



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

Titolo del progetto: Tutela e consolidamento del patrimonio lapideo: il ruolo dei batteri carbonatogeni

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

Responsabile scientifico: Dott.ssa Teresa Rinaldi

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Laboratorio molecolare e di DNA antico al Evolutionary Biology Centre dell'Università di Uppsala

Azienda: Società SARA

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

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE "CHARLES DARWIN" con delibera del 20/09/2021

Progetto di ricerca:

Introduzione

L'aumento dell'inquinamento ambientale sta mettendo in serio pericolo la sopravvivenza dei monumenti e delle opere d'arte di pietra. Per mitigare gli effetti di questi processi deleteri, recentemente sono stati applicati numerosi trattamenti conservativi che, però, mostrano un'efficacia limitata e in alcuni casi sono tossici per l'ambiente e per le persone. Lo studio di questi trattamenti coinvolge settori e metodologie sempre più interdisciplinari e questo progetto di dottorato si propone proprio di incorporare conoscenze biologiche e geologiche per proteggere e consolidare le opere d'arte lapidee in maniera ecosostenibile (Dhami et al. 2014, Appl. Biochem. Biotechnol. 172:2552–2561).

Nel corso dei secoli, i materiali lapidei sono stati ampiamente utilizzati per opere d'arte e monumenti e tra le diverse tipologie, le rocce calcaree e i marmi (costituiti principalmente da calcite) sono tra i più impiegati. Queste rocce però sono soggette a diversi fenomeni di degrado ed i fattori che determinano il loro deterioramento possono essere sia chimici, che fisici che biologici. I fattori biologici in particolare sono causati da comunità microbiche che crescono sulle superfici lapidee e che svolgono un'azione corrosiva nei confronti del substrato carbonatico. Recentemente però l'attenzione si è rivolta anche verso specie batteriche che presentano caratteristiche che ne permettono l'impiego come "elementi riparatori" di materiali lapidei (Soffritti et al. 2019, Sustainability 11(14):3853)

Nel campo dei beni culturali per bioconsolidamento si intende l'utilizzo di tecniche innovative che utilizzano gli elementi riparatori in sostituzione delle tecniche tradizionali, che spesso hanno limitazioni e svantaggi legati alla tossicità per l'ambiente e le persone. Tra le tecniche, quella basata sul processo di biomineralizzazione batterica viene anche chiamata carbonatogenesi batterica ed utilizza la capacità di alcuni batteri di precipitare il carbonato di calcio quando questi vengono inoculati su alcune superfici lapidee in ambienti controllati per ottenere una ricalcificazione dei substrati degradati (Jroundi et al., 2017, Nat Commun 8, 279).

Gli studi degli ultimi anni in questo settore hanno dimostrato la potenzialità di questa tecnica che apporta reali vantaggi in termini di consolidamento del substrato su cui viene applicata (Jroundi et al. 2017, Nat Commun 8, 279 e riferimenti interni). In molti casi si è riscontrata una netta diminuzione della porosità delle dimensioni dei pori e quindi della capacità di assorbimento, aumento della resistenza e della coesione superficiale fino alla possibilità di sigillare

fessurazioni dei materiali lapidei (De Muynck et al. 2012 Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 1335–1347).

Nella maggior parte dei casi però, le ricerche hanno interessato batteri esogeni isolati dal suolo, mentre ricerche più avanzate in questo campo cercano di far fronte ad alcune limitazioni della tecnica utilizzando batteri endogeni che vengono quindi direttamente isolati dai materiali su cui poi verranno riapplicati. Questo avviene dopo aver identificato e determinato quali batteri presentano le migliori capacità carbonatogeniche e quali siano effettivamente in grado di consolidare il substrato. Si è dimostrato come questa tecnica permetta di trattare rocce altamente degradate, evitando di alterare la dinamica della comunità batterica della roccia ed aumentando la capacità di bioconsolidamento. Tuttavia, gli unici studi attualmente disponibili riguardano rocce calcarenitiche che possono dare un'idea del comportamento dei batteri, ma non fanno chiara luce sull'utilizzo della tecnica per altri materiali lapidei.

La tecnica di utilizzo di batteri endogeni necessita un approfondito studio scientifico per comprendere meglio l'interazione batteri-substrato e per poter accertare la reale possibilità del suo utilizzo su manufatti antichi e su diversi materiali lapidei come per esempio marmo e travertino. È necessario dunque: 1) studiare il substrato dal punto di vista geologico per identificarne le caratteristiche ed il livello di degrado; 2) studiare la comunità microbica presente e l'eventuale apporto al deterioramento 3) selezionare batteri carbonatogenici e condurre prove di precipitazione di carbonato di calcio su vari substrati lapidei. Un aspetto molto importante infine è la valutazione dell'attività carbonatogenica consolidante che deve soddisfare diversi requisiti, non solo in termini di efficacia consolidante, ma anche di compatibilità con il supporto e di durabilità nel tempo.

Obiettivo della ricerca

L'obiettivo principale del progetto è mettere a punto tecniche di bioconsolidamento di supporto per il restauro e la conservazione dei beni culturali lapidei ponendo particolare attenzione ai materiali lapidei costituiti da calcite che sono i più utilizzati storicamente ma anche molto soggetti al deterioramento. Si propone di analizzare i substrati calcarei, i processi di deterioramento e l'applicazione di nuovi metodi biologici per il consolidamento dei substrati alterati, che siano sicuri per l'ambiente, gli operatori e per le stesse opere d'arte.

Più specificatamente è fondamentale comprendere se fosse possibile utilizzare comunità batteriche endogene carbonatogene per il consolidamento della pietra, con l'intento di creare una roadmap applicabile ad ogni manufatto lapideo con le sue diverse peculiarità. Questo obiettivo richiede l'identificazione delle comunità microbiche presenti sui materiali lapidei, la comprensione della relazione esistente tra colonizzazione e degrado, l'isolamento dei batteri in grado di precipitare carbonato di calcio, lo studio del substrato carbonatico e infine come questo risponde al trattamento di bioconsolidamento.

Descrizione dettagliata e punti principali delle attività pianificate

1.All'inizio del progetto sarà necessaria un'estensiva ricerca bibliografica utilizzando gli articoli più recenti su temi biologici (studio dei batteri che colonizzano i materiali lapidei), geologici (studio delle rocce carbonatiche) e di bioconsolidamento.

2.Per il campionamento, si isoleranno i batteri presenti su substrati lapidei da scavi archeologici situati nel Museo Nazionale Romano, Terme di Diocleziano. Prevedo di utilizzare due tipi di campionamento, uno per analizzare la comunità microbica totale ed uno per indagare i batteri con il metabolismo del carbonato di calcio e la loro attività.

3.I campioni verranno analizzati sia con tecniche di microbiologia classica da laboratorio (isolamento, crescita e analisi di specie batteriche), sia studi di metagenomica (estrazione di DNA, sequenziamento e mappatura dei genomi

trovati) per determinare i componenti dell'intera comunità microbica.

4. Per la determinazione dell'attività batterica in relazione al CaCO_3 si prevede di utilizzare terreni di coltura diversi: B4-C (0.4% estratto di lievito, 0.5% glucosio, 0.25% CaCO_3 e 1.4% agar) per verificare i batteri in grado di dissolvere il CaCO_3 , e YPD (1% Bacto-peptone, 1% estratto di lievito, 2% glucosio e 2% agar, contenente 3 g/L di urea e 25 g/L di CaCl_2) per verificare l'attività carbonatogenica.

5. Per il monitoraggio e la selezione dei batteri carbonatogeni le colture verranno poi osservate al microscopio ottico (40x) per determinarne le caratteristiche morfologiche ed attuare un primo screening.

6. Per l'identificazione molecolare dei batteri si prevede di: estrarre il DNA dalle colture selezionate, amplificarlo con la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR), sequenziare il barcode 16S rDNA ed infine mappare le sequenze ottenute utilizzando BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

7. L'analisi del carbonato di calcio prodotto verrà effettuata sui terreni di coltura, tramite analisi al microscopio ottico a scansione (SEM) dotato di spettroscopia EDX (Energy Dispersive X-ray Analysis). Inoltre, verrà effettuata un'analisi con il diffrattometro a raggi X (XRD) per la determinazione della mineralogia del precipitato. Se necessario, si impiegheranno altre tecniche come la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) o la spettroscopia Raman.

8. Caratterizzazione del substrato carbonatico e scelta dei campioni archeologici da utilizzare tramite: osservazione macroscopica.

osservazione al microscopio stereoscopico (struttura, grado di coesione, porosità, tipo di fratturazione, identificazione di minerali accessori, colore).

analisi mineralogico-petrografica in sezione sottile al microscopio polarizzatore (caratteristiche strutturali e composizionali).

analisi mineralogica per diffrattometria ai raggi X (XRD) (composizione mineralogica).

analisi SEM (studio microstrutturale della roccia).

I campioni verranno poi caratterizzati in seguito al trattamento bioconsolidante, prima e dopo l'invecchiamento, per poter evidenziare eventuali cambiamenti delle caratteristiche fisico-chimiche delle superfici.

9. Trattamento di sterilizzazione superficiale tramite raggi gamma prima dell'applicazione del trattamento bioconsolidante per verificare l'efficienza della sterilizzazione (analisi da svolgere presso i laboratori Enea Casaccia).

10. Applicazione del trattamento di bioconsolidamento con inoculo di batteri carbonatogeni e terreno di coltura YPD urea e CaCl_2 .

11. Test di invecchiamento accelerato in camera climatica per valutare la resistenza nel tempo del trattamento bioconsolidante con esposizione dei materiali a temperature e livelli umidità variabili.

12. Valutazione del trattamento superficiale e della sua efficacia (analisi al punto 7 e analisi colorimetriche).

Infine, per determinare l'effettivo consolidamento si verificherà: 1) la coesione superficiale con il test del nastro adesivo che permette di valutare i granuli di carbonato incoerenti; 2) la porosità con prove di risalita capillare; 3) la resistenza meccanica (test per trazione e compressione). Tutti i test verranno eseguiti prima e dopo il trattamento per valutare le differenze.

Mobilità internazionale e nazionale

Si prevede di condurre gran parte delle analisi molecolari (estrazione di DNA, amplificazione con barcodes e sequenziamento di DNA) durante una visita di sei mesi presso il laboratorio molecolare di DNA antico presente all' Evolutionary Biology Centre dell'Università di Uppsala, sotto la supervisione della prof.ssa Laura Parducci.

Si prevede inoltre di condurre le analisi di irraggiamento durante una permanenza di sei mesi presso l'impianto di irraggiamento gamma "Calliope", presso l'Enea Casaccia, sotto la supervisione della dott.ssa Alessia Cemmi.

Titolo del progetto (inglese): Protection and bioconsolidation of stone cultural heritage by inoculation of carbonatogenic bacterial communities

Progetto di ricerca (inglese):

Introduction

Increasing environmental pollution is endangering the survival of stone monuments and artworks. To mitigate the effects of these deleterious processes, several conservative treatments have recently been applied which, however, show limited efficacy and in some cases, are toxic to the environment and to people. The study of these treatments increasingly involves merging of interdisciplinary sectors and methodologies, and this doctoral project aims to incorporate biological and geological knowledge with the aim of studying, protecting, and consolidating the stone heritage in an environmentally sustainable way (Dhami et al. 2014 Appl. Biochem. Biotechnol. 172:2552–2561).

Over the centuries, stone materials have been widely used for artworks and monuments and limestone rocks and marbles (consisting mainly of calcite) are the types of rocks mostly used. However, these rocks are subject to various degradation phenomena and the factors that determine their deterioration can be chemical, physical, and biological. Biological factors are caused by microbial communities that grow on stone surfaces and which carry out a corrosive action against the carbonate substrate. Recently, the attention has also turned to bacterial species that have characteristics that allow their use as "repairing elements" of stone materials (Soffritti et al. 2019 Sustainability 11(14):3853).

In the field of cultural heritage, bioconsolidation precisely means the use of innovative techniques that use repairing elements to replace traditional techniques, which often have limitations and disadvantages related to toxicity for the environment and people. Among the techniques, the one based on the bacterial biomineralization process is also called bacterial carbonatogenesis and uses the ability of some bacteria to precipitate calcium carbonate when these are inoculated on stone surfaces in controlled environments to obtain a recalcification of degraded substrates (Jroundi et al., 2017, Nat Commun 8, 279).

Studies in recent years in this field have shown the potentiality of this technique to bring real benefits in terms of consolidating the substrate to which they are applied (Jroundi et al. 2017, Nat Commun 8, 279 and references therein). In many cases there was a clear decrease in the porosity of the stoneworks and therefore in the absorption capacity, an increase in the strength and surface cohesion until a recalcification of degraded substrates was obtained (De Muynck et al. 2012 Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 1335–1347).

In most cases, however, research has involved exogenous bacteria isolated from the soil, while more advanced research in this field attempts to use instead endogenous bacteria, which are first isolated from the stone materials to which they will be successively reapplied. This is done after identifying and determining which bacteria have the best carbonatogenic capacity and which can consolidate the substrate. It has been shown that this technique allows highly degraded rocks to be treated without altering the dynamics of the rock's bacterial community, thus increasing the bioconsolidation capacity. However, the only studies currently available concern calcarenitic rocks, which gives a general idea of the bacterial behaviour, but do not shed light on the use of the technique for other stone materials.

Using endogenous bacteria requires in-depth scientific knowledge to fully understand the bacteria-substrate interaction and especially its possibility of use on ancient artefacts and on different stone materials such as marble and travertine. It is necessary to: 1) study the substrate from a geological point of view to identify its characteristics and degradation; 2) study the microbial community present and its possible contribution to deterioration; 3) select ocarbonatogenic bacteria and calcium carbonate precipitation and perform tests on different stone substrates. Finally, a very important aspect is the assessment of the consolidating carbonatogenic activity, which must meet various requirements, not only in terms of consolidating effectiveness, but also in terms of compatibility with the substrate and durability over time.

Research objective

The main objective of this project is to develop supportive bioconsolidation techniques for the restoration and conservation of stone cultural heritage, paying particular attention to stone materials consisting of calcite which are the most used historically but also very subject to deterioration. It is proposed to analyse calcareous substrates, deterioration processes and the application of new biological methods for the consolidation of altered substrates, which are safe for the environment, operators and for the works of art themselves.

More specifically, it will be important to test the use of carbonatogenic endogenous bacterial communities for stone consolidation, with the aim of creating a roadmap applicable to each stone artefact with its various peculiarities. This objective requires the identification of the microbial communities present on stone materials, the understanding of the relationship between colonization and degradation, the isolation of bacteria capable of precipitating calcium carbonate, the study of the carbonate substrate and finally how it responds to the bioconsolidant treatment.

Detailed description and main points of the planned activities

1. At the beginning of the project it will be carry out extensive bibliographic research using the most recent articles on biological (study of bacteria that colonize stone materials), geological (study of carbonate rocks) and bioconsolidation topics.
2. For sampling, the bacteria present on stone substrates will be isolated from archaeological excavations located in the National Roman Museum, Terme di Diocleziano and from sculptures. Two types of sampling will be performed, one to analyse the total microbial community and one to investigate bacteria with calcium carbonate metabolism and activity.
3. The samples will be analysed both with classical laboratory microbiology techniques (isolation, growth, and analysis of bacterial species), and metagenomics studies (DNA extraction, sequencing and mapping of the genomes found) to determine the components of the entire microbial community.
4. For the determination of bacterial activity in relation to CaCO_3 , different culture media will be used: B4-C (0.4% yeast extract, 0.5% glucose, 0.25% CaCO_3 and 1.4% agar) to verify the bacteria capable of dissolve the CaCO_3 , and

YPD (1% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% glucose and 2% agar, containing 3 g / L of urea and 25 g / L of CaCl₂) to verify the carbonatogenic activity.

5. For the monitoring and selection of carbonatogenic bacteria, the cultures will be observed under an optical microscope (40x) to determine their morphological characteristics and to carry out a first screening.

6. For the molecular identification of the bacteria DNA will be extracted from the selected cultures and amplified with the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, the 16S rDNA barcode will be sequenced and the sequences obtained will be analysed using BLAST ® (Basic Local Alignment Search Tool) of the NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

7. The analysis of the calcium carbonate produced will be carried out on the culture media, by analysis with a scanning optical microscope (SEM) equipped with EDX (Energy Dispersive X-ray Analysis) spectroscopy. In addition, I will carry out an analysis with the X-ray diffractometer (XRD) for the determination of the mineralogy of the precipitate. If necessary, I will employ other techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) or Raman spectroscopy.

8. Characterization of the carbonate substrate and selection of archaeological samples to be done through:

- o macroscopic observation.

- o stereoscopic microscope study (structure, degree of cohesion, porosity, type of fracturing, identification of accessory minerals, colour).

- o mineralogical-petrographic analysis in thin section under a polarizing microscope (structural and compositional characteristics).

- o mineralogical analysis by X-ray diffractometry (XRD) (mineralogical composition).

- o SEM analysis (microstructural study of the rock).

The samples will then be characterized following the bioconsolidating treatment, before and after aging to highlight any changes in the physic-chemical characteristics of the surfaces.

9. Surface sterilization treatment using gamma rays before applying the bioconsolidating treatment to check the efficiency of the sterilization (analysis to be carried out at the Enea Casaccia laboratories).

10. Application of the bioconsolidation treatment with inoculation of carbonatogenic bacteria and YPD urea and CaCl₂ culture medium.

11. Accelerated aging test in climatic chambers to evaluate the resistance over time of the bio-consolidating treatment with exposure of the materials to variable temperatures and humidity levels.

12. Evaluation of the surface treatment and its effectiveness (analyses from point 7 and colorimetric analysis).

Finally, to determine the effective consolidation, it will be verified: 1) the surface cohesion with the adhesive tape test which allows to evaluate the incoherent carbonate granules; 2) porosity with capillary rising tests; 3) mechanical resistance (test for traction and compression). All tests will be performed before and after the treatment to evaluate the differences.

The molecular analyses (DNA extraction, amplification with barcodes and DNA sequencing) will be performed during a 6-month visit to the molecular laboratory of ancient DNA at the Evolutionary Biology Center of the University of Uppsala, under the supervision of prof. Laura Parducci.

Irradiation analyses will be performed during a stage of 6 months at the "Calliope" gamma irradiation plant, at Enea Casaccia, under the supervision of Dr. Alessia Cemmi.