esempio è quello del poeta italiano Petrarca: l'analisi dell'aDNA sui suoi presunti resti ha rivelato che il cranio e lo scheletro postcraniale appartenevano a individui diversi, confermando l'ipotesi di profanazione della tomba [88]. È stato analizzato anche il corpo attribuito all'evangelista Luca. Secondo le fonti storiche scritte, l'Evangelista sarebbe nato in Siria, ma un'eventuale sostituzione delle sue reliquie potrebbe essere avvenuta a Costantinopoli. Il confronto tra i dati mitocondriali ottenuti dalle reliquie con quelli delle popolazioni moderne ha indicato che un'origine siriana dell'individuo era la più probabile, anche se non si può escludere quella turca [89].

6.3 Studio e valorizzazione di campioni particolari

Alcuni esemplari particolari, importanti per l'eccezionalità della loro conservazione, la loro completezza e il loro potere informativo, sono stati alla ribalta di studi finalizzati alla loro valorizzazione e alla ricostruzione di particolari della storia passata. L'Uomo venuto dal ghiaccio tirolese (Ötzi) visse durante la transizione neolitico-età del rame e il suo corpo mummificato fu recuperato nel 1991 rappresentando un ritrovamento eccezionale. Sono stati condotti diversi studi molecolari al fine di ottenere quante più informazioni possibili sulla sua vita e sull'ambiente in cui viveva. 'presenza [92]; campioni del contenuto intestinale sono stati analizzati per determinare gli ultimi pasti e i residui di polline al fine di recuperare informazioni circa 5.000 anni fa paleo-dieta e ambiente [93]. Un altro straordinario esemplare è uno degli scheletri di ominide più completi mai ritrovati nelle grotte carsiche di Lamalunga, nei pressi di Altamura (Italia). Lo scheletro è in parte inglobato in concrezioni calcitiche ed è ricoperto da formazioni coralloidi, quindi un accurato studio morfologico non è mai stato possibile. L'analisi del DNA antico su un frammento osseo ha permesso di definire il campione come Homo neandertalensis [94] e la totale assenza di contaminazione dovuta alla sua posizione nella grotta e alle precauzioni durante il suo recupero rende questo campione un candidato speciale per esplorare le caratteristiche genetiche dei Neanderthal. I resti umani paleo-eschimesi rinvenuti in un primo insediamento groenlandese di Saqqaq e datati a 3400-4500 anni fa hanno rappresentato una preziosa fonte informativa per comprendere le dinamiche migratorie verso il Nuovo Mondo e per una ricostruzione individuale grazie alla straordinaria buona conservazione del DNA nel permafrost. Utilizzando i dati mitocondriali [95] e del genoma nucleare [96] è stato possibile identificare una prima migrazione dalla Siberia al Nuovo Mondo circa 5.500 anni fa e non direttamente correlata ai nativi americani o ai successivi neo-eschimesi che li hanno sostituiti. Gli SNP funzionali nucleari sono stati utilizzati anche per determinare le caratteristiche fenotipiche dell'individuo.

6.4 Antiche popolazioni

L'analisi del DNA di campioni antichi ha dato un grande contributo anche per la comprensione della storia passata delle popolazioni umane. Dall'inizio della ricerca sull'aDNA, i Neanderthal e il loro rapporto con gli esseri umani moderni hanno rappresentato un argomento di interesse principale. Grazie a numerosi lavori, basati sia sulla metodologia classica che su quella NGS, incentrati sia sui genomi mitocondriali che nucleari, sono ora disponibili molte informazioni su questa specie, sulle sue caratteristiche e dinamiche di popolazione, sul suo ruolo evolutivo nella filogenesi del genere Homo e i suoi tratti genetici fenotipici e funzionali [97]. Una recente analisi su 101 antichi esseri umani dell'Eurasia ha confermato che l'età del bronzo fu un periodo di grandi cambiamenti culturali. Grazie ai dati genomici è stato determinato che si sono verificate migrazioni e sostituzioni di popolazione su larga scala e che probabilmente sono responsabili della maggior parte dell'attuale struttura demografica sia in Europa che in Asia. Queste migrazioni potrebbero anche essere coerenti con l'ipotizzata e lungamente dibattuta diffusione delle lingue indoeuropee durante la prima età del bronzo [98]. Altre analisi possono essere condotte per identificare il luogo di origine di popolazioni definite archeologicamente e le loro relazioni genealogiche con le popolazioni moderne. Questo tipo di analisi si basa su simulazioni in cui dati antichi e moderni vengono messi insieme in diversi possibili scenari demografici che possono tenere conto anche di informazioni storiche e archeologiche. Grazie a questo approccio è stata trovata continuità genetica tra gli Etruschi e alcune popolazioni moderne della Toscana [99], così come tra i Longobardi e una popolazione moderna dell'Italia nord-occidentale [100].

7. Osservazioni finali

Anche se questo capitolo offre solo alcuni esempi di opere pubblicate in cui l'analisi dell'aDNA ha contribuito al vasto mondo dei beni culturali, è evidente da una ricerca bibliografica che alcuni possibili campi di applicazione non sono ancora ampiamente sfruttati. In particolare, l'analisi dell'aDNA per la determinazione dell'origine delle specie dei materiali non è ancora una procedura di routine, anche se potrebbe rappresentare un test importante e altamente affidabile per supportare lo studio e la valorizzazione di reperti preistorici e storici.

Step analitici	Software	Descrizione
Analisi dei dati primari	fastQprocessing [56]	Il pacchetto fornisce strumenti per il demultiplexing delle letture di sequenza in base al loro indice/indici dopo il sequenziamento parallelo di un pool di campioni, la rimozione di artefatti della libreria, il taglio dell'adattatore, l'unione di letture R1 e R2 per il sequenziamento paired-end e il filtraggio per lunghezza, filtro di qualità per evitare possibili errori di sequenza, identificazione del componente endogeno dal background ambientale, stima della contaminazione, rimozione dei prodotti clonali.
Mappaggio	Mapping Iterative Assembler (MIA) [43]	Il pacchetto prevede l'allineamento dei frammenti di sequenziamento del DNA a un riferimento, quindi chiama un consenso. Il consenso viene utilizzato come nuovo riferimento e il processo viene ripetuto fino alla convergenza. Supporta una matrice di sostituzione specifica della posizione, che migliora sia l'allineamento che il consenso richiamando l'aDNA danneggiato chimicamente.
Mappaggio	Burrows-Wheler Aligmment [68]	Il pacchetto è progettato per sequenze contro genomi di riferimento, anche grandi come il genoma umano.
Pattern di Misincorporazione	MapDamage [60]	Il software tiene traccia e quantifica i modelli di danno al DNA.
Pattern di Misincorporazione	PMDtools [13]	PMDtools consente l'identificazione di sequenze di DNA degradate che difficilmente originano dalla moderna contaminazione e la loro separazione al fine di ridurre le frazioni di contaminazione a livelli trascurabili.
Contamination check	Contamination Checker [43]	Il programma determina se un mitocondrio assemblato è esente da contaminazione. Cerca le posizioni in cui la sequenza di consenso differisce da un pannello di mitocondri umani noti, quindi classifica ciascuna lettura come appartenente al campione o come contaminante presunto.
Contamination check	ContamMix [63]	Il metodo stima il livello di contaminazione del DNA umano nelle sequenze mitocondriali, confrontando le affinità delle letture con la sequenza di consenso, rispetto alla loro affinità con un set di dati di potenziali contaminanti rappresentato da 311 mitogenomi di popolazioni mondiali.
Analisi dei dati	PALEOMIX [66]	Il pacchetto automatizza in gran parte le analisi relative ai dati NGS, eseguendo una serie di analisi, tra cui taglio della lettura, collasso di coppie di accoppiamenti sovrapposte, mappatura della lettura, rimozione dei duplicati PCR, chiamata SNP, profilazione metagenomica e quantificazione dei danni post mortem, incorporazione errata e modelli di frammentazione. Fornisce la ricostruzione degli alberi filogenomici di massima verosimiglianza e delle relazioni filogenetiche evolutive tra i taxa.
Analisi dei dati	SCHMUTZI [71]	Il software stima il pattern di contaminazione e misincorporation e ricostruisce i genomi mitocondriali endogeni anche per i campioni con una contaminazione superiore al 50%.

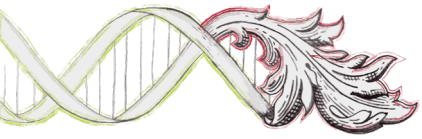
Tabella 2. Panoramica sugli strumenti bioinformatici più comunemente usati disponibili per l'analisi dell'aDNA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Paabo, S., Molecular-Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. Nature, 1985. 314(6012): p. 644-645.
2. Higuchi, R., et al., DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. Nature 1984. 312: p. 282–84.
3. Meyer, M., et al., A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. Nature, 2014. 505(7483): p. 403-6.
4. Orlando, L., et al., Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. Nature, 2013. 499(7456): p. 74-8.
5. Lindahl, T., Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature, 1993. 362(6422): p. 709-15.
6. Paabo, S., Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(6): p. 1939-43.
7. Briggs, A.W., et al., Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(37): p. 14616-21.
8. Paabo, S., et al., Genetic analyses from ancient DNA. Annual Review of Genetics, 2004. 38: p. 645-79.
9. Hansen, A., et al., Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. Molecular Biology and Evolution, 2001. 18(2): p. 262-5.
10. Gilbert, M.T., et al., Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. American Journal of Human Genetics, 2003. 72(1): p. 48-61.
11. Sawyer, S., et al., Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. Plos One, 2012. 7(3): p. e34131.
12. Ginolhac, A., et al., mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences. Bioinformatics, 2011. 27(15): p. 2153-5.
13. Skoglund, P., et al., Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(6): p. 2229-34.
14. Knapp, M., C. Lalueza-Fox, and M. Hofreiter, Re-inventing ancient human DNA. Investig Genet, 2015. 6: p. 4.
15. Lalueza-Fox, C., et al., A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. Science, 2007. 318(5855): p. 1453-5.

16. Rohland, N. and M. Hofreiter, Comparison and optimization of ancient DNA extraction. Biotechniques, 2007. 42(3): p. 343-352.
17. Rohland, N. and M. Hofreiter, Ancient DNA extraction from bones and teeth. Nature Protocols, 2007. 2(7): p. 1756-1762.
18. Dabney, J., et al., Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. 110(39): p. 15758-15763.
19. Gamba, C., et al., Comparing the performance of three ancient DNA extraction methods for high-throughput sequencing. Mol Ecol Resources, 2015, Sep 24.
20. Cigliero, S.D., E. Edalucci, and P. Fattorini, DNA Extraction from Blood and Forensic Samples, in Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues, G. Stanta, Editor. 2011, Springer Link. p. 45-54.
21. Pilli, E., et al., Pet fur or fake fur? A forensic approach. Investig Genet, 2014. 5: p. 7.
22. Kistler, L., Ancient DNA extraction from plants. Methods Mol Biol, 2012. 840: p. 71-9.
23. Hekkala, E., et al., An ancient icon reveals new mysteries: mummy DNA resurrects a cryptic species within the Nile crocodile. Molecular Ecology, 2011. 20(20): p. 4199-215.
24. Cooper, A. and H.N. Poinar, Ancient DNA: do it right or not at all. Science, 2000. 289(5482): p. 1139.
25. Mullis, K. B. and F. A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymoly, 1987. 155:335-50.
26. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
27. Hofreiter, M., et al., DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. Nucleic Acids Research, 2001. 29(23): p. 4793-9.
28. Bower, M.A., et al., How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence? Nucleic Acids Research, 2005. 33(8): p. 2549-56.
29. Poinar, H.N., et al., Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. Science, 2006. 311(5759): p. 392-4.
30. Green, R.E., et al., Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. Nature, 2006. 444(7117): p. 330-6.
31. Noonan, J.P., et al., Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. Science, 2006. 314(5802): p. 1113-8.
32. Schloss, J.A., How to get genomes at one ten-thousandth the cost. Nature Biotechnology, 2008. 26(10): p. 1113-5.
33. Metzker, M.L., Sequencing technologies - the next generation. Nature Reviews Genetics, 2010. 11(1): p. 31-46.
34. Head, S.R., et al., Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. Biotechniques, 2014. 56(2): p. 61-4, 66, 68, passim.
35. Meyer, M. and M. Kircher, Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. Cold Spring Harb Protoc, 2010. 2010(6): p. pdb prot5448.
36. Bennett, E.A., et al., Library construction for ancient genomics: single strand or double strand? Biotechniques, 2014. 56(6): p. 289-90, 292-6, 298, passim.
37. Gansauge, M.T. and M. Meyer, Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. Nature Protocols, 2013. 8(4): p. 737-48.
38. Briggs, A.W., et al., Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA. Nucleic Acids Research, 2010. 38(6).
39. Rohland, N., et al., Partial uracil - DNA - glycosylase treatment for screening of ancient DNA. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2015. 370(1660).
40. Gansauge, M.T. and M. Meyer, Selective enrichment of damaged DNA molecules for ancient genome sequencing. Genome Research, 2014. 24(9): p. 1543-9.
41. Maricic, T., M. Whitten, and S. Paabo, Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. Plos One, 2010. 5(11): p. e14004.
42. Burbano, H.A., et al., Targeted investigation of the Neandertal genome by array-based sequence capture. Science, 2010. 328(5979): p. 723-5.
43. Briggs, A.W., et al., Targeted retrieval and analysis of five Neandertal mtDNA genomes. Science, 2009. 325(5938): p. 318-21.
44. Dabney, J., et al., Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(39): p. 15758-63.
45. Devault, A.M., et al., Ancient pathogen DNA in archaeological samples detected with a Microbial Detection Array. Sci Rep, 2014. 4: p. 4245.
46. Bos, K.I., et al., A draft genome of Yersinia pestis from victims of the Black Death. Nature, 2011. 478(7370): p. 506-10.
47. Bos, K.I., et al., Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. Nature, 2014. 514(7523): p. 494-7.
48. Haak, W., et al., Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. Nature, 2015. 522(7555): p. 207-11.
49. Castellano, S., et al., Patterns of coding variation in the complete exomes of three Neandertals. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(18): p. 6666-71.
50. Fu, Q., et al., DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(6): p. 2223-7.
51. Carpenter, M.L., et al., Pulling out the 1%: whole-genome capture for the targeted enrichment of ancient DNA sequencing libraries. American Journal of Human Genetics, 2013. 93(5): p. 852-64.
52. Enk, J.M., et al., Ancient whole genome enrichment using baits built from modern DNA. Molecular Biology and Evolution, 2014. 31(5): p. 1292-4.
53. Avila-Arcos, M.C., et al., Application and comparison of large-scale solution-based DNA capture-enrichment methods on ancient DNA. Sci Rep, 2011. 1: p. 74.
54. Camacho, C., et al., BLAST+: architecture and applications. Bmc Bioinformatics, 2009. 10: p. 421.
55. Larkin, M.A., et al., Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 2007. 23(21): p. 2947-8.
56. Edgar, R.C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 2004. 32(5): p. 1792-7.
57. Katoh, K. and D.M. Standley, MAFFT: iterative refinement and additional methods. Methods Mol Biol, 2014. 1079: p. 131-46.
58. Kircher, M., ed. Analysis of High-Throughput Ancient DNA Sequencing Data. Ancient DNA: Methods and Protocols, ed. B. Shapiro and M. Hofreiter. Vol. 840. 2012, Springer Link. 197*228.
59. Orlando, L., M.T. Gilbert, and E. Willerslev, Reconstructing ancient genomes and epigenomes. Nature Reviews Genetics, 2015.

16(7): p. 395-408.
60. Jonsson, H., et al., mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. Bioinformatics, 2013. 29(13): p. 1682-4.
61. Green, R.E., et al., A draft sequence of the Neandertal genome. Science, 2010. 328(5979): p. 710-22.
62. Sanchez-Quinto, F., et al., Genomic affinities of two 7,000-year-old Iberian hunter-gatherers. Current Biology, 2012. 22(16): p. 1494-9.
63. Fu, Q., et al., A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. Current Biology, 2013. 23(7): p. 553-9.
64. Green, R.E., et al., The Neandertal genome and ancient DNA authenticity. Embo Journal, 2009. 28(17): p. 2494-502.
65. Rasmussen, M., et al., An Aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia. Science, 2011. 334(6052): p. 94-8.
66. Schubert, M., et al., Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. Nature Protocols, 2014. 9(5): p. 1056-82.
67. Lindgreen, S., AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads. BMC Res Notes, 2012. 5: p. 337.
68. Li, H. and R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 2009. 25(14): p. 1754-60.
69. Langmead, B. and S.L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods, 2012. 9(4): p. 357-9.
70. http://picard.sourceforge.net.
71. Renaud, G. et al., Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. Genome Biology, 2015. 16(1):224.
72. Burger, J., S. Hummel, and B. Herrmann, Palaeogenetics and cultural heritage. Species determination and STR-genotyping from ancient DNA in art and artefacts. Thermochimica Acta, 2000. 365(1-2): p. 141-146.
73. Marota, I., et al., DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. American Journal of Physical Anthropology, 2002. 117(4): p. 310-318.
74. Poulakakis, N., et al., Ancient DNA and the genetic signature of ancient Greek manuscripts. Journal of Archaeological Science, 2007. 34(5): p. 675-680.
75. Vuissoz, A., et al., The survival of PCR-amplifiable DNA in cow leather. Journal of Archaeological Science, 2007. 34(5): p. 823-829.
76. Merheb, M., et al., Mitochondrial DNA, restoring Beethovens music. Mitochondrial DNA, 2016. 27(1):355-9.
77. Schlumbaum, A., et al., Ancient DNA, a Neolithic legging from the Swiss Alps and the early history of goat. Journal of Archaeological Science, 2010. 37(6): p. 1247-1251.
78. Brandt, L.O., et al., Characterising the potential of sheep wool for ancient DNA analyses. Archaeological and Anthropological Sciences, 2011. 3(2): p. 209-221.
79. Shanks, O.C., et al., DNA from ancient stone tools and bones excavated at Bugas-Holding, Wyoming. Journal of Archaeological Science, 2005. 32(1): p. 27-38.
80. Pangallo, D., et al., Identification of animal skin of historical parchments by polymerase chain reaction (PCR)-based methods. Journal of Archaeological Science, 2010. 37(6):1202-1206.
81. Campana, M.G., et al., A Flock of sheep, goats and cattle: ancient DNA analysis reveals complexities of historical parchment manufacture. Journal of Archaeological Science, 2010. 37(6):1317-1325.
82. Teasdale, M.D., et al., Paging through history: parchment as a reservoir of ancient DNA for next generation sequencing. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2015. 370(1660).
83. Albertini, E., et al., Tracing the biological origin of animal glues used in paintings through mitochondrial DNA analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. 399:2987-2995.
84. Cavalieri, D., et al., Evidence for S. cerevisiae fermentation in ancient wine. Journal of Molecular Evolution, 2003. 57 Suppl 1: p. S226-32.
85. Walsh, S., et al., The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. Forensic Science International-Genetics, 2013. 7(1): p. 98-115.
86. King, T.E., et al., Identification of the remains of King Richard III. Nature Communications, 2014. 5.
87. Olalde, I., et al., Genomic analysis of the blood attributed to Louis XVI (1754-1793), king of France. Scientific Reports, 2014. 4.
88. Caramelli, D., et al., Genetic analysis of the skeletal remains attributed to Francesco Petrarca. Forensic Sci Int, 2007. 173(1): p. 36-40.
89. Vernesi, C., et al., Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(23): p. 13460-3.
90. Ermini, L., et al., Complete Mitochondrial Genome Sequence of the Tyrolean Iceman. Current Biology, 2008. 18(21): p. 1687-1693.
91. Rollo, F., et al., Fine characterization of the Iceman's mtDNA haplogroup. American Journal of Physical Anthropology, 2006. 130(4): p. 557-564.
92. Keller, A., et al., New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. Nature Communications, 2012. 3.
93. Rollo, F., et al., Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99(20): p. 12594-12599.
94. Lari, M., et al., The Neanderthal in the karst: First dating, morphometric, and paleogenetic data on the fossil skeleton from Altamura (Italy). Journal of Human Evolution, 2015. 82: p. 88-94.
95. Gilbert, M.T.P., et al., Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. Science, 2008. 320(5884): p. 1787-1789.
96. Rasmussen, M., et al., Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. Nature, 2010. 463(7282): p. 757-762.
97. Sanchez-Quinto, F. and C. Lalueza-Fox, Almost 20 years of Neanderthal palaeogenetics: adaptation, admixture, diversity, demography and extinction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. 370(1660): p. 20130374.
98. Allentoft, M.E., et al., Population genomics of Bronze Age Eurasia. Nature, 2015. 522(7555): p. 167-72.
99. Ghirotto, S., et al., Origins and evolution of the Etruscans' mtDNA. Plos One, 2013. 8(2): p. e55519.
100 Vai, S., et al., Genealogical relationships between early medieval and modern inhabitants of Piedmont. Plos One, 2015. 10(1): p. e0116801.



BIODETERIORAMENTO

Introduzione alla sessione di Biodeterioramento

Clara Urzì

La sessione biodeterioramento è dedicata a Laura Bruno, Professore Associato di Botanica dell'Università di Torvergata, Roma, scomparsa prematuramente giorno 16 Maggio 2023. Il suo contributo nel campo della Biologia dei Beni Culturali è testimoniato dalle numerose pubblicazioni nazionali e internazionali, dai progetti finanziati, collaborazioni scientifiche, dal suo continuo interesse nella ricerca di nuove soluzioni e capacità di interagire con colleghi di esperienze diverse. A questa sessione Laura ha partecipato attivamente con un suo contributo sugli olii essenziali applicati in una matrice idrogel per l'eradicazione di patine biologiche fotosintetiche in ambienti ipogei.

La sua scomparsa lascia un vuoto incolmabile tra i colleghi e amici.

Alcune considerazioni sulla necessità di utilizzare normative per lo studio e la conservazione del patrimonio culturale. Metodi di controllo del biodeterioramento tramite prodotti naturali

Clara Urzì

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Università di Messina, Viale F. Stagno d'Alcontres, 31 98166 Messina, Italia

Corresponding author: Clara Urzì urzicl@unime.it

Keywords: cultural heritage , biodeterioration, biocides, multifunctional coating, nanotechnologies, standardization

1. Riassunto

Questa introduzione agli interventi delle colleghe Bruno, Caneva e Di Vito (e dei loro collaboratori) partecipanti alla sessione del biodeterioramento, vuole prendere spunto dalla stimolante giornata in cui i vari contributi alle varie sessioni hanno evidenziato l'importanza di una proficua e stretta collaborazione tra restauratori, conservatori e biologi (e non solo), per evidenziare la necessità di continuare il lavoro di normazione avviato dalle Commissioni Normali, poi confluito nell' UNI/Normal per la standardizzazione dell'approccio metodologico necessario in ogni fase degli interventi di conservazione applicati ai Beni Culturali; in particolare modo per l'uso di metodi e tecniche a cui fare riferimento quando si testano nuove molecole, le cui interazioni ed effetti possono essere evidenti solo dopo molto tempo.

This introduction to the interventions of the colleagues Bruno, Caneva and Di Vito (and their collaborators) participating in the biodeterioration session, wants to take its cue from the stimulating day in which the various contributions to the different sessions highlighted the importance of fruitful and close collaboration between restorers, conservators and biologists (and not only), to signal the need to continue the standardization work started by the Normal Commissions, then merged into the UNI/Normal for the use of a methodological approach necessary in each phase of the conservation interventions applied in Cultural Heritage; in particular, methods and techniques to whom to refer when testing new molecules, whose interactions and effects may be noticeable only after a long time.

2. Introduzione

L'approccio metodologico scientifico applicato alla Conservazione dei Beni culturali e conseguente normativa deriva da due eventi fondamentali.
Il primo è stato la messa a punto da parte di esperti mondiali nel settore del restauro della cosiddetta carta del restauro, modificata negli anni (Carta di Atene, 1931; Venezia, 1964; Amsterdam, 1975; Washington 1987; Cracovia, 2000).
In particolare, la Carta del Restauro di Washington (1987) introdusse per la prima volta il concetto di conservazione preventiva e della manutenzione del manufatto, prendendo in considerazione non solo il manufatto ma l'ambiente in cui esso si trova, come probabile causa del degrado.
Un'altra tappa, in Italia, è stata l'istituzione della Commissione NorMaL nel 1977 su iniziativa di un gruppo di studiosi del CNR e dell'Istituto Centrale del Restauro (ICR), e in particolare del prof. Giovanni Urbani, allora direttore dell'ICR, convinto assertore dell'importanza e dell'inderogabile necessità di individuare metodologie di studio unificate e specifiche per il settore della conservazione dei materiali lapidei. All'attività di normazione della Commissione parteciparono, fin dalla sua istituzione, specialisti di diversa appartenenza: ricercatori del CNR, esperti e funzionari del Ministero per i Beni Culturali, docenti universitari, liberi professionisti (progettisti e restauratori), rappresentanti delle industrie interessate al settore, suddivisi in gruppi e sottogruppi di lavoro, ciascuno specializzato nelle diverse discipline scientifiche aderenti al settore conservativo (chimica, biologia, fisica, geologia ecc.). Il lavoro dei gruppi portò alla stesura di numerosi documenti elaborati secondo le competenze specifiche. Successivamente, nel 1996 fu firmata una convenzione tra il Ministero per i Beni Culturali e l'UNI (Ente Italiano di Normazione) allo scopo di attivare una collaborazione finalizzata alla elaborazione comune di norme tecniche, valide a livello nazionale e idonee ad essere proposte a livello europeo per la creazione di un corpo armonico nel campo del recupero e del restauro [1].
Dalle differenti edizioni della Carta del Restauro e dai documenti NORMAL risultano chiari i seguenti punti:

a. Necessità di un linguaggio comune nel descrivere le alterazioni (ad esempio lessico delle alterazioni)
b. Utilizzo di tecniche di campionamento non invasive
c. Utilizzo di metodi, anche innovativi ma standardizzati, nelle varie fasi di studio (dalla determinazione delle cause di degrado alle tecniche conservative di prevenzione e conservazione del manufatto).

Per quanto riguarda la diagnosi e gli interventi da attuare per l'eradicazione dei biodeterogeni, negli ultimi anni molti ricercatori del settore Beni Culturali, si sono concentrati su molecole attive con attività biocida e/o preventiva in sostituzione a formulati commerciali i cui principi attivi potrebbero essere potenzialmente nocivi per l'ambiente e gli operatori. I termini biocida e prodotti antifouling non sono interscambiabili, ma definiscono due gruppi di prodotti che sono applicati per il controllo dei biodeteriogeni, ma in momenti completamente diversi dell'intervento conservativo [2].
La legislazione europea riporta le seguenti definizioni:
Biocida: un biocida è definito come "una sostanza chimica o microrganismo destinato a distruggere, scoraggiare, rendere innocuo o esercitare un effetto di controllo su qualsiasi organismo" [3, 4]. Per quanto riguarda l'ambito di applicazione nei Beni Culturali, il termine biocida si riferisce a sostanze chimiche/formulazioni o microrganismi che uccidono gli orga-

nismi biodeteriogeni, di solito organizzati in biofilm, colonizzanti la superficie di un monumento. La proprietà antifouling definisce la capacità di rivestimenti appositamente progettati per rimuovere o prevenire incrostazioni biologiche da parte di qualsiasi organismi su superfici in presenza di acqua [5].
Come evidente dai contributi della presente sessione "Biodeterioramento" del Convegno Bioscienze nei beni culturali organizzato dall'Accademia dei Lincei, vi è un crescente interesse per l'uso di prodotti naturali o di derivazione biologica con attività biocida per il patrimonio culturale. Tali principi attivi possono avere origini diverse, tra cui: a) sottoprodotti microbici come acido zoosterico, capsaicina, enzimi extracellulari, idrolasi, acido usnico, parietina o estratti batterici; b) microrganismi interi; c) estratti vegetali come oli essenziali e/o idrolati, da soli o incorporati nella matrice sol/gel per migliorare le loro performance [2]. I vari contributi offrono un panorama diversificato sugli usi di composti naturali su monumenti esposti sia in ambienti all'aperto, che ipogei e sia su materiali lapidei che organici.
Il contributo di Laura Bruno e collaboratori riporta l'uso di oli essenziali incorporati in una matrice di idrogel come biocidi efficaci su patine algali presenti in ambienti ipogei. L'applicazione con idrogel rendeva efficace il loro utilizzo anche su superfici verticali. L'efficacia degli oli era stata preventivamente testata su ceppi algali precedentemente isolati da patine. Giulia Caneva e collaboratori, riportano l'azione di vari composti di origine naturale su patine cresciute in ambienti esterni presso le Mura Aureliane (Roma), la cui azione è stata testata in situ per un periodo di quattro anni. Maura Di Vito e collaboratori, hanno utilizzato con successo sia olii essenziali che i loro co-prodotti acquosi di distillazione (gli idrolati) per l'eradicazione di patine fungine su un dipinto esposto nella Galleria degli Uffizi. In questo caso il protocollo utilizzato prevedeva lo screening di diversi olii e idrolati valutando la dose efficace dei più attivi su differenti ceppi fungini biodeteriogeni, definendo il metodo di applicazione per le opere pittoriche, valutando la sicurezza d'uso per l'opera e per gli operatori mediante test di tossicità in vivo e, infine, procedendo con l'applicazione in situ sul retro del dipinto [6].

3. Conclusioni

Tutti i contributi presentati mettono in evidenza che i prodotti testati, che ricadono nella categoria biocidi, sembrano efficaci nelle condizioni utilizzate. Tuttavia, vi è la consapevolezza che non vi siano informazioni adeguate sull'efficacia specifica e omogenea di un determinato composto nei confronti dei biodeteriogeni/dosi di utilizzo, durata del trattamento, o eventuali interferenze con il substrato su cui è stato applicato. Da cui l'esigenza di utilizzare protocolli standardizzati per valutare:

1. l'efficacia contro gli specifici biodeteriogeni
2. dose di utilizzo
3. tossicità in vivo
4. tempo di applicazione
5. momento dell'intervento
6. utilizzo diretto o tramite matrici (per esempio: idrogel o nanocapsule o incorporato in nanosilicati) e ultimo ma non meno importante
7. interferenza con i substrati sia immediata che nel tempo.

I documenti NorMaL relativi al controllo dei biodeteriogeni (doc. 30/89, 35/91, 37/92, 38/93) potrebbero essere utili per la messa a punto di protocolli standardizzati da parte dei ricercatori del settore. Il documento NorMaL 38/93, in particolare, propone un protocollo per la valutazione dell'efficacia di biocidi, ancora attuale che potrebbe fornire la base per ogni studio in cui si testano nuove molecole. Una integrazione di tale documento potrebbe essere attuata da esperti del settore in cui i punti 1-7 precedentemente esposti possano essere standardizzati.

4. Bibliografia

[1] Urzì C. (2008). Biodeterioramento dei Manufatti Artistici. In: Barbieri P.; Bestetti G.; Galli E.; Zannoni D. Microbiologia Ambientale Ed Elementi Di Ecologia Microbica. Casa Editrice Ambrosiana, Milano: 327- 346. ISBN 978-88-08-18434-4.

[2] Lo Schiavo, S., De Leo, F., Urzì, C. 2020. Present and future perspectives for biocides and antifouling products for stone-built cultural heritage: Ionic liquids as a challenging alternative (2020) Applied Sciences (Switzerland), 10 (18), art. no. 6568.

[3] AA.VV. Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 Concerning the Making Available on the Market and Use of Biocidal Products. 2012. Available online: http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/2019-11-20,

[4] ECHA. Guidance on the Biocidal Products Regulation: Volume V-Guidance on Active Microorganisms and Biocidal Products; European Chemicals Agency: Helsinki, Finland, 2017.

[5] Yebra, D.M.; Kiil, S.; Johansen, K.D. Antifouling technology-past, present and future steps toward efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Progr. Org. Coat. 2004, 50, 75–104.

[6] Minotti, D., Vergari, L., Proto, M. R., Barbanti, L., Garzoli, S., Bugli, F., Sanguinetti, M., Sabatini, L., Peduzzi, A., Rosato, R., Bellardi, M. G., Mattarelli, P., De Luca, D., & Di Vito, M. (2022). Il Silenzio: The First Renaissance Oil Painting on Canvas from the Uffizi Museum Restored with a Safe, Green Antimicrobial Emulsion Based on Citrus aurantium var. amara Hydrolate and Cinnamomum zeylanicum Essential Oil. Journal of fungi (Basel, Switzerland), 8(2), 140. https://doi.org/10.3390/jof8020140

Caratterizzazione di biofilm fototrofi di monumenti lapidei e loro controllo attraverso l'uso di oli essenziali come biocidi

Laura Bruno
Dipartimento di Biologia, Laboratorio di Biologia delle Alghe, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Via Cracovia, 1 - 00133, Roma, Italy

Keywords: Cultural Heritage; Cyanobacterial Biofilms; Biodeterioration; Biocides; Essential Oils; Hydrogel.

1. Riassunto

Un importante campo di ricerca è dedicato allo sviluppo di metodologie innovative, sostenibili e sicure per contrastare il biodeterioramento dei monumenti lapidei dovuto alla crescita di comunità microbiche. In particolare, la formazione di biofilm ad opera di organismi biodeteriogeni è in grado di recare danno al bene culturale, che può comportare dall'alterazione cromatica a quella chimica fino al distaccamento del substrato stesso. Numerosi siti, confinati e non, sono affetti dalla formazione di biofilm e sono diverse le tecniche impiegate per la loro rimozione (chimiche e/o fisiche), che deve avvenire tenendo conto delle proprietà dei materiali lapidei e non deve arrecare danni al substrato. Per tali motivi, è in crescente aumento la richiesta di biocidi efficaci e sostenibili da parte dei conservatori. Negli ultimi anni, biocidi di origine vegetale, come estratti ed oli essenziali, e i loro principi attivi sono stati valutati come "green biocides" e, i risultati ottenuti contro biofilm a cianobatteri, aprono la strada ad ulteriori ricerche volte soprattutto a diminuire la concentrazione del biocida necessario, ottimizzare le metodologie e i tempi di applicazione, e valutare la loro efficacia nel medio e lungo termine. I risultati qui riportati, hanno dimostrato l'efficacia dell'applicazione di olio essenziale di *T. vulgaris* al 10% su biofilm cresciuti all'interno della Domus Aurea, e la possibilità di incapsulare questi biocidi in matrici di supporto (idrogel di alginato), che permette di ridurre la concentrazione di olio necessaria al di sotto del'1%. Come patrimonio inestimabile dell'umanità, i beni culturali devono essere conservati nel tempo e, a tal scopo, è quindi fondamentale caratterizzare i microrganismi biodeteriogeni che possono essere trattati con diversi biocidi, e considerare le caratteristiche dei substrati sui quali devono essere applicati, per definire la loro biorecettività e valutare che non avvengano delle alterazioni dei substrati a causa dei trattamenti impiegati.

The development of innovative and sustainable methods to counteract the biodeterioration of cultural heritages due to the growth of microbial communities is a difficult challenge for the researcher. The formation of biofilms causing damage to stone monuments can involve chromatic or chemical alteration up to the detachment of the substrate. Numerous monuments and sites, whether confined or not, are affected by the formation of phototrophic biofilms and there are various restoration techniques used for their removal (chemical and/or physical), which must consider the properties of the stone materials and must not cause damage to the substrate. For these reasons, the research for effective and sustainable biocides is growing. In recent years, phyto-derivatives, such as liquorice leaf extract or essential oils (EO), have been evaluated as "green biocides" as a safer and eco-friendly alternative to chemicals. The results reported here demonstrated the effectiveness of the application of 10% *T. vulgaris* EO on biofilms grown inside the Domus Aurea, and the possibility of encapsulating these biocides in alginate hydrogel, which make possible to reduce the oil concentration below 1%. The promising results obtained against cyanobacterial biofilms encouraged further research, aimed to decrease the concentration of the biocide, optimizing the application methods, and evaluating the effectiveness in the medium and long term. Moreover, it is essential to characterize the biodeteriogens forming biofilms and to consider the characteristics of the substrates on which the biocides must be applied, to define their bioreceptivity and evaluate that no alterations of the substrates occur due to the treatments used to preserve cultural heritage.

2. Introduzione

I monumenti in pietra sono una parte importante del nostro patrimonio culturale che testimonia la storia umana, il comportamento delle civiltà del passato, la vita sociale e le arti. Da sempre, queste risorse storiche attirano milioni di turisti che, in alcuni casi, ne possono mettere a rischio la loro stessa fruibilità e richiedono lo sviluppo di strategie per un turismo responsabile. Inoltre, la stabilità e integrità nel tempo dei beni culturali è messa a rischio dallo sviluppo di organismi biodeteriogeni, sotto forma di biofilm, che possono indurre non solo un danno estetico legato alla formazione di patine colorate al di sopra delle superfici lapidee, ma anche un danno strutturale dovuto all'attività metabolica dei microrganismi [1] e alla loro capacità di vivere anche in forma endolitica [2]. Tale fenomeno è definito biodeterioramento. La crescita di questi microrganismi è strettamente legata alle condizioni ambientali (temperatura, umidità relativa, inquinamento) e alla biorecettività dei substrati. In particolare, la crescita di biofilm fototrofi è sostenuta fortemente dalla presenza di luce, sia essa naturale o artificiale, e alti tassi di umidità, condizioni tipiche di ambienti confinati come gli ipogei; anche le condizioni meteorologiche come elevate irradianze, siccità ed escursioni termiche, possono influenzare fortemente lo sviluppo di biofilm in ambienti esposti all'aperto [3,4] (Fig.1). Inoltre, i trattamenti di tipo chimico impiegati sono molto spesso banditi dalla comunità europea e/o sono responsabili dello sviluppo di resistenze da parte degli organismi con effetti collaterali come deposizioni saline e alterazioni cromatiche. Per questi motivi è fondamentale mettere a punto delle tecniche innovative per contrastare lo sviluppo di biodeteriogeni e preservare il bene culturale: una soluzione è rappresentata dallo sviluppo di biocidi di origine naturale, che possiedono proprietà antimicrobiche e, allo stesso tempo, sono sicuri per la salute dell'uomo e dell'ambiente. Tra questi biocidi, gli oli essenziali (EO) sembrano molto efficienti contro un gran numero di organismi target, come batteri, alghe e funghi, anche a basse concentrazioni e sono risultati, quindi, promettenti anche nel campo della conservazione del patrimonio culturale, grazie al fatto che possiedono una persistenza ambientale bassa e possono bypassare la resistenza di alcuni microrganismi ai biocidi.

Figura 1. Biofilm fototrofi presenti sulle superfici delle a) pareti della Sala 93 della Domus Aurea (ambiente semi-confinato) [5] e b) delle Catacombe di San Marcellino e Pietro [4].

3. Metodologia

Per studiare il fenomeno del biodeterioramento, l'approccio in situ prevede sia il monitoraggio ambientale che il campionamento dei biofilm con tecniche non invasive e non distruttive come il MAT-Fungi Tape [6], che permette di campionare la patina biologica con un nastro adesivo, senza indurre un danno al substrato sottostante. Lo studio della comunità fototrofa avviene sia attraverso l'osservazione del campione fresco in microscopia ottica (LM), confocale (CLSM) ed elettronica a trasmissione (TEM) e scansione (SEM), che mediante tecniche di analisi molecolare [7;8]; inoltre, è possibile crescere i biofilm su diversi terreni di coltura agarizzati, per permettere l'isolamento dei microrganismi oggetto di studio. Infine, sono state sviluppate strategie innovative per la conservazione dei beni culturali, dapprima mediante test in laboratorio e poi in situ con la collaborazione dei restauratori. Queste possono prevedere l'uso di luci monocromatiche e/o l'applicazione di biocidi naturali come gli oli essenziali (EO), sia in soluzioni singole che in miscele, il cui effetto viene valutato misurando l'attività fotosintetica nel tempo attraverso un fluorimetro portatile. Più recentemente, è stato possibile incapsulare oli essenziali all'interno di idrogel di alginato, che ne facilitano l'applicazione e permettono una riduzione delle concentrazioni da applicare. Infine, viene valutato l'effetto sul substrato dei biocidi applicati.

4. Risultati e Discussione

Lo studio dei biofilm provenienti da diversi siti ha evidenziato come queste complesse comunità siano per lo più formate da cianobatteri associati a batteri, funghi, microalghe verdi e diatomee (Fig. 2): nelle Catacombe di Roma (88% umidità relativa; 12 - 22 °C; < 5 µmol m-2 s-1) e a Malta è usuale trovare cianobatteri filamentosi appartenenti all'ordine Oscillatoriales (*Oculatella subterranea*, *Leptolyngbya spp.*), all'ordine Chroococcales (*Gloeothece membranacea*, *Aphanocapsa parietina*, *Gloeocapsosis spp.*), presenti anche sulle superfici dei tempi indiani [7; 9]. In tutti questi siti, è presente un cianobatterio appartenente all'ordine delle Nostocales, *Scytonema julianum*, particolarmente dannoso perché in grado di sottrarre elementi minerali dal substrato e di precipitare carbonato di calcio a livello delle guaine polisaccaridiche [5; 10] (Fig. 2d).

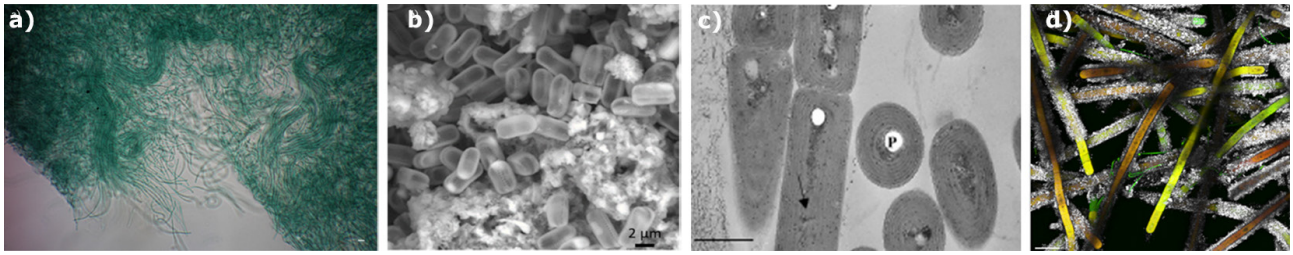


Figura 2. a) cianobatteri filamentosi del genere Leptolynbya osservati al microscopio ottico (40X) (bar=5 µm), e b) diatomee osservate al SEM (bar= 2 µm), campionate da biofilm [11]; c) osservazione al TEM di filamenti di Leptolynbya sp. (bar=1 µm) [12]; d) osservazione al CLSM di filamenti di S. julianum caratterizzata da manicotti di carbonato di calcio (bar=20 µm) [10]

Nell'ambito dello sviluppo di strategie innovative per la conservazione dei beni culturali, già a partire dagli anni 2001-2003, il progetto europeo CATS (Cyanobacteria Attack Rocks), ha avuto l'obiettivo di controllare, prevenire e monitorare la crescita di cianobatteri formanti biofilm negli ipogei romani, grazie all'integrazione di metodologie fisiche e biotecnologiche [13;14]; l'uso di lampade monocromatiche (blu) ha limitato con successo la crescita di biofilm fototrofi in questi ambienti confinati, evidenziando come l'utilizzo di diverse irradianze luminose, sia in termini di qualità che di quantità, possa influenzare lo sviluppo di questi microrganismi [15]. Negli anni più recenti, gli studi si sono focalizzati sull'impiego di biocidi naturali, derivati da estratti vegetali: l'uso di oli essenziali quali *Lavandula angustifolia* e *Thymus vulgaris* (sia singoli che in miscele) a concentrazioni variabili (10%, 1%, 0.1% v:v) ha evidenziato l'efficacia di questi biocidi quando applicati su biofilm artificiali composti da cianobatteri tipici delle Catacombe Romane (*S. julianum, O. subterranea, Leptolyngbya sp.*), con una riduzione dell'attività fotosintetica fino al 50% alla concentrazione dell'1% di EO che rimaneva stabile anche fino a 5 giorni dall'applicazione [4]. Inoltre, questi biocidi non si sono rivelati dannosi contro il substrato, poiché quando le stesse soluzioni sono state applicate su una mattonella di stucco affrescato, non si sono verificate né alterazioni colorimetriche né chimiche. Applicazioni di estratti alcolici da foglie di liquirizia (*Glycyrrhizza glabra* L.) al 10% (v:v) sono state eseguite anche su biofilm fototrofi cresciuti nella sala 93 della Domus Aurea (Roma, Italia), confrontando l'effetto di questo biocidi con il benzalconio (0,6% v:v), prodotto chimico convenzionalmente impiegato nelle tecniche di restauro. Le applicazioni sono state eseguite due volte a distanza di 14 giorni, e il monitoraggio è stato seguito per 76 giorni. Anche in questo caso di studio, i campioni trattati con estratto di liquirizia e benzalconio apparivano macroscopicamente scoloriti e l'attività fotosintetica risultava notevolmente ridotta (< 50%) rispetto il controllo con acqua [5]. Uno studio recente ha previsto l'impiego di idrogel di alginato per incapsulare biocidi: l'applicazione di questi idrogel nella chiesa di San Pietro Barisano e nella chiesa della Madonna dei Derelitti a Matera (SMART CITIES Project SCN_00520), si è rivelata di grande successo anche a distanza di due anni dal trattamento effettuato [11]. Infine, è stato fatto uno studio per valutare la biorecettività di 5 diversi substrati che sono stati colonizzati con biofilm fotosintetici artificiali [10]. Valutando le caratteristiche chimico-fisiche dei materiali oggetto di studio e associandole alla crescita dei microrganismi, è stato possibile stimare la loro biorecettività e applicare l'olio essenziale di *T. vulgaris* incapsulato in un idrogel di alginato a concentrazioni molto basse (0.25 e 0.1%, v:v) con un tempo di applicazione di sole 24 ore. L'esperimento ha evidenziando l'efficacia del biocida contro biofilm fototrofi per almeno sei mesi, senza indurre modificazioni colorimetriche al substrato, dettaglio fondamentale per preservare i monumenti lapidei (fig.3).

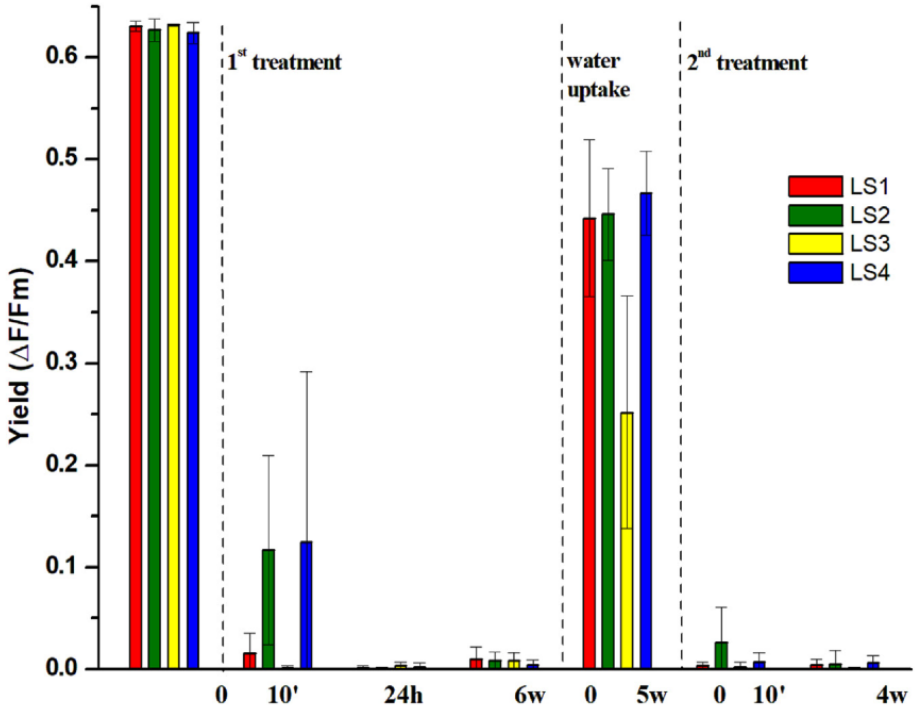


Figura 3. Misure dell'attività fotosintetica (yield) di biofilm fototrofi cresciuti su pietre di lecce (LS) trattati con olio essenziale di T. vulgaris allo 0.1% incapsulato in idrogel di alginato [10].

Conclusioni

È evidente che i monumenti lapidei sono soggetti a notevoli fenomeni di biodeterioramento dovuti alla crescita di biofilm fototrofi. Le strategie di prevenzione includono molteplici vie, come il controllo dell'illuminazione negli ambienti confinati e l'impiego di "green-biocides", come i fito-derivati applicati recentemente in questi studi. L'incapsulamento degli oli essenziali all'interno di idrogel di alginato ha consentito di sviluppare un sistema idrogel-biocida efficace per la rimozione di patine biologiche, applicabile anche su pareti verticali; inoltre, tale metodologia ha permesso di ridurre le concentrazioni di olio essenziale dal 10% al 0.25% (v:v), senza provocare danni al substrato sottostante. Ulteriori studi sono necessari ad allargare l'attività del biocida anche alla componente eterotrofa del biofilm, e alla selezione di diversi

oli essenziali e loro componenti, dei quali deve essere valutata l'attività preventiva, batteriostatica e battericida, e il loro effetto sul substrato.

5. Ringraziamenti

Si ringrazia per la collaborazione il Centro di Ricerca Enea (Frascati)-Laboratorio Diagnostiche e Metrologia; il Centro di Ricerca Enea (Casaccia)- Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali; Università degli Studi dell'Aquila - Dipartimento di Scienze Chimiche e Fisiche.

6. Bibliografia

1) J.D., Gu, Y., Katayama. Microbiota and biochemical processes involved in biodeterioration of cultural heritage and protection. Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage. 37, (2021)
2) F., Marano, F. Di Rita, M.R. Palombo, N.T.W. Ellwood, L.Bruno. A first report of biodeterioration caused by cyanobacterial biofilms of exposed fossil bones: a case study of the Middle Pleistocene site of La Polledrara di Cecanibbio (Rome, Italy). International Biodeterioration & Biodegradation, 106: 67-74, (2016).
3) L., Bruno, I., Ficorella, F. Valentini, L., Quici, N. Keshari, S.P., Adhikary. Characterization of phototrophic biofilms deteriorating Indian stone monuments, their response to heat stress and development of a non-invasive remediation strategy. In: M.A. Rogerio-Candelera (ed). Science, Technology and Cultural Heritage. CRC Press/Balkema, London, pp.205-210, ISBN 978-1-138-02744-2, (2014.)
4) L., Bruno, L., Rugnini, V., Spizzichino, L., Caneve, A., Canini, NTW., Ellwood. Biodeterioration of Roman hypogea: the case study of the Catacombs of SS. Marcellino and Pietro (Rome, Italy) Annals of Microbiology, 69:1023-1032, (2019).
5) L., Rugnini, G., Migliore, F., Tasso, N.W.T., Ellwood, A.R., Sprocati, L., Bruno. Biocidal Activity of Phyto-Derivative Products Used on Phototrophic Biofilms Growing on Stone Surfaces of the Domus Aurea in Rome (Italy). Appl. Sci. 2020, 10, 6584, (2020).
6) C., Urzì, and F., De Leo. Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. Journal of Microbiological Methods 44, 1-11, (2001).
7) Bruno, L., Billi, D., Bellezza, S., Albertano, P. Cytomorphological and Genetic Characterization of Troglobitic Leptolyngbya Strains Isolated from Roman Hypogea. Applied and Environmental Microbiology. 608-617, (2009).
8) Urzì, C., De Leo, F., Bruno, L., Albertano, P. Microbial Diversity in Paleolithic Caves: A Study Case on the Phototrophic Biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). Microbial Ecology. 60: 116-129, (2010).
9) F., Rossi, E. Micheletti, L. Bruno, S.P., Adhikary, P. Albertano, R., De Philippis. Characteristics and role of the exocellular polysaccharides produced by five cyanobacteria isolated from phototrophic biofilms growing on stone monuments. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 28 (2): 215-224, (2012).
10) F., Gabriele, R., Ranaldi, L., Bruno, C., Casieri, L., Rugnini, N., Spreti, Biodeterioration of stone monuments: Studies on the influence of bioreceptivity on cyanobacterial biofilm growth and on the biocidal efficacy of essential oils in natural hydrogel. Science of Total Environment. 870, 161901, (2023).
11) F., Gabriele, L., Bruno, C., Casieri, R., Ranaldi, L., Rugnini, N., Spreti. Application and Monitoring of Oxidative Alginate–Biocide Hydrogels for Two Case Studies in "The Sassi and the Park of the Rupestrian Churches of Matera". Coatings 12, 462. https://doi.org/10.3390/coatings12040462, (2022).
12) L., Bruno, D., Billi, S., Bellezza, P., Albertano. Cytomorphological and genetic characterization of troglophilic Leptolyngbya strains isolated from Roman hypogea. Applied and Environmental Microbiology 75: 608-617, (2009).
13) P., Albertano, D., Moscone, I.G., Pallesch, B., Hermosin, C., Saiz-Jimenez, S., Sanchez-Moral, M., Hernandez-Marin, C., Urzì, I., Groth, V., Schroeckh, M., Saarela, T., Mattila-Sandholm, J.R, Gallon, F., Graziottin, F., Bisconti, R., Giuliani. Cyanobacteria attack rocks (CATS): control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman hypogean monuments. In: Saiz-Jimenez, C., Swets & Zeitlinger, B.V., Lisse, N.L.c(Eds.), Molecular Biology and Cultural Heritage, pp. 151-162. ISBN 90 5809555X, (2003).
14) P., Albertano, L., Bruno, The importance of light in the conservation of hypogean monuments. In: Saiz-Jimenez (ed) Molecular biology and cultural heritage. Swets & Zeitlinger, Lisse, pp. 171–177 ISBN 90 5809 555X, (2003).
15) L., Bruno, V. Valle, Effect of white and monochromatic lights on cyanobacteria and biofilms from Roman Catacombs. International Biodeterioration & Biodegradation. 123, 286-295, (2013).

"Contributo scritto dalle dott.sse Lorenza Rugnini e Roberta Ranaldi in memoria di Laura Bruno, professoressa, mentore scientifico e grande amica".

Uso di oli essenziali e idrolati per il trattamento di biodeteriogeni fungini di dipinti antichi

Daphne De Luca[1], Debora Minotti[1], Lara Vergari[1], Stefania Garzoli[2], Francesca Bugli [3,4], Maurizio Sanguinetti[3,4], Maura Di Vito[3]

[1]Dipartimento di Scienze Pure e Applicate (DiSPeA), University of Urbino Carlo Bo
[2]Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma Sapienza
[3]Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore
[4]Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS

Corresponding author: Maura Di Vito maura.divito@unicatt.it

Keywords: essential oil, hydrolate, *Citrus aurantium* var. *amara*, *Cinnamomun zeylanicum* bark, paint artwork, biodeteriogens

1. Riassunto

Preservare le opere d'arte dagli attacchi dei biodeteriogeni è un dovere primario dell'umanità. Oggi i restauratori utilizzano prodotti chimici potenzialmente pericolosi sia per le opere d'arte che per la salute umana. Lo scopo di questo articolo è di presentare i dati del nostro studio pubblicato recentemente sulla rivista Journal of fungi (Minotti D., 2021) che ha avuto lo scopo di trovare una formulazione verde e sicura a base di sostanze naturali con attività fungicida per restaurare antichi dipinti ad olio, in particolare "Il Silenzio" (di Jacopo Zucchi) conservato al Museo degli Uffizi di Firenze, Italia. Le indagini hanno condotto all'individuazione di una emulsione olio in acqua caratterizzata da olio essenziale di *Cinnamomum zeylanicum* e idrolato *C. aurantium* var. amara. Questa emulsione ha mostrato la migliore attività antimicotica sia in vitro che *in situ* senza alterare le caratteristiche chimico-fisiche dei dipinti antichi a olio. Inoltre, non è stata dimostrata alcuna tossicità *in vivo*. Per la prima volta, un'emulsione antimicrobica green a base di un olio essenziale e un idrolato, sicura per gli operatori, è stata utilizzata per decontaminare un'opera d'arte colonizzata da funghi prima delle pratiche di restauro.

Preserving artworks from biodeteriogens' attacks is a primary duty of humanity. Today restorers use chemical products that are potentially dangerous for both artworks and human health. The purpose of this article is to present the data of our study recently published in the "Journal of fungi" (Minotti D., 2021) which aimed to find a green and safe formulation based on natural substances with fungicidal activity to restore ancient oil paintings, notably "Il Silenzio" (by Jacopo Zucchi) kept in the Uffizi Museum in Florence, Italy. The research led to an oil-in-water emulsion characterized by *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and *C. aurantium* var. *amara*. This emulsion showed the best antifungal activity both in vitro and in situ without altering the chemical-physical characteristics of the ancient oil paintings. Furthermore, no in vivo toxicity has been demonstrated. For the first time, a green antimicrobial emulsion based on an essential oil and a hydrolate, safe for operators, has been used to decontaminate an artwork colonized by fungi before restoration practices.

2. Introduzione

Il controllo del biodeterioramento dei materiali del patrimonio culturale prevede misure per arrestare il degrado causato sia da microrganismi che da organismi e, ove possibile, ritardarne la ricomparsa. Tutti i manufatti, con il tempo, sono soggetti all'attacco dei biodeteriogeni. La carta, le fibre vegetali/animali, il legno e le opere d'arte dipinte sono principalmente attaccate dai funghi per il loro contenuto di cellulosa. Inoltre, i funghi rappresentano sia un grave pericolo per i manufatti sia un rischio per la salute umana. Oltre alle pratiche di prevenzione, quelle di disinfezione vengono eseguite prima di ogni altra manipolazione per evitare la diffusione di spore, potenzialmente pericolose sia per le opere d'arte che per la salute umana. Le sostanze chimiche generalmente utilizzate per il restauro dei dipinti possono causare seri problemi all'equilibrio dell'ecosistema e alla salute umana, ma anche sensibilizzazione o reazioni allergiche verso specifici prodotti chimici o additivi (Da Silva, 2017, Schmitz-Felten, E., 2013, Hwang, J., 2021). Al fine di individuare nuovi prodotti citocidi a basso impatto ambientale ed elevata sicurezza per l'uomo, diversi gruppi di ricerca stanno rivolgendo la loro attenzione alle potenzialità sia degli oli essenziali (OE) sia degli idrolati (ID) che sono miscele di sostanze naturali ottenute attraverso la distillazione di matrici vegetali di piante aromatiche (Faucon, M., 2017, Tisserand, R., 2013, Rhind, J., 2019, Faucon, M., 2018). I primi sono prodotti naturali idrofobici estremamente concentrati con un'importante attività antimicrobica a cui corrisponde una potenziale tossicità che ne limita l'uso nella forma pura. Mentre i secondi (economici co-prodotti della distillazione) sono miscele idrofile estremamente diluite con minore attività microbicida ma, al contempo, una maggiore versatilità e sicurezza. Quest'ultimi, solo recentemente, hanno trovato impiego nell'ambito dei beni culturali perché le loro caratteristiche li rendono meno aggressivi degli OE e applicabili in contesti in cui gli OE non possono essere applicati, come ad esempio il restauro di opere cartacee (Di Vito, M., 2018).
Lo scopo di questo articolo è quello di riassumere i risultati del lavoro da noi pubblicato (Minotti, D., 2022) e finalizzato a individuare *in vitro* una miscela a base di idrolati e/o oli essenziali da utilizzare in formulazione spray per il restauro *in situ* de "Il Silenzio" (di Jacopo Zucchi), un dipinto olio su tela conservato presso il Museo degli Uffizi di Firenze.

2. Materiali e Metodi

2.1. Ceppi fungini

Per lo studio sono stati impiegati i seguenti ceppi fungini: *Aspergillus niger* (ATCC9642), *Aureobasidium pullulans* (ATCC 15233), *Chaetomium globosum* (ATCC 6205), *Cladosporium cladosporioides* (ATCC 16022), *Alternaria alternata* e *Penicillium citrinum* della collezione di funghi dell'Università di Urbino Carlo Bo Scienze Biomolecolari Dipartimento.

2.2. Oli Essenziali (EO) e Idrolati (ID)

Sono stati testati tre EO (*Cinnamomum zeylanicum, Monarda didyma* e *Monarda fistulosa*) e quattro ID (*M. didyma , M. fistulosa* e *Monarda citriodora* e *Citrus aurantium* var. *amara*).

2.3. Campioni di tela

Per simulare le tecniche di esecuzione dei dipinti su tela antica, sono stati realizzati due tipologie di provini (Minotti, D., 2022) impiegati per svolgere tutti gli esperimenti in vitro e in situ relativi alle analisi chimico-fisiche e microbiologiche. In particolare, la prima tipologia di provini era caratterizzata da due grandi campioni di tela (GCT - 26 cm di altezza × 18 cm di larghezza × 2,5 cm di spessore) ruvida con lembo di lino che simulavano antiche tecniche pittoriche (due a tempera e due ad olio, nel testo denominato T1—T2—O1—O2). La seconda tipologia, usata per i test microbiologici *in vitro*, comprendeva 51 piccoli tasselli di tela (PTT - 2 cm × 2 cm), eseguiti con tecniche antiche (apprettatura e preparazione di gesso e colla).

2.4. Analisi gascromatografica e spettroscopica di massa (GC-MS)

L'analisi chimica di C. zeylanicum EO è stata effettuata con l'uso di un gascromatografo accoppiato con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo (modello Clarus 500-Perkin Elmer, Harfsen, Paesi Bassi). Ogni analisi è stata ripetuta in triplicato. Le condizioni delle analisi eseguite sono accessibili nel dettaglio nel lavoro pubblicato (Minotti, D., 2022). Le percentuali relative dei composti rilevati sono state ottenute mediante normalizzazione dell'area dei picchi senza l'uso di uno standard interno o di fattori di correzione.

2.5. Test di sensibilità alla microdiluizione in brodo

In accordo con le linee guida internazionali EUCAST (Rodriquez-Tudela, 2008), il test di microbrodo diluizione è stato utilizzato per identificare la sensibilità fungina sia agli EO che agli ID. Il test è stato eseguito su piastre a 96 pozzetti in un volume totale di 100 µL utilizzando il brodo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) come terreno di coltura. Concentrazioni comprese tra il 2% v/v e lo 0,06% v/v e tra il 50% v/v e l'1,6% v/v sono state testate rispettivamente per OE e ID verso a una sospensione fungina di 2,5 × 105 UFC/mL. Le piastre sono state incubate per 7 giorni a 30°C ed è stata determinata la concentrazione minima inibente (MIC). La MIC è definita come la più bassa concentrazione della sostanza alla quale i funghi non hanno mostrato una crescita visibile rispetto al controllo. Per valutare le concentrazioni minime fungicide (MFC), 20 µL del contenuto di ciascun pozzetto sono stati seminati su Potato Dextrose Agar (PDA) (Oxoid, Basingstoke, UK). MFC è stata definita come la più bassa concentrazione della sostanza corrispondente alla morte del 99,9% o più dell'inoculo iniziale. Ogni test è stato eseguito in triplicato e sono stati inclusi controlli sia negativi che positivi.

2.6. Formulazione spray

È stata formulata un'emulsione caratterizzata dall'ID e dall'OE con maggiore efficacia antimicotica in vitro. Per identificare la migliore formulazione spray da utilizzare per esperimenti in situ, sono state eseguite diluizioni scalari di *C. zeylanicum* EO (da 1% v/v a 0,07% v/ v) in *C. aurantium* var. *amara* ID. Le diluizioni sono state agitate su vortex per 1 min e poste in posizione di quiete per 3 h per poi scegliere la prima emulsione che presentava la più bassa concentrazione di OE completamente disciolto nell'ID senza alcuna separazione di fase.

2.7. Test microbiologico in situ

Le PTT sono state utilizzate per valutare l'attività fungicida *in situ* della formulazione spray eseguita come descritto nel paragrafo 2.6. Dopo sterilizzazione agli UV per 80 minuti (40 minuti per lato), 50 mL di una sospensione fungina di 2,5 × 105 CFU/mL (uguale quantità di *A. niger, A. pullulans, C. globosum, C. cladosporioides, A. alternata e P. citrinum*) sono stati inoculati sul retro delle tele. Dopo l'asciugatura, da 1 a 5 spruzzi (capacità di 55 µL/spray, ovvero 14 mL/cm 2di ogni PTT) della formulazione sono stati applicati sul retro di PTT per 3, 5 o 24 h. Il lato trattato della tela è stato posto su PDA (Oxoid, Basingstoke, UK) e incubato per 7 giorni a 30°C. Al termine del periodo di incubazione è stata valutata l'efficacia del trattamento. Nei test sono stati inseriti gli idonei controlli: tela non trattata (controllo positivo) e tela non inoculata (controllo negativo). Ogni trattamento è stato ripetuto in triplicato.

2.8. Analisi Chimico-Fisica

Per valutare se l'applicazione della miscela a spruzzo potesse determinare alterazioni dello stato chimico-fisico o strutturale della tela, degli strati preparatori e/o del film pittorico, analisi chimico-fisiche sono state eseguite su campioni con e senza invecchiamento (vedi paragrafi seguenti) prima e dopo il trattamento antimicrobico.

2.8.1. Condizioni di invecchiamento

Per valutare l'efficacia del trattamento nel tempo, i GCT sono stati invecchiati per 3 settimane utilizzando "Solar box 3000e RH Xenon". Le condizioni di invecchiamento sono accessibili nel lavoro pubblicato (Minotti, D., 2022).

2.8.2. Misure di pH

Per valutare l'impatto del trattamento sul pH dei GCT sono stati eseguiti test secondo il metodo Cremonesi (2012) così come descritto nel lavoro pubblicato (Minotti, D., 2022).

2.8.3. Misure colorimetriche

Le misurazioni colorimetriche sono state eseguite con il "Konica Minolta CM-2600d" (con illuminazione diffusa, display a 8 gradi con misurazione simultanea della componente speculare inclusa, SCI, e della componente speculare esclusa, SCE, con raggi γ, λ 360–740 nm). I dati colorimetrici sono stati riportati in funzione dell'illuminazione standard CIE D65 illumination and 10° (CIE 1964) escludendo la componente speculare della radiazione. L'elaborazione delle coordinate colorimetriche L*a*b è descritta in dettaglio nell'articolo pubblicato (Minotti, D., 2022). Ogni variazione è stata interpretata come segue: 0–1 (differenza di colore non rilevabile dall'occhio umano), 1–3 (piccola differenza di colore), 3–6 (differenza percettibile) o >6 (grande differenza). Solo i valori superiori a 3 sono stati valutati come significativi perché i valori ≤3 non sono rilevabili o sono considerati irrilevanti (Đorđević, D, 2009).

2.8.4. Trattamento spray

I GCT, accuratamente staccati dal supporto, sono stati posti in un contenitore di vetro, con lo strato pittorico rivolto verso il basso. 50 spruzzi (14 mL/cm2) della miscela appena preparata sono stati utilizzati per il trattamento. Sono stati applicati 25 spruzzi sul retro dei campioni di tela e 25 su fogli di carta assorbente priva di acidi posti a contatto con il retro della tela. Quindi, sono stati posti cinque pesi sulla parte superiore della carta assorbente per evitare il movimento delle fibre tessili e per mantenere meglio le due superfici a contatto tra loro. Infine, il contenitore di vetro è stato sigillato da un apposito coperchio idoneamente isolato per impedire la volatilizzazione delle componenti volatili. Il campione è stato incubato a 30°C per 5 h. Il trattamento è stato eseguito in triplicato.

2.9. Studio sulla tossicità

La possibile tossicità dell'emulsione è stata valutata in un modello in vivo di Galleria mellonella (Singkum, P., 2019). Sono state escluse larve con variazioni di colore nel corpo e larve al di fuori del peso corporeo di 0,2-0,3 g. Dieci µL dell'emulsione di OE di *C. zeylanicum* (0,03% v/v) in idrolato di *C. aurantium* var. *amara* sono stati iniettati, mediante una siringa da 0,5 mL, nell'emocele attraverso l'ultima pro-gamba sinistra di dieci larve. L'area della puntura è stata disinfettata con etanolo al 70% prima della somministrazione. Le larve sono state quindi poste in un incubatore a 33°C e osservate ogni 8 ore per 3 giorni.

2.10. Trattamento della pittura del museo

Il dipinto intitolato "Il Silenzio" di Jacopo Zucchi, allievo di Giorgio Vasari (Figura 1-a , anno: 1572, dimensioni: 146 cm × 163 cm, olio su tela) esposto sul soffitto della "Sala delle Carte Geografiche" del Museo degli Uffizi (Firenze, Italia) è stato sottoposto al trattamento citocida utilizzando la formulazione spray precedentemente selezionata attraverso le prove in vitro effettuate sui provini di tela.

Figura 1. Fasi di restauro del dipinto "Il Silenzio". (a) Tela dopo il restauro. (b) Attacco microbiologico sul retro della tela prima del restauro. (c) Prelievo di campioni microbiologici sul retro della tela con tampone sterile. (d) Applicazione a spruzzo dell'emulsione a base di C. aurantium var. idrolato di amara e olio essenziale di Cinnamomum zeylanicum. (e) Tela posta sul tavolo a bassa pressione durante il trattamento (Minotti, D., 2022).

2.10.1. Campionamento e analisi microbica dell'opera d'arte

Per identificare i ceppi microbici responsabili del biodeterioramento, prima del trattamento spray sono stati raccolti quindici campioni. In particolare, ne sono stati prelevati sul retro dell'opera cinque con tampone sterile (Boettger, Paul Boettger GmbH & Co. KG, Bodenmais, Germany) e cinque con funghi-tape (Scientific Device, Glenview, IL, USA) (Figura 1-b), mentre sul davanti ne sono stati raccolti solo cinque con tampone sterile. Tutti i campioni sono stati prelevati in corrispondenza dell'area potenzialmente caratterizzata dall'attacco dei biodeteriogeni (Figura-1c) e sono stati inviati al laboratorio di microbiologia. Successivamente, i campioni sono stati seminati sul agar nutritivo (Muller Hilton agar, Malt Extract agar e PDA tutti da Oxoid, Basingstoke, Regno Unito) e incubati per 7 giorni a 30 °C. Al termine del tempo di incubazione, il riconoscimento dei ceppi fungini è stato effettuato utilizzando la spettrometria di massa a tempo di volo ionizzazione desorbimento laser assistita da matrice (MALDI-TOF MS) Bruker Daltonics (Bruker, Brema, Germania).

2.10.2. Trattamento citocida spray

Prima del trattamento, l'opera d'arte è stata liberata dal telaio e la tela è stata rimossa per somministrare uniformemente il trattamento. L'opera è stata posta su un tavolo a bassa pressione (Serie: NSD 1101 di CTS srl Altavilla Vicentina, Vicenza, Italia) su cui è stato applicato un foglio di Melinex ® (Film di poliestere monosiliconato spessore 23 micron, peso 33 g/m 2 Cts srl Altavilla Vicentina, Vicenza, Italia). Trecento mL di miscela (circa 14 mL/cm 2), costituita da 299,1 mL (99,7% v/v) di *C. aurantium* var. *amara* ID e 0,9 mL (0,3% v/v) di *C. zeylanicum* OE, sono stati preparati al momento. La miscela è stata applicata a spruzzo (Figura 1-d) dopo averla miscelata per ottenere un'emulsione uniforme. Un totale di 96 spray sono stati erogati sull'opera d'arte. In particolare, 48 spruzzi sono stati applicati sul retro della tela e gli altri 48 su un foglio di carta assorbente (carta assorbente acid free 300 g/m 2 Vangerow srl, Bolzano, Italia) che è stato posto a diretto contatto con il retro del dipinto. Ogni spruzzo aveva una capacità di 3 mL ed era erogato a circa 20 cm dalla superficie. Per evitare la dispersione dei composti attivi degli OE e degli ID, il Melinex ®è stato sigillato con nastro isolante, racchiudendo al suo interno sia l'opera d'arte che la carta assorbente formando un sacchetto contenitore. Il trattamento è stato eseguito per 24 h, di cui 7 sul tavolo a bassa pressione riscaldato a 30 °C, ed il restante tempo a temperatura ambiente. Inoltre, un foglio di compensato è stato posto sulla tela e fermato con sei pesi (da 150 a 500 g) per evitare i movimenti della pellicola pittorica della tela (Figura 1-e). Il giorno successivo il contenitore di Melinex ® è stato aperto, la carta assorbente è stata rimossa e sono stati prelevati cinque campioni di tampone sul retro della tela. Successivamente, la residua umidità è stata rimossa impostando il tavolo a bassa pressione a 40 hPa e 30 °C per 30 min, quindi le successive fasi di restauro e sono state avviate.

3. Risultati

3.1. Analisi GC/MS

L'analisi GC/MS dell'OE di *C. zeylanicum* usato nella miscela ha permesso di individuare ventiquattro composti chimici. La composizione chimica dell'EO era caratterizzata principalmente da cinnamaldeide (66,0%) principale componente attivo, β-cariofillene (5,8%), (E)-cinnamil acetato (5,5%), linalolo (4,9%), 1, 8-cineolo (4,4%) ed eugenolo (4,1%). Tutte le altre componenti erano presenti a concentrazioni minori comprese tra 0,1% a 0,4%.

3.2. Test di sensibilità alla micro-diluizione in brodo

Tra gli OE testati, l'OE di *C. zeylanicum* è stato selezionato per la sua azione antifungina mostrando valori migliori sia in termini di MIC che di MFC (rispettivamente 0,008% v/v e 0,125% v/v). Allo stesso modo, l'ID di *C. aurantium* var. *amara* è risultato il più efficace tra gli ID, mostrando valori di MIC e MFC pari a 6,25% v/v e 3,12 v/v.

3.3. Test microbiologici su campioni di tela

I PTT sono stati trattati come descritto nel paragrafo 2.3 utilizzando un'emulsione spray composta da *C. zeylanicum* OE (0,03% v/v) disperso in *C. aurantium* var. *amara* ID. Al termine dei periodi di incubazione, tutti i campioni di tela, compresi quelli trattati con la concentrazione più bassa e il tempo di esposizione più breve (uno spruzzo per 3 ore), hanno mostrato la totale assenza di crescita fungina. I dati hanno indicato l'efficacia del trattamento anche alle concentrazioni più basse.

3.4. Invecchiamento artificiale

Dopo l'invecchiamento artificiale, non sono state osservate variazioni significative su entrambi i campioni ad olio (O1 e O2) dei provini GCT, mentre i campioni a tempera (T1 e T2) mostrato cambiamenti di colore significativi visibili a occhio nudo e confermati dall'analisi colorimetrica.

3.5. pH

Le variazioni di pH dopo il trattamento erano inferiori all'unità di pH e quindi accettabili sia per i campioni invecchiati che per quelli non invecchiati. Tutte le variazioni rilevate, ad eccezione di quelle relative al colore verde terra, erano da considerarsi benefiche perché consistevano in una alcalinizzazione della superficie GCT.

3.6. Misure colorimetriche

I dati ΔE hanno mostrato che i campioni non invecchiati non hanno subito un cambiamento di colore significativo dopo il trattamento (ΔE ≤ 3), mentre tra i campioni invecchiati solo quelli realizzati a tempera hanno mostrato una variazione di colore significativa. Pertanto, i dati indicavano una ragionevole sicurezza d'uso per i dipinti ad olio.

3.7. Studio sulla tossicità

Le larve di *Galleria mellonella* trattate con 10 mL dell'emulsione sono state monitorate ogni 8 ore per tre giorni. Al terzo giorno tutte le larve erano perfettamente vitali e nessuna mostrava segni di tossicità (viraggio di colore).

3.8. Trattamento del dipinto "Il Silenzio".

3.8.1. Test microbiologico

Esami microbiologici eseguiti su campioni prelevati in corrispondenza, sia del fronte che del retro, dell'area potenzialmente caratterizzata dall'attacco di biodeteriogeni hanno evidenziato la presenza di *Aspergillus versicolor* e *Penicillium chrysogenum* solo sul retro del dipinto.

3.8.2. Trattamento citocida

Il trattamento è stato eseguito dal restauratore senza alcun problema metodologico o di salute dell'operatore. Questi dati hanno supportato i dati di sicurezza ottenuti dal modello in vivo di *Galleria mellonella*. Al termine del trattamento, l'operatore non ha rilevato alterazioni visive del dipinto. Il test microbiologico effettuato su campioni prelevati al termine del trattamento ha evidenziato l'assenza di qualsiasi crescita microbica.

3. Conclusioni

Negli ultimi anni, un numero sempre crescente di ricerche sono state prodotto al fine di valutare l'azione degli OE nel trattamento di diversi tipi di opere d'arte. Recentemente, sia l'OE di *Origanum vulgare* che di *Thymus vulgaris* sono stati studiati per contrastare la colonizzazione di biodeteriogeni e l'infestazione di insetti su legno e alghe, muschi e licheni su opere d'arte in pietra (Stupar, M., 2014, Stupar, M., 2014, Palla, F., 2020). Altri studi hanno indagato direttamente l'attività dei singoli componenti degli OE identificando quali di questi (timolo ed eugenolo) fossero adatti per formulazioni applicabili nel restauro dei dipinti murali (Veneranda, M., 2018). Pochissimi studi sono stati svolti direttamente sulle opere d'arte. La maggior parte degli articoli scientifici sono studi in vitro o ex situ.

Pochissimi studi riguardano l'uso dell'OE di *C. zeylanicum* nel patrimonio culturale. Matusiak e collaboratori (Matusiak, K, 2018) hanno riportato l'uso di questi OE per la disinfezione del patrimonio tessile. Lo studio ha mostrato l'attività battericida e fungicida dei vapori dell'OE e la sua possibile applicazione nella disinfezione dei tessuti senza alterarne le caratteristiche chimico-fisiche. In un recente lavoro, Campanella e collaboratori (Campanella, L., 2021) hanno mostrato il potenziale uso dell'OE di *C. zeylanicum* quando incapsulato in perline di psyllium-alginato per applicazioni su opere di carta (Campanella, L., 2021). Analogamente, sono pochissimi gli studi che valutano l'efficacia degli ID nei trattamenti destinati ai beni culturali. In un nostro precedente lavoro abbiamo dimostrato come l'ID di *C. aurantium* var. *amara* (fiori), usato da solo o incorporato nell'idrogel di gellano, mostra attività fungicida nei confronti di ceppi fungini dannosi per il patrimonio cartaceo (Di Vito, M., 2018).

In questo lavoro, per la prima volta l'attività citocida di un'emulsione spray a base di un OE e di un ID (denominata Zeylantium green emulsion) è stata studiata in vitro su campioni di tela, in vivo su modello animale di Galleria mellonella e in situ direttamente su un'importante opera d'arte esposta al pubblico in uno dei più prestigiosi musei del mondo.

Gli esperimenti in vitro condotti su campioni di tela, invecchiati e no, hanno indicato che il trattamento effettuato con l'emulsione ha attività fungicida a partire da una concentrazione di 14 mL/cm^2 senza indurre variazioni di colore e di pH significative sui provini fatti secondo le tecniche antiche ad olio.

I dati preliminari in vitro hanno permesso,, con ragionevole certezza di passare al trattamento *in situ* su dipinti ad olio antichi. L'intervento effettuato sul dipinto "Il Silenzio" non ha mostrato alterazioni visive né di tipo meccanico né di tipo estetico. Le fibre della tela sono risultate omogenee e compatte e la superficie dipinta non ha mostrato variazioni visive di tono e saturazione cromatica. Inoltre, il trattamento è risultato sicuro per l'operatore e non ha ostacolato le successive fasi di restauro necessarie alla pittura.

Di particolare rilevanza è l'aspetto salutistico dell'intervento. Infatti, come noto dalla letteratura, i livelli dei vapori di solventi organici presenti nell'aria del luogo di lavoro durante le pratiche di ripristino possono risultare ben al di sopra dei limiti di esposizione professionale, costituendo quindi una minaccia per la salute del lavoratore (Jeżewska, A., 2014). Questa esposizione chimica unita alla presenza di contaminanti fungini nei bioaerosol degli ambienti museali è riconosciuta come fonte di malattie professionali che colpiscono le prime vie respiratorie dei restauratori (Varnai, V.M., 2011, Maxim, D., 2021).

Sarebbe quindi di grande importanza individuare prodotti fungicidi che siano allo stesso tempo efficaci, facili da usare e sicuri per la salute dei restauratori. I nostri studi in vivo condotti su *Galleria mellonella* hanno indicato che l'emulsione testata è ragionevolmente sicura poiché priva di tossicità nel modello *in vivo* scelto. Inoltre, l'emulsione utilizzata in questo studio presentava il contenuto dei componenti normati dalle linee guida IFRA (International Fragrance Association) decisamente al di sotto di quelle massime raccomandate.

Questo studio si inserisce perfettamente in un mondo che sta globalmente volgendo lo sguardo sempre più verso approcci naturali in un'ottica One Health. In conclusione, l'introduzione di un prodotto di origine naturale con spiccata attività fungicida nelle pratiche di restauro potrebbe essere vantaggioso sia per preservare il patrimonio artistico sia per tutelare la salute dei restauratori.

4. Bibliografia

- Campanella, L.; Angeloni, R.; Cibin, F.; Dell'Aglio, E.; Grimaldi, F.; Reale, R.; Vitali, M. Capsulated Essential Oil in Gel Spheres for the Protection of Cellulosic Cultural Heritage. Nat. Prod. Res. 2021, 35, 116–123.
- Da Silva, M.T.C. Novel Biocides for Cultural Heritage; Universidade de Évora: Évora, Portugal, 2017.
- Di Vito, M.; Bellardi, M.G.; Colaizzi, P.; Ruggiero, D.; Mazzuca, C.; Micheli, L.; Sotgiu, S.; Iannuccelli, S.; Michelozzi, M.; Mondello, F.; et al. Hydrolates and Gellan: An Eco-Innovative Synergy for Safe Cleaning of Paper Artworks. Stud. Conserv. 2018, 63, 13–23.
- Đorđević, D.; Hladnik, A.; Javoršek, A. Performance Of Five Chromatic Adaptation Transforms Using Large Number Of Color Patches. Acta Graph. 2009, 20, 9–19.
- Singkum, P.; Suwanmanee, S.; Pumeesat, P.; Luplertlop, N. A Powerful in Vivo Alternative Model in Scientific Research: Galleria Mellonella. Acta Microbiol. Et Immunol. Hung. 2019, 66, 31–55.
- Faucon, M. Traité d'aromathérapie Scientifique et Médicinale. Les Huiles Essentielles; Éditions Sang de la Terre et Médial: Paris, France, 2017.
- Faucon, M. Traité d'aromathérapie Scientifique et Médicale: Les Hydrolats; Éditions Sang de la Terre et Médial: Paris, France, 2018.
- Hwang, J.; Jeong, H.; Jung, Y.; Nam, K.T.; Lim, K.M. Skin Irritation and Inhalation Toxicity of Biocides Evaluated with Reconstructed Human Epidermis and Airway Models. Food Chem. Toxicol.. 2021 , 150 , 112064.
- eżewska, A.; Szewczyńska, M.; Woźnica, A. Occupational Exposure to Airborne Chemical Substances in Paintings Conservators. Med. Pr. 2014, 65, 33–41.
- Minotti, D., Vergari, L., Proto, M. R., Barbanti, L., Garzoli, S., Bugli, F., Sanguinetti, M., Sabatini, L., Peduzzi, A., Rosato, R., Bellardi, M. G., Mattarelli, P., De Luca, D., & Di Vito, M. (2022). Il Silenzio: The First Renaissance Oil Painting on Canvas from the Uffizi Museum Restored with a Safe, Green Antimicrobial Emulsion Based on Citrus aurantium var. amara Hydrolate and Cinnamomum zeylanicum Essential Oil. Journal of fungi (Basel, Switzerland), 8(2), 140. https://doi.org/10.3390/jof8020140
- Palla, F.; Bruno, M.; Mercurio, F.; Tantillo, A.; Rotolo, V. Essential Oils as Natural Biocides in Conservation of Cultural Heritage. Molecules 2020, 25, 730.

- Matusiak, K.; Machnowski, W.; Wrzosek, H.; Polak, J.; Rajkowska, K.; Śmigielski, K.; Kunicka-Styczyńska, A.; Gutarowska, B. Application of Cinnamomum Zeylanicum Essential Oil in Vapour Phase for Heritage Textiles Disinfection. Int. Biodeterior. Biodegrad. 2018, 131, 88–96.
- Rhind, J. Essential Oils (Fully Revised and Updated 3rd Edition): A Comprehensive Handbook for Aromatic Therapy, 3rd ed.; Singing Dragon: London, UK, 2019.
- Rodriquez-Tudela, J.L.; Donnelly, J.P.; Arendrup, M.C.; Arikan, S.; Barchiesi, F.; Bille, J.; Chryssanthou, E.; Cuenca-Estrella, M.; Dannaoui, E.; Denning, D.; et al. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia–forming moulds Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14, 982–984.
- Schmitz-Felten, E.; Kuhl, K.; Graveling, R. Occupational Exposure to Biocides (Disinfectants and Metal Working Fluids)—OSHWiki. 2013 Available online: http://oshwiki.eu/wiki/Occupational_exposure_to_biocides_(disinfectants_and_metal_working_fluids)
- Stupar, M.; Grbić, M.L.; Simić, G.S.; Jelikić, A.; Vukojević, J.; Sabovljević, M. A Sub-Aerial Biofilms Investigation and New Approach in Biocide Application in Cultural Heritage Conservation: Holy Virgin Church (Gradac Monastery, Serbia). Indoor Built Environ. 2014, 23, 584–593.
- Stupar, M.; Grbić, M.L.; Džamić, A.; Unković, N.; Ristić, M.; Jelikić, A.; Vukojević, J. Antifungal Activity of Selected Essential Oils and Biocide Benzalkonium Chloride against the Fungi Isolated from Cultural Heritage Objects. S. Afr. J. Bot. 2014, 93, 118–124.
- Tisserand, R.; Young, R. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals, 2nd ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2013; ISBN 9780443062414.
- Varnai, V.M.; Macan, J.; Ćalušić, A.L.; Prester, L.; Macan, B.K. Upper Respiratory Impairment in Restorers of Cultural Heritage. Occup. Med. 2011, 61, 45–52.
- Maxim, D. Health effects of exposure to indoor fungi case study-the restorers of mural paintings. Eur. J. Sci. Theol. 2013, 9, 149–157.
- Veneranda, M.; Blanco-Zubiaguirre, L.; Roselli, G.; di Girolami, G.; Castro, K.; Madariaga, J.M. Evaluating the Exploitability of Several Essential Oils Constituents as a Novel Biological Treatment against Cultural Heritage Biocolonization. Microchem. J. 2018, 138, 1–6.

Green and long-lasting biocides: coupling natural substances and nanotechnologies
Biocidi verdi e di lunga durata: accoppiamento di sostanze naturali con nanotecnologie

Giulia Caneva[1], Flavia Bartoli[1,2]

[1]Dip. Scienze, Università degli Studi di Roma Tre
[2]Istituto di Scienze per il Patrimonio Culturale Centro Nazionale delle Ricerche (ISPC-CNR)

Keywords: biodeterioration control; nanocapsules; essential oils; multifunctional coatings

Riassunto

Il biodeterioramento dei materiali lapidei è un fenomeno rilevante e molti differenti metodi di trattamento sono stati sviluppati insieme a strategie di conservazione preventiva. A causa del rischio per la salute umana e per l'ambiente, l'uso dei biocidi tradizionali per ridurre i fenomeni di biodeterioramento è sempre più scoraggiato. Oggi la ricerca è soprattutto focalizzata sull'uso di biocidi non pericolosi per l'ambiente e nello sviluppo di promettenti nanotecnologie. Questo lavoro vuole dare un contributo alla tematica accoppiando l'uso di sostanze naturali e nanocapsule, verificando l'efficacia pluriennale di coatings già sviluppati (caricato di mercaptobenzotiazolo (MBT) e zosterato di sodio (ZOS)) ed esposti su campioni test presso le Mura Aureliane (Roma) e l'efficacia di ulteriori composti (olio di origano ed eugenolo) in nuove nanocapsule. Qui inoltre valutiamo gli effetti dei coatings sulle patine biologiche analizzandone l'evoluzione chimico-fisica nel tempo e perfezionandoli anche tramite nuove sintesi. I risultati preliminari ottenuti hanno mostrato che l'uso delle nanoparticelle può aumentare l'attività biocida e che una prolungata azione nel tempo dei coating nanostrutturati presenta un'attività variabile in funzione dei microorganismi trattati e del litotipo.

Biodeterioration of stone monuments is a relevant phenomenon, and many different methods of treatments and biocides products have been used in combination with preventive strategies. Due to risks for human health and the environment, the use of traditional biocides to reduce bio-deterioration phenomena of stone monuments is increasingly discouraged. Nowadays, the research is focusing on sustainability eco-friendly biocides, such as on the development of promising nanotechnologies. This paper is aimed in giving a contribution in this field, coupling natural substances and nanotechnologies, through a plurennial evaluation of previous developed coatings (based on 2 mercaptobenzotiazole (MBT) and sodium zosterate (ZOS) applied on samples at the Aurealian walls (Rome), and testing further combination of natural compounds in nanocapsules. Now we also assess the effects on the growing biopatinas and the chemical-physical evolution during the time, and we will also increase the performances trough new synthesis. The preliminary results showed that the use of nanosystem can improve the biocidal activity and a longer activity of the biocide, with a differential efficiency of the coatings in relation to the microorganisms and to the lithotype.

1. Introduzione

Il fenomeno del biodeterioramento dei materiali lapidei è particolarmente rilevante quando le condizioni ambientali, l'apporto dei nutrienti e le condizioni edafiche (bioricettività) favoriscono la crescita biologica [Caneva et al. 2008; Cutler & Viles 2010; Miller et al. 2012]. Differenti metodi di trattamento, quali UV, pulitura laser, microonde, trattamenti di shock termico (Heat Shock Treatments (HSTs), oltre che sostanze biocide, sono state usate in combinazione a strategie di prevenzione [Tretiach et al. 2012; Mascalchi et al. 2015; Caneva & Tescari 2017; Fidanza & Caneva 2019].
Considerando il rischio per la salute umana e per l'ambiente, l'uso dei biocidi tradizionali è però sempre più scoraggiato e la ricerca per la conservazione dei beni culturali è focalizzata ad individuare tecniche il più possibile "green ed ecosostenibili". Oltre alla selezione di biocidi non pericolosi per l'uomo e l'ambiente, ci si sta focalizzando nello sviluppo di nanotecnologie, in quando l'applicazione di un "nanocomposto" permette quantità di biocida fortemente ridotte, e una riduzione dei costi delle operazioni di restauro, grazie ad un controllo prolungato nel tempo.
La ricerca di prodotti polifunzionali rappresenta quindi un approccio innovativo in grado di apportare significativi miglioramenti alle tecniche di restauro. Risultati di precedenti sperimentazioni hanno evidenziato tale potenzialità e, all'interno del progetto SUPERARE (Prog. Gruppi di Ricerca 2020 dalla Regione Lazio), sono stati testati sulle colonizzazioni presenti sulle mura Aureliane due biocidi - 2 mercaptobenzotiazolo - (MBT) e zosterato di sodio (ZOS) rilasciati da nanocapsule e nanoparticelle caricate in bassa concentrazione.
Il presente lavoro, sviluppato all'interno del progetto GRAL ed analogamente finanziato dalla Regione Lazio, intende quindi: a) verificare l'efficacia pluriennale dei coatings già sviluppati; b) dare un nuovo contributo, testando ulteriori composti di origine naturale applicati anch'essi mediante l'utilizzo di nanotecnologie ed analizzandone l'evoluzione chimico-fisica dei coating nel tempo. Tutto questo sarà poi associato ad una ulteriore valutazione dei metodi di controllo low-cost dei parametri ambientali e quindi alla divulgazione delle conoscenze e alla standardizzazione di protocolli.

2. Materiali e metodi

La recente review di Fidanza & Caneva (2019) ha permesso di individuare l'olio di origano e l'eugenolo come ulteriori biocidi green meritevoli di sperimentazione, testando sia nanocapsule che nanoparticelle mesoporose. Per verificare l'efficacia pluriennale di coating nanostrutturati già collocati presso le Mura Aureliane (Fig. 1a) si sta valutando il procedere della colonizzazione biologica mediante il rilevamento di immagini e con misure colorimetriche.

Si stanno valutando eventuali variazioni strutturali dei coating mediante test di interferenza eseguiti secondo diversi standard UNI e RIlem: Variazioni colorimetriche (UNI-EN 15886 (2011); UNI EN 15886 (2010); Uni Normal 43/93 (1994); Assorbimento di acqua in lab and situ mediante Karsten pipe (NormaL 43/88 (1988), RILEM II. "contact sponge method" UNI 11432:2011; assorbimento di acqua a bassa pressione (CNR- Normal 44/93). Ulteriori analisi verificheranno l'eventuale aumento di rugosità e il cambiamento microstrutturale (mediante SEM-Normal 8/81).
Si sta anche procedendo con la valutazione della stabilità chimico-fisica delle matrici combinate TEOS/nanoparticelle di TiO2, nonché dei nanocontenitori di silice, al variare di T, RH, ed irraggiamento, mediante invecchiamento accelerato in camera climatica, secondo gli opportuni standard (American Society for Testing and Materials International ASTM D4303-10 con adeguate modifiche). Si precederà successivamente a studi di fotodegradazione esponendo i supporti ad irraggiamento con radiazioni solari ed UV. Lo stesso protocollo di invecchiamento verrà adottato per le matrici ed i nanocontenitori funzionalizzati con i nuovi biocidi selezionati.
I litotipi selezionati solo stati: marmo di Carrara, travertino, malta, mattone e peperino. I relativi provini (dim 5x5x1) sono stati sottoposti ad invecchiamento consistente in due cicli di riscaldamento a 600 °C e bagno in acqua distillata per 24h, con lo scopo di aumentarne la porosità. Tutti i litotipi non trattati sono stati caratterizzati mediante prove di assorbimento di acqua per capillarità, permeabilità al vapore acqueo, angolo di contatto, profilometria, colorimetria e osservazione al SEM, seguendo le norme UNI EN 15801:2010 per le prove di assorbimento, DIN 52 615 per la prova di permeabilità e NORMAL 43/93 per prove colorimetriche.
Per l'incapsulamento dei biocidi green scelti, sono state testate diverse procedure di sintesi e al fine di valutare la procedura migliore, le particelle sono state analizzate al SEM per valutarne la morfologia e la distribuzione dimensionale.
Per la caratterizzazione dell'efficacia biocida sono state collezionate patine biologiche nell'area delle Mura Aureliane (Figura 1) in cui si sta svolgendo il monitoraggio ed esse sono state messe in coltura, per poi procedere all'identificazione su base morfologica al microscopio ottico e con tecniche molecolari. Tali colture miste di microorganismi sono state inoculate con i sistemi di nanocaspule caricati con i biocidi green e vuoti, e con i biocidi puri. Mediante osservazione al microscopio ottico a luce trasmessa, in luce visibile ed UV si sta valutando qualitativamente e quantitativamente l'efficienza e l'efficacia dei nanosistemi.

Figura 1. Campionamento e osservazione al microscopio ottico delle patine biologiche campionate ai fini della sperimentazione.

3. Risultati e discussione

Nei biofilm che si sviluppano sulle superfici dei materiali, si è rilevata una dominanza di microorganismi fotosintetici, quali alghe verdi e cianobatteri, e in particolare dei generi *Chlorococcum* sp. e *Leptolyngbya* sp., associati a una modesta presenza di funghi meristematici. La caratterizzazione molecolare è in corso. A distanza di 2 anni dall'esposizione dei provini trattati (in SUPERARE) si sta osservando una lenta e minima ricolonizzazione da parte di organismi fungini e altri organismi eterotrofi non fotosintetici, che lascia presupporre una funzionalità del coating caricato con biocidi (MBT e Zosterato di sodio) verso gli organismi fotosintetici. Attualmente si osserva anche un differente grado di colonizzazione tra i diversi materiali lapidei ed i diversi sistemi/biocidi.
Per il perfezionamento dei coatings tramite nuove sintesi di nanoparticelle e biocidi green, le particelle che hanno fornito il miglior risultato, ovvero dimensioni al di sotto dei 200 nm e un'omogenea distribuzione dimensionale, sono state sottoposte ad un'ulteriore caratterizzazione tramite TEM, BET e μ-Raman. Per valutare la capacità di rilascio del biocida caricato nelle nanocapsule, sono state ulteriormente effettuate analisi di spettrofotometria di assorbimento UV-VIS per l'ottenimento delle curve di calibrazione necessarie alla determinazione del contenuto di biocida rilasciato dalle nanoparticelle.
L'analisi dell'efficacia ed efficienza biocida confrontando i nanosistemi caricati, i biocidi puri e i nanosistemi vuoti ha evidenziato nel caso dell'MBT e dello ZOS che il biocida commerciale ha mostrato maggiore efficacia rispetto al biocida naturale (Bartoli et al. 2021), ma in ogni caso la quantità di biocida caricata è talmente bassa da ridurre le problematiche tossicologiche. Nei test in vitro delle nanocapsule caricate di biocidi naturali quali olio di origano ed eugenolo i risultati sono promettenti, mostrando un'elevata efficacia e efficienza, con una cospicua riduzione della biomassa anche in tempi ristretti (Figura 2). Inoltre, si è evidenziata una differenza di attività nei confronti di alghe e cianobatteri.

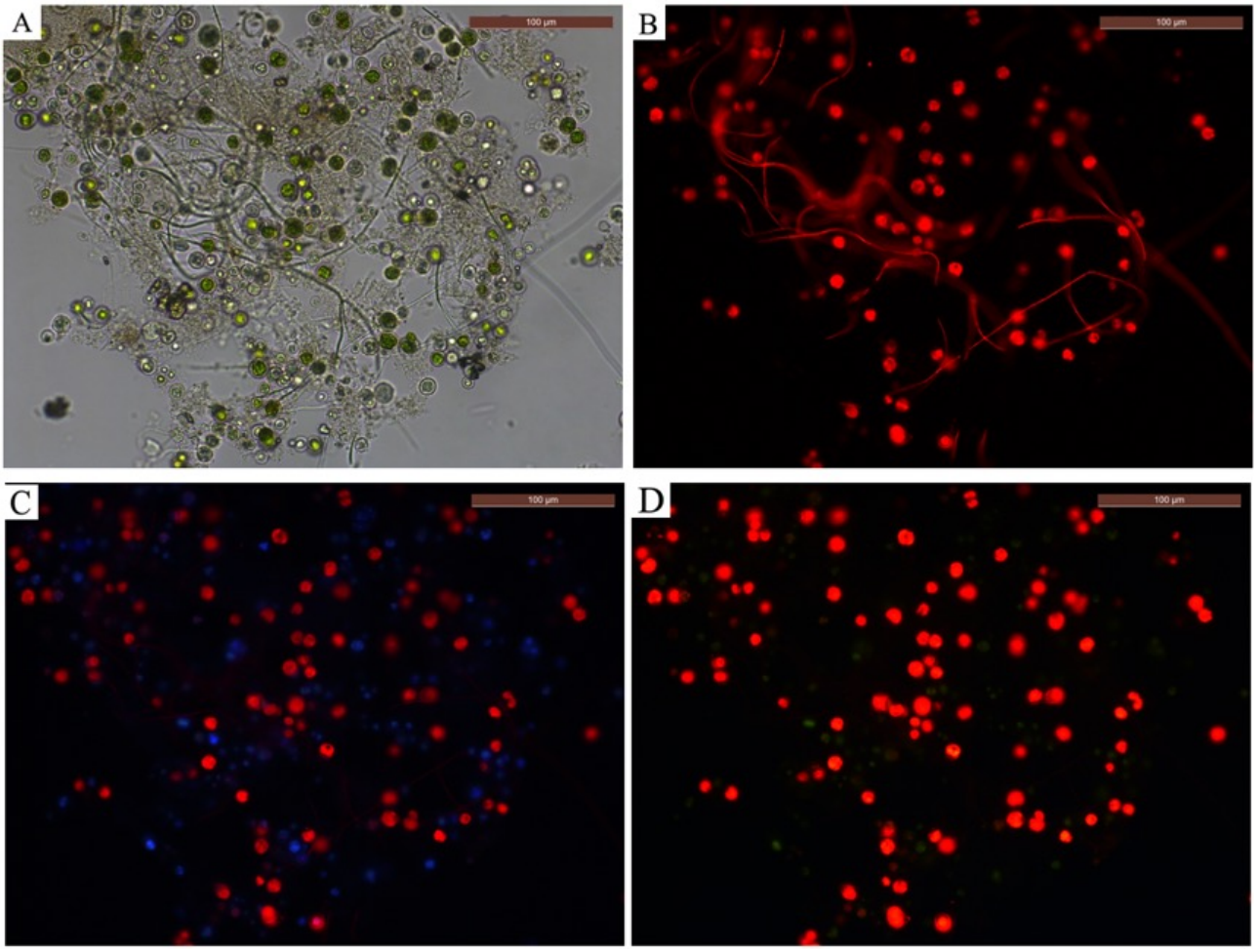


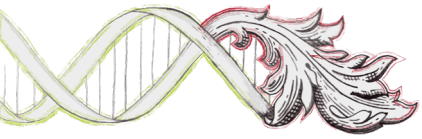
Figura 2. Immagine di coltura trattata con nanosistemi al microscopio ottico in luce visibile, e rispettivamente nel filtro rosso, blu, verde

Conclusioni

Riteniamo che la ricerca in tale ambito sia utile e molto promettente, anche se i dati ottenuti sono ancora di carattere preliminare. Sarà in particolare necessario valutare con maggiore approfondimento la stabilità termica dei coatings, il caricamento di biocidi e il loro rilascio dalle nanocapsule, così la loro stabilità nel tempo.

Referenze bibliografiche

- Bartoli, F., Zuena, M., Sodo. A., & Caneva G. (2021). The efficiency of biocidal silica nanosystems for the conservation of stone monuments: Comparative in vitro tests against epilithic green algae. Applied Sciences, 11(15), 6804. https://doi.org/10.3390/app11156804
- Caneva, G., & Tescari, M. (2017, September). Stone biodeterioration: Treatments and preventive conservation. In Proceedings of the 2017 International Symposium of Stone Conservation, Conservation Technologies for Stone Cultural Heritages: Status and Future Prospects, Seoul, Korea (Vol. 21).
- Caneva, G., Nugari, M. P., & Salvadori, O. (Eds.). (2008). Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation. Getty Publications.
- Cutler, N., & Viles, H. (2010). Eukaryotic microorganisms and stone biodeterioration. Geomicrobiology Journal, 27(6-7), 630-646.
- Fidanza, M. R., & Caneva. G. (2019). Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review. Journal of Cultural Heritage 38: 271-286)
- Mascalchi, M., Osticioli, I., Riminesi, C., Cuzman, O. A., Salvadori, B., & Siano, S. (2015). Preliminary investigation of combined laser and microwave treatment for stone biodeterioration. Studies in Conservation, 60(sup1), S19-S27.
- Miller, A. Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Sáiz-Jiménez, C., Macedo, M. F., & Prieto, B. (2012). Bioreceptivity of building stones: A review. Science of the total environment, 426, 1-12.
- Tretiach, M., Bertuzzi, S., & Candotto Carniel, F. (2012). Heat shock treatments: a new safe approach against lichen growth on outdoor stone surfaces. Environmental science & technology, 46(12), 6851-6859.
- Warscheid, T., & Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 46(4), 343-368.



BIOPULITURA

Introduzione alla Sessione Biopulitura

Giancarlo Ranalli

Le biotecnologie applicate all'arte sono procedure innovative da collocare temporalmente agli inizi del 2000. Tra queste, le biopuliture microbiche prevedono l'impiego di microrganismi opportunamente selezionati nel rimuovere biologicamente i residui e le sostanze indesiderate da superfici alterate. Al riguardo, le problematiche complesse presenti a carico dell'esteso ciclo pittorico del '400 al Camposanto Monumentale di Pisa sono ben note, sia per gli aspetti pionieristici, sia per la vastità applicativa nella biorimozione di colle animali alterate.
Obiettivo della presente Sessione "Biopulitura" è pertanto la presentazione di lavori ed esperienze di "frontiera" nel settore dei Beni Culturali negli ultimi 20 anni.
La tavola rotonda, quindi, consentirà un'occasione di approfondimento, confronto e valutazione critica dei punti di forza e di debolezza, nella prospettiva di ulteriori applicazioni delle biopuliture applicate all'arte.

The development of biotechnology applied to art are innovative procedures to be placed temporally in the early 2000s. Among them, biocleanings are understood as the use of appropriately selected microorganisms in biologically removing residues and unwanted substances from altered surfaces. The complex problems present in charge of the extensive 15th-century pictorial cycle at the Monumental Cemetery in Pisa are well known, both for the pioneering aspects and the breadth of application in the bioremediation of altered animal glues.
Therefore, the objective of this Biocleaning Session is to present "frontier" works and experiences in the field of Cultural Heritage over the past 20 years. The panel discussion, therefore, will provide an opportunity for in-depth discussion, comparison and critical evaluation of strengths and weaknesses, with a view to further applications of biocleaning applied to art.

La collezione microbica ENEA come strumento per un restauro sostenibile

Flavia Tasso, Giada Migliore, Patrizia Paganin, Clelia Isca, Chiara Alisi, Anna Rosa Sprocati

ENEA - Dipartimento dei Sistemi Produttivi e Territoriali- C.R. Cassaccia, Via Anguillarese 301, Roma

Keywords: microbial collections, sustainable restoration, biocleaning, microbial biotechnologies

1. Riassunto

Una collezione microbica è un archivio in cui cellule microbiche, dopo essere state caratterizzate e classificate, vengono mantenute in uno stato inattivo, al fine di essere conservate per un tempo indeterminato. Le collezioni microbiche rappresentano delle risorse di eccellenza per la salvaguardia della biodiversità microbica e per lo sviluppo della bioeconomia e della biosostenibilità.
Nel corso del tempo i ricercatori ENEA hanno isolato, caratterizzato e preservato microorganismi da diverse matrici ambientali, creando la Collezione Microbica ENEA composta da circa 1500 microrganismi tra batteri, lieviti, funghi, alghe e virus, con notevoli potenzialità applicative nei campi ambientale, dei Beni Culturali, della salute, dell'agroalimentare e della bioenergia.
Negli ultimi anni, nel mondo della conservazione del restauro dei Beni Culturali, si sta assistendo ad una transizione verso prodotti e procedure sostenibili, per tutelare la salute degli operatori, proteggere le opere e ridurre l'impatto ambientale. Le biotecnologie microbiche sono uno dei protagonisti di questo processo di transizione, fornendo molti vantaggi rispetto ai metodi chimico-fisici tradizionali: selettività e bassa aggressività per il manufatto, minore pericolosità per gli operatori e compatibilità ambientale. La tecnica che impiega i microrganismi o i loro prodotti come agenti per rimuovere dalle opere depositi indesiderati di qualunque natura viene definita "Biopulitura". L'ENEA ha intrapreso un percorso di ricerca per verificare ad ampio spettro la fattibilità di questa metodologia, cercando di comprenderne le potenzialità e i limiti, sperimentando i numerosi ceppi microbici spontanei conservati nella sua collezione microbica. La procedura di biopulitura sviluppata prevede l'utilizzo di batteri vivi immobilizzati ad alta concentrazione in supportanti a diversa viscosità, per creare il cosiddetto "micro-pack". I casi studio affrontati con successo hanno spaziato tra tipologie di manufatti costituiti da diversi materiali (come affreschi, dipinti murali e mobili, materiale lapideo) e diversi substrati da rimuovere (colle, resine, gesso, carbonati, proteine, idrocarburi, olii, ossidi di metalli).

A microbial collection is an archive in which microbial cells, characterised and identified, are kept in an inactive state in order to be preserved for an indefinite time. Microbial collections are excellent resources for the preservation of microbial biodiversity and for the development of the bio-economy and biosustainability.
Over the course of time, ENEA researchers have isolated, characterised and preserved microorganisms from different environmental matrices, creating the ENEA Microbial Collection composed of about 1500 microorganisms including bacteria, yeasts, fungi, algae and viruses, with great biotechnological potential for applications in different fields: environment, cultural heritage, health, agri-food and bioenergy.
In recent years, the world of Conservation and Restoration of Cultural Heritage is operating a transition towards sustainable products and procedures to safeguard the health of operators, protect works and reduce environmental impact. Microbial biotechnologies are one of the protagonists of this process, providing many advantages over traditional chemical-physical methods: selectivity and low aggressiveness for the artefact, less danger for operators and environmental compatibility. The technique that uses microorganisms or their products as agents to remove undesirable deposits of any nature from the artworks is called "Biocleaning". In the last 17 years ENEA has tested the feasibility of this methodology on a broad scale, trying to understand its potential and limitations, by studying the numerous spontaneous microbial strains stored in its microbial collection. The biocleaning procedure developed involves the use of living bacteria immobilised at high concentration in media of varying viscosity to create the so-called "micro-pack". Successful case studies have ranged from artworks consisting of different materials (such as wall paintings, canvas, and stone material) and different substrates to be removed (glues, resins, gypsum, carbonates, proteins, hydrocarbons, oils and metal oxides).

L'importanza della conservazione dei microrganismi

Il ruolo fondamentale svolto dai microrganismi nel mantenimento della vita sulla terra è indiscusso, ma la conoscenza esistente sull'entità della diversità microbica e della sua distribuzione globale è minima. Per poter conoscere, studiare e di conseguenza utilizzare i microrganismi è tuttavia necessario saperli coltivare e conservare adeguatamente.
In accordo con la Convenzione ONU sulla Diversità Biologica, la "conservazione ex-situ" svolge un ruolo molto importante nella conservazione dei microrganismi poiché la complessità degli organismi unicellulari rende difficile eseguire una " conservazione in-situ".
Una collezione di microrganismi è un vero e proprio archivio in cui cellule microbiche, ottenute da una coltura pura, dopo essere state caratterizzate e classificate vengono mantenute in uno stato inattivo grazie a vari metodi (conservazione in azoto liquido, congelamento, liofilizzazione), al fine di essere conservate per un tempo indeterminato. All'inizio le collezioni microbiche furono per lo più realizzate da istituti universitari specializzati. Il loro fine era creare un punto di riferimento istituzionalizzato per la raccolta, la conservazione e anche la reperibilità di colture pure di particolari microrganismi o di singoli ceppi di essi che avessero un qualunque interesse, sia storico accademico che strettamente applicativo. La prima collezione fu istituita dal Prof. Frantisek Král nel 1890 presso l'Università tedesca di Praga (Çaktu et al., 2011). Un passo fondamentale nella storia delle collezioni microbiche fu compiuto nel 1925 quando, in risposta alla necessità

di una collezione centrale di microrganismi che gli scienziati di tutto il mondo potessero utilizzare per condurre le loro ricerche e far progredire la scienza della microbiologia, nacque l'ATCC (American Type Culture Collection; https://www.atcc.org/). Con il passare degli anni e con il progresso delle conoscenze scientifiche, le collezioni di microrganismi sono aumentate di numero e sono state realizzate anche da enti governativi, multinazionali industriali o istituti medici, data la loro capitale importanza in numerosissimi ambiti, quali la medicina, l'industria e l'ambiente.
Nel 1970 è nata la WFCC (World Federation of Culture Collections; https://wfcc.info/), una commissione multidisciplinare dell'Unione Internazionale delle Scienze Biologiche (IUBS) che si occupa della raccolta, autenticazione, manutenzione e distribuzione di colture di microrganismi e cellule in coltura. Il suo scopo è promuovere e sostenere la creazione di collezioni culturali e servizi correlati, fornire collegamenti e creare una rete di informazioni tra le collezioni e i loro utenti, organizzare workshop e conferenze, pubblicazioni e newsletter e lavorare per garantire la perpetuazione a lungo termine di collezioni importanti. La WFCC ha creato il Global Catalogue of Microorganisms (GCM; https://gcm.wdcm.org/), un database completo e dinamico di risorse microbiche, ottenuto raccogliendo le informazioni sui ceppi presenti nelle diverse collezioni nel mondo e correlandole alle corrispondenti sequenze genomiche e proteomiche. L'attuale versione di GCM contiene informazioni su oltre 273.933 ceppi e include 43.436 specie batteriche, fungine e archaea provenienti da 52 raccolte in 25 paesi.
In Europa la comunità scientifica ha lanciato un appello universale per uno sforzo comune verso la conoscenza e la conservazione della biodiversità microbica. Da questo sforzo congiunto è nata nel 2010 MIRRI (Microbial Resource Research Infrastructure; https://www.mirri.org/), un'infrastruttura paneuropea che comprende oltre 50 centri di risorse biologiche, collezioni di colture e istituti di ricerca di dieci paesi europei e un paese associato. I suoi obiettivi sono la conservazione, lo studio sistematico, la valorizzazione e lo scambio delle risorse microbiche e della biodiversità; MIRRI si pone al servizio delle scienze della vita e della bioindustria e facilita l'accesso alla più vasta collezione di microorganismi, dei loro prodotti e dei dati ad essi associati.
Queste premesse ci fanno comprendere come le collezioni microbiche siano da considerarsi delle risorse di eccellenza per la salvaguardia della biodiversità microbica e per lo sviluppo della bioeconomia e della biosostenibilità.

La collezione microbica ENEA-MIRRI

Nel corso degli anni i ricercatori ENEA hanno isolato, caratterizzato e preservato microorganismi e pool microbici da diverse matrici ambientali ed ecosistemi naturali. Si è così andata costituendo la collezione microbica ENEA composta da circa 1500 microrganismi tra batteri, lieviti, funghi, alghe e virus, con notevoli potenzialità applicative in campo ambientale, dei beni culturali, della salute, dell'agroalimentare e della bioenergia. La collezione comprende batteri con attività di promozione della crescita delle piante e di biocontrollo di funghi fitopatogeni; ceppi microbici adattati ad ambienti estremi (siti contaminati e degradati, suoli aridi e impoveriti, siti archeologici e ambienti ipogei); ceppi microbici utili per la produzione di molecole ad alto valore biologico ad uso alimentare e nei processi di conversione di biomasse in biocarburanti, pool microbici con funzioni idrolitiche e fermentanti per applicazioni biotecnologiche; ceppi di microalghe di acqua dolce e marina utili per la produzione di molecole bio-based nei settori nutraceutico, cosmeceutico e farmaceutico o per la
produzione di energia; infine, un virus vegetale con applicazione in diversi settori delle nanotecnologie, soprattutto in campo biomedico, per la messa a punto di vaccini innovativi, di sistemi di diagnostica e per la somministrazione mirata di farmaci in campo oncologico.
La collezione microbica ENEA rappresenta, pertanto, una preziosa fonte di risorse per lo sviluppo delle biotecnologie e uno strumento per tutelare e valorizzare le risorse di biodiversità microbica acquisite dall'ente di ricerca.
La collezione ENEA è inserita nel network italiano dei Centri di Risorse Biologiche - Joint Research Unit MIRRI-IT (https://sostenibilita.enea.it/news/microbial-resource-research-infrastructure-italian-node-mirri-it). Grazie al progetto "SUS- MIRRI.IT" (Strengthening the MIRRI Italian Research Infrastructure for Sustainable Bioscience and Bioeconomy) avviato nel 2022 e finanziato nell'ambito del PNRR, l'ENEA, insieme agli altri centri italiani coinvolti, ha intrapreso un processo di adeguamento delle collezioni agli standard di gestione internazionale per garantire la qualità del materiale conservato, unitamente alla costruzione di una piattaforma digitale che porterà alla creazione di soluzioni e prodotti innovativi di interesse biotecnologico, stimolando la bioeconomia.

L'impiego dei microrganismi per la Biopulitura

L'obiettivo 11.4 dell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile richiama la comunità internazionale ad un'azione globale di protezione e promozione del patrimonio culturale e naturale, indicandolo come elemento contributore alla creazione di città e territori inclusivi, sicuri, resilienti e sostenibili. Da qui la necessità di una transizione nel campo della conservazione e del restauro dei Beni Culturali verso prodotti e procedure che tengano conto degli aspetti ambientali, sociali ed economici. Le opere d'arte e gli operatori sono costantemente esposti a rischi a causa dell'utilizzo di prodotti nocivi, che possono provocare effetti tossici alla salute, danneggiare le opere stesse e produrre rifiuti di difficile smaltimento.
Le biotecnologie microbiche sono uno dei protagonisti di questo processo di transizione. La possibilità di sfruttare le cellule microbiche ed i loro prodotti metabolici fornisce molti vantaggi rispetto ai metodi chimico-fisici tradizionali: selettività e bassa aggressività per il manufatto, minore pericolosità per gli operatori e compatibilità ambientale. I microorganismi sono infatti in grado di esprimere un ampio spettro di attività metaboliche modulando la produzione di numerosissime molecole, inclusi gli enzimi, già noti nel restauro, ma poco utilizzati per i costi e
le condizioni operative stringenti.
La procedura che impiega i microrganismi o i loro prodotti come agenti per rimuovere dalle opere depositi o substrati indesiderati di qualunque origine viene definita "biopulitura" (Sprocati et al., 2018).
Gli studi sull'utilizzo dei microrganismi come agenti di restauro hanno avuto inizio negli anni '80 quando alcuni scienziati (Atlas et al., 1988) dimostrarono che ceppi del genere Desulfovibrio erano in grado di ridurre i solfati, presenti nelle croste nere, a solfiti producendo calcite. Dalla fine degli anni '90 in Italia dalla collaborazione tra l'Università di Milano e l'Università del Molise sono nati numerosi studi applicativi che hanno permesso di identificare microrganismi in grado

di rimuovere nitrati e solfati da materiali lapidei (Ranalli et al., 1997) e altri capaci di rimuovere colle animali da affreschi (Ranalli et al., 2005).

La collezione microbica ENEA per la biopulitura

In risposta alla necessità di estendere l'applicazione di questa tecnologia ad altre tipologie di materiali e di depositi da rimuovere e, soprattutto, grazie alla spinta dei restauratori che si sono mostrati fortemente motivati a sperimentare la biopulitura come alternativa ai metodi di pulitura tradizionali, l'ENEA ha intrapreso un percorso di ricerca con l'obiettivo di verificare a più ampio spettro la fattibilità di questa metodologia, cercando di comprenderne le potenzialità e i limiti. Le ricerche sono partite dalla possibilità di sperimentare i numerosi ceppi microbici spontanei, conservati nella collezione "in house" ENEA-MIRRI. I ceppi da applicare in ogni caso studio, oltre a risultare efficaci nella metabolizzazione dei substrati da rimuovere dall'opera, dovevano rispondere a due requisiti fondamentali: non essere patogeni e non produrre spore. Se il primo requisito è fondamentale per la tutela della salute degli operatori e dei fruitori delle opere, il secondo impedisce che eventuali forme quiescenti del microrganismo impiegato restino sull'opera e si riattivino nel tempo, producendo effetti non controllati.
I casi studio affrontati hanno spaziato tra tipologie di manufatti costituiti da diversi materiali (carta, pergamena, affreschi, dipinti murali e mobili su tela e su tavola, materiale lapideo) e diversi substrati da rimuovere (colle, resine sintetiche e naturali, gessi, carbonati, proteine, idrocarburi, olii, ossidi di metalli). La tabella 1 riassume gli interventi e i casi studio affrontati tra il 2006 e i primi mesi del 2023 con le procedure messe a punto nel nostro laboratorio, grazie alla curiosità e alla lungimiranza di tanti restauratori e in collaborazione con numerose Ditte di restauro, Musei, Sovrintendenze, Scuole di alta Formazione per il Restauro. Questi interventi sono stati realizzati con ceppi batterici diversi, a seconda della tipologia di patina da rimuovere.

Procedure di biopulitura nei casi di studio

La procedura di biopulitura sviluppata dal nostro laboratorio prevede l'utilizzo di batteri vivi immobilizzati ad alta concentrazione (10^8 CFU/ml) in supportanti a diversa viscosità (Sprocati et al., 2020), per creare un micro-pack, facile da applicare e rimuovere senza lasciare residui sul manufatto (Mazzoni et al., 2014). Questi micro-packs possono essere applicati su superfici verticali e soffitti; non richiedono condizioni operative stringenti in termini di temperatura e pH e non hanno problemi di smaltimento. Il micro-pack può essere convenientemente preparato su un tavolo di appoggio oppure direttamente sull'oggetto da trattare. Nel primo caso, viene prima adagiato un film plastico, che preserva l'umidità durante il trattamento, seguito da un velo di carta leggermente inumidita (es. carta giapponese), uno strato di supportante in cui sono stati preventivamente inglobati i batteri e un altro velo di carta. L'interposizione della carta facilita l'applicazione e la rimozione del micro-pack e consente ispezioni periodiche per verificare lo stato di avanzamento del processo. Tuttavia, l'opportunità di interporre carta può essere valutata di volta in volta, in base alla situazione specifica; il contatto diretto con il materiale originale a volte può rivelarsi più adatto. Dopo la rimozione, un tampone umido o una spugna sono impiegati nella pulitura della superficie.
Il tempo di contatto del micro-pack dipende da vari fattori, quali la natura del materiale da asportare, lo spessore dello strato, l'attività metabolica del microrganismo, la natura e lo stato di conservazione dei manufatti. Le procedure possono essere adattate in base alle specifiche esigenze del caso. In figura 1 sono mostrati alcuni dei siti e delle opere sui quali è stata applicata con successo la procedura di biopulitura.

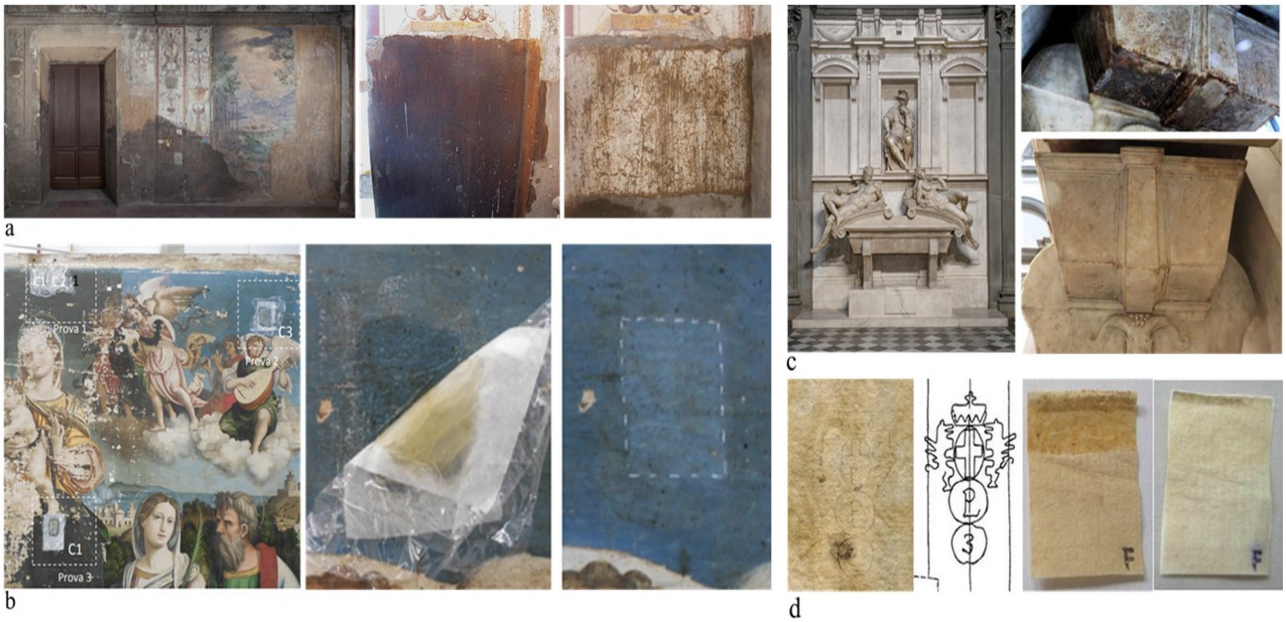


Figura 1: Immagini di alcuni dei siti e delle opere sui quali è stata applicata con successo la procedura di biopulitura. A fianco di ogni sito di intervento è mostrato il risultato dell'applicazione del micropack. a: Loggia inferiore della Casina Farnese sul Colle Palatino, Roma (Mazzoni et al., 2014); b: Madonna della Cintola, Laboratorio Dipinti dei Musei Vaticani, Roma (Crisci et al. 2022); c: Tomba di Lorenzo duca d'Urbino, Sagrestia Nuova, Firenze (Alisi et al., 2022); d: Documento notarile in carta della Repubblica di Genova, XVIII secolo, Istituto Centrale per la Grafica, Roma (Barbabietola et al., 2016).

Tabella 1: Casi studio di biorestauro svolti tra il 2006 e il2023 affrontati da ENEA in collaborazione con sovrintendenze, musei, scuole di alta formazione e ditte di restauro. Sono indicati i siti/opere oggetto degli interventi, le problematiche affrontate e gli enti coinvolti.

Intervento	Problematica	Collaborazione
Tomba della Mercareccia, Tarquinia	biodeteriogeni	2006- Ditta Adele Cecchini, Soprintendenza dell'Etruria Meridionale
Dipinti murali, Casina Farnese, Colle Palatino, Roma	carbonati, gesso, caseina	2012-Ditta Adele Cecchini, Soprintendenza
Documento Repubblica di Genova, XVIII secolo, Istituto Centrale per la Grafica, Roma	colla animale	2013- Istituto Nazionale per la Grafica
Mitreo Terme di Caracalla, Roma	biodeteriogeni	2014- Soprintendenza SSBAR, ditta Tecno-el
Dipinti murali, Palazzo dei Papi, Avignone	polivinilacetato	2014 Consorzio Arké
Giardini Vaticani, Roma	biodeteriogeni, sali e ossidi di rame	2013-2016 Laboratorio Marmi-Musei Vaticani
Chiesa di San Giorgio, Bitti, Nuoro	carbonati	2015- Gabriella Usai, ditta di Restauro
Dipinti murali, Galleria Carracci a Palazzo Farnese, Roma	ossidi di ferro	2015- Ditta L. D'Alessandro, ATI-Farnese
Statue in marmo La lupa, Testa di Donna, Idealità e materialismo, Cleopatra, Galleria Arte Moderna, Roma	cere, grassi, idrocarburi	2014- 2018 GAM
Dipinto su tavola Madonna della Cintola, Musei Vaticani	colletta in olio	2015- GRS e Laboratorio dipinti dei Musei Vaticani; Università Suor Orsola Benincasa
Domus Aurea, Roma	biodeteriogeni	2015-2023- Soprintendenza Speciale per il Colosseo
Tomba dei Rilievi, Cerveteri	biodeteriogeni	2016- Sovrintendenza dell'Etruria Meridionale
Statua romana in marmo greco Bacco col cesto, Venaria Reale, Torino	Paraloid	2016- Ditta A. Iaccarino; Centro La Venaria Reale
Dipinto privato	biodeteriogeni	2018-2020 Accademia delle Belle Arti, L'Aquila
Manufatto Egizio, Torino	bioconsolidamento	Fondazione "La Venaria Reale"; Università di Torino
Cippo in marmo, Terme di Diocleziano, Roma	biodeteriogeni	2018-2022 Soprintendenza, Museo Nazionale Romano, Università della. Tuscia
Affreschi, Cappella XIII, Orta S. Giulio	biodeteriogeni	2018- ATI- Carla Tomasi
Stucchi decorativi, basilica di Santa Pudenziana, Roma	sali e ossidi di rame	2019- ICR
Castello S. Severa	biodeteriogeni	2020- Ditta Antonella Amoruso
Sagrestia Nuova di Michelangelo, Firenze	ossalati, fosfati, proteine	2020-2022 Musei del Bargello
Mosaico Poggio Moscini, Bolsena	bioconsolidamento	2020- Università della Tuscia
Tele Vitone, Roma	biodeteriogeni	2021-2023 Fondazione MAXII
Casino del Bel Respiro, Villa Pamphilj, Roma	biodeteriogeni	2022- Ditta Carla Tomasi
Portico Galleria Borghese, Roma	Paraloid	2022- Galleria Borghese
Frammento di statua, National Gallery Washington	macchie brune: olio, cere	2022- National Gallery Washington
Dipinti murali Castello Giulio II, Navi romane, Museo delle Navi, Roma	Paraloid, polivinilacetato, cera	2022-2023 Parco Archeologico di ostia Antica
Affreschi, Chiesa di S. Orso, Aosta	Paraloid, polivinilacetato, cera	2022- Soprintendenza Valle d'Aosta
Dipinto su tela a tempera magra, Roma	Paraloid	2022- ICR
Tela di Sironi, Milano	vernice terpenica	2022- Fondazione Beato Angelico
La tela dei Santi Ambrogio e Girolamo con la Vergine Incoronata, Viterbo	mastice, colla animale	2022- Università della Tuscia
Madonna del Parto, Jacopo Sansovino, Chiesa di S. Agostino, Roma	macchie brune: olio, cere	2022- Anna Borzomati
Teste monumentali, Terme di Diocleziano, Roma	biodeteriogeni	2022- Df14restaurobeniculturali
Prove esplorative- OPD, Firenze	ossidi di ferro, Primal	2023-Opificio delle Pietre Dure
Affresco "La Maestà", Cimabue, Basilica inferiore, Assisi	Paraloid, colla animale	2023- Tecnireco, Yococu

2. Conclusioni

I casi descritti dimostrano che la pulitura mediante batteri, condotta secondo un approccio basato sull'integrazione delle conoscenze, rappresenta una soluzione per la transizione ecologica dei prodotti e dei metodi di restauro, rispondendo ai criteri di sostenibilità sociale ambientale ed economica. Non dimentichiamo, però, che la biopulitura non deve essere necessariamente un sostituto della pulitura tradizione, considerato che i due metodi in molti casi possono risultare complementari e che l'azione preliminare dei batteri può consentire una riduzione dell'impiego di prodotti nocivi per la salute del restauratore.

3. Ringraziamenti

"Parte di questo lavoro è stato condotto grazie ai fondi European Commission – NextGenerationEU, Project SUS-MIRRI.IT "Strengthening the MIRRI Italian Research Infrastructure for Sustainable Bioscience and Bioeconomy", code n. IR0000005."

4. Bibliografia

1) K. Çaktu, E.A. Turkoglu. Microbial Culture Collections: The Essential Resources for Life. Gazi University Journal of Science 24(2), pp. 175-180, (2011).
2) A.R. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, P. Marconi, G. Migliore. Formule microbiche per l'arte. Kermes 100, pp. 23-26 (2018).
3) R.M. Atlas, A.N. Chowdhury and K. Lal Gauri. Microbial calcification of gypsum-rock and sulphated marble. Studies in Conservation 33, pp. 149-153 (1988).
4) G. Ranalli, M. Chiavarini, V. Guidetti, F. Marsala, M. Matteini, E. Zanardini, C. Sorlini. The Use of Microorganisms for the Removal of Sulphates on Artistic Stoneworks. International Biodeterioration & Biodegradation. 40 (24), pp. 255-261, (1997).
5) G. Ranalli, G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, M.P. Colombini, I. Bonaduce, E. Zanardini, P. Abbruscato, F. Cappitelli and C. Sorlini. Biotechnology applied to cultural heritage: biorestoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. Journal of Applied Microbiology 98, pp. 73–83, (2005).
6) A.R. Sprocati, C. Alisi, G. Migliore, P. Marconi, F. Tasso. Sustainable restoration through biotechnological processes: a proof of concept. In "Roles of microorganisms in heritage degradation and preservation" (E. Joseph, P. Junier eds.) Springer, pp. 235-261, ISBN 978-3-030-69411-1, (2020).
7) M. Mazzoni, C. Alisi, F. Tasso, A. Cecchini, P. Marconi, A.R. Sprocati. Laponite micro-packs for the selective cleaning of multiple coherent deposits on wall paintings: The case study of Casina Farnese on the Palatine Hill (Rome-Italy). International Biodeterioration & Biodegradation 94, pp. 1-11, (2014).
8) L. Crisci, C. Alisi, M. Pratelli, U. Santamaria, A.R. Sprocati. Il Biorestauro: messa a punto di una procedura su misura per l'opera. In: Tra cielo e terra. La Madonna della Cintola di Vincenzo Pagani. Edizioni Musei Vaticani, pp.189-207 (2022).
9) C. Alisi, D. Magrini, S. Vettori, B. Salvadori, M. Vincenti, D. Manna, M. Bietti, A.R. Sprocati. Sustainable Restoration Guided by Scientific and Archival Investigations: The Bio-Cleaning of Lorenzo Duke of Urbino's Sarcophagus, a Michelangelo's Masterpiece in the Medici Chapels. Heritage.; 5(4):3359-3373. https://doi.org/10.3390/heritage5040172. (2022).
10) N. Barbabietola, F. Tasso, C. Alisi, P. Marconi, B. Perito, G. Pasquariello, A.R. Sprocati. A safe microbe-based procedure for a gentle removal of aged animal glues from ancient paper. International Biodeterioration & Biodegradation 109, pp. 53-60, (2016).

Gel biocidi a base di polivinil alcol per la pulitura e la disinfezione dei beni culturali

Vanessa Rosciardi[1], Piero Baglioni[1]

[1] CSGI, Consorzio interuniversitario per lo sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase, Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff", Università degli Studi di Firenze via della lastruccia 3,, 50019 Firenze

Keywords: Gel, Cleaning, Cultural Heritage, PVA, biocidal, B. Subtilis

1. Riassunto

La proliferazione incontrollata di microorganismi su superfici artistiche può rappresentare un importante rischio per la corretta conservazione dei beni culturali. Una disinfezione generica può essere ottenuta mediante l'applicazione diretta di alcoli o fluidi a carattere ossidativo sulle superfici di interesse. Tuttavia, applicazioni di questo tipo sono poco controllabili in termini di tempo e superficie da trattare (problema comune in tutti i casi di utilizzo di fluidi liberi) e risultano poco selettive nei confronti dei microorganismi target. Il meccanismo di azione di fluidi disinfettanti di largo uso è infatti molto generico e può potenzialmente provocare danni di tipo ossidativo all'opera trattata. Tenendo a mente queste considerazioni, in questo contributo presentiamo la formulazione di una nuova classe di idrogel disinfettanti a base di poli(vinil-alcol) (PVA) covalentemente funzionalizzato con una N-aloammina biocida. In questi sistemi, il controllo puntuale dell'azione disinfettante è garantito dal fatto che il componente biocida non è un fluido libero, né un fluido confinato, bensì delle molecole altamente efficaci ma chimicamente fissate sul reticolo del gel. Inoltre, per quanto il meccanismo con cui le N-aloammine esercitano l'azione biocida non sia ancora del tutto noto, è invece confermata da diversi studi l'altissima specificità di interazione tra N-aloammine e batteri, rendendo i gel qui presentati non solo efficaci, ma assolutamente sicuri per le superfici artistiche su cui possono essere applicati. Diversi gel biocidi sono stati ottenuti variando le formulazioni e la presenza di componenti polimerici aggiuntivi e ne sono stati caratterizzate le caratteristiche meccaniche e morfologiche. L'efficacia biocida dei sistemi è stata investigata a livello preliminare in vitro su colture di *B. subtilis* ed è stata valutata tramite analisi di immagine su campioni fluorescenti osservati in microscopia confocale a scansione laser.

The uncontrolled proliferation of microorganisms on artistic surfaces is an important risk for the proper preservation of Cultural Heritage[1]. Generic disinfection can be obtained by the direct application of alcohols or fluids with an oxidative character on the surfaces of interest. However, applications of this type have little controllability in terms of time and space (a common problem in all cases of use of free fluids) and are not very selective towards the target microorganisms. The mechanism of action of widely used disinfectant fluids is in fact very generic and can potentially cause oxidative damage to the treated artwork. Bearing these considerations in mind, in this paper we present the formulation of a new class of disinfectant hydrogels based on covalently functionalized polyvinyl-alcohol (PVA) with a biocidal N-haloamine. In these systems, the precise control of the disinfectant action is guaranteed by the fact that the biocidal component is not a free fluid, nor a confined fluid, but highly effective molecules chemically fixed on the gel lattice. Moreover, although the mechanism by which N-haloamines exert the biocidal action is not yet fully known, it is confirmed by several studies the very high specificity of interaction between N-haloamines and bacteria, making the gels presented here not only effective but safe for the artistic surfaces on which they can be applied. Several biocidal gels have been obtained by varying the formulations and the presence of additional polymeric components and their mechanical and morphological characteristics have been characterized. The biocidal efficacy of the systems was investigated at the in vitro preliminary level on cultures of B.subtilis and was evaluated by image analysis on fluorescent samples observed via confocal laser scanning microscopy.

2. Introduzione

Il processo di pulitura è un delle fasi più delicate dell'intervento sul patrimonio culturale tangibile. Negli ultimi anni, grazie alla scienza dei materiali, sono stati messi a punto sistemi colloidali complessi e all'avanguardia per questo scopo, garantendo efficacia, selettività e sicurezza nell'applicazione. Più in dettaglio, il campo dei gel è stato ed è tutt'ora ampiamente investigato come materiali di elezione per la pulitura, potendo essere caricati con i fluidi pulenti di interesse (acqua, microemulsioni, solventi) confinandoli al loro interno e modulandone il rilascio sulla superficie da trattare, con un impatto positivo sia sull'efficacia che sulla controllabilità del trattamento.
I materiali target da rimuovere tramite interventi di pulitura sono solitamente rappresentati da polvere, accumulo di sebo per cattivo maneggiamento delle opere, vernici, colle e protettivi invecchiati. Accanto a questi, possono presentarsi situazioni in cui lo strato "indesiderato" da rimuovere risulti di origine microbiologica, con la presenza di biofilm e colonizzazioni di microorganismi di vario genere[1]. In questi casi, da una parte è necessaria l'inattivazione dei microrganismi, dall'altra la rimozione del biofilm in modo controllato dall'opera di interesse. A tal fine, in questo contributo presentiamo una nuova classe di idrogel a base di PVA funzionalizzato con una N-aloammina. Con il termine N-aloammine viene indicata un'ampia classe di molecole che hanno in comune la presenza nella loro struttura di uno (o più) gruppi N-X, dove X è un alogeno, comunemente Cl, Br, I (vedi figura 1).

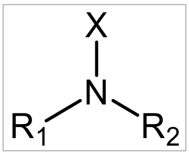


Figura 1. Struttura schematica di una generica N-aloammina. L'atomo indicato con X è un qualsiasi alogeno, più comunemente Cl, Br, I.

In virtù della forte natura ossidativa dell'atomo di alogeno che prende parte al legame N–X, le N-aloammine presentano una notevole attività battericida. La natura ossidativa dell'atomo di alogeno è data dal verificarsi di una sinergia di effetto induttivo (-I) ed effetto mesomerico (+M) che si manifesta nel legame N–X. All'effetto induttivo contribuisce principalmente la natura dei sostituenti R1 e R2: solitamente almeno uno dei due è un gruppo carbonilico. In virtù della presenza di sostituenti elettron-attrattori, l'atomo di azoto risente di un forte effetto induttivo -I. Inoltre, sul legame N-Cl, si manifesta un marcato effetto mesomerico +M, che contribuisce ulteriormente al potere ossidante della molecola. Dal momento che LI'effetto induttivo -I è maggiore all'aumentare dei gruppi carbonilici legati all'azoto, la capacità battericida segue infatti l'ordine: immide > ammide >> ammine[2].
La struttura di questa tipologia di molecole, non solo le rende biocide nei confronti di un ampio spettro di microrganismi, ma apporta altri vantaggi quali stabilità a lungo termine in soluzioni acquose e in stoccaggio in forma secca, possibilità di essere ricaricate del loro potere biocida, corrosività inferiore rispetto ad alogeni liberi, sicurezza per l'ambiente e per le persone, basso costo[3].
L'attività battericida delle N-aloammine dipende dal trasferimento di un alogeno con proprietà ossidanti dalla molecola alla cellula del batterio, il quale avviene in seguito a idrolisi del legame N-X. È stato dimostrato che, in presenza di batteri, il trasferimento dell'alogeno ossidativo avviene preferenzialmente dalla N-aloammina verso il batterio piuttosto che verso l'acqua, rendendo queste molecole altamente target-specifiche[4]. Dopo essere entrata in contatto con il batterio la N-aloammina viene riconvertita nel suo precursore non alogenato (N-H).
Visti i vantaggi dell'utilizzo di gel per la pulitura di superfici artistiche, e considerate le peculiari caratteristiche delle N-aloammine, in questo contributo presentiamo la formulazione di una nuova classe di idrogel disinfettanti a base di PVA covalentemente funzionalizzato con una N-aloammina biocida. In questi sistemi, il controllo puntuale dell'azione disinfettante è garantito dal fatto che il componente biocida non è un fluido libero, né un fluido confinato, bensì delle molecole altamente efficaci ma chimicamente fissate sul reticolo del gel. Inoltre, per quanto il meccanismo con cui le N-aloammine esercitano l'azione biocida non sia ancora del tutto noto, è invece confermata da diversi studi l'altissima specificità di interazione tra N-aloammine e batteri REF, rendendo i gel qui presentati non solo efficaci, ma assolutamente sicuri per le superfici artistiche su cui possono essere applicati. Diversi gel biocidi sono stati ottenuti variando le formulazioni e la presenza di componenti polimerici aggiuntivi e ne sono stati caratterizzate le caratteristiche meccaniche e morfologiche. L'efficacia biocida dei sistemi è stata investigata a livello preliminare in vitro su colture di *B. Subtilis* ed è stata valutata tramite analisi di immagine su campioni fluorescenti osservati in microscopia confocale a scansione laser.

3. Metodologia

In questo contributo, un polimero di nuova sintesi è stato ottenuto funzionalizzando un polivinilalcol ad alto peso molecolare e alto grado di idrolisi con acido 5-idantoinacetico (appartenente alla classe delle N-aloammine) in dimetilsolfossido (DMSO). Il polimero così ottenuto, e da ora in seguito denominato PVA-Hyd, è stato purificato e caratterizzato via risonanza magnetica nucleare (NMR), cromatografia ad esclusione sterica accoppiata a scattering di luce ad angolo variabile (SEC-MALS) e viscosimetria.
I gel contenenti PVA-Hyd sono stati ottenuti tramite un processo puramente fisico a partire da soluzioni acquose del polimero sottoposte a cicli di congelamento e scongelamento.
I gel ottenuti sono stati caratterizzati morfologicamente via microscopia confocale a scansione laser (CLSM). La presenza e distribuzione spaziale dei gruppi funzionali biocidi sono state seguite tramite spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR) e microscopia FTIR. La risposta viscoelastica dei sistemi è stata investigata tramite esperimenti di reologia in regime oscillatorio. I gel funzionalizzati sono stati attivati per semplice immersione in soluzioni 10% di NaClO in acqua. I gel attivati sono stati testati su piastre di coltura inoculate con *B. Subtilis* con un tempo di incubazione totale di 24 ore, successivamente alle quali i batteri vivi e morti sono stati discriminati all'interno dei gel grazie al kit fluorescente BacLight e tramite osservazione CLSM. L'analisi di immagine e la conta batterica sono state effettuate tramite appositi plugins del software ImageJ.

4. Risultati e Discussione

Il polimero di interesse (PVA) è stato funzionalizzato con successo con acido 5-idantoinacetico, con una sostituzione del 4% (%mol/mol), come determinato da analisi NMR. Il polimero funzionalizzato (PVA-Hyd) è stato utilizzato come base per la formulazione di tre principali tipi di idrogel contenenti, rispettivamente ed in aggiunta a PVA-Hyd, PVA non funzionalizzato, PVA a basso grado di idrolisi (L-PVA) e amido di riso commerciale. L'analisi morfologica ha evidenziato una porosità crescente secondo l'ordine PVA < L-PVA< amido, con diametro dei pori da un minimo di 5 ad un massimo di circa 20 µm. Le caratteristiche meccaniche dei gel funzionalizzati sono state investigate tramite reologia in regime oscillatorio e sono risultate comparabili a quelle di gel omologhi non funzionalizzati. La funzionalizzazione residua in seguito al lavaggio dei gel in acqua per due settimane è risultata del 70% per il sistema PVA-Hyd/PVA, del 90% per il sistema PVA-Hyd/amido e del 99% per il sistema PVA-Hyd/L-PVA. La distribuzione dei gruppi funzionali è stata investigata tramite microscopia FTIR in riflettanza, risultando omogenea sia sulla superficie che nello spessore dei gel. Per l'attivazione dei gel, la clorurazione dei gruppi N-H della funzionalità idantoinica è stata effettuata per immersione in soluzioni acquose di NaClO, secondo letteratura. Il protocollo di clorurazione è stato modificato e ottimizzato per tutti i sistemi e le condizioni di massima efficacia sono risultate essere le seguenti: concentrazione di NaClO pari al 10% in peso e tempo di immersione pari a 10 secondi. L'efficacia della clorurazione è stata investigata tramite FTIR-ATR mentre la stabilità dei gruppi funzionali biocidi sulla catena di PVA è stata monitorata tramite NMR. I gel così attivati sono stati posizionati in contatto con terreni di coltura su piastre Petri, precedentemente inoculate con soluzioni batteriche di *B. Subtilis*. Un campione di controllo è stato preparato posizionando un generico gel di PVA non funzionalizzato sullo stesso tipo di piastra inoculata. Dopo 24 ore di incubazione, è stata osservata la crescita batterica su tutte le piastre, ma la totale assenza di crescita in corrispondenza delle aree occupate dai gel funzionalizzati. Al di sotto del gel di controllo (PVA non funzionalizzato), la proliferazione batterica è risultata inalterata (figura 2).

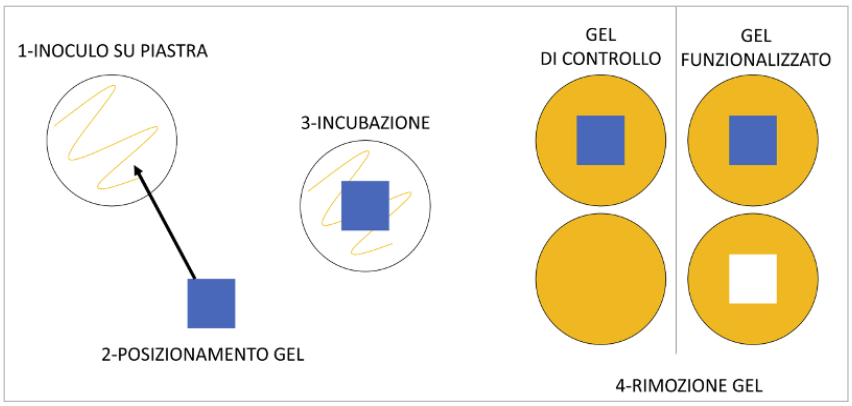


Figura 2. Rappresentazione schematica dei passaggi sperimentali per testare l'efficacia biocida dei gel funzionalizzati con acido 5-idantoinacetico. Dopo aver inoculato il terreno di coltura con una sospensione di B. Subtilis, campioni di gel sono stati posizionati direttamente sulla piastra e l'intero sistema è stato incubato in condizioni di crescita ottimale per 24 ore. Trascorse 24 ore, la proliferazione batterica è risultata evidente su tutta l'area della piastra, meno che in corrispondenza dell'area occupata dai gel biocidi. La stessa procedura sperimentale è stata effettuata utilizzando un gel di controllo (PVA non funzionalizzato). La sua rimozione dopo incubazione ha rivelato la crescita indisturbata dei batteri anche sotto la sua superficie.

I gel rimossi dalle piastre sono stati delicatamente posizionati in apposito porta campione per microscopia confocale laser, su cui è stata gocciolata la soluzione kit BacLight per effettuare un test vivo/morto. In breve, la soluzione kit contiene una particolare molecola fluorescente che si lega differentemente a diversi componenti cellulari dei batteri. Di conseguenza, la molecola fluoresce nel rosso quando è legata a componenti cellulari di batteri danneggiati o morti, e nel verde nel caso sia legata a componenti cellulari di batteri vivi. I risultati delle osservazioni CLSM sono riportati in figura 3. La conta batterica sui diversi campioni è stata effettuata campionando i gel in triplicato e in un minimo di 15 porzioni differenti. Il trattamento dei dati è stato effettuato mediante ImageJ, utilizzando i pluging WaterShed e ObjectCounter. I risultati dei test di vitalità sono riassunti in figura 4 e evidenziano l'efficacia dei sistemi funzionalizzati. L'efficacia biocida segue l'ordine PVA-Hyd/PVA < PVA-Hyd/L-PVA < PVA-Hyd/amido. In particolare, l'alta efficacia del sistema funzionalizzato contenente amido (substrato metabolico disponibile per *B. subtilis*) suggerisce l'esistenza di un meccanismo di attrazione batterica per chemiotassi all'interno del gel, dove i batteri vengono successivamente deattivati dalle funzionalità biocide più interne.

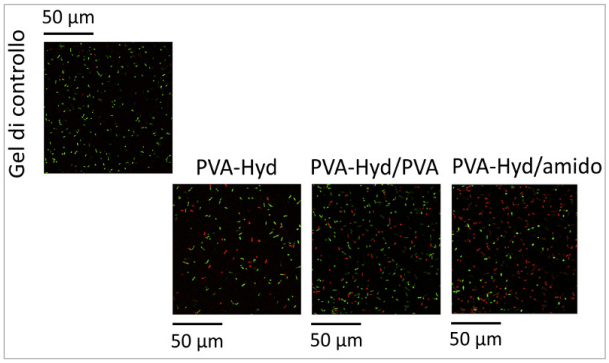


Figura 3. Riassunto schematico delle osservazioni condotte sui gel dopo incubazione per 24 ore su piastra di coltura inoculate con B. subtilis. Nelle immagini ottenuta tramite microscopia confocale a scansione laser in verde sono evidenziate le cellule batteriche vive e in rosso quelle danneggiate o morte.

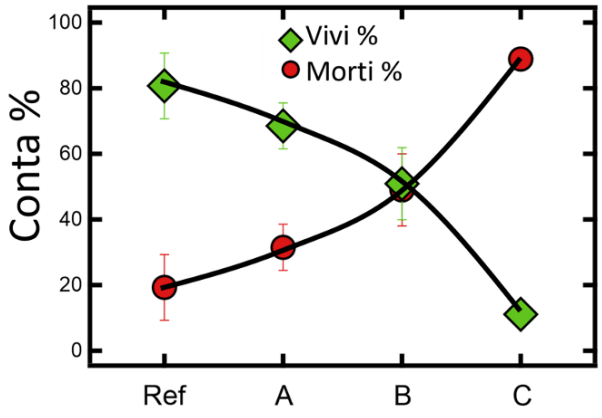


Figura 4. Dati normalizzati riferiti alla conta batterica effettuata sui campioni osservati in microscopia confocale a scansione laser.

5. Conclusioni

Questo lavoro è nato nell'ambito dello studio della pulitura di superfici artistiche nel caso in cui queste siano soggette ad attacco biologico, che presentino cioè colonie batteriche in fase di crescita e/o proliferazione.
La scelta di realizzare un sistema pulente che sfrutti una matrice altamente ritentiva è stata dettata dalla necessità di formulare un protocollo di pulitura che non preveda l'applicazione di ossidanti liberi direttamente sull'opera d'arte.
Molti idrogel per la pulitura di superfici artistiche sono stati realizzati negli ultimi anni, ma nessuno di questi risulta specificamente indirizzato alla rimozione di materiale biologico. A tal fine, in questo contributo sono stati sviluppati degli idrogel a base di PVA funzionalizzato con una N-aloammina biocida ad azione altamente specifica.
Complessivamente, sono stati raggiunti nuovi orizzonti nella formulazione di sistemi contenenti N-aloammine; nello specifico è stato dimostrato, per la prima volta, che è possibile preparare idrogel per via fisica che includano questo tipo di molecole. Funzionalità del tipo N-aloammine sono già state inserite in polimeri, ma mai prima di adesso, tali polimeri funzionalizzati sono stati impiegati per la preparazione di idrogel di questo tipo.
È stata, inoltre, approfondita la conoscenza in merito ai meccanismi di clorurazione, in particolare riguardo agli effetti di agenti altamente ossidanti come ipoclorito su molecole facilmente ossidabili come il PVA. È stato evidenziato come i protocolli di clorurazione "classici" possano portare al verificarsi di reazioni secondarie indesiderate, alterando in maniera significativa la struttura stessa dei sistemi.
In ultima istanza, i sistemi realizzati contenenti funzionalità idantoinica hanno dimostrato di possedere l'attesa capacità biocida, che affianca la capacità pulente già nota da letteratura. I test biologici effettuati sono, ad ogni modo, esperimenti preliminari a cui faranno seguito test più complessi che permettano di approfondire il meccanismo di azione dei sistemi.

Questo lavoro dimostra ancora una volta l'enorme potenzialità dell'approccio scientifico interdisciplinare. Sono state infatti sfruttate conoscenze provenienti da diversi ambiti scientifici, quali la chimica organica, la chimica-fisica e la biologia, applicandole al campo dei beni culturali – virtualmente lontano dalla ricerca scientifica. Concludendo il presente lavoro propone con successo un nuovo sistema che può essere utile nel concetto di rimozione di materiale biologico nell'ambito dei beni culturali.

6. Ringraziamenti

Si ringrazia CSGI (Consorzio per lo Sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase) per il finanziamento del presente studio.

7. Bibliografia

1) F. Macedo, A.Z. Miller, A. Dionísio, C. Saiz-Jimenez, Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview, Microbiology (2009)155 (1), 3476-3490
2) S. D. Worley, D. E. Williams, Halamine water disinfectants, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. (1988) 18, 133-175
3) X. Fan, X. Ren, T. Huang, Y. Sun, Cytocompatible Antibacterial Fibrous Membranes Based on Poly(3-hydroxybutyrateco-4-hydroxybutyrate) and Quaternarized N-Halamine Polymer, RSC Advances (2016) 6, 42600-42610
4) A. Dong, S. Lan, J. Huang, T. Wang, T. Zhao, W. Wang, L. Xiao, X. Zheng, F. Liu, G. Gao, Y. Chen, Preparation of Magnetically Separable N-Halamine Nanocomposites for the Improved Antibacterial Application, J. Colloid Interface Sci. (2011) 364, 333-340

Probiotici per i beni culturali: la sfida del Biocleaning

Pilar Bosch Roig[1]

[1]*Dpto. Restauración y Conservación del Patrimonio.*
Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio, Universitat Politècnica de Valencia, Spagna

Keywords: Biorestoration, Biocleaning, Cultural Heritage, High-dimension, microorganisms, conservation and restoration.

1. Riassunto

I probiotici sono microrganismi introdotti o applicati nel corpo per le loro qualità benefiche. Allo stesso modo, la tecnologia di biorestauro utilizza microrganismi ambientali sicuri e benefici per i Beni Culturali. Questa tecnologia nasce della ricerca di prodotti alternativi e sostenibili, più specifici, efficaci, non tossici per i restauratori e rispettosi dell'ambiente. Tra le diverse e innovative applicazioni biotecnologiche, la biopulitura è stata utilizzata per recuperare diversi monumenti e opere d'arte come i probiotici sono utilizzate per recuperare la salute umana. La maggior parte delle superfici trattate con microrganismi sono piccole; tuttavia, alcune importanti problemi, come la contaminazione da sali o residui di restauro di colle animali, possono intaccare superfici artistiche di grandi dimensioni. Pertanto, su questo articolo, analizziamo ed evidenziamo i problemi e i limiti del passaggio di scala del protocollo di biopulitura per applicazioni di grandi dimensioni. Verranno esposti e valutati studi di casi reali che implementano le applicazioni in termini di difficoltà di prestazioni, efficacia e costi. Questa ricerca orientata all'applicazione ha preso in considerazione gli aspetti pratici che i restauratori devono affrontare nel loro lavoro quotidiano in situ, come la scelta dei materiali, le esigenze pratiche dell'elevata dimensione, la selezione dell'applicazione e della rimozione più efficienti, la facilità d'uso e buoni rapporti costi/benefici. Questa analisi pratica potrebbe essere trasferibile ad altre strategie di biopulitura su larga scala. Si stanno aprendo nuove frontiere di intervento e i risultati ottenuti contribuiscono a fornire ai restauratori una nuova scelta di interessanti procedure di trattamento "green" adatte a cantieri di restauro di grandi dimensioni.

Probiotics are microorganisms introduced or applied to the body for their beneficial qualities. In the same way, biorestoration technology uses safe environmental microorganisms that are beneficial for Cultural Heritage (CH). Looking for alternative and sustainable products that are more specific, effective, non-toxic for restorers, and environmentally friendly. Among the diverse, innovative biotechnological applications, biocleaning has been used to recover diverse monuments,and artworks, like probiotics are used to recover human health. Most CH surfaces treated with microorganisms are small; however, some important pathologies, such as salt contamination or animal glue restoration residues, can affect high-dimension artistic surfaces. Therefore, in this research we analyze and overcome the problems and limitations of scaling up the bio-cleaning protocol for high-dimension applications. Real case studies scaling up implementations will be exposed and evaluated regarding performance difficulty, efficacy, and costs. This application-oriented research has considered the practical aspects conservators face in their in situ daily work, such as materials choice, the practical needs of the high dimension, selecting the most efficient, ease of use application and removal, and good cost/benefit ratios. This practical analysis could be transferable to other large-scale biocleaning strategies. New frontiers of intervention are opening, and the obtained results contribute by giving conservators a new choice of interesting green treatment procedures suitable for high-dimension restoration sites.

2. Introduzione

Il patrimonio culturale è una eredità che deve essere salvaguardata, mantenuta e trasmessa alle generazioni presenti e future nel miglior modo possibile (secondo UNESCO e SDG 11). Pertanto, quando un bene culturale subisce un danno, i professionisti eseguono diversi interventi di restauro (pulitura, consolidamento, reintegrazione, ecc.) per potere "prendersi cura" adeguatamente, agendo come se fossero "medici dell'arte".
Le linee di ricerca oggi sono rivolte alla "prevenzione" e/o all'utilizzo di "cure" atossiche che non comportino rischi per la salute del patrimonio o per i restauratori e la collettività, cercando di essere in sintonia con l'ambiente e la sostenibilità. In questo senso, c'è un'importante preoccupazione per ridurre l'uso di sostanze tossiche e quindi c'è una crescente necessità di sviluppare alternative più verdi, più sicure e più sostenibili che riducano i rischi associati a dei trattamenti chimici-tossici. Nell'accordo stabilito dai leader mondiali (settembre 2015, Nazioni Unite) si sono stabiliti una serie di obiettivi di sviluppo sostenibile (SDG) per eradicare la povertà, proteggere il pianeta e garantire prosperità per tutti come parte della nuova agenda globale per il 2030 a cui tutti noi dobbiamo allinearci: governi, società civile, settori privati, ricercatori, così come tutte le persone individualmente. La sostenibilità dei prodotti è uno di questi obiettivi, insieme alla necessità sociale e ambientale globale di unire gli sforzi per proteggere l'ambiente (SDG15), migliorare la salute e il benessere delle persone (SDG3), promuovere lo sviluppo e il consumo sostenibile (SDG12) per combattere il cambiamento climatico e contro tutto ciò che potrebbe danneggiare il pianeta.
La biotecnologia è un grande alleato che ci consente di sviluppare tecnologie e prodotti alternativi più verdi e sostenibili che riducono al minimo l'impatto sull'ambiente e sulla salute, anche nel campo della conservazione e del restauro del patrimonio.
In particolare, il biorestauro utilizza microrganismi vivi selezionati (non patogeni, non biodeteriogeni, non sporulanti) come "probiotici" per migliorare la salute del patrimonio culturale. Sfruttando i cicli geomicrobiologici presenti in natura, utilizzando microrganismi ambientali (non OGM) e sistemi applicativi naturali a base di alghe (come l'agar) e vegetali (come il cotone) tra altri. La biopulitura, per esempio, è stata utilizzata per recuperare diversi monumenti e opere d'arte come i probiotici sono utilizzate per recuperare la salute umana. Questa tecnologia introduce microorganismi nel nostro

patrimonio culturale per le loro qualità benefiche.
I primi studi in questo campo risalgono al 1988 [1], tuttavia la tecnologia di biopulitura è stata sviluppata grazie a ricerche svolte da vari gruppi di ricerca internazionali e interdisciplinari in vari progetti di ricerca pubblici (come BIOBRUSH) e privati e contratti di restauro (soprattutto in Italia e Spagna) da cui risultati hanno permesso di sviluppare e applicare la tecnologia in modo soddisfacente su superfici del patrimonio culturale Europeo. Tali indagini hanno mostrato la capacità della tecnologia pricipalmente per la rimozione di croste nere, sali e sostanze organiche da monumenti e opere d'arte (pitture murali e sculture soprattutto) di natura prevalentemente inorganica [2, 3]. Anche se continua la ricerca per sviluppare sistemi di biopulitura che permettano di eliminare altri tipi di sostanze complesse come resine e graffiti [4].
Questo tipo di ricerca ha potuto essere sviluppato e applicato a piccole aree di superfici del patrimonio monumentale come le lunette esterne del Duomo di Milano [5] le pareti esterne del Duomo di Matera [6], litotipi colorati di marmo della facciata del Duomo di Firenze [7]. Anche su certe aree di sculture come la scultura in marmo di Demetra e Cronos del cimintero del castello di Buonconsiglio a Trento [8], scultura di pietra policroma esposta alla Galleria Interdisciplinare della Sicilia, Palazzo Abatellis, Palermo [9]; la scultura di Pietà Rondanini di Michelangelo dal Castello Sforzesco di Milano [1] la scultura "Neera" della artista Lina Arpesani del cimitero di Milano [10]; il sarcofago del Duca di Urbino di Michelangelo, Firenze [11]. E pure su piccole aree di dipinti murali come i dipinti murali della loggia di Casina Farnese a Roma [12], l'affresco di Giovanni Lanfranco La Navicella preso i Musei Vaticani, l'affresco dei fratelli Riminaldi alla cupola del Duomo di Pisa [13], gli affreschi della chiesa di Santos Juanes de Valencia, Spagna [14] e gli affreschi murali della chiesa di San Nicolás di Valencia, Spagna [15] tra gli altri.
Tra le varie pubblicazioni che mostrano la applicazione della tecnica su superfici artistiche, troviamo pochi lavori che ne mostrano l'applicazione su grandi dimensioni. In questo lavoro vengono mostrati tre casi studio dove la biopulitura è stata applicata in opere di grandi dimensioni, mostrando le difficoltà pratica incontrate e le soluzioni adottate per risolverle.

3. Casi studio:

3.1. Biopulitura ex situ dei dipinti murali strappati del Camposanto Monumentale di Pisa, Italia

I primi dipinti murali di grandi dimensioni oggetto di biopulitura sono stati condotti al Camposanto Monumentale di Pisa tra il 2000-2018 grazie alla collaborazione tra l'Opera della Primaziale Pisana ed i suoi restauratori, la Soprintendenza ai BBCC ed il contributo scientifico interdisciplinare di chimici (Università di Pisa, Dip. di Chimica, prof.ssa A.M. Colombini e coll.) e di microbiologi (Università del Molise, Dip. di Bioscienze, prof. G. Ranalli e coll.) [16, 17]. Nel corso degli anni, numerosi dipinti murali strappati dal Camposanto sono stati trasferiti nei cantieri di restauro per interventi di biopulitura di residui di colla animale impiegata a suo tempo nella tecnica dello strappo, poi alterata e molto difficile da rimuovere. Questo è stato il caso del dipinto "Conversione San Efisio e battaglia" (3,5 x 7,8 m) di S. Aretino; il dipinto "Trionfo della Morte" (5,6 x 15,0 m) di B. Buffalmacco e il dipinto "Storie dei Santi Padri" (6,10 x 15,60 m) di B. Buffalmacco [16, 18].
Per eseguire questo processo di biopulitura, la prima sfida è stata quella di isolare il microrganismo più adatto a svolgere il "compito". In questo caso è stato impiegato il batterio *Pseudomonas stutzeri* A29 isolato e specializzato direttamente fornendo colla animale invecchiata dei dipinti murali strappati [19].
Successivamente è stato definito il sistema più idoneo per l'applicazione sui dipinti murali di grandi dimensioni. In questo caso, trattandosi di dipinti ex situ, posti in posizione orizzontale, si è scelto di utilizzare strisce di cotone sulle quali veniva distribuita la soluzione batterica (Figura 1). A causa delle grandi dimensioni degli affreschi, è stato necessario utilizzare piattaforme mobili e rulli di pittura. Per favorire il lavoro dei batteri "pulitori", l'ambiente di lavoro è stato dotato di un adeguato sistema di termoregolazione. Dopo il trattamento di biopulitura, i batteri avevano degradato la colla animale così da favorire la "liberazione" del tessuto dello strappo dalla pellicola pittorica senza difficoltà. Infine, in alcune zone, il lavoro di biopulitura è stato portato a termine con l'uso di enzimi proteolitici per rimuovere eventuali residui di colla [20].

Figura 1: Processo di biopulitura ex situ di un frammento di dipinti murali strappati del Camposanto monumentali di Pisa

3.2. Biopulitura dei dipinti murali in situ e ex situ della chiesa Santos Juanes de Valencia, Spain

Il secondo caso di studio riguarda la biopulitura delle pitture murali della "Chiesa di Santos Juanes de Valencia" in Spagna (Figura 2). Grazie a varie indagini e collaborazioni interdisciplinari tra l'Istituto Universitario per il Restauro del Patrimonio (IRP) della Universitàt Politecnica di Valencia (UPV) e l'Università degli studi del Molise (Italia), la tecnologia è stata adattata alle particolarità riscontrate a Valencia [14, 21, 22, 23]. In questa chiesa ci troviamo con due diversi problemi riguardanti le pitture murali: dipinti murali strappati con resti di colla invecchiata e alterata, e dipinti murali non strappati con efflorescenze saline insolubili.
Con l'intenzione di sviluppare un sistema di biopulitura in grado di risolvere entrambi i problemi, abbiamo selezionato il batterio *Pseudomonas stutzeri* per la sua doppia capacità metabolica di degradare sia la colla animale che di avere un effetto denitrificante [23]. Allo stesso modo, come sistema di applicazione, l'agar-agar è stato implementato sia a caldo che a freddo. L'agar-agar si ottiene dalle alghe ed è in grado di trattenere i batteri e fornire loro l'acqua necessaria per

sviluppare le loro attività metaboliche necessarie alla biopulitura. Inoltre, non macchia e non lascia residui sulle pitture murali ed è facile da preparare e da applicare e rimuovere su qualsiasi tipo di superficie grande, piccola e pure oblique, come quelle della cupola della chiesa (Figura 2).
La temperatura per le pitture murali strappate e trattate ex situ poteva essere controllata tramite riscaldamento, ma per le pitture murali non strappate e da intervenire in situ doveva essere utilizzata una lampada a infrarossi.

Figura 2: Processo di biopulitura ex situ di un frammento di dipinti murali strappati della Chiesa Santos Juanes de Valencia, Spagna.

3.3 Biopulitura del pavimento in situ cappella del Cristo di S. Maria di Conxo, Santiago di Compostela, Spain.

Il terzo caso studio implica la biopulitura di 233m^2 di pavimento costituito da granito contaminato da grandi concentrazioni di sali che lo alteravano visualmente e fisicamente. Per la desalinizzazione di questo pavimento, si sono effettuate diverse prove di pulitura a piccola scala, con delle tecniche tradizionale (comprese) e delle tecniche di bio-desalinizzazione con dei batteri denitrificanti (*Pseudomonas stutzeri*) ottenendo i migliori risultati con i batteri[24].
Per mettere a posto la biopulitura in questo caso ci abbiamo trovate diverse limitazioni in situ. Su quelle limitazioni più critiche troviamo la temperatura molto fredda nell'interno della chiesa e che rallentano i metabolismi dei batteri riducendo la sua efficacia e aumentando il tempo necessario per biopulire. E, l'altra importante limitazione è la necessità di adattare il protocollo di applicazione alle caratteristiche del pavimento irregolare, freddo ed eterogeneo.
Per determinare il protocolo ottimale in situ su grandi dimensioni si sono testati diversi sistemi di applicazioni e di controllo termico che fossero di facile applicazione in situ, con un basso costo economico e di tempo, e anche efficaci ed efficienti, permettendo di pulire grande aree per giornata di lavoro.
Il protocollo finale selezionato implicava l'uso dell'agar preparato prima in laboratorio e tritato per permettere di adattarsi alle irregolarità della pietra granitica, e la temperatura veniva regolata grazie a una coperta termica che si poteva adattare alla eterogeneità dello spazio della cappella [25].

Figura 3: Processo di biopulitura in situ del pavimento della cappella del Cristo di S. Maria di Conxo, Santiago di Compostela, Spagna.

4. Conclusioni

Questi tre casi studio di applicazioni della biopulitura su grandi dimensioni mettono in evidenza i punti di forza e di debolezza della tecnologia attuale. Da una parte possiamo vedere come questa tecnologia è in linea con i diversi obiettivi di sostenibilità e SDG, e come sia una tecnologia trasferibile tanto su piccola come su larga scala. Ma da l'altra parte, ci sono ancora delle sfide per arrivare ad essere un sistema di pulitura più abituale nei cantieri di restauro. Possiamo enumerare, tra altri, due grandi sfide: ottenere i batteri e adattarne il protocollo ad ogni caso studio particolare. In questo campo ci sono ancora pochi prodotti di biorestauro accessibili per i restauratori e purtroppo è sicuramente la limitazione più grande per diffondere il suo utilizzo.

5. Bibliografia

1) R.M. Atlas, A.N. Chowdhury, K.L. Gauri, Microbial calcification of gypsum-rock and sulfated marble. J. Stud. Conserv. 33, 149–153, (1988).
2) F. Cappitelli, E. Zanardini, L. Toniolo, P. Abbruscato, G. Ranalli, C. Sorlini. Bioconservation of the marble base of the Pietà Rondanini by Michelangelo Buonarroti. Geophys. Res. Abstr. 7, 06675. 24:255–260 (2005).
3) C. Sorlini, G. Ranalli, E. Zanardini. Stone Bioconservation. In: Mitchell R, McNamara CJ (eds) Cultural Heritage Microbiology: fundamental Studies in Conservation Science. ASM Press, Washington, DC, pp 291–303, (2010)
4) P. Bosch-Roig, P. Sanmartín Bioremoval of graffiti in the context of Current Biocleaning Research. E. Joseph (ed.), Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage, 175-197(2021) https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1_8
5) F. Cappitelli, L. Toniolo, A. Sansonetti, D. Gulotta, G. Ranalli, E. Zanardini, C. Sorlini. Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments. Appl Environ Microbiol n°73, pp.5671–5675, (2007).
6) G. Alfano, G. Lustrato, C. Belli, E. Zanardini, F. Cappitelli, E. Mello, C. Sorlini, G. Ranalli. The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: The case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. Int. Biodeterior. Biodegrad, 65, 1004–1011, (2011).

[7] E. Gioventù, P.F. Lorenzi, F. Villa, C. Sorlini, M. Rizzi, A. Cagnini, A. Griffo, F. Cappitelli, F. Comparing the bioremoval of black crusts on colored artistic lithotypes of the Cathedral of Florence with chemical and laser treatment. Int Biodeter Biodegrad n°65, pp.832–839, (2011).

[8] A. Polo, F. Cappitelli, L. Brusetti, P. Principi, F. Villa, L. Giacomucci, G. Ranalli, C. Sorlini. Feasibility of Removing Surface Deposits on Stone Using Biological and Chemical Remediation Methods. Microb. Ecol. 60, 1–14, (2010).

[9] M. Martino, S. Schiavone, F. Palla, L. Pellegrino, E. De Castro, A. Balloi. Bioremoval of sulphate layer from a 15th century polycrome marble artifact. Conserv. Sci. Cult. Herit. 15, 235–24, (2015).

[10] F. Troiano, D. Gulotta, A. Balloi, A. Polo, L. Toniolo, E. Lombardi, D. Daffonchio, C. Sorlini, F. Cappitelli. Successful combination of chemical and biological treatments for the cleaning of stone artworks. Int. Biodeterior. Biodegrad. 85, 294–304, (2013).

[11] C. Alisi, D. Magrini, S. Vettori, B. Salvadori, M. Vincenti, D. Manna, M. Bietti, A.R. Sprocati. Sustainable Restoration Guided by Scientific and Archival Investigations: The Bio-Cleaning of Lorenzo Duke of Urbino's Sarcophagus, a Michelangelo's Masterpiece in the Medici Chapels. Heritage, vol.5, pp.3359-3373, (2022). https://doi.org/10.3390/heritage5040172

[12] M. Mazzoni, C. Alisi, F. Tasso, A. Cecchini, P. Marconi, A.R. Sprocati. Laponite micro-packs for the selective cleaning of multiple coherent deposits on wall paintings: the case study of Casina Farnese on the Palatine Hill (Rome-Italy). Int Biodeter Biodegrad n°94, pp. 1–11, (2014).

[13] G. Ranalli, E. Zanardini, L. Rampazzi, C. Corti, A. Andreotti, M.P. Colombini, P. Bosch-Roig, G. Lustrato, C. Giantomassi, D. Zari. Onsite advanced biocleaning system for historical wall paintings using new agar-gauze bacteria gel. J. Appl.Microbiol. 126, 1785–1796, (2019).

[14] P. Bosch-Roig, J.L. Regidor-Ros, R.M. Montes-Estellés. Biocleaning of nitrate alterations on wall paintings by Pseudomonas stutzeri. Int Biodeter Biodegr n° 84, pp. 266–274, (2013)

[15] M.B. Saiz Maunleón, P. Bosch Roig, M.R. Montes Estellés. Tecnologías especiales de limpieza láser y biolimpieza. En Intervención Arquitectónica y Pictórico Ornamental en la Iglesia Parroquial de San Nicolás Obispo y San Pedro Mártir de Valencia, pp. 139–145, (2017) Valencia: Parroquia de San Nicolás. ISSN 978–84-617-5628-5.

[16] G. Ranalli, G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, M.P. Colombini, I. Bonaduce, E. Zanardini, P. Abbruscato, F. Cappitelli, C. Sorlini. Biotechnology applied to cultural heritage: Borestoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. J. Appl. Microbiol. 98, 73–83, (2005)

[17] G. Ranalli, E. Zanardini, A. Andreotti, M.P. Colombini, C. Corti, P. Bosch-Roig, P. De Nuntiis, G. Lustrato, P. Mandrioli, L. Rampazzi, C. Giantomassi, D. Zari. Hi-tech restoration by two-steps biocleaning process of triumph of death fresco at the Camposanto Monumental Cemetery (Pisa, Italy). J Appl Microbiol n°125, pp.800–812, (2018)

[18] G. Lustrato, G. Alfano, A. Andreotti, M.P. Colombini, G. Ranalli. Fast biocleaning of mediaeval frescoes using viable bacterial cells. Int. Biodeterior. Biodegrad. 69, 51–61 (2012).

[19] P. Antonioli, G. Zapparoli, P. Abbruscato, C. Sorlini, G. Ranalli, P.G. Righetti. Art-loving bugs: The resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery. Proteomics 5:2453–2459, (2005)

[20] P. Bosch-Roig, R.M. Montes Estellés, J.L. Regidor, P. Roig Picazo, G. Ranalli. New frontiers in the microbial bio-cleaning of artworks. The Picturer restorer 2012 41: 37-41

[21] P. Bosch-Roig, G. Ranalli. The safety of biocleaning technologies for cultural heritage. Front. Microbiol. n°5, pp.155, (2014).

[22] P. Bosch-Roig, G. Lustrato, E. Zanardini, G. Ranalli. Biocleaning of Cultural Heritage stone surfaces and frescoes: Which delivery system can be the most appropriate? Ann Microbiol n°65, pp. 1227–1241, (2014).

[23] P. Bosch-Roig, F. Decorosi, L. Giovannetti, G. Ranalli, C. Viti. Connecting phenome to genome in *Pseudomonas stutzeri* 5190: an artwork biocleaning bacterium. Res Microbiol n°167, pp.757–765, (2016)

[24] P. Bosch-Roig, H. Allegue, I. Bosch. Granite pavement nitrate desalination: traditional methods vs. biocleaning methods. Sustainability n°11, pp. 4227, (2019). https://doi. org/10.3390/su11154227

[25] P. Bosch-Roig, L. Pérez-Castro, A. Fernández-Santiago, I. Bosch, I. High Dimension Granite Pavement Bio-Desalination Practical Implementation. Appl. Sci. n°11 pp.6458, (2021). https://doi.org/10.3390/app11146458

Biocleaning of historical iron artworks: innovative green gels amended with microbial derivatives

Arianna Passaretti[1,2§], Luana Cuvillier[1,2§], Elodie Guilminot[3], Giorgia Sciutto[4], Edith Joseph[1,2*]

[1] Haute Ecole Arc Conservation Restauration, University of Applied Sciences and Arts HES-SO, 2000 Neuchâtel, Switzerland
[2] Laboratory of Technologies for Heritage Materials (LATHEMA), Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, 2000 Neuchâtel, Switzerland
[3] Arc'Antique research and conservation–restoration laboratory, 44300 Nantes, France
[4] Department of Chemistry "G. Ciamician", University of Bologna, Ravenna Campus, 48121 Ravenna, Italy
[§] Entrambi gli autori hanno contributo in egual misura

** Corresponding author: edith.joseph@he-arc.ch*

Keywords: biopulitura, chimica verde, metaboliti, bio-solventi, gel, collezioni storiche, metallo

1. Riassunto

Un approccio interdisciplinare innovativo, che fonde le scienze naturali e la conservazione dei beni culturali, è il principio cardine dei temi di ricerca sviluppati fra la Haute Ecole Arc Conservation Restauration e l'Università di Neuchâtel in Svizzera. La ricerca mira a formulare bio-gel innovativi, in grado di trattare la superficie alterata di opere in metallo in un'ottica verde e sostenibile.
Grande attenzione è rivolta alle componenti dei sistemi gel (agenti addensanti, solventi ed agenti chelanti), al fine di selezionare solo materiali di origine biologica, biodegradabili, e non tossici. In particolare, in questo contributo vengono presentate le potenzialità di agenti complessanti di origine naturale denominate "siderofori", quale possibile alternativa sostenibile ed efficace rispetto alle sostanze sintetiche e tossiche, comunemente impiegate nella conservazione dei metalli (es. sale di sodio acido etilendiamminotetraacetico - Na_2EDTA). In parallelo, i bio-solventi sono esplorati come metodo alternativo e più ecologico per la rimozione di rivestimenti organici protettivi. Difatti, questa classe di solventi organici deriva da fonti rinnovabili e da naturali processi metabolici di origine microbiologica, e negli ultimi decenni sono attentamente scrutinati per evitare l'utilizzo di solventi nocivi ed inquinanti (es. acetone, acqua ragia) largamente utilizzati nell'industria così come nel campo dei beni in metallo.
La ricerca qui presentata è quindi orientata verso la rimozione di materiali indesiderati o alterati sia di natura inorganica (corrosione e tarnishing) che organica (rivestimenti protettivi). I sistemi gel sono inizialmente valutati su mock-up metallici. I substrati a base di ferro, rame e argento, scelti in quanto maggiormente presenti nelle collezioni storiche di oggetti in metallo, sono invecchiati chimicamente per corroderne la superficie. In alternativa, sono rivestiti con protettivi organici (ad esempio, vernici acriliche ed alla nitrocellulosa) ampiamente utilizzati per la cura degli oggetti storici in metallo. Dopo una valutazione analitica multimodale atta a verificare l'azione e la sicurezza dei gel sui mock-up metallici, le soluzioni HELIX sono applicate su casi reali, grazie alla stretta e proficua collaborazione con curatori e conservatori di beni artistici in metallo.

2. Introduzione

I nostri temi di ricerca integrano aspetti innovativi ed un approccio inventivo interdisciplinare ai confini tra la conservazione del patrimonio artistico e le scienze naturali, con l'obiettivo di agire contro l'alterazione presente su manufatti metallici (ad esempio sculture, oggetti archeologici, collezioni storiche) o su materiali organici archeologici (ad esempio legno bagnato) contaminati da prodotti di corrosione del ferro. Grazie a tecniche avanzate di imaging, studiamo le interazioni tra i metalli ed il loro ambiente di origine e di esposizione, aspirando a proporre approcci ecologici innovativi nella conservazione dei beni culturali. In questo contributo, parliamo in particolare della conservazione dei manufatti metallici.
Il fenomeno dell'alterazione superficiale sulle opere d'arte in metallo è una delle principali preoccupazioni in termini di aspetto visivo e può essere correlato ai processi di corrosione che si verificano spontaneamente in presenza di fattori esterni ambientali quali ad esempio umidità relativa, temperatura, gas inquinanti, eccetera. Inoltre, i rivestimenti organici (ad esempio cera, vernice) applicati durante interventi di restauro passati possono invecchiare ed alterarsi nel tempo, risultando inefficaci nella protezione e provocando un'ulteriore alterazione dell'aspetto della superficie metallica da preservare. La loro rimozione (e sostituzione) è quindi necessaria, in quanto l'esposizione dei manufatti metallici ad agenti caustici, provenienti dall'ambiente o da metodi di pulitura inadeguati, provoca il loro irreversibile degrado
Gli attuali metodi di pulitura annoverano principalmente procedure meccaniche, che presentano gli svantaggi di essere troppo invasive, difficili da applicare da parte di non esperti, e dispendiose in termini di tempo e/o tossiche.
In risposta ai potenziali rischi dei metodi di pulitura tradizionali impiegati nella conservazione delle opere d'arte in metallo, che possono influire sulla salute umana, sull'ambiente o sulle opere d'arte stesse, la ricerca verso pratiche più sicure e sostenibili è di grande interesse[1]. A tal fine, studi precedenti hanno dimostrato l'efficacia e l'affidabilità dei microrganismi per il trattamento ed il restauro dei beni artistici in metallo[2]. La combinazione tra le soluzioni microbiologiche ed i sistemi gel è in grado di fornire un'azione d'intervento controllata, una facile pulitura dopo l'applicazione, ed una significativa riduzione della quantità di agenti attivi necessari al trattamento, apparendo come un approccio alternativo vincente[2].

Il progetto HELIX mira a sviluppare gel ecologici, d'origine biologica e facili da usare per la pulitura di opere d'arte storiche in metallo, in particolare oggetti alterati in leghe di rame, ferro, ed argento. Idrogel commerciali ottenuti da fonti rinnovabili sono esplorati tramite l'aggiunta di metaboliti precedentemente selezionati per la loro capacità di complessare gli ioni metallici al fine di sfruttarli per la rimozione della corrosione erosiva (es. ruggine) o considerata antiestetica dal punto di vista conservativo (es. tarnishing). In parallelo, organogel bioderivati sono sviluppati tramite l'impiego di bio-solventi per la rimozione di rivestimenti organici indesiderati o alterati presenti su manufatti metallici.
Sfruttando le capacità dei microrganismi presenti in natura, vengono quindi adottate strategie per rimuovere i prodotti di degrado presenti sulle leghe sopra menzionate, che si trovano più comunemente nelle collezioni storiche di metalli. I meccanismi microbiologici coinvolti nell'assorbimento degli ioni metallici e nella degradazione dei grassi sono esplorati su prodotti di corrosione rappresentativi e su sostanze organiche. Per la pulitura di substrati metallici sensibili all'acqua, vengono individuati sistemi gel bioderivati che non presentano tossicità o appositamente sviluppati come metodologie di biopulitura. Pertanto, diverse combinazioni di gel d'origine biologica sono sviluppati tramite l'aggiunta di estratti microbiologici, e vengono testate su campioni metallici che presentano diversi tipi di corrosione e/o rivestimenti organici rappresentativi del patrimonio metallico di origine contemporanea o decorativa. Le formulazioni gel per la biopulitura vengono infine applicate e valutate su manufatti metallici reali con alterazione emblematiche quali corrosione o materiali protettivi degradati.
Al fine di rendere la comunità di restauratori consapevoli dell'affidabilità e dell'efficienza dei gel verdi sviluppati nel progettto HELIX, vengono qui presentati alcuni test effettuati su oggetti di prova.
In ambienti poveri in ferro, alcuni microrganismi producono siderofori, che sono chelanti naturali del ferro[3]. A differenza dei tradizionali agenti chelanti sfruttati nella conservazione dei metalli (es. sale sodico dell'acido etilendiamminotetraacetico - Na_2EDTA), i siderofori sono sostanze di origine biologica, biodegradabili e presentano un pH prossimo a neutro, risultando quindi meno dannosi sia per l'ambiente che per le opere d'arte da trattare[4]. Per illustrare l'azione dei siderofori, un coltello a mezzaluna in acciaio, naturalmente corroso, è stato trattato con un idrogel a base d'agar con l'aggiunta di un sideroforo (Figure 1A). Il successo della reazione complessante sulla corrosione presente è accertato dal colore della formulazione che vira al arancione vivo durante l'applicazione (Figure 1A)[5]. Gli stessi siderofori mostrano affinità anche con altri metalli. Qui di seguito sono presentati i test di pulitura effettuati su un polittico ortodosso in ottone (Figure 2A) ed un orologio da tasca in lega d'argento con presenza di corrosione bluastra (probabilmente riconducibile ai prodotti di corrosione del rame) (Figure 2B). L'efficienza dello stesso sideroforo è stata confrontata con Na_2EDTA e EDDS (acido etilendiammina-N,N'-disuccinico), un altro chelante verde con una struttura molecolare vicina all'EDTA[6]. Sulle leghe di rame, i siderofori offrono una pulitura progressiva e regolare, mentre l'EDDS produce un'efficienza e un'azione simili a quelle dell'EDTA, ma senza ricorrere a sostanze chimiche pericolose per la salute e per l'ambiente.
Nella conservazione dei metalli vengono spesso applicati materiali organici protettivi (ad es. cere, vernici) per prevenirne la corrosione. Tuttavia, anch'essi sono sensibili ai fattori ambientali di degrado nel tempo, prefigurando un possibile impatto negativo sia sulla loro funzione protettiva che sul substrato metallico sottostante[7,8]. Gli organogel sviluppati nel progetto HELIX sono quindi progettati per la rimozione di rivestimenti organici indesiderati o alterati, impiegando esclusivamente biopolimeri e biosolventi nella formulazione. I sistemi di pulitura sono concepiti per essere efficaci su vernici a base di nitrocellulosa o acrilica e mostrano risultati convincenti, come osservato sotto illuminazione UV (Figure 1B).

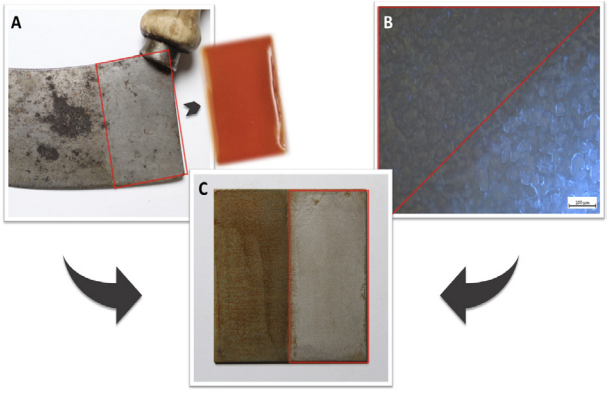


Figura 1: (A) Coltello mezzaluna a base di ferro corroso parzialmente pulito con un gel di agar e l'aggiunta di siderofori (rettangolo rosso) ed immagine incorporata a destra del gel dopo l'applicazione. (B) Campione di ferro rivestito con Paraloid® B72, rimosso grazie ad un organogel sviluppato nel progetto HELIX (triangolo rosso superiore) sotto illuminazione ultravioletta. (C) Campione di ferro artificialmente corroso e rivestito con Paraloid® B72, con un rettangolo rosso che indica la zona pulita dopo l'applicazione di un gel a doppia azione.

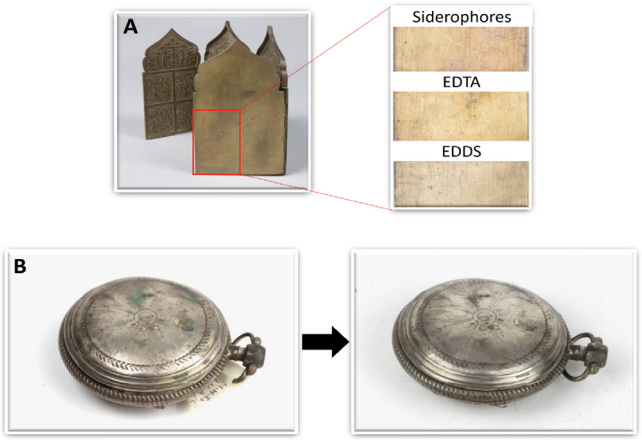


Figura 2: A) Poliptico in ottone delle collezioni Grand Patrimoine Loire-Atlantique (Francia) con un rettangolo rosso che indica le prove di pulitura eseguite utilizzando gel di agar caricati con diversi agenti chelanti (siderofori, EDTA e EDDS) e l'aspetto delle aree trattate dopo l'intervento (immagine incorporata a destra).
(B) Orologio da taschino in lega d'argento appartenente alla collezione del Musée Historique de Lausanne (Svizzera) prima (a sinistra) e dopo (a destra) la rimozione delle macchie blu di corrosione del rame con un gel d'agar a base di siderofor.o

Alla luce di questi notevoli risultati, la ricerca è quindi indirizzata verso la progettazione di gel verdi in grado di rimuovere contemporaneamente corrosione indesiderata e rivestimenti organici in maniera controllata sebben simultanea. Risultati incoraggianti sono già stati ottenuti e riportati nella figura 1C.
Le formulazioni HELIX si presentano come ottime alternative ecologiche nella prassi della conservazione del patrimonio storico-artistico in metallo, fornendo prestazioni di pulitura soddisfacenti e mantenendo allo stesso tempo un'elevata

attenzione ai principi della chimica verde[7]. Vari percorsi microbiologici sono attualmente in fase di studio per valutarne le potenzialità su altri substrati metallici, quali ad esempio le leghe d'argento, che risultano complesse da trattare a causa della loro natura intrinsecamente antibiotica[9]. Infine, una stretta collaborazione con i restauratori appare fondamentale per verificare l'affidabilità su opere d'arte reali ed apportare tali soluzioni innovative fuori dal laboratorio di ricerca.

3. Ringraziamenti

Il progetto HELIX (Investigating metal bioremediation for the preservation of historical metal artworks, 2020–2024) è finanziato dal Fondo Nazionale Svizzero per la Ricerca Scientifica (FNS), numero di sovvenzione 205121_188755. Gli autori ringraziano il professore Stephan von Reuss per la sua co-supervisione delle tesi di dottorato nell'ambito del progetto HELIX, Lidia Mathys per il supporto tecnico di laboratorio, e Claude-Alain Künzi del Musée Historique de Lausanne (MHL) (Svizzera) e Claire De Lalande del Grand Patrimoine Loire Atlantique (Francia) per l'accesso alle loro collezioni.

6. Bibliografia

1) Passaretti, A., Cuvillier, L., Sciutto, G., Guilminot, E. & Joseph, E. Biologically Derived Gels for the Cleaning of Historical and Artistic Metal Heritage. Appl. Sci. 11, 3405 (2021).
2) Junier, P. & Joseph, E. Microbial biotechnology approaches to mitigating the deterioration of construction and heritage materials. Microb. Biotechnol. 10, 1145–1148 (2017).
3) Albelda-Berenguer, M., Monachon, M. & Joseph, E. Siderophores: From natural roles to potential applications. Advances in Applied Microbiology vol. 106 (Elsevier Inc., 2019).
4) Fazary, A. E. et al. Microbial production of four biodegradable siderophores under submerged fermentation. Int. J. Biol. Macromol. 88, 527–541 (2016).
5) Cuvillier, L. et al. Exploiting Biologically Synthetized Chelators in Conservation : Gel-based Bio-cleaning of Corroded Iron Heritage Objects. in Metal 2022, 10th interim meeting of the ICOM-CC metals working group (eds. Mardikian, P., Näsänen, L. & Arponen, A.) (2022).
6) Tandy, S., Ammann, A., Schulin, R. & Nowack, B. Biodegradation and speciation of residual SS-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) in soil solution left after soil washing. Environ. Pollut. 142, 191–199 (2006).
7) Perera, D. Y. Physical ageing of organic coatings. Prog. Org. Coatings 47, 61–76 (2003).
8) Degrigny, C., Agryropoulos, V., Pouli, P. & Grech, M. The methodology for the PROMET project to develop/test new non-toxic corrosion inhibitors and coatings for iron and copper alloy objects housed in Mediterranean museums. Met. 07 31–37 (2007).
9) Chernousova, S. & Epple, M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. Angew. Chemie - Int. Ed. 52, 1636–1653 (2013).

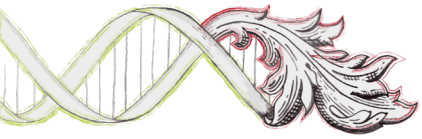


TAVOLA ROTONDA: Il parere dei restauratori

Introduzione alla tavola rotonda – Il parere dei restauratori

Marco Ciatti

Solo poche riflessioni prima di passare la parola ad un qualificato gruppo di restauratori e di esperti scientifici per le loro considerazioni sulla materia del Workshop odierno.
La principale è la soddisfazione per i numerosi spunti innovativi che le relazioni ci hanno presentato, secondo una linea di rapporto tra il mondo della conservazione e quello della ricerca scientifica applicata che ha ormai in Italia delle radici piuttosto lunghe e che l'istituto nel quale ho avuto l'onore di servire per quasi quarant'anni, l'Opificio delle Pietre Dure, ha particolarmente coltivato negli anni, iniziando dalle prime radiografie che negli anni Trenta consentirono a Procacci ed ai suoi restauratori di scoprire testi medievali inediti al di sotto di successive ridipinture, sino all'attuale rete di collaboratori di livello europeo. Riandando alle origini di tale rapporto si deve constatare che fu la chimica ad avere a lungo il monopolio di tale rapporto a partire dalle prime analisi sui colori di Pompei da parte di Chaptal in poi e solo l'uso dei Raggi X nei primi decenni del Novecento segnò l'inizio del contributo della Fisica che nel tempo si è conquistata una notevole importanza grazie alle indagini a varie lunghezze d'onda che devono oggi sempre precedere e guidare, se ve ne è necessità, quelle chimiche attraverso dei ben mirati prelievi. Il contributo della Biologia era rimasto sinora piuttosto in ombra limitata ai casi di aggressione biologica e di biodeterioramento, pur rappresentando temi e problemi tutt'altro che trascurabili nella vita quotidiana delle opere d'arte. La principale innovazione per il mio laboratorio fu costituita in questo ambito dalla dotazione di una strumentazione per la disinfestazione anossica delle opere d'arte appena giunte, prima del restauro, e con un certo orgoglio posso ricordare di aver dotato di una tale attrezzatura anche il laboratorio che l'OPD gestisce nel Deposito del Santo Chiodo di Spoleto per il recupero delle opere d'arte colpite dal sisma dell'Italia Centrale. Negli ultimi anni la possibilità di impiegare mezzi biologici nel campo della pulitura ha segnato una ripresa di interesse verso le possibilità offerte da quella disciplina, e le relazioni di oggi hanno ancor più allagato il campo di possibilità offerte al mondo della conservazione con potenzialità anche nel campo della biodiagnostica.
Ma il rapporto scienza e restauro non deve rappresentare solo uno slogan, ma deve essere orientato secondo precise linee metodologiche. In particolare si deve sempre ricordare, al di là del momento – perché anche le tecniche di indagine sono soggette a mode passeggere-. che tra le possibili innovazioni si devono privilegiare quelle che più rispettano l'opera d'arte sia nella fase diagnostica, e quindi le modalità non invasive, sia in quella di intervento, che deve costituire un rischio sempre più basso per la conservazione della materia dell'opera d'arte. Ebbene penso si possa sostenere che le relazioni di oggi arricchiscono le nostre possibilità in tutte le fasi del nostro lavoro di conservatori: da alcune inedite forme di controllo delle cause di deterioramento, alle innovative forme di biodiagnostica, ma soprattutto a nuovi materiali per la pulitura ed il consolidamento dei beni culturali, ancora più mirati e non genericamente invasivi ed aggressivi. Tali sono alcune delle caratteristiche da richiedere ad un materiale impiegato nella delicatissima fase della pulitura, insieme a quella della facile possibilità di rimozione dalla superficie e di costante e continuo controllo della sua azione. Alcuni dei restauratori qui invitati ne hanno fatto un diretto uso in maniera innovativa e, coniugando sperimentalità e sicurezza, ed i risultati conseguiti, in parte già noti, danno buone speranze. Per questa nuova classe di materiali si deve auspicare che esse non restino in uso solo all'interno di alcuni illuminati centri di restauro, ma che possano davvero divenire uno degli strumenti del comune bagaglio di strumenti che un restauratore può mettere in campo nel proprio lavoro. Questo è in fondo uno dei principali problemi del restauro del nostro Paese, cioè la distanza tra quello che si può oggi applicare e che viene realizzato in alcuni importanti centri pubblici di conservazione e quello che è la comune routine dei professionisti condizionati costantemente da tariffe troppo basse e anche dall'insensibilità dei committenti verso l'uso di materiali più sicuri, ma più costosi anche per il maggior tempo che la loro applicazione richiede. A tale proposito non si può che auspicare che la presentazione di tali argomenti in una sede autorevole quale l'Accademia dei Lincei possa servire a convincere anche i più riottosi ad aprire gli occhi verso le nuove possibilità che esistono oggi per un restauro più sicuro e sostenibile.
Sentiremo quindi la posizione in merito alle possibili applicazioni delle bioscienze nel campo della conservazione sotto i diversi punti di vista dei ricercatori scientifici, e dei restauratori che ne hanno già sperimentato alcune delle possibilità. Molto ben rappresentativa del panorama nazionale è la scelta dei partecipanti alla tavola rotonda con esponenti del Laboratorio di restauro dei Musei Vaticani e dei due principali istituti nazionali di conservazione e di formazione quali l'ICR e l'OPD, e di restauratori professionisti operanti per istituzioni pubbliche, quali Soprintendenze o Università che possono fornire delle testimonianze interessanti sulle proprie esperienze in materia. Ugualmente meritoria è la compresenza di esperti scientifici e di restauratori dal momento che solo dal loro continuo dialogo si possono mettere a punto innovazioni davvero migliorative dell'operatività quotidiana. Importante è, inoltre, che anche i corsi di laurea in restauro inizino a prevedere nei propri programmi questa nuova linea di materiali, con tutta la prudenza e l'attenzione che si usa quando si propongono materiali innovativi. Da parte mia ricordo ancora la piacevole sorpresa provata per il buon odore percepito entrando nel laboratorio di restauro dei materiali lapidei dell'OPD, dove un allievo stava realizzando una tesi incentrata proprio sulla pulitura con oli essenziali di una scultura classica che era stata a lungo esposta all'aperto nel giardino del Museo Archeologico Nazionale di Firenze, e successivamente nell'osservare gli ottimi risultati conseguiti.
Dunque con la massima curiosità apriamo la tavola rotonda pronti ad ascoltare le esperienze, i risultati, ma anche le possibili criticità da parte dei colleghi qui convenuti.

Sistemi di pulitura bio-based: nuove prospettive e sfide per la conservazione delle opere d'arte

Lorenza D'Alessandro

Nel campo della conservazione dei beni culturali si può definitivamente riconoscere come superata quella fase esplorativa, anche dubitativa della ricerca, rispetto al mondo dei microrganismi e dei biodeteriogeni in generale e dei prodotti da essi ricavabili. Oggi siamo consapevoli, e i restauratori lo hanno constatato ognuno nel proprio settore, del nuovo contributo che le bioscienze offrono alla conservazione dei manufatti di interesse storico artistico, attraverso lo sfruttamento 'mirato' di alcune delle molteplici proprietà metaboliche dei microrganismi. In breve si tratta di convertire a nostro favore le potenzialità offerte dai microrganismi … e se oggi ci troviamo qui, e credo di poter parlare a nome di molti colleghi che partecipano a questo workshop, è per il lavoro di squadra che hanno saputo condurre le biologhe dell'Enea, con un team tutto al femminile, che ha visto a capo la dott.ssa Anna Rosa Sprocati, sostituita ora dalla dott.ssa Chiara Alisi, coadiuvate dalla dott.ssa Flavia Tasso e da tante altre valide biologhe. Grazie al loro prezioso e paziente lavoro di ricerca e al confronto con noi restauratori, pur parlando linguaggi diversi, si è stabilita una sinergia in grado di produrre risultati efficaci attraverso l'utilizzo delle biotecnologie microbiche in diverse problematiche conservative. Siamo consapevoli di essere all'inizio di un percorso di ricerca che potrebbe offrire in un prossimo futuro nuove strategie operative di grande interesse. Ognuno dei miei colleghi restauratori che siedono a questo tavolo ha esperienza di diversi casi studio che vedono l'applicazione delle biotecnologie microbiche nel campo della conservazione finalizzate ad affrontare problematiche differenti:

- Biodeterioramento: Diagnosi dei biofilm di biodeteriogeni colonizzatori di opere e monumenti. Controllo e prevenzione del biodeterioramento mediante prodotti microbici, o di origine naturale (applicazione di biocidi).
- Biorestauro: operazioni di consolidamento (bioconsolidanti: p. es. produzione di calciti di origine microbica per il consolidamento di lapidei); interventi di pulitura (pulitura selettiva mediante microrganismi immobilizzati in una matrice di supporto). In alcuni casi come potenziali agenti di riconversione di alterazioni cromatiche nei materiali originali.

Personalmente mi sono occupata principalmente di interventi di puliture con biotecnologie microbiche: microrganismi in grado di rimuovere depositi di varia natura sedimentati sopra la stratigrafia dei materiali costitutivi originali. Il settore delle biotecnologie microbiche è quello che attualmente offre le maggiori potenzialità.
Selettività, atossicità, compatibilità con i materiali costitutivi e con l'ambiente sono alcuni dei tratti distintivi di queste procedure, che possono diventare nel tempo la leva del cambiamento verso la sostituzione dei prodotti tossici ancora oggi largamente utilizzati nel restauro. Di fatto corrispondono alla necessità reale ed emergente degli operatori del restauro di poter lavorare con prodotti non tossici per la salute e non aggressivi per le opere (inoltre facilmente controllabili e privi di "residui" pericolosi prodotti sia in fase di pulitura che in fase di smaltimento). Queste metodiche consentono di poter accedere a servizi avanzati per individuare, insieme ai ricercatori, soluzioni "su misura" per particolari casi, declinando strategie operative di nuovo interesse e in alcuni casi non risolvibili con le metodiche tradizionali.
Ho avuto modo di collaborare con il gruppo ENEA Casaccia per la ricerca di soluzioni di pulitura alternative ai metodi convenzionali in uso, nei seguenti cantieri di lavoro:
2013 - Avignone, Palazzo dei Papi . Matteo Giovanetti , Cappella di San Marziale. Presenza di resine viniliche sulle pitture murali. Individuata in laboratorio una procedura per rimuovere la resina mediante un ceppo fungino immobilizzato in Vanzan®NF, senza alterare i pigmenti sottostanti e lasciando l'impacco per un periodo inferiore al tempo di sporifcazione (ricerca eseguita in qualità di consulente per il Consorzio Arkè) .
2015 - Roma, Palazzo Farnese, Galleria dei Carracci. La collaborazione con l'ENEA ha portato ad individuare soluzioni biotecnologiche valide rispetto ad alcune problematiche che non mostravano al momento una soluzione di trattamento tradizionale soddisfacente. Si citano, a titolo di esempio, prove di biopulitura, mediante l'utilizzo di impacchi batterici diversificati, che hanno permesso la rimozione di segni di degrado persistenti su marmi e travertino (macchie brune – ossidi di ferro inquinamento urbano) e dipinti murali (aloni di resine sintetiche applicati nel corso di precedenti restauri - Paraloid B72 e Primal AC33), nel rispetto dei materiali originali e della salute degli operatori (ricerca eseguita in qualità di consulente per il gruppo ATI Farnese).
2019/2020- Città del Vaticano, Basilica di San Pietro, A. Algardi, Incontro di Papa Leone e Attila, altorilievo in marmo di Carrara. Presenza di cere, olii e depositi grassi. La biopulitura mediante l'utilizzo di impacchi batterici diversificati, ha permesso la rimozione delle sostanze estranee sovrammesse alla superficie lapidea, non perfettamente rimovibili con prodotti usuali, grazie alla capacità dei batteri di solubilizzare cere e sostanze grasse e di utilizzarli come fonte per la loro crescita. Vorrei concludere questo breve intervento sottolineando due aspetti della ricerca in corso:

- La necessità e l'urgenza di poter arrivare ad ottenere facilmente i prodotti descritti, rendendoli disponibili sul mercato e di pratico utilizzo. La bontà del metodo e il suo successo si misura anche in base alla messa a punto di metodiche standard e alla ripetibilità delle procedure, in relazione alla stabilità dei ceppi batterici quando questi vengono opportunamente distribuiti in prodotto commerciabile, in vista di ridurre i tempi di contatto e semplificare le operazioni di applicazione.
- Promuovere i momenti di condivisone delle esperienze maturate e 'fare rete' (sarebbe utile creare una banca dati), perché solo dallo scambio reciproco e dalla ricerca avviata con rigore scientifico si può arrivare ad ottenere nuovi ed apprezzabili risultati.

Ci stiamo affacciando a un contesto di grandi opportunità, dove sarà possibile lavorando in team, ognuno per le proprie competenze professionali, risolvere problematiche conservative complesse. In particolare, ed è questo il mio personale auspicio, focalizzando la ricerca su casi specifici dove le metodiche tradizionali non rispondono positivamente, come ad esempio nel trattamento delle superfici ambrate vicine al color cuoio delle sculture realizzate in marmo bianco di Carrara, dove il viraggio sembrerebbe al momento irreversibile.

Restauro Sostenibile- Riflessioni

Guy Devreux

Laboratorio di Restauro Materiali Lapidei-Musei Vaticani

L'anno prossimo, saranno passati dieci anni dall'avvio dei restauri delle opere presenti nei Giardini Vaticani. All'epoca, si ritenne opportuno impostare il nostro lavoro su criteri diversi da quelli solitamente incentrati solo ed unicamente sulla conservazione dei nostri manufatti. Aver avuto l'opportunità di confrontarci con questi straordinari giardini ci ha fatto riflettere sull'impatto che il nostro intervento avrebbe avuto sull'equilibrio di questo fragilissimo ecosistema. Ed è da tale contingenza che è emersa l'urgenza di adottare procedure diverse da quelle tradizionali, riconducibili alla filosofia del restauro eco-sostenibile o bio-restauro che dir si voglia.
L'entusiasmo, fortemente alimentato dai risultati ottenuti, ci ha convinti ad insistere in un percorso che è stato spesso arduo e insidioso. Si poteva inoltre contare su di un gruppo affiatato, composto da professionisti specializzati in diversi campi della conservazione e della ricerca scientifica.
Il primo pericoloso equivoco da superare era quello della supposta equivalenza fra prodotto e metodo naturale e prodotto o metodo atossico. Un approccio empirico, privo di basi scientifiche, non solo conduce a soluzioni errate, ma rappresenta il maggior ostacolo al corretto sviluppo delle tecniche naturali applicate alla conservazione. Si tratta purtroppo di un diffuso modo di pensare spesso fondato sul pregiudizio e sulla superficialità.
Dopo cinque anni di prove, test ed esami, attenendoci scrupolosamente ai protocolli scientifici elaborati dal Laboratorio di Diagnostica dei Musei Vaticani, siamo riusciti a sostituire i comuni biocidi chimici di sintesi, utilizzati per rimuovere le patine biologiche dai manufatti lapidei, con una miscela di oli essenziali in acqua. Senza ulteriormente entrare in dettagli tecnici, quello che è emerso in modo chiaro da questa esperienza è la assoluta necessità di affrontare questi temi con il costante aiuto e sostegno della ricerca scientifica.
Non si tratta certo di rinnegare la visione romantica del restauratore di bottega che nel suo lavoro impiega metodi tradizionali e naturali. In realtà, all'opposto, è solo la ricerca che può avvalorare e confermare il corretto e consapevole uso delle sostanze naturali a nostra disposizione conferendo rigore e scientificità alle metodologie adottate.
La giornata dedicata alle Bioscienze nei Beni Culturali e organizzata all'Accademia Nazionale dei Lincei ha contribuito in modo efficace a sottolineare questa realtà. La sempre più stretta ed interconnessa relazione fra ricerca e restauro si accompagna ad una analoga presa d'atto di come la scienza possa cambiare le modalità del nostro operare. Tale fenomeno è in particolar modo riscontrabile nelle nuove generazioni di restauratori che, molto più consapevoli dell'importanza del contributo che la scienza è in grado di offrire al loro agire, vedono da un lato mettere a riparo le opere da trattamenti, metodi e prodotti dannosi e dall'altro migliorare le condizioni della sicurezza del loro lavoro.
Le presentazioni di alto livello scientifico che si sono susseguite nel corso di questa giornata sono molto incoraggianti e ci aiutano a comprendere che la strada del bio-restauro è una delle più promettenti fra quelle possibili nell'aggiornamento della nostra professione. Sono state messe a punto soluzioni prima difficilmente immaginabili. Nel passato, la ricerca tendeva a concentrarsi su settori commercialmente più appetibili con un volume d'affari maggiore, trascurando le attività legate al restauro. E da parte nostra ci si rivolgeva altrove per dare nuove soluzioni ai nostri problemi. Va tuttavia considerato che l'attualità del tema generale dell'eco-sostenibilità ha ora finito per convogliare importanti sovvenzioni e investimenti a tutto vantaggio per la conservazione del nostro patrimonio artistico.
Date queste premesse, si è ravvisato nel corso dell'incontro l'importanza di creare degli organi di sostegno e controllo che possano collegare tutte le realtà scientifiche istituzionali e private dedicate al restauro sostenibile in modo da avvalorarne metodi e prodotti. Allo stesso modo, questi stessi organi potrebbero essere deputati alla vigilanza e al coordinamento di una corretta informazione e divulgazione nel rispetto dell'etica della conservazione, tenendo sempre presente che l'introduzione di nuovi ritrovati potrebbe rendere necessario un continuo aggiornamento di una materia che resta comunque costantemente in divenire.
E' bene che, accanto alla prosecuzione delle ricerche di laboratorio e all'intensificazione delle attività pratiche sulle opere, questa giornata così significativa rappresenti anche un primo passo che, a livello teorico, consenta l'elaborazione di un pensiero collettivo sul tema dell'affermazione del concetto di eco-sostenibilità nel restauro.

Il recupero di un'antica tecnologia: la mucillagine del fico d'inda e il peperoncino

Fernanda Falcon Martinez

Soprintendenza ABAP per le province di L'Aquila e Teramo

Nopal è il nome con cui si conosce la pianta di fico d'india in Messico. Questa pianta emigrò in Europa nel XVI secolo, colonizzando il paesaggio del sud di Italia e portando allora con sé la sua ricchezza: la lacca carminio che si ottiene da una resina che secerne le larve dell'insetto Coccus Lacca e che vive in questa pianta. Però la pianta di Opuntia ficus indica aveva per gli antichi popoli messicani, altre funzioni.
L'idea che impulsò l'iniziativa di studiare le proprietà della mucillagine di nopal o noplagel, è stata di approfondire la conoscenza di una tradizione che si tramanda in Messico da tempi molto antichi ossia la pratica di addizionare con la sua mucillagine intonaci e dipinti murali dai tempi preispanici e che non si è mail interrotta. La esperienza che ho potuto condurre personalmente con le biotecnologie inizia nel 2014 in ambito di un progetto di cooperazione bilaterale Per quella occasione si formò un partenariato tra ENEA come ente Italiano e Colegio de Michoacán per la parte messicana.

Il gruppo cosi costituito iniziò a studiare le caratteristiche funzionali della mucillagine della pianta di fico d'inda o nopal-Gel, come additivo per impasti a base di calce, riscontrando ottimi risultati in termini di miglioramento delle proprietà fisiche e chimiche degli impasti. Inoltre, pur essendo la mucillagine costituita in gran parte da carboidrati e per tanto soggetto a subire attacco biologico, le prove messe appunto per provare la bio recettività hanno dato esiti positivi.
Successivamente nel con un nuovo progetto (2018-2020), che si lega al precedente, si è esaminato un altro prodotto naturale che aiutasse il restauratore a contrastare uno dei problemi conservativi più difficili da risolvere, ovvero il controllo del bio deterioramento delle superfici, soprattutto di quelle esposte all'aperto. Con le sperimentazioni sono state studiate le proprietà della mucillagine della pianta di fico d'inda in abbinamento con un'altra pianta multifunzionale: Capsicum o peperoncino. Da tale associazione nasce il nopalCap.

Un continuo lavoro di divulgazione, attraverso seminari e convegni inerenti "pratiche sostenibili e nuove tecnologie", ha reso sempre più noti i risultati che erano stati ottenuti durante la fase di sperimentazione. Il crescente interesse, sia da studenti sia per parte di professionisti del settore che hanno voluto inserire nopalgel e nopalcap nella loro pratica di restauro.

La necessità di un prodotto di facile uso, in particolare per gli operatori nei beni culturali, è stato uno degli obiettivi a cui si è dedicato il gruppo di specialisti di ENEA, e cioè lo studio di un prodotto stabile, di facile trasporto e facile utilizzo per l'impiego anche in cantieri di restauro. Da un lato si è studiato la shelf life della mucillagine fresca con o senza additivi antiossidanti, (ancora in corso), dall'altro è stato messo appunto il processo di liofilizzazione per l'ottenimento di un prodotto stabile da ricostituire in acqua quando necessario. Il processo è stato sperimentato anche a livello industriale. Lo studio di queste due piante multifunzionali come prodotto da utilizzare in campo di bio restauro è tutt'alto che conclusa.

Attualmente questi prodotti continuano ad essere provati da lavoratori del settore con la assistenza di ENEA, nei casi dove il problema del bio deterioramento di malte è preponderante. Tutti i casi dove sono stati utilizzati nopalgel e nopalcap, come additivo della malta a base di calce, sono oggetto di monitoraggio e controllo continuo con l'aspettativa che possa trovare spazio nella normale pratica di restauro come soluzione efficace, semplice, economica, di facile utilizzo e amichevole con l'ambiente

È infine, molto importanti indicare che i casi in cui sono stati impiegati questi prodotti in Italia, sono attualmente oggetto di monitoraggio continuo da parte di Enea, con l'aspettativa che si possa comprovare che hanno passato la prova più importante da superare: quella del tempo.

L'impiego di sostanze di origine naturale nelle sperimentazioni dell'Opificio delle Pietre Dure

Monica Galeotti

Laboratorio Scientifico Opificio delle Pietre Dure

L'impiego di sostanze di origine naturale con caratteristiche potenzialmente meno nocive di quelle sintetiche verso l'uomo e verso l'ambiente è da anni al centro dell'attenzione dei settori di restauro dell'Opificio delle Pietre Dure. I restauratori che si occupano di opere lapidee, per le caratteristiche dei supporti su cui operano, sono sempre stati fra i più entusiasti nell'avviare sperimentazioni con questi materiali. Si ricordano, ad esempio, i lavori svolti sul consolidamento di litotipi calcarei con ceppi batterici[1] e sulla pulitura di croste nere con microorganismi[2].
Nel 2017, sempre il settore di restauro di materiali lapidei ha introdotto in Opificio gli olii essenziali come alternativa ai biocidi tradizionali, conducendo, insieme con la collega biologa Isetta Tosini, prove preliminari di applicazione su una statua marmorea nel giardino di Boboli[3]. Le sperimentazioni dell'Opificio partono dagli esiti delle ricerche di università e centri di ricerca, spesso condotte in-vitro, e mirano a proporre protocolli operativi che prendano in considerazione le modalità applicative e l'interazione con i vari substrati. In quest'ottica nel 2019 è stato svolto un lavoro di tesi della Scuola di Alta Formazione[4] che prendeva in esame alcuni olii essenziali, usati sia tal quali che in miscela, combinati con tre diversi supportanti per consentire un tempo lungo di contatto con il substrato tenendo bassa la concentrazione di principio attivo. Lo studio è stato eseguito su campioni di marmo invecchiato e colonizzato naturalmente e su una statua del Museo Archeologico Nazionale di Firenze. Il percorso sugli olii essenziali è proseguito nel 2021 con una tesi del Master sull'arte contemporanea organizzato dall'Opificio, che ha offerto lo spunto per un interessante caso di studio con l'opera *Gerusalemme Città della Pace* di Dani Karavan, realizzata in calcestruzzo e posta nel parco-museo di Celle (Santomato-Pistoia)[5]. In alcune zone test affette da crescita di muschi, alghe e licheni, sono stati messi a confronto impacchi di biocidi tradizionali con miscele di olii essenziali in acqua e alcool con un supportante a base polivinilica. Oltre alla pulitura, gli olii sono stati usati anche nella fase di protezione del manufatto: dopo una prova su campioni di cemento trattati ed esposti in prossimità dell'opera, si è deciso di proteggere il cemento e le stuccature di restauro con un prodotto a base di silice nanostrutturata e funzionalizzata addizionato una soluzione di olii essenziali in acqua e alcool. Questo protettivo, la cui azione viene monitorata periodicamente dall'Opificio, sta dimostrando una buona capacità preventiva verso ulteriori attacchi biologici.
Lavori in svolgimento, che aprono a nuove prospettive in linea con le ricerche attuali, includono la sperimentazione con principi attivi di olii essenziali incapsulati e l'utilizzo di sostanze naturali con la doppia funzione di leganti volatili e biocidi. La prima tematica è stata sviluppata in occasione di una tesi della Scuola di Alta Formazione appena conclusa, in collaborazione con il CNR-ICCOM di Sesto Fiorentino[6], in vista della proposta di ricollocazione di una collezione di opere pittoriche nello studio dell'artista, dotato di armadi metallici che potrebbero contenere le opere ma in cui è necessario prevedere un sistema di controllo degli attacchi biologici. La tematica dei consolidanti temporanei viene invece portata avanti in un lavoro di dottorato[7] in cui si stanno studiando proprietà ed effetti del mentolo come legante volatile in grado di esercitare un'azione consolidante di durata limitata da usarsi in contesti emergenziali e durante operazioni specifiche di movimentazione e di restauro. Le spiccate proprietà biocide di questa sostanza e la sua doppia azione su substrati diversi è al centro di un'attività di ricerca del progetto CHANGES (https://sites.google.com/uniroma1.it/changes/). La partecipazione a questo progetto rappresenta per l'Opificio, una straordinaria opportunità per dare continuità e sistematicità ai tanti spunti di ricerca esposti sopra e per interagire con esperti del partenariato con competenze complementari in modo dare nuovi impulsi alla ricerca nell'ambito delle bioscienze applicate alla conservazione.

1 Eleonora Vittorini Orgeas «Il consolidamento del materiale lapideo; sperimentazioni nuove e tradizionali a confronto su Nicodemo del "Compianto sul Cristo morto" del maestro di Santa Anastasia, Caprino Veronese» Tesi SAFS dell'anno accademico 2015-16

2 Valutazione dell'efficacia nell'utilizzo di microrganismi per la biorimozione delle croste nere dai materiali lapidei ed approfondimento delle metodologie applicative, Eleonora Gioventù,Paola Franca Lorenzi, OPD Restauro, No. 22 (2010), Centro Di (Firenze)

3 Il restauro di due sculture antiche del Giardino di Boboli, Riccardo Gennaioli, Franca Sorella, Isetta Tosini, OPD Restauro, No. 31 (2019), Centro Di (Firenze)

4 Mariagiulia Spada "Studio e verifica dell'efficacia delle proprietà biocide degli oli essenziali. Restauro della statua di Silvano del giardino del Museo Archeologico Nazionale di Firenze", Tesi SAFS dell'anno accademico 2018-19

5 Rossana Parigi, "Proposta per un restauro ecosostenibile: impiego degli oli essenziali nella pulitura dell'opera in cemento Gerusalemme Città della Pace di Dani Karavan nel Parco della Fattoria di Celle a Pistoia", Tesi Master Specialistico in Conservazione e gestione delle opere d'arte contemporanea

6 Giulia Ciabattini "Il fondo Leonardo Savioli: dal Centro Pecci allo studio dell'artista.Restauro strutturale di un dipinto su compensato,messa in sicurezza delle opere e proposte per l'allestimento.", Tesi SAFS dell'anno accademico 2022-23.

7 Dottorando Vincenzo Amato- Dottorato In Storia Delle Arti E Dello Spettacolo - Dipartimento SAGAS – Università di Firenze

Riflessioni sul biorestauro: punti di forza e problemi applicativi

Eleonora Gioventù

ICR - Istituto Centrale per il Restauro

Il tema delle bioscienze applicate alla conservazione dei beni culturali è senza dubbio di grande attualità, e possiamo finalmente dire che sta traguardando ruoli e modalità sempre più concreti. Un percorso iniziato con i primi test di laboratorio eseguiti negli anni '80, che proponevano l'uso di microrganismi per la pulitura delle opere d'arte, ed evolutosi virtuosamente fino ad oggi; un'evoluzione lenta e piena di criticità, che possiamo però definire rigorosa e costante.
Il punto di interesse di questo convegno è, a mio avviso, il passaggio allo step successivo, ovvero quello di riunire tutte le pratiche che le bioscienze ci possono offrire nel campo della conservazione nell'ottica di un approccio interdisciplinare, a partire dal processo di studio e analisi fino ad arrivare all'intervento di restauro e di monitoraggio nel tempo.

Nel contesto sociale attuale, in cui è imprescindibile l'interrogarsi sul futuro del nostro pianeta e sulla sostenibilità del nostro fare quotidiano, l'applicazione delle bioscienze è senza dubbio una delle strade obbligatorie da percorrere ed approfondire, in quanto la sfida del nostro tempo ed il dovere degli operatori culturali sono quelli di indirizzarsi sempre di più verso un restauro e una conservazione sostenibili.

Condividendo la mia esperienza personale nel campo del biorestauro, che parte dalle prime prove di biopulitura mediante i microrganismi studiati dall'Università di Milano e continua nel tempo con differenti progetti di ricerca sempre legati a queste tematiche, posso mettere in luce alcuni punti deboli del processo, ovvero le difficoltà applicative di alcuni prodotti in determinate circostanze, ma soprattutto le difficoltà di commercializzazione dei prodotti su larga scala, fattore che purtroppo influenza molto la scarsa diffusione dei materiali biocompatibili. Se pensiamo infatti ai prodotti bioderivati realmente disponibili e acquistabili da un'impresa di restauro, ne emerge il loro numero limitato, nonostante i numerosi progetti di ricerca forniscano risultati sempre più promettenti.

Nel contesto dell'importanza della reale applicabilità delle ricerche scientifiche credo che il ruolo delle istituzioni nell'agevolare questo passaggio sia, oltre a quello di concentrarsi a livello della ricerca scientifica per stabilirne l'efficacia, quello di lavorare sullo sviluppo di protocolli metodologici applicativi e soprattutto su una sorta di messa a sistema di questi prodotti delle bioscienze. Prendendo proprio esempio dalla natura infatti, che si evolve e si fortifica grazie a sistemi comunitari interconnessi, pensiamo ad esempio lo sviluppo dei biofilms che crescono e sopravvivono grazie all'interazione complessa delle differenti reazioni metaboliche dei singoli microrganismi componenti, sarebbe opportuno fare uno sforzo collettivo volto all'approfondimento di studio e ricerca proprio sulla messa a sistema dei prodotti e metodi di intervento biocompatibili.

L'obiettivo prioritario dovrebbe essere quello di produrre protocolli ed individuare procedure standard che agevolino la diffusione e l'efficacia complessiva degli interventi sostenibili. Perciò la "strutturazione ragionata" dell'utilizzo dei differenti prodotti disponibili, che spesso non riescono da soli a soddisfare le esigenze di rapidità ed efficacia di intervento, potrebbe essere la strada per contribuire ad un avvio più concreto di questi metodi nell'applicazione quotidiana degli interventi.

Un dato importante in questa analisi è inoltre la valutazione e la quantificazione dell'impatto ambientale sia dei prodotti e dei metodi nel loro processo applicativo che, e soprattutto, del loro processo di produzione.
Tutti questi fattori andrebbero quindi studiati e messi a sistema, in particolare dalle istituzioni, per un'evoluzione green dei capitolati di intervento al fine di renderli certificabili sotto il profilo della ecocompatibilità ed indirizzare perciò il mercato verso questa strada.

Questo convengo costituisce certamente un primo tassello in questa direzione, dal momento che è riuscito a mettere bene in luce quei plurimi aspetti delle bioscienze che possono contribuire allo sviluppo di questi protocolli indispensabili per un restauro e una conservazione sostenibili.

Il “Parco Green” per una gestione sostenibile degli interventi di restauro

Alessandro Lugari

Parco Archeologico del Colosseo

Il Parco archeologico del Colosseo non è solo un sito archeologico, ma anche una grande area verde che si estende per più di 40 ettari nel cuore di Roma. Un “parco naturale” in cui la vegetazione spontanea convive con i grandi alberi secolari, piantati per far rivivere lo spirito dei giardini imperiali e dei rinascimentali Horti Farnesiani. E quest’area, ancora verde nonostante l’urbanizzazione, è stata scelta come habitat da una nutrita fauna di piccoli mammiferi, rettili, insetti e uccelli.

Per valorizzare al massimo l’ambiente naturale e contribuire allo sviluppo dell’economia sostenibile, il PArCo ha lanciato nel corso del 2020 il progetto “Parco Green”. Prendendo spunto dal concetto di “Green Economy”, il progetto comprende differenti attività, accomunate dallo scopo di ridurre l’impatto ambientale, diminuire l’inquinamento e conservare l’ecosistema e la biodiversità. Le attività spaziano dal riciclo dei materiali alla realizzazione di progetti di restauro ecosostenibile; dalla raccolta dei frutti spontanei del Parco alla messa a dimora di essenze antiche e rinascimentali, e ancora molto altro. Per la parte conservativa il PArCo ha dato il via a una sperimentazione di tecniche di restauro innovative, tra le quali il bioconsolidamento, sperimentato e applicato sull’Arco di Settimio Severo.

L’aumento dell’inquinamento nelle aree urbane ha messo in pericolo la sopravvivenza delle pietre carbonatiche che costituiscono la maggior parte delle decorazioni architettoniche e della statuaria antica. Il deterioramento dei manufatti in pietra ha dato forte impulso, negli ultimi decenni, alla ricerca e allo sviluppo di nuovi trattamenti di consolidamento e protezione. I prodotti convenzionali non raggiungono infatti un consolidamento profondo, formando tipicamente un sottile impervio strato superficiale che ostruisce i pori della pietra. In questo campo si sono sviluppati studi specifici sulla bioconservazione, in particolare sulla carbonatogenesi batterica. Pertanto, è stato sviluppato un metodo basato sull’attivazione selettiva del microbiota carbonatogeno che vive all’interno del materiale lapideo stesso, mediante l’applicazione di una soluzione nutritiva adeguata.

Questo trattamento di bioconservazione, applicato nel restauro della facciata occidentale dell’Arco, favorisce lo sviluppo di batteri eterotrofi in grado di indurre carbonatogenesi, partendo dall’interno del materiale verso l’esterno, senza alterazione dell’aspetto superficiale della pietra o induzione di effetti collaterali. L’attivazione del microbiota carbonatogeno che abita le pietre carbonatiche ornamentali in decomposizione è un trattamento di conservazione efficace per l’applicazione in situ. Per questo rappresenta una strategia innovativa ed ecologica e soprattutto segna un miglioramento sensibile rispetto ai precedenti trattamenti, in quanto evita l’inoculazione della pietra trattata con una coltura batterica estranea, riducendo così i costi e minimizzando i potenziali inconvenienti.

Il problema fondamentale dell’utilizzo di tali prodotti e tali tecnologie è probabilmente la paura del cambiamento e forse l’ignoranza dei progettisti verso il loro reale funzionamento. Oramai sono anni che si parla solamente di sperimentazione, tali metodi sono più che collaudati, e soprattutto sono spesso più economici di quelli ‘tradizionali’, sia in termini specifici nell’ambito della conservazione stessa (per tempi e costi) sia in termini generali rapportati all’economia del sistema ‘terra’, in quanto ecosostenibili. Per questo motivo forse, come categoria, dovremmo fare una forte autocritica per non essere ancora riusciti ad imporre tali tecniche, almeno nelle situazioni possibili.

Esperienze di Restauro sostenibile e integrazione dei criteri ambientali nelle attività del Parco Archeologico del Colosseo

Fiorangela Fazio

Parco Archeologico del Colosseo

Con riferimento ai temi trattati durante questo workshop vorrei dire qualcosa in merito alle esperienze fatte al Parco archeologico del Colosseo, agli esiti positivi e come mi è stato chiesto, valorizzare insieme a voi alcune criticità nell'utilizzo di tecnologie basate sulle bioscienze, ai fini del restauro e delle attività di manutenzione dei beni conservati al Parco.
Ci troviamo davanti ad un Patrimonio estremamente esposto ai fattori ambientali, compreso quello antropico, ed oggetto di continui interventi ai fini della sua tutela e conservazione.
Siamo consapevoli che la conservazione e in modo particolare il restauro si poggiano ormai su una pratica consolidata, che necessita oggi di arricchirsi di nuove soluzioni a più basso impatto per l'ambiente e per l'uomo.
Ma sappiamo dall'esperienza che questa è una lunga strada, che si percorre lentamente e della quale, ad ogni passo, bisogna valutare la sostenibilità.
Al Parco archeologico del Colosseo nel 2020 è nato un progetto che, con un cantiere pilota presso la Basilica Emilia al Foro Romano, si è posto l'obiettivo di valutare la sostenibilità dell'introduzione dei criteri ambientali nella progettazione degli interventi di restauro. Sono state quindi prese in esame varie tecnologie alternative alla pratica tradizionale, con carattere di eco-compatibilità. Gli elementi oggetto di valutazione, oltre ad essere relativi al fabbisogno conservativo specifico dei beni, si riferiscono agli aspetti tecnici e di impatto economico.
In particolare mi riferisco alla complessità tecnica delle metodologie applicative, al loro grado di approvigionamento sul mercato, che non investe ancora adeguatamente in questo campo ed alla conseguente difficoltà di reperire operatori con adeguata formazione. Infine, elemento non trascurabile è l'impatto economico. Molto spesso le scelte ideali per l'ambiente risultano essere le più onerose in quanto, al di là di ogni considerazione sui benefici a lungo temine derivanti dall'utilizzo di pratiche green, l'impatto economico è percepito e più spesso valutato, nel breve periodo.
Il progetto alla Basilica Emilia, bloccato dalla pandemia è stato salvato nei suoi contenuti essenziali e ormai da tempo esteso ad altri siti del Parco, fornendo dati su una più ampia scala di tipologie conservative.
Le esperienze fatte sono state varie ed in sintesi possiamo affermare che si sono ottenuti ottimi risultati, ad esempio con l'utilizzo degli enzimi. Una formulazione di questi, sospesa in una matrice di nanoparticelle sotto forma di gel, ha consentito la devitalizzazione di patine biologiche sui frammenti marmorei architettonici esposti all'aperto. L'esito da questo punto di vista è stato positivo, infatti, dalle misurazioni effettuate, l'abbattimento della carica microbica a seguito dei trattamenti è stato eccellente, attestandosi su valori che arrivano all'83%.
Altri dati incoraggianti sono arrivati dall'esperienza con gli olii essenziali e con un particolare supportante a base di alcool polivinilico, un prodotto pellicolante in grado di migliorare il lavoro dei principi attivi all'interfaccia con le superfici interessate ed allo stesso tempo abbattere le esalazioni potenzialmente nocive, incapsulando le sostanze al suo interno.
Nonostante gli ottimi risultati raggiunti si sono rilevati alcuni possibili punti di criticità.
Il degrado che incontriamo sulle superfici dei reperti marmorei esposti all'aperto, nel nostro sito, è tipico di un ambiente urbano ad alto tasso di inquinamento, in quanto il Parco archeologico del Colosseo, pur essendo ricco di verde è incastonato nella città di Roma, una città molto inquinata. Per questa ragione è realmente difficile che le patine sui reperti esposti all'aperto siano patine composte da un solo prodotto del degrado, esse sono composte per la quasi totalità, dalla commistione di parti biologiche vive, mineralizzazioni, depositi e componenti oleose derivate dalla combustione degli idrocarburi. Per ottenere la rimozione di queste patine, nel rispetto dei principi di basso impatto ambientale è stato necessario definire protocolli calibrati, che hanno previsto sulle medesime superfici, una successione ragionata di operazioni e l'alternarsi di principi attivi con diversi campi di azione. Il punto è che oltre agli incoraggianti risultati in merito all'efficacia, ne è emerso un dato di notevole impegno di manodopera esperta e di tempi di esecuzione allungati, con le naturali ricadute economiche. Inoltre, pur lasciandosi guidare dalle esperienze di sperimentazione condotte e divulgate da altri istituti, in molti momenti si e' rilevata la necessità di avere a disposizione protocolli di base, ratificati a livello generale in ambito scientifico, cui fare riferimento.
Questo è un tema fondamentale quando ci muoviamo nell'ambito dei Contratti Pubblici e l'obiettivo è quello di giungere alla progettazione completa di interventi di restauro basati su criteri di eco-compatibilità.
E' necessario che tali progettazioni siano supportate da protocolli stringenti o vere e proprie linee guida, cui fare riferimento nei disciplinari di gara, anche a garanzia della loro appaltabilità tecnica.
Proprio in questo momento, al Parco archeologico del Colosseo ci accingiamo ad intervenire su siti ad elevata criticità, con un prodotto di natura biologica, derivato dalla mucillagine della pianta di fico d'india, per valutarne la sostenibilità nella pratica corrente del restauro e della manutenzione ordinaria.
Si affronterà il tema delle malte di contenimento di strutture originali, per valutare gli effetti di durabilità degli interventi, a fronte di fattori di deterioramento come i fenomeni di gelività, la migrazione dei sali solubili, la colonizzazione da parte dei biodeteriogeni. Speriamo, con la collaborazione di ENEA che ha svolto la sperimentazione sul prodotto, di definire il protocollo specifico per il suo utilizzo su questo sito. Ciò sarà fondamentale per la progettazione degli interventi.
Il nostro sogno è quello di sposare appieno la questione ambientale nel campo degli interventi di conservazione e restauro e di arrivare alla loro progettazione e realizzazione attraverso procedura pubblica di appalto.
Questo porterebbe con sé molti valori e sarebbe un contributo per la crescita dell'offerta sul mercato di nuove tecnologie e professionalità adeguatamente formate. Sono un restauratore e sento di ringraziare per il lavoro svolto da chi ha contribuito a questa giornata sulle Bioscienze applicate al restauro.
Dal Parco archeologico del Colosseo, e da me personalmente voglio fare arrivare l'esortazione ad andare avanti in questo prezioso lavoro, e la disponibilità a collaborare per i comuni obiettivi in questo campo.

Alcuni spunti per promuovere un restauro sostenibile

Chiara Scioscia Santoro

Soprintendenza Speciale Archeologia Belle Arti e Paesaggio di Roma chiara.sciosciasantoro@cultura.gov.it

Il Convegno da poco concluso sulle Bioscienze nei Beni culturali, che si è svolto nella prestigiosa sede dell'Accademia dei Lincei di Roma, è stato, non solo un proficuo momento di scambio dei risultati sugli studi e sulle ricerche di questi ultimi anni in materia di biosotenibilità nell'ambito della conservazione dei beni culturali, ma è stato anche l'occasione per dare l'avvio ad una riflessione sul ruolo che gli Enti preposti alla tutela del Patrimonio archeologico, storico, artistico ed architettonico dovrebbero avere nel promuovere e sovvenzionare lo studio e la ricerca di tecnologie biosostenibili nel campo della conservazione e, soprattutto, nell'applicare gli esiti di tali studi agli interventi di restauro.

Le problematiche emerse in seguito ai cambiamenti globali degli ultimi anni devono far emergere la necessità di riorganizzare all'interno delle amministrazioni le procedure di intervento: i progetti di restauro devono prevedere anche la possibilità di interventi che contemplino l'uso di prodotti "bio" e metodologie ecocompatibili; i prezzari dovrebbero essere aggiornati con l'inserimento di voci di sistemi di intervento biosostenibili e applicare ad essi costi adeguati; all'interno dei pubblici uffici dovrebbero essere organizzati corsi di informazione e aggiornamento rivolti a tutti i dipendenti, con lo scopo di sensibilizzare tutte le professionalità ad un diverso approccio alle procedure di intervento; bisogna muoversi con l'obiettivo di creare un'unità del sapere nel campo dell'innovazione nelle scienze applicate alla conservazione e al restauro in modo da lavorare sempre in sinergia.

Sarebbe auspicabile, inoltre, che le Pubbliche Amministrazioni diano alla figura del Restauratore presente nel proprio organico il giusto ruolo di soggetto di riferimento in grado di farsi garante di un corretto sviluppo della politica di conservazione e di promuovere un approccio metodologico all'intervento di restauro, ragionato in funzione della reale necessità conservativa dell'opera su cui si dovrà intervenire. Contestualmente, all'interno dell'Amministrazione, deve essere incrementato il dialogo con Istituti scientifici per lo sviluppo di tematiche declinate sui nuovi ambiti di ricerca.

Si tratta di una catena in cui ogni anello da solo non ha ragione d'essere se non unito a tutti gli altri e, oggi che il Ministero della Cultura si è fatto garante dell'impegno per il raggiungimento degli obiettivi per lo sviluppo sostenibile, sottoscritto con l'agenda 2030, le Soprintendenze e gli Enti pubblici preposti alla tutela del Patrimonio storico artistico saranno fortemente motivati a lavorare per formare una struttura in grado di costruire un sistema sostenibile, forte e competitivo.

La biopulitura del sarcofago del monumento funebre a Lorenzo duca di Urbino, Sagrestia nuova - Museo delle Cappelle Medicee, Firenze

Marina Vincenti

Il restauro dei monumenti funebri di Giuliano Duca di Nemour e Lorenzo Duca di Urbino nella Sagrestia nuova, progettata e realizzata da Michelangelo Buonarroti 1526-1533, si è svolto tra il 2019 e il 2020 a cura della scrivente con la collaborazione specialistica di Daniela Manna la Direzione dei lavori affidata prima a Monica Bietti e poi a Francesca De Luca, con fondi ministeriali, per incarico da parte di Paola D'Agostino Direttore dei Musei del Bargello.
L'impostazione metodologica del restauro è consistita nello studio della storia conservativa dei monumenti e nelle accurate indagini fotografiche a luce visibile a cura di Antonio Quattrone, alla fluorescenza indotta dagli Uv e IR a cura di Andrea Rossi della Di.Ar per individuare sostanze alterate ancora presenti sui marmi. Il team dell'Istituto di Scienze del Patrimonio Culturale del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISPC-CNR) ha affrontato le problematiche emerse durante lo studio preliminare. La pulitura delle sculture è stata monitorata prima e dopo con misurazioni colorimetriche e di riflettanza del marmo. Giunte a completamento della pulitura delle sculture con una metodologia consolidata, costituita dall' applicazione a tampone di alcool e acetone e successivamente con tamponi a base di acqua demineralizzata, ci siamo trovate ad affrontare il degrado del Sarcofago del Monumento funebre a Lorenzo Duca di Urbino, già fortemente macchiato dopo l'inumazione del corpo di Alessandro non eviscerato, come ricordato dalle fonti, ed oggetto di drastiche puliture e abrasioni in particolare sulla parte frontale. Sui due lati brevi e sotto la cassa del sarcofago, macchie brune di spessori variabili fino ai depositi più consistenti della parte inferiore, deturpavano il marmo. Al fine di caratterizzare i materiali presenti sono state effettuate misurazioni con spettroscopia infrarossa in modalità riflettanza totale (TR-FTIR). Tale tecnica è stata applicata direttamente in situ. Su queste macchie sono stati prelevati anche alcuni campioni per meglio definire i composti organici e inorganici presenti. Gli spettri acquisiti in situ hanno mostrato in varie aree la presenza di gesso di deposito e di ossalati di calcio e stearato di calcio, la cui origine è riconducibile al degrado di materiali organici superficiali (es: protettivi). In un campione si è osservata anche la presenza di fosfato di calcio e di materiale proteico; questi composti potrebbero essere correlati a processi di decomposizione corporea. La presenza di composti del fosforo è stata confermata anche dall'indagine della fluorescenza a raggi X (XRF), che permette la rilevazione degli elementi presenti su una superficie, andando a confermare i risultati dell'analisi FTIR e le ipotesi che erano state formulate inizialmente sulla possibile natura delle macchie presenti. I risultati delle indagini sono stati condivisi con Anna Rosa Sprocati e Chiara Alisi dell'Enea di Roma. Insieme a loro è stata avviata una campagna di test con batteri (provenienti dalla collezione Enea Mirri) competenti per le singole sostanze da rimuovere applicati in gel di Vanzan o Laponite posti a contatto della superficie interponendo porzioni di carta giapponese. I risultati soddisfacenti ed apprezzati dalla Direzione dei lavori hanno portato alla stipula di una convenzione tra L'Enea ed i Musei del Bargello. Chiara Alisi ed Anna Rosa Sprocati hanno provveduto al trasporto da Roma di 16 litri di batteri selezionati per le singole sostanze da rimuovere, precedentemente formulati ed uniti in parte al gel di laponite, in parte in Vanzan. La successiva applicazione è avvenuta in tre giornate di lavoro consecutive, il tempo vita dei batteri. L'applicazione è avvenuta su 6mq circa di superficie del sarcofago, sui due lati brevi e quello frontale l'applicazione dei gel è avvenuta interponendo fogli di carta Giapponese, le superfici orizzontali: la parte esterna del fondo della cassa del sarcofago hanno mostrato difficoltà di applicazione e adesione del gel supportante, suggerendoci un'applicazione diretta del gel senza interposizione della carta, la successiva rimozione ha poi previsto una asportazione a secco e poi con tamponi di cotone umidi. La scelta della biopulitura ci ha consentito di agire in modo controllato e rispettoso del marmo, compromesso da precedenti azioni meccaniche e procedere all'asportazione delle sostanze presenti sul sarcofago in modo selettivo e graduale. La verifica della validità della pulitura è stata confortata da puntuali osservazioni con dino-light confrontate con le immagini registrate nella prima fase di acquisizione dei dati. Altre puntuali misurazioni FT – IR hanno visto sensibilmente diminuire la presenza delle sostanze individuate. Quello che a noi è parso un modo naturale di procedere, nel rispetto della storia dei due Monumenti funebri e le professionalità che abbiamo coinvolto per la risoluzione delle problematiche emerse è stata una occasione virtuosa che raramente si può attuare. Troppo spesso il dialogo tra le diverse professionalità: restauratori, storici dell'arte, scienziati e gli equilibri tra le istituzioni coinvolte, sono difficoltosi, intermittenti e infruttuosi. La qualità e la buona riuscita di un restauro è demandata ai restauratori che entrano in sintonia con l'opera e rispondono alle sue esigenze conservative ed estetiche spesso in deroga alle limitate risorse economiche messe a disposizione dai committenti. L'esperienza che abbiamo portato a buon fine è stata per noi di grande arricchimento professionale e soddisfazione personale. Riflettendo a distanza di tempo possiamo riconoscere alcune carenze in fase di progettazione del restauro: è cioè mancato un protocollo di intesa tra gli Istituti coinvolti che stabilisse le tappe necessarie per l'acquisizione e la condivisione dei dati rilevati. Auspichiamo una codifica delle necessarie indagini scientifiche già in fase di progettazione di un intervento di restauro ed una maggiore diffusione delle metodiche sostenibili nei capitolati. I numerosi casi di applicazione dei batteri nel restauro dei beni culturali, i risultati soddisfacenti ottenuti, sono solo una premessa alla loro diffusione e commercializzazione, ancora molto carenti.

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
Laboratorio Tecnografico - Centro Ricerche ENEA Frascati

www.enea.it

enea.it