

Composti naturali eco-compatibili per il controllo dei biodeteriogeni al Museo delle Terme di Diocleziano (Roma).

Rita Reale¹
Emanuele Dell'Aglio¹
Anna De Santis²
Silvia Borghini³
Anna Rosa Sprocati⁴
Chiara Alisi⁴ > chiara.alisi@enea.it

Key words >
bio-pulitura
conservazione
oli essenziali
batteri

¹ Department of Chemistry, “La Sapienza” University of Rome, P.le A. Moro 5, 00185, Rome, Italy

² Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo, Soprintendenza Speciale Archeologia, Belle Arti e Paesaggio di Roma, – Rome, Italy

³ Ministero dei Beni e delle Attività Culturali e del Turismo, Museo Nazionale Romano, Terme di Diocleziano, Rome, Italy

⁴ SSPT-PROTER-OEM, Enea Casaccia, via Anguillarese 301, 00123, Rome, Italy.

Abstract > During the restoration of a stone artefact placed in the outer environment, the intervention to remove biological weeds, such as lichens, fungi and higher plants, is frequent. At the present time, the biocidal treatments are essentially chemical and involve toxic molecules which are harmful for the environment. The increasing attention for natural resources has led recently to a greater promotion of “green” and sustainable materials and methodologies aimed to achieving low impact for the artefacts, environment and workers. The aim of this research is the promotion of innovative methodologies for direct elimination and control of biodeteriogens, using non-toxic natural products, environmentally friendly, that can work effectively like the conventional biocides. Since October 2018, in Michelangelo’s Cloister garden (Baths of Diocletian Museum, Rome), in the framework of the European STORM project, some experiments were carried out for the treatment of biodeteriogens through the use of innovative, eco-friendly substances. Laboratory products, based on extraction from natural substances, bacterial cells and essential oils, were applied using both cellulose pulp and a natural gel. They were also compared with distilled water (blank) and Benzalkonium chloride 1%, a chemical substance currently used during restoration. Surface cleaning has been evaluated with a digital microscope, photographing the surface areas before and after the treatment, and taking some bio-patina samples to identify the species present. What was visually observed has been confirmed by the image analysis and, in the last phase of the research, also by the microphotographs and bioluminometer analysis. The results by the whole experimentation provided the basis for the definition of a treatment methodology which included the identification of the type and number of applying, their contact time, and the monitoring system necessary to obtain a good

result. What regard to the monitoring methodology, a good match has been observed between the analysis of the RGB colour space of microphotographs and the use of the bioluminometer, which should be implemented for future observations.

Introduzione

La conservazione del patrimonio culturale rappresenta un problema importante per la società moderna, sia da un punto di vista economico che culturale. L'ampia distribuzione di beni architettonici nei paesi del Bacino del Mediterraneo, e la loro importanza culturale, artistica e religiosa sottolinea il potenziale impatto sociale che i fenomeni di biodeterioramento hanno su di essi. La conoscenza dei vari fattori responsabili del deterioramento dei monumenti e delle opere d'arte ha una fondamentale importanza per definire idonee strategie di conservazione mirate anche alla prevenzione. Diverse discipline, tra cui la chimica, la biologia e la geologia si sono adoperate a supportare quella che può essere oggi definita la scienza dei Beni Culturali.

Tutti i materiali sono, per la loro natura, esposti all'azione di fattori fisici, chimici e biologici che provocano cambiamenti sia strutturali che compositivi [1]. Negli ultimi anni è stato ampiamente dimostrato il ruolo svolto dai microorganismi nei fenomeni di degradazione dei beni culturali: la crescita, lo sviluppo e le attività metaboliche possono apportare danni fisico-chimici ed estetici ai manufatti artistici, tanto da avere conseguenze negative per la loro conservazione. Moltissime specie di microorganismi (batteri, alghe unicellulari, funghi, piante superiori) possono trovare condizioni favorevoli per il loro sviluppo sia su opere statuarie e monumentali che su resti archeologici [2].

Il controllo dei microorganismi biodeteriogeni è quindi un problema comune nel restauro e viene normalmente affrontato con l'applicazione di biocidi di sintesi a largo spettro che però possono essere dannosi per l'ambiente in cui è inserita l'opera da trattare e dare luogo all'insorgere di microorganismi resistenti al principio attivo.

L'uso di composti di origine naturale a basse concentrazioni (estratti vegetali, oli essenziali) o cellule batteriche vitali, viene incontro all'esigenza dei restauratori di trovare prodotti meno impattanti per l'ambiente che, essendo miscele complesse, hanno meno probabilità di selezionare sul lungo periodo organismi resistenti all'azione del biocida.

La sperimentazione

Nel mese di ottobre 2018 è stata avviata una sperimentazione nel giardino del Chiostro di Michelangelo al Museo delle Terme di Diocleziano, su un manufatto lapideo di epoca romana¹ che presentava un'ampia superficie interessata da un attacco di biodeteriogeni piuttosto diffuso ed omogeneo (figura 1). Lo scopo di questa sperimentazione era di testare alcuni prodotti sperimentali, tutti di origine naturale, per il controllo dei biodeteriogeni su materiale lapideo, in sostituzione di biocidi di sintesi, verificarne l'efficacia nell'eliminazione delle patine biologiche e monitorarne nel tempo la capacità di prevenire la colonizzazione del marmo da parte di nuovi organismi.

I prodotti testati, alcuni già in commercio e altri in fase di sperimentazione, sono:

Mix 10bis è una miscela di 3 oli essenziali (*Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum Zeylanicum*, *Carum carvi*, forniti dalla società Exentiae Srl), che nasce dalla collabora-

¹ Dimensioni: alt. 146, largh. 132, prof. 162 cm. inv. 714. Si tratta di un piedistallo in marmo bianco proveniente dal ponte realizzato da Valentiniano sul Tevere all'altezza dell'attuale Ponte Sisto.



Figura 1. (a) Veduta del Chiostro del Michelangelo e (b) il manufatto prima della sperimentazione.

zione tra il laboratorio di Diagnostica e il laboratorio Marmi e Calchi dei Musei Vaticani, nel corso del progetto di restauro dei manufatti lapidei esposti nei Giardini Vaticani. **BIO-Z**, sviluppato nel laboratorio SSPT-PROTER-OEM dell'ENEA, è un prodotto derivato da un ceppo batterico ambientale *Pedobacter sp* MCC-Z, non patogeno e non sporigeno, isolato da un suolo agricolo. Bio-Z è un estratto grezzo con buone caratteristiche tensioattive [3] e riduce la tensione superficiale (40 mN/m), ha una buona stabilità nel tempo (testato fino a 4 mesi) è resistente alle variazioni di pH, temperatura e salinità; ha proprietà emulsionanti e proprietà antimicrobiche, testate su alcuni biodeteriogeni noti, soprattutto verso il gruppo di batteri Gram positivi. La procedura per l'applicazione prevede che Bio-Z sia inglobato all'interno di un supportante idoneo per la situazione specifica, che ne faciliti la stesura e la rimozione, senza lasciare residui sull'opera alla fine del trattamento. L'applicazione ha dato risultati positivi nei test eseguiti in vivo su biofilm fotosintetici al Mitreo delle Terme di Caracalla, su arredamenti lapidei dei Giardini vaticani, su campioni di pietra di lecce e su reperti della Domus Aurea [4]; **NopalCap**, sviluppato nei laboratori dell'ENEA, è un prodotto costituito a partire dalla mucillagine vegetale del fico d'India. La mucillagine era usata come additivo delle malte e degli intonaci nella tradizione messicana fin dall'epoca preispanica. Le sue proprietà hanno conferito un ottimo stato di conservazione del patrimonio. Il NopalCap, composto da mucillagine combinata con l'estratto alcolico di frutti di *Capsicum* (peperoncino), è risultato efficace come additivo nelle malte per inibire la colonizzazione da parte di microorganismi (funghi e cianobatteri) [5]; **LIQ** è un estratto di foglie di liquirizia. Mentre gli effetti positivi dell'estratto di radice e dei suoi composti come antibatterico, antimicotico, antivirale e antiprotozoico sono stati ampiamente comprovati e dimostrati da numerosi studi in campo farmacologico e della salute umana, le parti aeree della pianta sono scarsamente utilizzate e sono considerate uno scarto agricolo. Gli studi fitochimici sull'estratto di foglie di liquirizia hanno tuttavia mostrato la presenza di classi di fenoli e composti acidi quali glabranina, pinocembrina e licoflavanoni che sono presenti solo in tracce o sono del tutto assenti nelle radici, ma che sono anch'essi noti per l'azione antimicrobica ed antifungina in uomini e piante. Il prodotto usato alla concentrazione del 3% ha dimostrato la sua efficacia nei test in vitro e, in vivo, è risultato efficace per l'eliminazione da un dipinto su tela di patine miste di funghi e batteri composte da: *Arthrinium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* [4]. Ha dato risultati positivi nei test eseguiti in vitro e in vivo alla Domus Aurea [6] e su biofilm colonizzatori di arredamenti lapidei

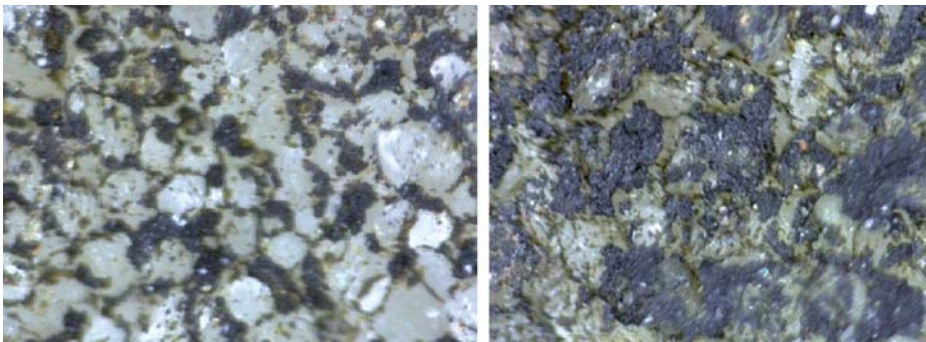


Figura 2. Due zone a diversa densità del biofilm che ricopriva il manufatto.

dei Giardini Vaticani. È un prodotto sperimentale in via di messa a punto nel laboratorio SSPT-PROTER-OEM con la ditta tedesca TRIFOLIO-M;

SME 1.11, sviluppato nel laboratorio SSPT-PROTER-OEM dell'ENEA, è un ceppo batterico isolato nel sito minerario di Ingurto (Sardegna). Identificato come *Pseudarthrobacter siccitolerans* mediante la sequenza r-DNA 16S depositata presso la Genebank con accessione MH371336, presenta attività biocida verso funghi neri; non presenta attività lipasica e non solubilizza i carbonati. La capacità di degradare la pectina e produrre siderofori sono due caratteristiche che hanno reso questo ceppo un buon candidato per il controllo del bio-deterioramento [4].

Prima del trattamento

Il biofilm, che copriva larghe porzioni della parte alta del manufatto (figura 2), è stato fotografato con un microscopio digitale Dino-Lite, modello AM4815ZT. Sono stati prelevati 2 campioni di biofilm tramite prelievo a bisturi. In laboratorio i campioni sono stati riuniti per avere a disposizione una maggiore quantità di materiale per l'estrazione del DNA totale e l'amplificazione del gene 16S (batteri e cianobatteri) e 18S (funghi). I risultati dell'analisi metagenomica del biofilm (figura 3) hanno evidenziato tra i Batteri la prevalenza di microorganismi fototrofi, i più abbondanti dei quali appartenenti al phylum Cianobatteri (76%) e insieme ai Cloroflexi costituiscono quasi l'80% dei batteri. I restanti phyla sono rappresentati da Acidobacteria, oligotrofi comunemente presenti nei suoli, ed in parte da Bacteroidetes, batteri ubiquitari la cui presenza è spesso associata ad habitat marini e salati. Nel phylum Proteobacteria, il genere più abbondante è il *Lysobacter*, distribuito principalmente nel suolo e nelle acque.

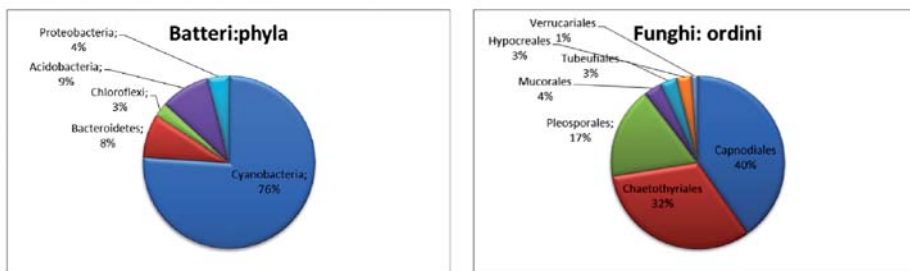


Figura 3. Diversità microbica nel biofilm: distribuzione dei taxa più rappresentati per i Batteri (Phyla) e Funghi (Ordini).

Tra i Funghi si è osservata la prevalenza di tre ordini che insieme coprono quasi il 90% della diversità fungina: Capnodiales, cui appartengono vari i funghi neri epilitici [7], il cui genere più abbondante nel biofilm analizzato risulta essere la *Vermiconia*; Chaetothyriales, dominato dalla specie *Coniosporium apollinis*, isolato e identificato su marmi e granito come specie epilitica [8]; Pleosporales, dominati dal genere *Alternaria*, caratterizzato da specie endofite e parassite delle piante.

Applicazione dei prodotti

La superficie da trattare è stata suddivisa in parti uguali con del nastro adesivo di carta per l'applicazione dei prodotti da testare: i prodotti e le modalità di applicazione sono riportati in tabella 1 e in figura 4. Alcuni sono stati applicati in polpa di cellulosa e in un gel formato da Vanzan (gomma xantana) al 1%, il ceppo batterico in solo Vanzan, e il Mix 10bis applicato in sola polpa di cellulosa. Come blank è stata usata acqua deionizzata (riferimento per azione non biocida) e come controllo positivo il Benzalconio cloruro al 1% (riferimento per l'azione biocida).

Dopo l'applicazione, la superficie è stata protetta con della pellicola di polietilene per rallentare l'evaporazione dei prodotti ed evitare il dilavamento in caso di pioggia, e con della pellicola di alluminio bloccata con nastro adesivo in alluminio per evitare l'interazione della radiazione solare.

Tabella 1: Applicazione dei prodotti

N°	Prodotto	Origine	Applicazione
1	BioZ	Bio-emulsionante di origine batterica	polpa di cellulosa
2			gomma xantana
3	Liquorice	Estratto alcolico di foglie di liquirizia al 3%	polpa di cellulosa
4			gomma xantana
5	Nopal Cap	Mucillagine di opuntia e estratto di peperoncino	polpa di cellulosa
6			gomma xantana
7	SME1.11	Ceppo batterico	gomma xantana
8	H ₂ O	Acqua deionizzata	polpa di cellulosa
9	Mix 10bis	Miscela di olii essenziali 3%	polpa di cellulosa
10	BAK	Benzalconio cloruro 1%	polpa di cellulosa

Risultati dei trattamenti

Due settimane dopo l'applicazione, a seguito della rimozione degli strati di protezione





































Figura 4. Suddivisione degli spazi e applicazione dei prodotti da testare.



Figura 5. La superficie dopo la rimozione degli impacchi e il lavaggio con acqua.

Tabella 2: Aspetto della superficie del marmo prima e dopo i trattamenti

	Superficie del marmo prima del trattamento									
	BioZ + pulp	BioZ + Gel	Liq. + Pulp	Liq. + Gel	NopC+Pulp	NopC + Gel	SME + Gel	H2O + Pulp	Mix10bis + Pulp	Bak + Pulp
	Superficie del marmo dopo il trattamento. 16 Ottobre 2018 16.05 pm									
										
	Superficie del marmo tre mesi dopo il trattamento. 16 Gennaio 2019 – 16.45 pm									
										
	Superficie del marmo sette mesi dopo il trattamento. 23 Maggio 2019 – 15.40 pm									
										

è stata eseguita la rimozione meccanica degli impacchi. Le superfici sono state risciacquate con acqua di rete e spazzolini morbidi in setole di nylon (figura 5).

La valutazione dell'efficacia dei prodotti testati per il controllo dei biodeteriogeni è stata effettuata attraverso l'analisi delle immagini fotografiche acquisite subito dopo la rimozione degli impacchi, e a 3 e 7 mesi dopo il trattamento, in modo da monitorare le variazioni cromatiche nel tempo.

Le aree interessate (tabella 2) sono state elaborate con il software Image-Pro Plus 6 (Media Cybernetic) che ha prodotto gli istogrammi dell'intensità di colore (da 0 a 255, rispettivamente minimo e massimo) per ciascuno dei canali: rosso (R), verde (G) e blu (B) (figura 6). Per una migliore comprensione dell'analisi, in termini di pixel è stata eseguita la sottrazione dei valori medi dall'intensità massima di 255. In questo modo la tendenza all'aumento dell'intensità indica una diminuzione della luminosità superficiale, relativa all'aumento dello strato di sporco o colonizzazione biologica.

Possiamo così osservare un'importante variazione della superficie non trattata (bianca) seguita dai test acqua (H₂O) e BioZ-G. Una leggera variazione è riportata dallo SME1.11, tutti gli altri hanno una variazione limitata, tranne BAK, dove la diminuzione dei valori indica una riduzione dell'ingiallimento iniziale.

A supporto dell'analisi delle immagini è stata effettuata l'analisi quantitativa con un bioluminometro (Accupoint, CellBioscience) uno strumento portatile che sfrutta le capacità di chemoluminescenza del reagente luciferina-luciferasi, che a contatto con l'ATP cellulare presente nel substrato è in grado di emettere luce. La quantità di luce emessa (Relative Light Unit - RLU) è direttamente proporzionale alla concentrazione di cellule presenti sulla superficie dell'opera d'arte prima e dopo i trattamenti biocidi. Le indagini sono state effettuate nelle stesse aree fotografate, sette mesi dopo la fine del trattamento.

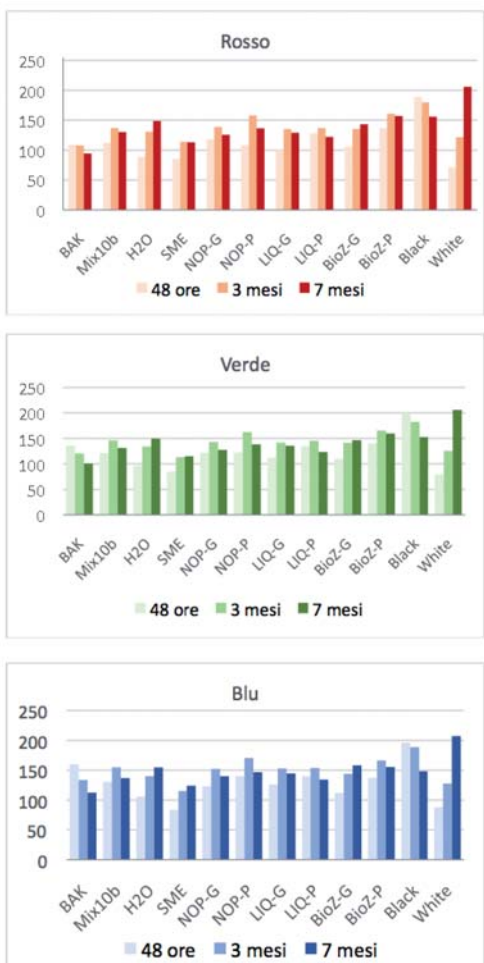


Figura 6. Istogrammi dei valori medi RGB ottenuti dalle fotografie in funzione dell'intervallo di tempo dopo il trattamento.

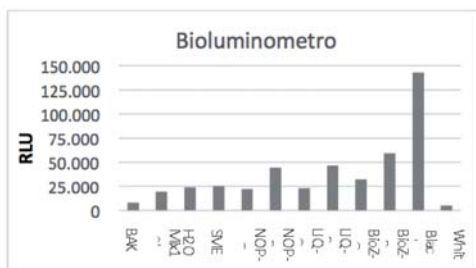


Figura 7. Analisi con il bioluminometro, le RLU indicano la presenza di ATP residua sulle superfici trattate.

Rispetto al valore di RLU del biofilm intatto (Black) pari a 140.000, i trattamenti ne hanno determinato la drastica riduzione: persino il BioZ-P che ha l'effetto più blando, riduce il RLU a 60.000, mentre gli altri si aggirano su valori tra 45.000 e 25.000, equivalenti rispetto all'acqua deionizzata (figura 7). Dai risultati osservati, BAK e Mix10bis sembrano avere l'effetto biocida migliore.

Conclusion

In definitiva il risultato migliore di biopulitura sembra essere stato ottenuto dall'applicazione dello SME1.11 (ceppo batterico) supportato da gel di Vanzan, seguito dall'estratto di liquirizia applicato sempre con gel di Vanzan e dal Mix 10bis, mentre mediamente efficaci sembrano essere il Nopal e il BioZ, che risultano confrontabili con l'azione dell'acqua. La superficie trattata con benzalconio cloruro mostra invece una forte alterazione cromatica. In generale si sono dimostrati più efficaci gli impacchi applicati con il gel rispetto a quelli con polpa di cellulosa, probabilmente il miglior effetto è legato alla maggiore capacità del gel di trattenere il prodotto.

Ringraziamenti

Questo lavoro è inserito nei risultati del progetto Safeguarding Cultural Heritage through Technical and Organisational Resources Management STORM che ha ricevuto finanziamenti dal programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 dell'Unione Europea nell'ambito della convenzione di sovvenzione n° 700191. Parte del lavoro è stato realizzato con il contributo del Ministero degli Affari Esteri e della Cooperazione Internazionale, Direzione Generale per la Promozione del Sistema Paese.

Bibliografia

- [1] T. Warscheid, J. Braams, Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeterior Biodegrad* 46:343–368 (2000)
- [2] Kovacik, L. (2000) Cyanobacteria and algae as agents of biodeterioration of stone substrata of historical buildings and other cultural monuments. In *New millenium international forum on conservation of cultural property*. Institute of Conservation Science for Cultural Heritage, Kongiu (pp. 44-58).
- [3] Beltrani T, S. Chiavarini, D. O. Cicero, M. Grimaldi, C. Ruggeri, E. Tamburini, C. Cremisini. (2015) Chemical characterization and surface properties of a new bioemulsifier produced by *Pedobacter* sp. strain MCC-Z. *T.Int J Biol Macromol.* 72: 1090–1096.
- [4] Sprocati AR, Alisi C, Migliore G, Marconi P, Tasso F (2020) Sustainable restoration through biotechnological processes: a proof of concept. In press in “Roles of microorganisms in heritage degradation and preservation” (E Joseph, P Junier eds.) Springer
- [5] Cardone L, 2020. La sperimentazione del NopalCap come additivo per le malte idrauliche utilizzate nell’ambito della conservazione. Diploma accademico di II livello in Restauro, Accademia Di Belle Arti Di Napoli.
- [6] Rugnini L, Migliore G, Tasso F, Ellwood NTW, Sprocati AR and Bruno L (2020) Biocidal Activity of Phyto-Derivative Products Used on Phototrophic Biofilms Growing on Stone Surfaces of the Domus Aurea in Rome (Italy). *Appl. Sci.* 10:6584; doi:10.3390/app10186584
- [7] Isola, D., Zucconi, L., Onofri, S. et al. (2016). Extremotolerant rock inhabiting black fungi from Italian monumental sites. *Fungal Diversity* 76, 75–96. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0342-9>
- [8] Sterflinger, K., De Baere, R., de Hoog, G. et al. (1997). *Coniosporium perforans* and *C. apollinis*, two new rock-inhabiting fungi isolated from marble in the Sanctuary of Delos (Cyclades, Greece). *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 349–363. <https://doi.org/10.1023/A:1000570429688>