

**Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021**

Titolo del progetto: Dal manufatto ai microrganismi e oltre: approcci biomolecolari innovativi applicati alla conservazione sostenibile dei beni culturali.

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:  
SCIENZE DELLA TERRA

Responsabile scientifico: Prof. Massimo Reverberi

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 12

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Institute of Science and Technology in Art (ISTA); Akademien der Bildenden Künste Wien, AUSTRIA

Azienda: SARA ENVIMOB S.r.l. (startup accademica di Sapienza)

Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10.000,00

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA AMBIENTALE con delibera del 21/09/2021

Progetto di ricerca:

Lo scopo della ricerca è quello di creare un workflow per lo studio del biodeterioramento nei beni culturali attraverso l'applicazione di tecniche molecolari, per l'identificazione di organismi detteriogeni per prevenire e restaurare i manufatti.

Uno dei principali limiti in questo campo è la mancanza di protocolli standard applicabili in diversi substrati e di un database ad hoc.

Il nostro obiettivo è sviluppare un workflow che includa cinque passaggi (metodi di campionamento non invasivi, estrazione del DNA, amplificazione, sequenziamento e identificazione tassonomica) ottimizzato per diversi materiali: carta e pergamena, pietra e campioni ambientali (dal suolo, legno, o acqua). Lo scopo di ogni materiale è:

- ideare metodi di campionamento ed estrazione del DNA più semplici ed efficaci;
- sequenziamento di long reads con l'innovativo MinION (ONT);
- progettare una pipeline bioinformatica di facile utilizzo per allineare e identificare gli organismi dai loro genomi o ampliconi;
- creare una banca dati genetica ad hoc adatta ai beni culturali.

Il biodeterioramento (degrado causato da microrganismi) è uno dei tipi più frequenti di degrado (a livello biologico, chimico/fisico e meccanico) nei beni culturali.

La corretta identificazione dei microrganismi permette di intervenire in diversi modi: prevenzione (controllo microclimatico), restauro (con metodi sostenibili ad hoc per i microrganismi identificati), ma anche semplicemente ottenere informazioni sulla storia di un manufatto (origine animale della pergamena).

Per quanto riguarda il campionamento la normativa UNI EN 16085 afferma che bisogna sempre cercare di utilizzare il campionamento il meno invasivo possibile. Sulla base di ciò, i metodi di campionamento possono essere suddivisi in:

- Invasivo: bisturi o scalpello per graffiare la superficie e raccogliere materiale sufficiente per l'estrazione (es. licheni);
- Microinvasivo: bisturi (solo su patine spesse senza danneggiare il manufatto) o nastro adesivo (su pareti o statue);
- Non invasivo: tampone sterile o membrana di nylon molto superficiale (su materiale fragile come la pergamena).

La scelta dei metodi dipende dal tipo di materiale e dalla gravità del danno. In tempi recenti sono state sperimentate diverse tecniche come la gomma da cancellare in PVC (Fiddyment et al., 2015; Piñar, Tafer, et al., 2020), o la microaspirazione (Piñar, Sclocchi, et al., 2020).

La gomma da cancellare in PVC è una nuova tecnica di campionamento che può essere una soluzione migliore poiché presenta vari vantaggi: 1) è ampiamente accettata dalla comunità dei conservazionisti come misura non invasiva per rimuovere lo sporco; 2) nessun materiale viene perso in quanto il DNA viene estratto direttamente dalle briciole raccolte; 3) è un materiale facilmente reperibile.

L'estrazione del DNA può essere effettuata dopo coltura in vitro o direttamente dal campione. Il primo metodo è stato ampiamente utilizzato negli ultimi anni ma non è molto efficace in quanto consente di isolare solo il 10% circa dei microrganismi, il secondo metodo, invece, è molto più efficace in quanto molti più microrganismi possono essere identificati tramite estrazione diretta, e in meno tempo rispetto alla coltura in vitro, come confermato anche durante la mia tesi di laurea magistrale.

Per quanto riguarda le analisi, il controllo visivo o la microscopica sono stati gli approcci più utilizzati, successivamente hanno preso piede le analisi biomolecolari che però sono state utilizzate solo in rari casi poiché erano molto dispendiose sia in termini di denaro che di tempo. Oggi PCR e Next Generation Sequencing (NGS) hanno velocizzato le analisi e in particolare le Oxford Nanopore Technologies (3rd Gen Seq) hanno permesso il sequenziamento di più campioni contemporaneamente in un tempo brevissimo (circa 24h) abbassando incredibilmente il costo.

In particolare, il loro dispositivo tascabile, il MinION, è uno strumento innovativo e facile da utilizzare (collegandolo ad un pc tramite un cavo USB), ed è stata ulteriormente ottimizzata negli ultimi anni.

La mancanza di un database genetico specifico invece è un problema per diversi motivi:

- 1) La ricerca e l'allineamento di sequenze in un database generale rappresenta un compito molto più lungo e difficile poiché deve confrontare le sequenze con qualsiasi organismo vivente;
- 2) Una banca dati ben fornita di microrganismi biodeteriogenici per i beni culturali consentirebbe a chi analizza di identificare un particolare microrganismo, e di conseguenza anche il tipo di problema che solitamente crea e suggerire modalità di intervento per prevenire o ripristinare un bene.

## PRESENTAZIONE DELLE ATTIVITÀ

La ricerca mira a progettare e testare su casi di studio reali un workflow valido per l'applicazione di tecniche biomolecolari nei beni culturali, con lo scopo di portare maggiori conoscenze, per creare standard e rilasciare un database ad hoc. Per fare ciò verranno esaminati diversi manufatti realizzati con materiali diversi: materiali lapidei; pergamene e materiali cartacei; quadri; materiali ambientali (ad es. suolo). Il workflow si compone di cinque passaggi, ognuno dei quali sarà personalizzato per ogni tipo di artefatto:

- 1) campionamento,
- 2) estrazione del DNA,
- 3) amplificazione,
- 4) sequenziamento,
- 5) analisi dei dati e generazione di database.

### 1. Campionamento

Il campionamento, in biologia molecolare, è un problema più complicato poiché deve essere disponibile materiale sufficiente per estrarre una buona quantità e qualità di DNA, ed è difficile da ottenere con metodi non invasivi.

Per questo motivo verranno studiati metodi di campionamento più efficaci, in particolare:

- nastro adesivo per materiali lapidei;
- gomma da cancellare in PVC per pergamene o quadri;
- Semplice raccolta di materiale per materiale ambientale come il carotaggio.

### 2. Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA sarà effettuata direttamente dal campione. Viene solitamente effettuato con kit standard o tramite metodi di estrazione già utilizzati in passato e funzionanti. Tuttavia, poiché i beni culturali sono materiali sempre diversi, spesso i kit standard non vanno bene, e bisogna provarne di diversi per trovare quello più adatto. Uno dei metodi già utilizzati è, ad esempio, il 3-CTAB (Scala et al., 2017) che permette di estrarre bene e in soli due giorni ma con metodi di campionamento più invasivi, d'altra parte alcuni kit richiedono meno tempo e possono consentire una maggiore quantità di DNA.

L'obiettivo è quindi quello di confrontare diversi metodi e kit di estrazione in base al tipo di materiale e trovare il più adatto.

### 3. Amplificazione

La terza fase è l'amplificazione di un frammento di DNA, tramite PCR, per ottenere più copie di DNA, per le analisi bioinformatiche successive. In questo tipo di screening vengono utilizzati primer universali che amplificano le regioni conservate nel DNA di ogni regno; in particolare, alcune delle regioni del DNA utilizzate per questo tipo di "barcoding" sono le regioni ITS, i geni ribosomiali 18S e 16S, altre regioni del DNA ribosomiale (ad es. LSU), e i citocromi. In questo modo possiamo fornire uno "screening" quasi esaustivo di tutti gli organismi presenti sulla superficie di un manufatto.

Nel caso di materiali di origine animale o vegetale (es. pergamena, legno), tramite PCR è possibile risalire e determinare la specie utilizzata per la produzione del manufatto e ottenere maggiori informazioni sul materiale, ed in alcuni casi geolocalizzarne l'origine.

Oltre alla classica PCR, esistono anche alternative per l'amplificazione, come l'utilizzo del Repli-g Midi Kit (Qiagen) ottimizzato per una quantità minima di DNA iniziale (ottimo per i beni culturali) che amplifica l'intero genoma (WGA) attraverso una tecnica innovativa chiamata Multiple Displacement Amplification (MDA). Lo scopo della ricerca in questo punto è:

- Confronto di primers differenti, per l'identificazione delle specie animali con citocromo b
- Provare diversi metodi di amplificazione che risolvono il problema della bassa quantità di DNA

### 4. Sequenziamento

Il sequenziamento sarà effettuato con l'innovativo dispositivo MinION (ONT). L'utilizzo di questo strumento permette non solo di eseguire un sequenziamento molto più veloce (circa 24h) rispetto alle altre tecniche ma anche di sequenziare contemporaneamente un pool di DNA, che permette di identificare solo le specie più abbondanti.

### 5. Analisi bioinformatica e database

Dopo il sequenziamento, i dati grezzi ottenuti dallo strumento devono essere analizzati da un esperto di bioinformatica e inseriti in una delle banche dati online per identificare la specie. Anche le analisi bioinformatiche, come il sequenziamento, sono più semplici e veloci da eseguire con il MinION, ma una cosa che manca è un database ad hoc per il patrimonio culturale. Per questo motivo uno scopo parallelo sarà anche lo studio bioinformatico che permetta la creazione di un database in cui verranno inserite le specie che verranno trovate durante le analisi, e quelle già presenti in letteratura. La creazione di una banca dati faciliterà le operazioni di identificazione poiché la ricerca non verrà effettuata su una banca dati generica nella quale possiamo trovare una specie qualsiasi, ma su una banca dati ristretta, che renderà quindi più rapida l'operazione.

Inoltre, per ogni specie, saranno collegati i paper in cui sono stati trovati, in questo modo sarà anche più facile correlare una specifica specie a un problema specifico e tipo di degrado, cosa non possibile in un database mondiale.

### Mobilità Internazionale

La mobilità internazionale si svolgerà presso l'Istituto di Scienza e Tecnologia nell'Arte (ISTA) dell'Akademie der Bildenden Künste Wien con la Dr.ssa Piñar e la Dr.ssa Graaf che si sono occupati dell'uso di Nanopore nel patrimonio culturale. A Vienna il lavoro sarà basato sulla parte di bioinformatica (con la Dr.ssa Graaf) ma anche sul lavoro in laboratorio (con la Dr.ssa Piñar) per sperimentare nuove tecniche e soprattutto confrontare metodi.

Titolo del progetto (inglese): From artefact to microbe and beyond: innovative biomolecular approaches applied to cultural heritage

### Progetto di ricerca (inglese):

The research aims to create a workflow for the study of biodeterioration in cultural heritage through the application of molecular techniques, for the identification of deteriorogenic organisms to prevent and restore artifacts.

One of the main limitations in this field is the lack of standard protocols applicable in different substrates, and a

genetic database ad hoc for cultural heritage.

We aim at developing a workflow that includes five steps (non-invasive sampling methods, DNA extraction, amplification, sequencing, and taxonomic identification) optimized for different artifact materials: paper and parchment, stone, and environmental (i.e. soil, wood, water, or lake core). The purpose for each material is:

- ideate easier and more effective sampling and DNA extraction methods;
- long reads sequencing with the innovative MinION (ONT);
- design a user-friendly bioinformatic pipeline to align and identify organisms from their genomes or amplicons;
- create an ad hoc genetic database suitable for cultural heritage.

Biodeterioration (degradation caused by microorganisms) is one of the most frequent types of degradation (at biological, chemical /physical, and mechanical levels) in cultural heritage.

The correct identification of microorganisms allows us to intervene in different ways: prevention (such as microclimate control), restoration (also sustainable methods like the work of Genova et al., 2020), but also just obtaining information about the history of an artifact (animal origin of parchment).

Regarding sampling, there is a regulation (UNI EN 16085), which states we must always try to use sampling as less invasive as possible. Therefore, the sampling methods can be divided into:

- Invasive: scalpel or chisel to scratch the surface and collect sufficient material for extraction (i.e. lichens);
- Micro-invasive: scalpel (only on thick patinas without damaging the manufacture) or adhesive tape (on walls or statues);
- Non-invasive: swab or the nylon membrane which is very superficial (on fragile material like parchment).

The choice of methods depends on the type of material and the seriousness of the damage. In recent times different techniques have been tried such as a PVC eraser (Fiddymont et al., 2015; Piñar, Tafer, et al., 2020), or a micro-aspiration (Piñar, Sclocchi, et al., 2020).

PVC eraser is a novel sampling technique that may be a better solution instead of the sterile swab it has various advantages: 1) are widely accepted by the conservation community as a non-invasive measure for removing dirt; 2) no material is lost as the DNA is extracted directly from the collected crumbs; 3) is a material that can be readily available.

Pinar et al use it in the study of two ancient Slavonic parchment codices in which they sampled by rubbing the surface of the parchment and collecting the fragments detached from it in a sterile assay tube.

The DNA extraction can be done after in vitro culture or directly from the sample. The first method has been widely used in recent years but is not very effective as it allows to isolate only about 10% of microorganisms, the second method, instead, is much more effective since many more microorganisms can be identified through direct extraction, and in less time than passing through in vitro growth as also confirmed during my master's thesis.

As for the analyses, for a long time, visual or microscope analysis represents the most used approaches for characterizing the biodeteriogenous microbials. Over recent years, the use of biomolecular analyses is gaining momentum even applied to cultural heritage; however, at least initially, only expensive, and time-consuming analyses were available, and this approach remained unused. Today, PCR and Next Generation Sequencing (NGS) speeded up the analyses and in particular, the Oxford Nanopore Technologies (3rd Gen Seq) allowed the sequencing of multiple samples at once in a very short time (about 24h) lowering incredibly the cost per unit sequenced.

In particular, their pocket-sized sensor device, the MinION, it's easy to use, just connect it to a laptop through a USB cable. This technology has been further optimized in recent years, resulting in an increasing number of publications in the field of metagenomics.

The lack of a specific genetic database certainly does not help studies of this type and their standardization, for several reasons:

- 1)Searching and aligning sequences in a general database represents a much longer and more difficult task since it has to compare sequences with any living organism;
- 2)A well-stocked database of biodeteriogenic microorganisms for cultural heritage would allow those who analyse to identify a particular microorganism, and consequently also the type of problem that usually creates and suggest methods of intervention to prevent or restore an asset.

## PRESENTATION OF THE ACTIVITIES

The project aims designing and testing on real case studies a valid workflow for the application of biomolecular techniques in cultural heritage, to bring more knowledge in this area, to create standards according to the material, and to release an ad hoc database for the species affecting the cultural heritage artifacts. To do this, several artifacts made of different materials will be examined: stone materials; parchment and paper materials; paintings; environmental materials (e.g., soil). The workflow consists of five steps, each of which will be tailored for each type of artifact:

- 1) sampling,
- 2) DNA extraction,
- 3) amplification,
- 4) sequencing,
- 5) data analysis and database generation.

### 1. Sampling

Sampling, in molecular biology, is a more complicated problem since enough material must be available to extract a good quantity and quality of DNA, and sometimes this is very difficult to obtain with non-invasive methods.

Then, during the first part of the research, more effective sampling methods will be studied, in particular:

- adhesive tape for stone materials;
- PVC eraser for parchments or paintings;
- Simple collection of material for environmental material such as coring.

### 2. DNA Extraction

DNA extraction will be performed directly from the sample. Is usually carried out with standard kits or through extraction methods already used in the past and working. However, since the material cultural assets are always different, often the standard kits are not good, and different ones must be tried to find the most suitable one, or over the years new ones are invented that are faster and more effective than the previous ones. One of the methods already used is, for example, the 3 CTAB methods (Scala et al., 2017) which worked well for almost all materials but depending on the sampling method and the material, it allows to extract of different quantities of DNA, and in two days. On the other hand, some kits take less time and may allow for a greater amount of DNA.

The aim is therefore to compare different extraction methods and kits based on the type of material and find the most suitable.

### 3. Amplification

The third step of the workflow is the amplification of a DNA fragment, through PCR, to have many more copies of DNA, for subsequent analyses. In this type of screening PCR, universal primers that amplify conserved regions in the DNA of every kingdom are used; specifically, some of the DNA regions used for this sort of "barcoding" are the ITS regions, the ribosomal genes 18S, and 16S, other ribosomal DNA (e.g., LSU) regions, cytochromes inter alia. In this way, we can provide an almost exhaustive "screening" of all organisms present on the surface of an artifact.

In the case of materials of animal or plant origin (e.g., parchment, wood), through PCR is possible to trace and determine the species used for producing the artifact and get more information about the material, and in some cases geo-localize its origin.

In addition to the classic PCR, there are also alternatives for amplification, such as the use of the Repli-g Midi Kit (Qiagen) which is optimized for minimal starting DNA (great for cultural heritage) that amplifies the whole genome (WGA) through an innovative technique called Multiple Displacement Amplification (MDA). The purpose of the research in this point:

- Comparing different primers, for the identification of the animal species with cytochrome b
- Trying different amplification methods that solve the problem of low amount of DNA

### 4. Sequencing

Sequencing can be performed with the innovative device MinION (ONT). Nanopore technology is a cutting-edge technology still little used in the field of cultural heritage. The use of this tool allows not only to perform much faster sequencing (about 24h) than the other techniques but also to sequence a DNA pool at the same time, which allows us

to identify only the most abundant species.

#### 5. Bioinformatics analysis and database

Following sequencing, the raw data obtained by the instrument must be analysed by a bioinformatics expert and entered one of the online databases to identify the species. Even bioinformatic analyses, such as sequencing, are simpler and faster to perform with the MinION, but one thing that is missing is an ad hoc database for cultural heritage. For this reason, a parallel purpose to the workflow will also be the bioinformatics study that allows the creation of a database in which the species that will be found in the analyses will be inserted, and those already present in the literature. The creation of a database will facilitate identification operations since the search will not be carried out on a generic database in which we can find any species, but on a restricted database, which will therefore make the operation faster.

Furthermore, for each species, there will be linked the papers in which they were found, in this way it will also be easier to correlate a specific species to a specific problem and type of degradation, which is not possible in a worldwide database.

#### International Mobility

The international mobility will take place in the Institute of Science and Technology in Art (ISTA) in the Akademie der Bildenden Künste Wien with Dr. Piñar and Dr. Graaf who have been dealing with the use of Nanopore in cultural heritage. In Vienna the work will be based on the bioinformatics part (with Dr. Graaf) but also on the work in the laboratory (with Dr. Piñar) to experiment with new techniques and above all to compare methods.