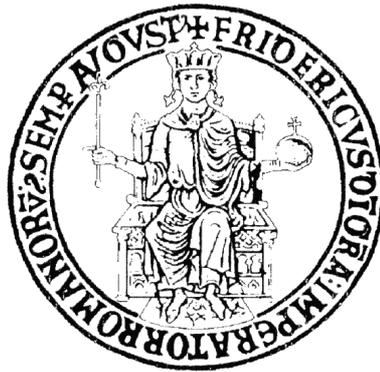


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



**Dipartimento delle Scienze Biologiche**

**sezione di Biologia Vegetale**

**Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata**

**(Sistematica Molecolare)**

**Effetti della colonizzazione di microorganismi fotosintetici sul  
patrimonio artistico: caratterizzazione morfologica e molecolare  
degli organismi e possibili tecniche di controllo.**

**XXIII ciclo**

**Dott.ssa Chiara Marzano**

## **ABSTRACT**

Dissertation title: The effects of colonization of photosynthetic microorganisms on the cultural heritage: morphological and molecular characterization of microorganisms and possible control techniques.

Doctoral candidate: Chiara Marzano

The purpose of my dissertation is the study of bioincrustations (prevalently produced by microorganisms, such as bacteria, cyanobacteria and microalgae, but by mosses as well) growing on monuments and on exposed surfaces of archaeological sites and the development of new protocols for to remove them. A non destructive technique was employed to collect biofilms from eight sampling sites located in different places of Naples and surroundings. The substrates were either yellow tuff or piperno, two locally abundant volcanic rocks.

Various molecular techniques (DNA extraction, enviromental PCR, cloning and DGGE) were employed for identification and classification of the biofilm organisms. Experiments of controlled growth of biofilms in artificial environments were carried out in a a climatic chamber thanks to the cooperation of Prof. Cesareo Saiz-Jimenez of the CSIC in Seville. Different environmental conditions were simulated, in order to verify whether the different microclimatic parameters (humidity, sun exposure, temperature) may influence the distribution and composition of microbial biofilms.

Specific protocols were designated, aiming at monitoring and eradicating

bioincrustations, according to the identification of biodeteriorating microorganisms on the two substrates, as well as of microclimatic parameters influencing biofilm formation.. The proposed protocols do not alter the chemical nature of the substratum and are based on the use of biocides and cold microwaves. The knowledge of bioincrustation-forming organisms allowed to establish appropriate value ranges of microwave intensity.

Results indicated that using microwaves is certainly the most appropriate method, because it does not cause alterations to the surfaces of the substrates, does not contribute to environmental pollution, and it is less hazardous for operators.

# INDICE

Prefazione.....	8
-----------------	---

## CAPITOLO I

1.1 I fattori di degrado dei materiali.....	11
1.2 Biodeterioramento.....	12
1.3 Meccanismi di degrado chimico e fisico.....	18
1.4 Evoluzione del <i>biofilm</i> .....	20
1.5 Sistematica dei biodeteriogeni.....	22

## CAPITOLO II

Identificazione di <i>biofilm</i> fotoautotrofo da monumenti in tufo e piperno.....	39
2.1 Substrati di origine vulcanica: tufo e piperno.....	39
2.2 Siti di campionamento.....	41
2.3 Siti di campionamento in Piperno.....	42
• Cava di piperno Pianura.....	42
• Museo Nazionale.....	42
• Convitto Vittorio Emanuele II.....	43
• Chiesa di Santa Maria di Costantinopoli.....	44
2.4 Siti di campionamento in tufo.....	45
• <i>Piscina Mirabilis</i> .....	45
• Stadio Antonino Pio.....	45
• Teatro Romano di Sessa Aurunca.....	47
• Accademia delle Belle Arti.....	47
2.5 Metodologie di prelievo e conservazione del <i>biofilm</i> .....	56
Caratterizzazione del <i>Biofilm</i> microbico.....	56
2.6 Tecniche di osservazione di microscopia ottica ed elettronica.....	58
Microscopia Ottica.....	58

Microscopia Elettronica.....	58
2.7 Tecniche di indagine molecolare.....	60
Estrazione del DNA ed Elettroforesi.....	60
PCR Ambientali.....	62
DGGE.....	63
Clonaggio.....	64
Preparazione di cellule competenti.....	65
Trasformazione.....	66
Screening delle colonie.....	66
Sequenziamento del DNA.....	67
Analisi delle sequenze.....	68
Risultati.....	69
Discussioni.....	78

### Capitolo III

3.1 Evoluzione del <i>biofilm</i> in condizioni ambientali controllate artificiali.....	84
3.2 Materiali e metodi.....	86
Analisi preliminari.....	86
Colonizzazione dei campioni di tufo e piperno.....	88
Caratterizzazione del <i>biofilm</i> cresciuto in condizioni artificiali.....	89
Risultati.....	90
3.3 Caratterizzazione della composizione del <i>biofilm</i> presi da substrati di tufo e piperno in terreno coltura BG11.....	90
3.4 Esperimento di induzione del processo di biodeterioramento su i due campioni Tufo e Piperno.....	93
Discussioni.....	96

## **Capitolo IV**

### **Metodologie di intervento per il restauro e recupero delle opere lapidee**

<b>4.1 Metodi chimici.....</b>	<b>99</b>
<b>4.2 Protocollo sperimentale con Metatin.....</b>	<b>101</b>
<b>Risultati.....</b>	<b>102</b>
<b>4.3 Metodi fisici.....</b>	<b>104</b>
<b>4.4 Protocollo sperimentale con le microonde.....</b>	<b>106</b>
<b>Risultati.....</b>	<b>109</b>
<b>Conclusioni Generali.....</b>	<b>112</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>115</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>129</b>

*A Sara e Sofia*

## PREFAZIONE

Una sempre maggiore attenzione viene oggi dedicata al problema della conservazione dei monumenti ed al loro deterioramento (Koestler 1997); tale processo di degrado ha reso necessario un concorso di forze tese alla loro salvaguardia. Per questo motivo diverse discipline scientifiche, come la chimica e la geologia si sono adoperate a supportare quella che può essere oggi definita la scienza dei Beni Culturali. La tutela di manufatti storici artistici diventa poi più complessa per i monumenti ed i siti archeologici che sono situati all'aperto, a causa sia delle dimensioni, sia soprattutto per le interazioni che si vengono a creare tra il monumento e l'ambiente circostante. Proprio per tali motivi negli ultimi anni anche la biologia è diventata sempre più utile per la tutela del patrimonio artistico (Gonzales 2003), poiché questi organismi vengono ormai considerati i principali agenti di degrado delle opere d'arte data la loro interazione diretta con il manufatto (Caneva *et al.*1989; Hueck 1965,1968) . L'individuazione delle cause fisiche, chimiche e biologiche che determinano il degrado delle opere diventa fondamentale per procedere ad interventi tesi alla conservazione dell'opera che siano ben progettati e rispondenti alle oggettive esigenze del monumento (Paolillo 2009).

Lo scopo del lavoro di tesi del mio dottorato è stato quindi la caratterizzazione strutturale e morfologica dei microorganismi fotoautotrofi responsabili del deterioramento dei manufatti presi in esame e l'elaborazione di strategie per la conservazione e la tutela dei monumenti e le opere d'arte dalla colonizzazione di tali organismi. Lo studio della microflora presente su questi

materiali lapidei si è concretizzato attraverso una serie di campioni ambientali effettuati in diversi periodi dell'anno, che hanno mirato all'individuazione degli organismi più frequenti, ed a una loro analisi morfologica e molecolare finalizzata al riconoscimento del tipo di organismo e della sua azione di degrado sul monumento.

Il primo passo è stata la scelta dei siti di campionamento basata sulle diverse caratteristiche ambientali e dei substrati in modo da avere un quadro più completo possibile sul comportamento e sulla variabilità dei microrganismi infestanti. Nell'architettura della Campania, al pari di quella di molte altre regioni italiane, il legame tra le pietre di origine locale e quelle utilizzate per le costruzioni è molto forte. Nell'ambito del patrimonio edilizio storico campano sono stati utilizzati quasi esclusivamente, come materiali da costruzione, i prodotti vulcanici derivanti dai vari centri eruttivi come Campi Flegrei Somma e Vesuvio. In particolare, i materiali più frequentemente utilizzati per tale scopo sono rappresentati soprattutto dalle vulcanoclastiti afferenti alle formazioni dell'Ignimbrite Campana (De Gennaro *et al.* 1995) , e del Tufo Giallo Napoletano (Di Girolamo 1998; De Gennaro 2000) che si ritrovano nelle costruzioni dall'epoca greco-romana ad oggi con funzione sia strutturale che ornamentale. Su questo forte legame tra risorse geologiche ed architettura si è basata la scelta dei siti di campionamento, che presentano esclusivamente substrati quali il tufo e piperno.

I campioni di *biofilm* prelevati sono stati sottoposti a differenti tecniche di indagine quali microscopia ottica ed elettronica che hanno consentito di ottenere una conoscenza preliminare degli organismi presenti nel *biofilm* sia da

un punto di vista quantitativo che qualitativo. Successivamente gli stessi campioni sono stati sottoposti a tecniche di biologia molecolari quali PCR ambientali e DGGE. Il protocollo d'estrazione di DNA di campioni di *biofilm* che è stato utilizzato è quello di Doyle & Doyle , mentre i marcatori scelti sono il 16S per i procarioti ed i cianobatteri e il 18S per gli eucarioti (rDNA ribosomiali).

La tecnica della DGGE mi ha permesso di caratterizzare con buon grado di dettaglio la composizione dei campioni attraverso la separazione delle bande di DNA ottenute dai prodotti di PCR che sono state prelevate e clonate al fine di determinare tutte le specie microbiche presenti in ogni campione di *biofilm* analizzato.

Infine si è tentato di sviluppare protocolli per l'eliminazione delle patine con metodi fisici attraverso l'utilizzo di radiazioni elettromagnetiche a bassa potenza.

# Capitolo I

## 1.1 I fattori di degrado dei materiali

Ogni materiale e quindi ogni opera d'arte, inserita in un determinato ambiente tende a mettersi in equilibrio con esso, ma se si verifica un cambiamento nei parametri ambientali questo può provocare come conseguenza la perdita dell'equilibrio raggiunto e la necessità, per gli oggetti, di nuovo adattamento. Un manufatto risulta essere interessato, contemporaneamente, all'azione di diversi fattori di degrado collegabili quindi al suo ambiente di conservazione (Jain *et al.* 1993). Questi fattori stabiliscono tra loro sinergie per cui non è facile per un osservatore non esperto stabilire le priorità nelle cause e meccanismi di degrado. Un manufatto in materiale lapideo può essere soggetto, contemporaneamente, all'azione di : sbalzi di temperatura che stressano la struttura; attacco da acque aggressive acide; attacco microbiologico; attacco di inquinanti; azione antropica; azione meccanica dei fattori meteorologici (acqua, nevischio, grandine) azione chimica dei fattori meteorologici (Caneva *et al.*, 1991,1996).

Le inevitabili trasformazioni che si accompagnano a questi processi risultano in un cambiamento più o meno rapido ed evidente delle caratteristiche originali del materiale, e, in definitiva portano a quella che abitualmente chiamiamo alterazione o degrado. Il clima è il fattore principale dell'alterazione per ogni determinato ambiente. Mentre per i climi "estremi" è possibile separare un'azione chimica o fisica prevalente, per quelli temperati i risultati del deterioramento sono una risultanza delle due azioni. Nelle aree a clima

temperato, quali le nostre, assume grande importanza dal punto di vista chimico la quantità di precipitazioni e quindi dell'acqua che può penetrare nel materiale e il tempo di contatto. Circa le precipitazioni, i parametri di cui tener conto non sono soltanto la quantità di acqua che raggiunge il materiale lapideo e il tempo di contatto, ma gli effetti dell'alterazione aumentano in proporzione alla porosità del materiale che quindi è da considerarsi un altro parametro determinante. La porosità totale di un materiale lapideo è costituita da pori aperti (comunicanti con l'esterno) e chiusi; essa può essere primaria (presente in origine) o secondaria (ad esempio acquisita in seguito ad alterazione). Sono i pori di dimensioni capillari e quelli più fini a favorire l'assorbimento e quindi anche l'eventuale degrado da gelo-disgelo (Tiano *et al.* 1995, 1998) o da cristallizzazione salina.

## **1.2 Biodeterioramento**

Le differenti caratteristiche di ciascun monumento sono legate sia al materiale di cui esso è costituito sia alle differenti condizioni climatiche in cui sorge. Per tali motivi esso è quindi soggetto anche a degrado ed usura processi attuati soprattutto ad opera di fattori biologici (Krumbien 1983, 1988; Urzì *et al.* 1991, 2001, 2003). Molti dei danni inferti al patrimonio culturale sono infatti causati da organismi quali ad esempio alghe, cianobatteri, funghi muschi e licheni che si insediano direttamente sulla superficie dell'opera colonizzandola e causando danni di natura sia chimica che fisica dando così vita ad lento un processo di degradazione che prende il nome di biodeterioramento (Wiggins 1990; Caneva *et*

al. 1996, 2002, 2007). Tale processo non è che l'alterazione e il degrado prodotto dall'azione vitale di microrganismi colonizzatori che si insediano sulle superfici dei monumenti utilizzati come supporto per la loro crescita o come fonte di nutrimento (Urzi *et al.*, 1991; May *et al.*, 1993). Il biodeterioramento è molto diffuso ed è uno degli aspetti fondamentali del processo di trasformazione ed usura delle opere.

Non esiste infatti nessun materiale lapideo che sia immune dalla colonizzazione di biodeteriogeni, o condizione ambientale che eviti il loro sviluppo. Il biodeterioramento assume un'importanza diversa a seconda delle caratteristiche del materiale di cui è costituita l'opera, e dell'ambiente in cui esso si sviluppa. Ad esempio dove le condizioni di inquinamento dell'aria ed in climi particolarmente piovosi e freddi, il danno al monumento può essere ricollegato più a meccanismi fisici come il gelo-disgelo o la cristallizzazione dei sali piuttosto che a un danno di origine biologica. Al contrario in climi caldi e umidi, e dove lo sviluppo industriale è minore le forme di alterazione prevalenti sono quelle correlate alla presenza di biodeteriogeni.

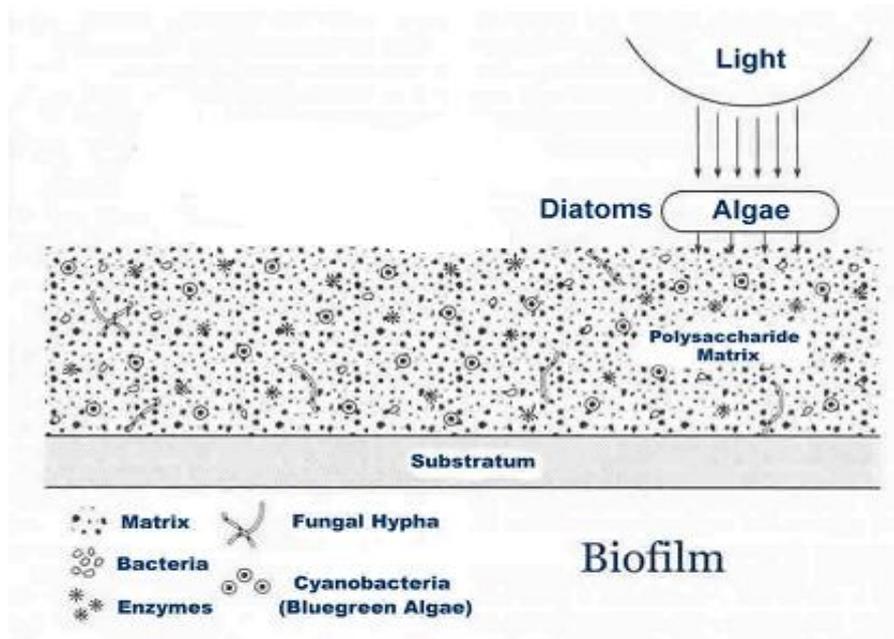
La microflora che colonizza un monumento, ed è quindi responsabile del suo deterioramento, è rappresentata da un ecosistema estremamente complesso, che si sviluppa in modo diverso a seconda delle condizioni ambientali, come è già stato detto, e dalle proprietà fisico-chimiche del materiale in esame. Numerosi studi, infatti, hanno potuto dimostrare il coinvolgimento diretto o indiretto di una grande varietà di organismi nel processo di biodeterioramento.

L'insieme di tutte le comunità che colonizzano il substrato artistico formano il *biofilm* (Morton *et al.* 1994) (fig. 1), una struttura biologica costituita da comunità di microrganismi immersi in una matrice mucillaginosa, formata da

polisaccaridi, sostanza polimerica extracellulare EPS, prodotta da loro stessi. Questi *biofilm* microbici crescono praticamente su qualsiasi substrato inorganico, alterandone il colore originale e l'aspetto con lo sviluppo di popolazioni cellulari variamente pigmentate colonizzando i materiali inorganici utilizzati per la realizzazione delle opere d'arte, una volta che siano soddisfatte le loro necessità in termini di luce, temperatura e umidità. Il loro proliferare sulle opere d'arte non si limita solo ad un danno estetico, ma produce, purtroppo, anche danni microstrutturali nel materiale colonizzato. Si distinguono infatti microrganismi di tipo epilittico, che restano sulla superficie, e microrganismi endolitici, che penetrano negli strati sottosuperficiali.

Nel *biofilm* di origine microbica possono essere presenti anche muschi e licheni, che rappresentano un vero problema per molti manufatti del vasto patrimonio artistico europeo, già esposti all'azione di fattori di degrado abiotici come le piogge acide o le sostanze inquinanti. I meccanismi di adesione al substrato da parte del *biofilm* sono molto complessi e a tutt'oggi non ancora ben chiari alla maggior parte degli studiosi.

La fase iniziale della sua formazione dipende dalla biorecettività (Guillitte 1995) cioè dalla rugosità e porosità del substrato di ancoraggio (Dornieden *et al.* 2000). I danni che gli organismi biodeteriogeni possono indurre sui monumenti si possono dividere in due grosse categorie: i danni fisici e i danni chimici.



**Figura 1: Esempio di composizione del *biofilm***

In Campania, la conservazione dei monumenti riguarda superfici molto vaste dove le condizioni ambientali sono molto differenti: dai monumenti che sorgono nelle aree cittadine, sofferenti per l'inquinamento atmosferico, fino alle aree archeologiche lontane da centri ad alta concentrazione industriale, come ad esempio l'area archeologica di Cuma e dei Campi Flegrei, dove però è più forte l'attacco attuato dai vari biodeteriogeni con effetto disgregante. In basso è riportata una tabella con le diverse tipologie di danni ad opera di differenti organismi. (tabella I) esempi di biodeterioramento (tavola I)

**Tabella 1**

Effetti	Agenti		
	Materiali lapidei	Metallo	Vetro
Presenza di macchie variamente pigmentate	Batteri autotrofi-eterotrofi Funghi e licheni	Nd	Nd
Incrostazioni	licheni	Nd	Nd
Croste/macchie/patine nere	Batteri autotrofi-eterotrofi Funghi	Nd	Batteri autotrofi-eterotrofi Funghi
Patine mucillaginose	Batteri eterotrofi	Nd	Nd
Pellicole variamente pigmentate e di differente consistenza	Alghe e cianobatteri	Nd	Nd
Patine polverulente bianco-giallastre	Attinomiceti	Nd	Nd
Polverizzazione	Batteri autotrofi	Nd	Nd
Esfoliazione	Batteri autotrofi-eterotrofi Funghi	Nd	Nd
Opacizzazione	Nd	Nd	Batteri autotrofi Licheni e funghi
Corrosione	Nd	Batteri autotrofi-eterotrofi	Nd
Disgregazione per estensione dei talli di vario colore	Licheni e briofite	Nd	Nd
Collasso e perdita consistente di materiale con conseguente perdita di leggibilità della struttura	Piante superiori	Nd	Nd

## Tavola I

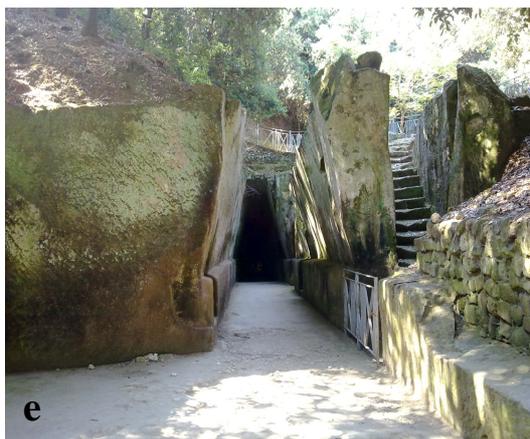
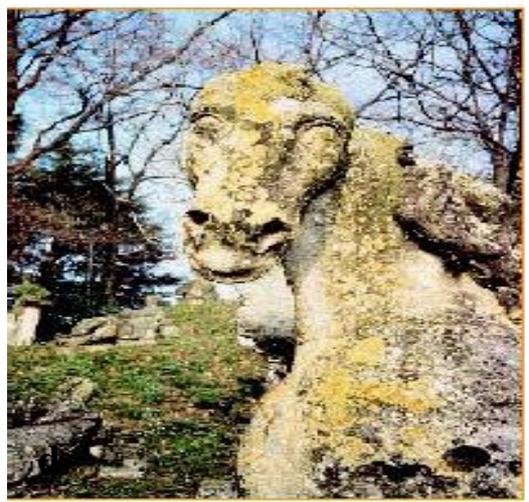


Tavola I: Esempio di biodeterioramento attuato da vari organismi: a) alghe e cianobatteri; b) alghe cianobatteri e batteri; c) funghi e muschi; d) licheni e) licheni e alghe; f) piante superiori.

### 1.3 Meccanismi di degrado chimico e fisico

Come appena detto i materiali dei Beni Culturali, sono soggetti a fenomeni di alterazione e degrado a causa dell'interazione tra l'opera e l'ambiente. L'alterazione cromatica causata dalla presenza di *biofilm* è un fenomeno che non influisce sulla leggibilità dell'opera ma influenza essenzialmente il suo aspetto e generalmente si manifesta con una variazione di colore (Krumbein 1983, 1988).

Il degrado può essere causato da una perdita materiale dell'opera mediante fenomeni di usura e distruzione a una causa di trasformazioni di natura chimica, fisica o biologica. Il degrado si manifesta con danni di tipo fisico o chimico. I danni di tipo fisico sono relativi a tutti quei meccanismi che causano un micro- o macro-decoesionamento del substrato, dove gli eventuali frammenti prodotti da tali processi mantengono la stessa composizione chimica del materiale originario (Warscheid *et al.*, 2000). Questo tipo di danno è causato ad esempio da un'azione meccanica di diversi organismi, quali il movimenti o anche la semplice crescita. La pressione esercitata dai differenti biodeteriogeni porta alla frammentazione del manufatto con conseguente maggiore esposizione dello stesso ad altri fattori di degrado quali piogge vento ed anche agenti inquinanti. Un esempio danno meccanico è l'effetto delle guaine mucillaginose di alghe e cianobatteri che compongono la maggior parte delle patine, a causa della loro caratteristica adesività.

Sicuramente i danni fisici maggiori vengono indotti da piante infestanti che con le loro radici possono smuovere il terreno e compromettere la stabilità

del monumento(Commissione NORMAL 2000). I processi di natura chimica sono, invece, indotti dalle reazioni chimiche che coinvolgono i metaboliti, come il rilascio di composti organici intermedi, di sostanze di scarto e di enzimi extracellulari. I principali processi di biodeterioramento chimico sono: l'acidolisi, le reazioni alcaline, la mobilizzazione selettiva e l'accumulo di elementi, lo scambio cationico, la degradazione enzimatica e la produzione di pigmenti.

La separazione tra i processi di natura fisica e quelli di natura chimica non è facile in quanto nella maggior parte dei casi i due processi avvengono contemporaneamente per cui l'azione di frattura meccanica è accompagnata quasi sempre dalla interazione chimica con il substrato da parte dei metaboliti prodotti dagli organismi. La presenza di patine, soprattutto quelle formate da licheni su materiale lapideo, può causare uno stress fisico sul substrato provocando un aumento di temperatura, un'alterazione termo-idrica con ritenzione d'acqua (Garty 1990).

## 1.4 Evoluzione del *biofilm*

La formazione di *biofilm* microbici richiede coordinazione, interazioni e comunicazione tra le diverse specie che lo costituiscono (Davey *et al.* 2000; Decho 2000). In questo modo ha inizio la formazione del *biofilm* (Rodney *et al.* 2002) che è caratterizzato dall'interazione della cellula con la superficie. Una volta che la cellula ha aderito alla superficie, il *biofilm* comincia a maturare con la produzione di una matrice extracellulare (EPS) che generalmente contribuisce all'architettura della comunità. Malgrado la sua presenza sia universale, la matrice extracellulare è molto varia sia nella composizione sia nei tempi di sintesi. Grandi differenze nell'architettura dei *biofilm* possono derivare anche da piccoli cambiamenti ambientali. Queste differenze sembrano dovute proprio alla differente composizione della matrice extracellulare che, oltre a contenere polisaccaridi e proteine, contiene anche ioni e acidi nucleici. Studi recenti dimostrano che DNA extracellulare e detriti cellulari, osservati in diversi *biofilm*, hanno un ruolo importante nella struttura del *biofilm* e sono considerati parte di essi.

Di solito la formazione dei *biofilm* su superfici lapidee inizia con batteri e microrganismi fototrofi (alghe, cianobatteri) che utilizzano la CO<sub>2</sub> atmosferica come fonte di carbonio e la luce solare come fonte di energia. Successivamente i microrganismi eterotrofi sfruttano i metaboliti dei microrganismi fototrofi come risorsa di carbonio organico per la loro crescita.

In relazione alle dinamiche sopra descritte le popolazioni microbiche che si sviluppano sulla superficie dei monumenti possono variare in relazione alle zone geografiche ed anche rispetto ai fattori atmosferici e alle condizioni

microclimatiche; di conseguenza la composizione del *biofilm* microbico deve essere attentamente presa in considerazione per ottimizzare le metodiche di conservazione dei beni colturali e/o un eventuale intervento di restauro basato sulla eradicazione del *biofilm*.

Ne consegue che una dettagliata caratterizzazione delle comunità microbiche dei *biofilm* dei monumenti è indispensabile per sviluppare le più opportune procedure di controllo biologico del loro sviluppo. Per comprendere meglio il ruolo dei microrganismi nelle successive fasi di sviluppo del *biofilm* su diversi manufatti artistici, si rende necessario l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare per una caratterizzazione delle popolazioni microbiche più precisa e dettagliata. In basso è riportato un esempio semplificato della formazione del *biofilm* su di un substrato (fig. 2).

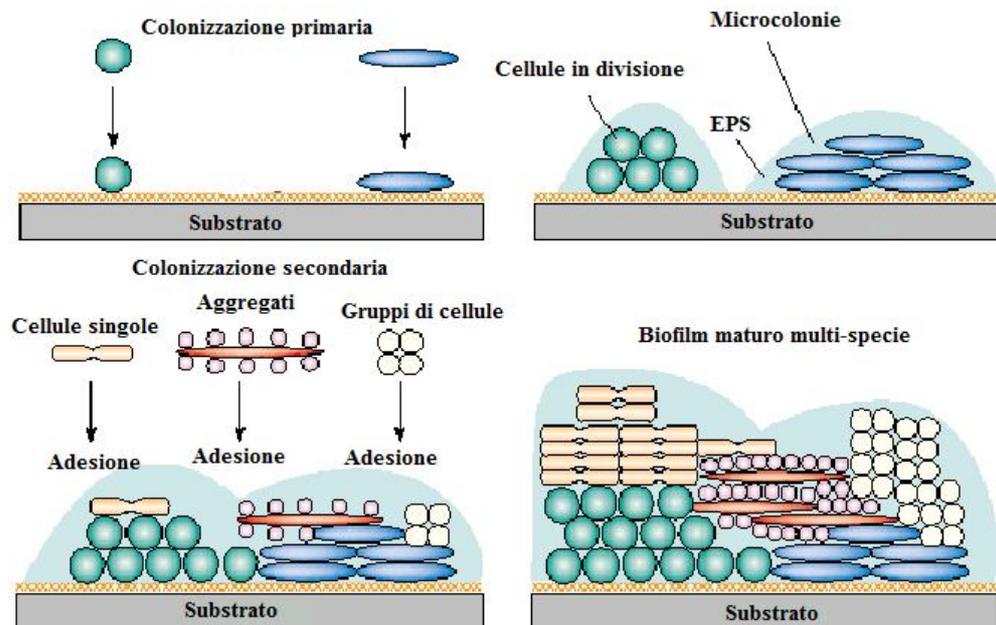


Figura 2: Esempio di evoluzione di *biofilm* su substrato inerte

## **1.5 Sistematica dei biodeteriogeni**

La composizione del *biofilm*, come è stato già detto è molto complessa e articolata: al suo interno si alternano differenti organismi che sono in grado di organizzarsi in una comunità completamente autonoma. Per una conoscenza più approfondita di questo sistema biologico si rende necessaria una descrizione dettagliata delle singole specie iniziando dai batteri. Nella tavola 2 sono riportate le immagini esemplificative dei biodeteriogeni presenti all'interno del *biofilm*.

## **I Batteri**

I batteri sono un vasto raggruppamento sistematico di microrganismi dall'aspetto e dimensioni molto vari; possono moltiplicarsi per scissione preceduta dalla duplicazione del DNA e gli individui che risultano da questa divisione possono restare uniti formando catenelle di batteri.

Molte specie bacillari, ad esempio, formano in periodi di intenso stress nel loro interno le spore batteriche che contengono DNA ed RNA, ma sono quiescenti e resistenti alle più avverse condizioni ambientali; queste spore batteriche possono restare attive anche per molti anni.

I batteri vivono in tutti gli ambienti; si dicono aerobi quelli che respirando come tutti gli altri organismi vivono in presenza di ossigeno libero; anaerobi sono, per contro, quei batteri che non possono vivere che in ambiente privo di ossigeno libero, che esercita su di essi un'azione tossica. Altri ancora sono detti anaerobi facoltativi, poiché si sviluppano bene in presenza di ossigeno ma possono vivere anche in ambienti privi di ossigeno.

La loro forma è mutevole in rapporto alle fasi dello sviluppo e delle condizioni ambientali; possono essere di tre tipi: cocci con forma sferica, bacilli con la caratteristica forma di bastoncelli, ed infine spirilli che si presentano come lunghi filamenti spiralati.

Per il loro metabolismo i batteri si distinguono in autotrofi ed eterotrofi, a seconda della sorgente energetica che utilizzano; gli autotrofi vanno a loro volta distinti in fotosintetici o fotoautotrofi, e chemiosintetici o chemioautotrofi. I primi utilizzano la clorofilla per trasformare l'energia luminosa in energia chimica rendendo così possibile la sintesi di sostanze organiche complesse a

zuccheri e alcuni amidi partendo da sostanze inorganiche semplici come anidride carbonica e acqua; i secondi operano, invece, in assenza di clorofilla e di luce.

Tra i cocchi ritroviamo la famiglia delle *Micrococcacee*. Il genere *Micrococcus* sp. (Di Bonaventura *et al.* 1999), comprende cocchi aerobi che si presentano soprattutto a coppie o aggregati in grappoli irregolari, hanno una colorazione gialla, arancione o rossa. Questo batterio può formare patine mucillaginose di colore verde intenso in zone esposte a parziale insolazione. Favorevole inoltre, alla sua crescita è la presenza di umidità nel substrato.

## **I Cianobatteri**

I Cianobatteri (Cyanophyta), sono organismi procarioti a fotosintesi ossigenica, possono vivere in ambienti estremamente inospitali, possono anche crescere in assenza di luce a spese di fonti organiche di energia.

Sono microorganismi diffusi ovunque, dalle acque caldissime delle sorgenti termali, ai geysers, ai laghi gelidi antartici, ed anche infine possono crescere anche su superfici inerte. Molti generi di cianobatteri fissano l'anidride carbonica producendo un polisaccaride di riserva: la cianoficina.

La parete cellulare di molti Cianobatteri si presenta come una semplice parete di peptidoglicano, mentre in altri è paragonabile ad una guaina molto spessa, gelatinosa, costituita soprattutto da sostanze pectiche e emicellulosiche. Questo rivestimento è spesso vistosamente pigmentato, soprattutto nelle specie che prediligono gli habitat terrestri. La guaina gelatinosa che avvolge i cianobatteri contribuisce all'aggregazione delle cellule che si presentano spesso come filamenti o come colonie irregolari.

Posseggono clorofilla *a*, carotenoidi, xantofille e due proteine idrosolubili le ficobiline (la ficocianina, di colore blu, e solo in alcune specie, la ficoeritrina di colore rosso). Questi organismi sono dotati di notevole adattabilità; alcune di essi si dividono in epilittici, cioè che vivono sulla superficie lapidee, ed endolittici che si insinuano nelle fessure capillari del substrato.

I Cianobatteri sono anche in grado di fissare l'azoto elementare attraverso cellule specializzate dette eterocisti, cellule ingrossate presenti nelle

specie filamentose, che hanno il compito di sintetizzare l'enzima nitrogenasi . Le eterocisti dispongono del solo fotosistema PSI e sono prive del fotosistema PSII, quindi non possono compiere la fotosintesi e dipendono dalle altre cellule della colonia per il nutrimento.

Alcune specie sono in grado di sciogliere la roccia calcarea; altre come *Rivularia* sp. e *Schizotrix* sp. depositano il calcare nella guaina determinando la formazione di sedimenti carbonatici di tufo. Esse vivono sotto forma di patine gelatinose su rocce e muri.

Alcuni generi prendono parte alla formazione dei Licheni. Uno di questi è *Nostoc* (Sanmartin *et al.* 2010), presente sui suoli nudi e su varie superfici. Esso forma degli ammassi gelatinosi sferici nelle acque o sul terreno umido; tali ammassi sono dovuti alla presenza di mucillagini di natura polisaccaridica e contengono all'interno filamenti nei quali sono presenti, a distanza, regolare cellule (eterocisti) caratterizzate dall'ispessimento della parete e dall'assenza di pigmenti. Tali cellule incolori sono da collegarsi con la capacità di fissare l'azoto atmosferico.

Un altro genere che prende parte alla formazione dei Licheni è *Oscillatoria*; quest'ultimo è diffuso sulle rocce umide, o, meno frequentemente, sui suoli umidi o nelle acque e comprende tipi con filamenti ramificati formati da cellule isomorfe disciformi poco profonde, e possiede filamenti ramificati. (Crispim *et al.* 2003, 2005; Lamenti *et al.* 2003)

## **Le Alghe**

Le alghe sono abbondanti in tutti gli ambienti umidi o acquatici, ma dominanti nei mari; nelle acque dolci la maggior parte delle specie sono microscopiche unicellulari, solitarie o coloniali e una buona parte forma fusti simili a piante. Tra le unicellulari, alcune sono mobili, nuotano per mezzo di flagelli o strisciano sul substrato, altre non sono in grado di muoversi e quindi vanno alla deriva come plancton, o sono fisse sul substrato.

Le alghe che si organizzano in colonie mostrano un'estrema varietà di forme: ammassi globosi, filamenti o incrostazioni.

Le pareti cellulari sono generalmente rigide, ma alcuni generi (*Euglena*), sono plastici e possono mutare forma. Questi microorganismi eucarioti autotrofi possono essere unicellulari o pluricellulari e variamente colorati.

La grande diversità di ambienti in cui vivono le alghe ha determinato una notevole diversità nella morfologia del loro corpo (Van Den Hoek, 1995); infatti comprendono organismi sia di dimensioni che di organizzazione del corpo variabilissime.

Le alghe possono essere di due tipi acquatiche o terrestri; queste ultime vivono sul terreno o sulle rocce; possono inoltre suddividersi in specie epilittiche, se crescono sulla superficie esposta del substrato; endolittiche (Golubic 1970, 1993) se colonizzano invece la parte non esposta interna del substrato.

Le alghe che crescono in ambienti terrestri possiedono differenti strategie di sopravvivenza tra cui ritroviamo la capacità di formare delle matrici

polisaccaridiche che consentono un buon assorbimento ed un rilascio graduale e lento dell'umidità. Questa strategia assicura una buona adesione con le superfici e di conseguenza anche la sopravvivenza durante i lunghi periodi secchi. Le alghe vengono classificate in base alla morfologia del corpo (tallo), ai pigmenti contenuti nei plastidi, all'habitat e al ciclo vitale.

Le alghe che si sviluppano sui manufatti lapidei sono microscopiche, unicellulari, singole o riunite in colonie in strutture di varia dimensione. Le popolazioni algali crescono su un numero notevole di opere in pietra e possono mettere in atto differenti forme di biodeterioramento mediante diversi tipi di meccanismi. Questi organismi possono ricoprire le superfici che sono già state corrose dagli agenti atmosferici e tale azione ricoprente è dovuta non solo alla loro stessa presenza, ma anche alla capacità delle colonie algali di assorbire pulviscolo atmosferico e la fuliggine diventando possibili sedi per successive colonizzazioni.

Possono essere anche corrosive poichè esercitano un danno dovuto alla emissione sul manufatto di metaboliti acidi come i terpeni e l'acido acrilico. Tale danno può aggiungersi, e di solito con conseguenze molto più gravi, a quello già causato dalla diffusione delle alghe ricoprenti.

Possono essere infine decoesive esercitando un'azione più dannosa, che si compie attraverso meccanismi fisici, a cui si aggiungono processi di reazione chimica attraverso il rilascio di sostanze dotate della capacità di legarsi con elementi minerali quali soprattutto calcio e magnesio. Le alghe apportano sui monumenti modificazioni che possono essere talvolta irreversibili, sia nella forma che nella leggibilità dell'opera stessa, danni causati soprattutto

dall'azione meccanica delle loro guaine mucillaginose che apportano micro-decoesioni e conseguenti polverizzazioni delle superfici.

Fra quelle maggiormente rappresentate nei *biofilm* da noi collezionati ritroviamo ad esempio il phylum delle *Chlorophyta*. Queste alghe verdi sono caratterizzate dalla presenza di cloroplasti di colore verde che contengono clorofilla *a* e *b* insieme a carotenoidi specifici e xantofille; i carboidrati vengono accumulati sotto forma di amido come materiale di assimilazione e di riserva (talora anche notevoli quantità di grassi). La loro parete cellulare è costituita in prevalenza da cellulosa spesso provvista di uno strato esterno di natura pectica.

Le *Chlorophyceae* comprendono alghe unicellulari, alghe filamentose ramificate o no, dotate di talli di aspetto fogliaceo. Possono entrare in simbiosi con i funghi per dare i licheni ad esempio *Chlorella vulgaris* (Hoshina *et al.* 2004). Le cellule allo stato vegetativo non possiedono flagelli e sono quindi immobili. Le forme unicellulari si riuniscono spesso in aggregati di aspetto caratteristico; sono presenti negli ambienti umidi e si rinvencono assieme alle altre alghe come patine verdi sui manufatti.

## I Funghi

Sono organismi privi di plastidi che conducono una vita eterotrofa, ma possono anche essere parassiti, saprofiti, o simbionti.

I funghi possono essere provvisti di diversi pigmenti, soprattutto nei corpi fruttiferi: si tratta in genere di composti ciclici privi di azoto; non sono comunque mai presenti pigmenti fotosintetici. I funghi simbionti instaurano relazioni con altri organismi; i licheni per esempio sono associazioni di funghi e alghe o cianobatteri.

I funghi possono agire anche da decompositori; infatti nell'ambiente essi degradano materiali organici complessi fino a semplici composti inorganici, così carbonio, azoto, fosforo ed altri costituenti fondamentali dei corpi vengono liberati e resi disponibili per altri organismi presenti all'interno del *biofilm*.

Il corpo o la struttura vegetativa di un fungo è detto micelio e può variare sia per la sua complessità che per le dimensioni. Esso è sempre formato da sottili filamenti semplici le ife, o molto più spesso ramificati; possono essere unicellulari o se pluricellulari vengono definiti settati.

La cellula fungina è racchiusa da una parete il cui composto fondamentale è quasi sempre la chitina-polisaccaride azotata. Il principale prodotto di riserva dei funghi è il glicogeno, sottoforma di goccioline e grassi, mentre manca l'amido. La maggior parte di loro utilizza i carboidrati (preferibilmente glucosio e maltosio) ed i composti azotati per sintetizzare i propri aminoacidi e le proteine. Fra i funghi la classe più coinvolta nei processi di biodeterioramento è quella degli *Ascomycetes*. Questa classe di funghi hanno

le ife settate e fortemente ramificate producono aschi, cioè cellule in cui avviene la meiosi e nel cui interno sono prodotte meiospore, a cui è affidata sia la diffusione che la conservazione della specie.

Un ordine degli *Ascomycetes* di grandissima importanza è quello delle *Aspergillales*, i cui due generi principali sono *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. che comprendono un gran numero di specie indicate spesso con il nome di Muffe .

Il termine “muffa” non costituisce un’entità sistematica, bensì è un termine collettivo che indica il gruppo di miceli fungini che si sviluppano in superficie. Una muffa presenta lunghe e ramificate serie filiformi di ife che formano un micelio, cioè un ammasso intricato di cellule simile ad un tessuto. Il colore del micelio dipende dalla enorme quantità di conidi che vengono formati in superficie.

La larghissima diffusione dei funghi ha provocato e provoca danni gravissimi ai più differenti manufatti, specialmente nelle regioni caldo-umide. Sui i manufatti di origine organica, ad esempio i derivati del legno, una delle principali alterazioni provocate dal parassitismo di microrganismi fungini è il cosiddetto "marciume". I marciumi del legno sono prodotti quasi tutti dai funghi della famiglia *Polyporacee*.

I funghi superiori in grado di utilizzare tutti i componenti del legno (cellulosa, emicellulosa, lignina) causano il "marciume bianco" *Coriolus versicolor*, *Heterobasidium annosum* (Dominic *et al.* 2009). I funghi del marciume bruno sono molti Basidiomiceti (*Piptoporus betulinus*, *Coniophora puteana*) (Baldrian *et al.* 2008): essi degradano cellulosa ed emicellulosa e modificano la struttura della lignina.

I funghi possono attaccare anche i manufatti lapidei insediandosi in lesioni preesistenti causate da colonizzatori autotrofi e lì proliferare; oppure come colonizzatori secondari utilizzando strutture cellulari morte come fonte di carbonio. I funghi sono responsabili di un danno di tipo meccanico, determinato dall'infiltrarsi delle ife nella pietra, esercitando una pericolosa azione di decoesione delle superfici con una conseguente maggior esposizione ad agenti atmosferici ed inquinanti.

## **I Licheni**

I licheni sono agenti molto diffusi almeno in condizione di scarso inquinamento dell'aria, essi sono facilmente riconoscibili per le loro caratteristiche forme macroscopiche e per colori vivaci, giallo, bianco e arancio.

I licheni sono formati da una simbiosi tra un fotobionte (un'alga o un cianobatterio a volte compresenti) ed un micobionte (un fungo). La simbiosi è una coesistenza sviluppatasi tra organismi differenti ed è vantaggiosa per entrambi. Nel caso dei licheni il fungo fornisce acqua e sali minerali all'alga o al cianobatterio, mentre questo ultimo procura al fungo le molecole organiche di cui ha bisogno. La maggior parte dei funghi che partecipano alla simbiosi sono ascomiceti mentre gli organismi autotrofi possono essere alghe verdi o cianobatteri. Grazie a questa vantaggiosa simbiosi i licheni sono riusciti a colonizzare ambienti anche molto diversi il substrato può essere roccioso o vegetale.

Taluni possono svilupparsi direttamente sul terreno. L'attività dei licheni dà inizio alla formazione del suolo sulle superfici rocciose, permettendo perciò la successione biologica anche in aree dove persistono condizioni climatiche avverse.

Quando la simbiosi avviene con un cianobatterio il lichene diviene totalmente autotrofo, sia per il carbonio che per l'azoto, raggiungendo così il più alto grado di autotrofia ed autosufficienza. Questa simbiosi ha una particolare importanza poiché arricchisce il suolo di azoto fissato; i licheni che partecipano a questa associazione rappresentano la principale fonte di azoto in molte regioni.

Il fungo mantiene le sue caratteristiche riproduttive, come se vivesse

isolato. L'alga, invece perde le sue caratteristiche di riproduzione e si moltiplica solo vegetativamente; le sue cellule sono più grandi rispetto a quelle della stessa specie vivente allo stato libero, perché la sua divisione cellulare come simbiote viene apparentemente rallentata. I funghi sono, invece, in grado di sviluppare i loro caratteristici corpi fruttiferi (periteci e apotecii).

L'associazione tra micobionte e ficobionte comunque porta alla formazione di un organismo nuovo, con caratteri morfologici e fisiologici propri, non riscontrabili nei due partner separatamente.

Il fungo, che costituisce come massa la parte più cospicua del tallo lichenico, fornisce all'alga l'acqua e i sali minerali che ricava dal substrato, ed a sua volta trae dall'alga gli zuccheri e, in alcuni casi, i composti azotati (alghe azotofissatrici). Grazie a questo consorzio i licheni sono in grado di colonizzare ambienti più diversi anche quelli caratterizzati da condizioni climatiche più estreme, dove i due simbionti separatamente non potrebbero sopravvivere.

I licheni sono, dunque organismi pionieri per eccellenza. La moltiplicazione vegetativa dei licheni si compie sia attraverso la frammentazione casuale del tallo, sia mediante la formazione di strutture specifiche contenenti cellule di entrambi i simbionti che una volta liberate nell'ambiente, possono dare origine a nuovi talli.

In base alla morfologia del tallo nei licheni si distinguono quattro principali forme di crescita: gelatinosi il tallo è omomero, in essi l'ammasso di cianobatteri è compenetrato dalle ife fungine. Questi licheni si presentano di colore nero o grigio bluastrò, di consistenza dura o papiracea da secchi, gelatinosa e semitrasparente da umidi. Nei licheni crostosi il tallo aderisce strettamente al substrato (roccia, corteccia) penetrandovi fino ad un certo grado

e non possiede una forma ben definita. Esso forma patine di aspetto crostoso la cui superficie può essere continua, fessurata o suddivisa in areole; inoltre può avere un andamento superficiale (licheni epilitici o epifloici), oppure penetrare all'interno della matrice (licheni endolitici o endofloici). In questi ultimi, il tallo penetra tanto profondamente da non emergere quasi in superficie. I licheni fogliosi hanno un aspetto simile a quello di una foglia e il tallo è formato da lamine lobate a struttura dorsoventrale parzialmente sollevate dal substrato; esso aderisce al substrato per mezzo di cordoni di ife (rizine). Quando il tallo è ancorato al substrato solo da una porzione centrale il lichene è detto umbilicato. Nei licheni fruticosi il tallo si sviluppa in tre dimensioni prendendo l'aspetto di piccoli cespugli attaccati al substrato per la porzione basale; le ramificazioni prendono il nome di lacinie. Possono essere eretti, prostrati o penduli a sezione appiattita dorsoventrale o circolare.

Fra i vari tipi di licheni quelli crostosi sono solitamente i primi colonizzatori sia della roccia nuda che della corteccia; successivamente avviene l'insediamento delle specie fogliose; da ultimo compaiono quelle fruticose.

Identica successione può essere notata sui monumenti all'aperto (Edwards *et al.* 1995; Larry *et al.* 2004), soprattutto quelli costituiti prevalentemente in tufo che rappresenta il substrato adatto per le specie pioniere che non chiedono altro per svilupparsi che acqua, luce e sali minerali.

Inoltre i licheni secernendo sostanze molto corrosive, disgregano le superfici (Nimis *et al.* 1992) su cui si attaccano, permettendo l'insediamento dei funghi saprofiti i quali, rielaborando i resti organici dei licheni stessi, preparano quell'*humus* necessario all'impianto di altre specie come i muschi. Questi a loro volta, sfruttando l'alta capacità igroscopica e secernendo anch'essi sostanze

acide, favoriscono un ulteriore disfacimento del substrato permettendo l'attecchimento di specie superiori che accelerano il processo di disgregazione. Per quanto riguarda la specifica azione dei licheni sulle superfici dei materiali lapidei, alcuni studiosi ritengono che essi svolgano un'azione positiva, in quanto esercitano una efficace protezione della superficie dall'inquinamento; secondo altri invece l'azione dei licheni è comunque negativa. In particolare i danni da essi prodotti sarebbero dovuti sia all'aumento di massa ed alla conseguente disgregazione dei materiali e invasione di nuove aree, sia a cambiamenti di volume cui corrispondono restringimenti od espansione dei talli; sia infine, all'azione meccanica che essi compiono sui substrati nei geli invernali per la loro capacità di assorbire acqua.

## Le Briofite

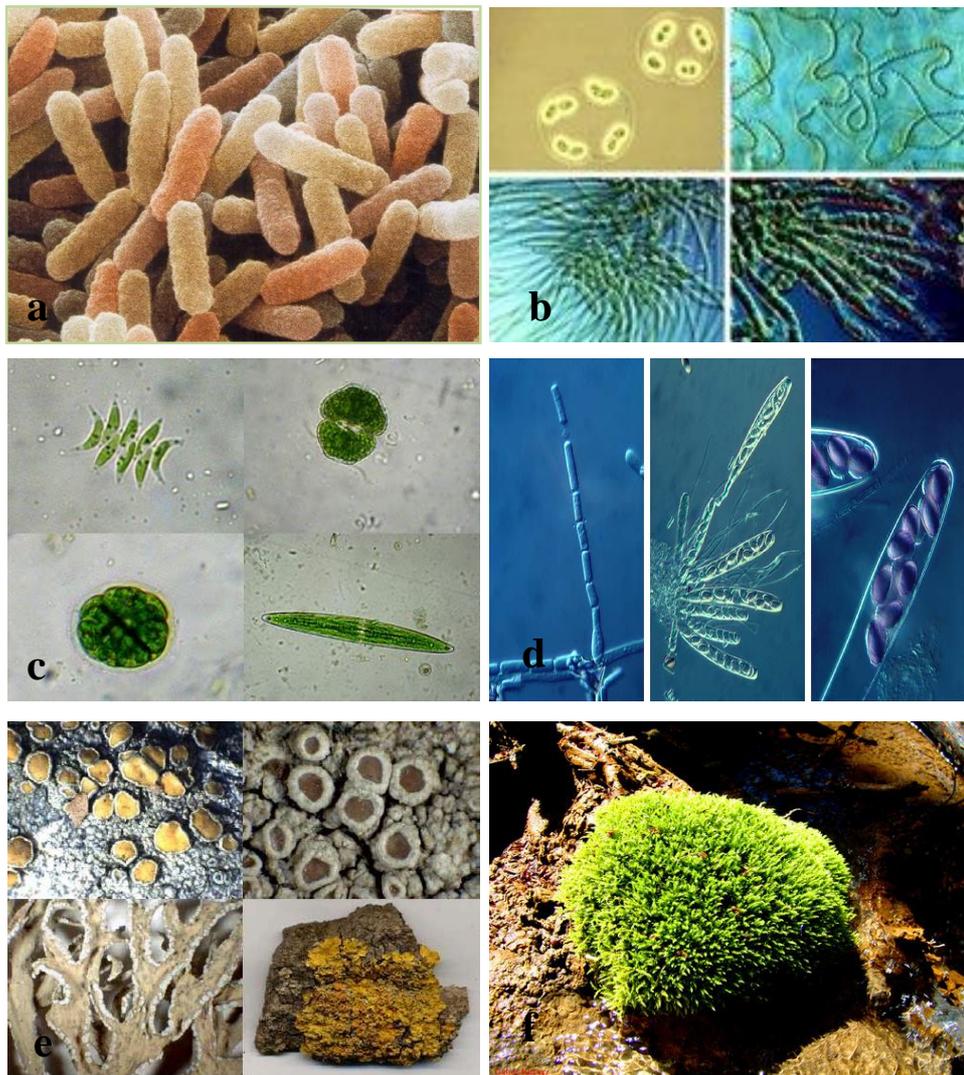
Le briofite comprendono le Epatiche e i Muschi; esse presentano i primi adattamenti alla vita terrestre e prediligono i luoghi caldi ed umidi; alcune specie sono acquatiche, e solo alcuni muschi riescono a spingersi sulle rocce in luoghi piuttosto aridi. Sono piante di dimensioni relativamente modeste, dal corpo vegetativo ancora talliforme nelle epatiche, differenziato in fusticino con foglioline nei muschi; tutte posseggono non vere radici, ma semplici strutture filiformi, le rizine assorbenti l'acqua e i sali.

I muschi sono ubiquitari, crescono sul terreno umido, sulle rocce e sulla corteccia degli alberi e sui muri, prediligendo le aree umide e acquitrinose. Insieme ai licheni si insinuano un po' ovunque e non mancano forme che si insinuano in luoghi piuttosto aridi: le piantine, formate da sottili fusticini e da foglie microscopiche, sono totalmente prive di tessuti vascolari e di vere radici; infatti la funzione di supporto e di trasporto dell'acqua e dei sali minerali assorbiti dal terreno, è svolta da strutture filamentose ipogee dette rizoidi.

I muschi sono dotati di una straordinaria capacità di rigenerazione. Frammenti di fusticini o di foglioline possono sviluppare direttamente, oppure indirettamente, nuove piante.

I muschi attecchiscono sul substrato, spesso anche in unione con altre forme biologiche (licheni o alghe) oppure succedono ad esse formando abbondanti depositi di *humus*, sul quale si possono insediare altre piante. I danni da loro prodotti sono di tipo chimico e di tipo meccanico (Altieri *et al.* 1997); in genere risultano più modesti di quelli causati dalle alghe.

## Tavola II



**Tavola II: Foto relative ai biodeteriogeni presenti nel *biofilm* : a) batteri; b) cianobatteri; c) alghe; d) funghi; e) licheni; f) muschi.**

## CAPITOLO II

### CARATTERIZZAZIONE DEL *BIOFILM* DA MONUMENTI IN TUFO E PIPERNO

#### 2.1 Substrati di origine vulcanica: Tufo e Piperno

Nell'architettura della Campania, come in realtà quasi dovunque, le pietre utilizzate per le costruzioni sono per lo più quelle di origine locale.

Nell'ambito del patrimonio edilizio storico campano, quindi, come materiali da costruzione sono stati utilizzati quasi esclusivamente i prodotti vulcanici derivanti dai vari centri eruttivi come Campi Flegrei (per informazioni sulla geologia dell'area, si veda Barberi *et al.* 1991), Somma e Vesuvio (Giacomelli *et al.* 2001) ossia il Tufo Giallo Napoletano ed il piperno (De Gennaro 1987).

Il tufo, che è stato ampiamente usato come pietra da costruzione per le sue qualità meccaniche e per la facilità di estrazione in cava, è una roccia piroclastica caratterizzata da una prevalenza di ceneri a varia granulometria, con inclusioni di pomici e frammenti di lava, derivante da eruzioni di tipo esplosivo. Esso si presenta di colore giallo paglierino, scalfibile con l'unghia e con le caratteristiche tipiche di una buona pietra da costruzione: buona lavorabilità, buona resistenza allo schiacciamento e agli agenti atmosferici, ottima aderenza con le malte per l'elevata porosità; inoltre, essendo costituita prevalentemente da ossidi di Alluminio, di Potassio, di Calcio e di Magnesio non subisce processi chimici di ossidazione o di idratazione.

Il piperno è da considerarsi la pietra nobile dell'edilizia napoletana in quanto le sue caratteristiche tecniche, la consistenza lapidea e l'elevata resistenza allo schiacciamento, se da un lato ne hanno limitato l'estrazione, più costosa rispetto a quella del tufo, dall'altro ne hanno permesso l'utilizzo sia come "pietra a faccia vista" che non ha bisogno di intonaco, che per le colonne portanti.

Il piperno, si presenta con una pasta grigio-chiara, relativamente tenera, in cui sono immerse delle formazioni allungate di colore grigio-scuro, dette fiamme, più resistenti all'erosione.

## 2.2 Siti di campionamento

I siti di campionamento sono stati scelti in base sia alla tipologia di substrato utilizzato per la costruzione delle opere (tufo e piperno), sia in base alla differente posizione geografica in cui sorgono, per valutare se l'ambiente esterno influenza o meno la crescita, lo sviluppo e la composizione microbica del *biofilm*. Il contesto ambientale in cui si trova il bene culturale influisce infatti sul suo degrado chimico, fisico e biologico.

I monumenti siti all'esterno espongono maggiormente i materiali ai fenomeni meteorologici come pioggia, irraggiamento solare, escursioni termiche tra giorno e notte e i venti; tutti questi fattori possono essere responsabili dello sviluppo di biodeteriogeni, specialmente di organismi e microrganismi autotrofi. Tutti i siti sono stati analizzati in due differenti periodi dell'anno, estate ed inverno.

## **2.3 Siti di campionamento in Piperno**

### **CAVA DI PIPERNO DI MASSERIA DEL MONTE IN PIANURA**

I principali luoghi di estrazione del piperno sono a Soccavo e a Pianura, ai piedi della collina dei Camaldoli (Del Prete 2005); il sito selezionato è stato la cava di Masseria del Monte in località Pianura. La cavità si sviluppa per una superficie totale di quasi 5.000 mq e il suo assetto planimetrico è caratteristico di una geometria di coltivazione del tipo “a pilastri abbandonati” ossia con dimensione degli interassi tra i pilastri definite sulla scorta della sola esperienza. Allo stato attuale, tutti i pilastri, diversi settori di volta e alcune pareti perimetrali della cavità risultano particolarmente instabili dando origine a numerosi fenomeni di crollo ben evidenti in tutta la cava che per tale motivo la cava risulta chiusa al pubblico e, inoltre, è completamente invasa da piante infestanti. I sei campionamenti sono stati effettuati ad altezza d'uomo vicino all'ingresso dove l'esposizione luminosa è più alta. I punti di prelievo e le relative immagini sono riportati nella tavola III.

### **MUSEO ARCHEOLOGICO NAZIONALE**

Il secondo monumento esaminato è il Museo Archeologico Nazionale (De Franciscis 1963). Questo sito è ubicato in una zona di intenso traffico veicolare e pedonale e risulta essere esposto alla luce solare per molte ore nell'arco della giornata. L'edificio che attualmente ospita il museo, la cui costruzione fu iniziata nel 1585, rappresenta anche una rilevante testimonianza architettonica:

infatti è uno dei maggiori palazzi monumentali di Napoli. Tutti i campioni sono stati prelevati dai blocchi in piperno del muro di contenimento, dove si è rilevata una forte presenza di patine soprattutto nella parte inferiore a diretto contatto con la strada. Oltre alla presenza di muschi, si sono osservate patine di *biofilm* di colore variabile dal verde al giallo al bruno imputabili alla la presenza di alghe e cianobatteri.

Per la la posizione dei punti di campionamento si veda tavola IV.

## **II CONVITTO VITTORIO EMANULE II**

Il terzo sito di campionamento è stato l'edera del Convitto Vittorio Emanuele II in Piazza Dante. La costruzione dell'edificio risale al 1768 (Alisio 1965) e fu voluta da Ferdinando IV di Borbone come una delle sedi dell'Ordine dei Gesuiti. Dopo un secolo circa l'edificio fu trasformato nel Convitto Nazionale Vittorio Emanuele II di Napoli. I sei campioni sono stati prelevati dai basamenti in piperno a circa trenta centimetri dal suolo in corrispondenza delle colonne, in diversi punti della facciata come mostrato nella mappa sottostante. L'esposizione solare è molto elevata durante quasi tutto il giorno e di conseguenza le patine di *biofilm* si presentavano di un colore verde brillante. Anche qui il *biofilm*, il cui colore varia dal verde al giallo al bruno, era presente soprattutto a contatto con la pavimentazione, dove la disponibilità dell'acqua è maggiore.

I punti di campionamento per questo sito sono riportati nella tavola V.

## CHIESA DI SANTA MARIA DI COSTANTINOPOLI

Altro monumento esaminato è stato la Chiesa di Santa Maria di Costantinopoli (Regina, 2004), che ritrova nell'omonima via ad angolo con Piazza Museo (dove l'esposizione solare è alta). La costruzione della chiesa iniziò nel 1575, ma l'edificio fu ultimato soltanto nel 1586 e nei primi anni del XVII secolo andò assumendo la forma attuale grazie agli interventi dell'architetto domenicano Frà Nuvolo. I campioni sono stati prelevati dai basamenti in piperno delle rampe di accesso alla chiesa in diversi punti dello scalone della chiesa .

Le patine di *biofilm* si presentano molto abbondanti ricoprendo in alcuni casi interamente le pietre di piperno e colorandole di verde. Anche in questo caso le patine colorate oltre ad arrecare un danno estetico procurano delle microfratture sia sulle pietre che formano le scale, che sulle porzioni laterali, dove oltre alle patine è possibile evidenziare la presenza di muschi.

Per la posizione dei punti di campionamento si veda tavola VI.

## **2.4 Siti di campionamento in Tufo**

### **PISCINA MIRABILIS**

La *Piscina Mirabilis* era una cisterna di acqua potabile romana costruita in età augustea a Miseno (Bacoli, Napoli), sul lato nord-ovest del Golfo di Napoli. Si tratta della più grande cisterna nota mai costruita dagli antichi romani, ed aveva la funzione di approvvigionare di acqua le numerose navi che trovavano ormeggio e ricovero nel porto di Miseno. La struttura è scavata nel tufo ed è suddivisa da pilastri ed archi; l'accesso al sito è possibile grazie alla presenza di una scalinata situata nell'angolo di sud-est, che conduce alla prima navata. I sei campioni sono stati prelevati tre lungo le pareti e gli altri tre sulle colonne a differenti altezze. Le condizioni di umidità ed esposizione luminosa erano uniformi all'interno del sito e il *biofilm* ricopriva completamente le pareti e le colonne fino ad un'altezza di circa due metri. In corrispondenza delle due grate luminose e dell'entrata si poteva rilevare anche la presenza di muschi. Le immagini del sito sono nella tavola VII.

### **STADIO ANTONINO PIO**

Lo stadio Antonino Pio di Pozzuoli (De Caro 2002), uno dei maggiori dell'antichità (300 per 70 metri), fu costruito dall'imperatore per celebrarvi gli Eusebeia, giochi ginnici quinquennali. Lo Stadio ha la tradizionale pianta rettangolare; come nella maggior parte degli edifici antichi destinati a spettacoli,

anche nello Stadio di Antonino Pio gli spalti erano divisi in vari settori. La cavaea costruita prevalentemente in tufo era divisa in tre parti, corrispondenti a differenti fasce di spettatori. Nello stadio sono stati effettuati sei diversi campionamenti a differenti condizioni di esposizione solare. I primi tre campioni sono stati prelevati su una zona esposta direttamente alla luce solare; i restanti tre campioni sono stati prelevati all'interno del sito, dove invece l'esposizione solare era ridotta. Tutti i siti di campionamento presentavano una patina verdastra, anche se non erano direttamente esposti alla luce solare. I punti prelevati sulla cavea, esposti continuamente alla luce, presentavano soprattutto una presenza di muschi.

La piantina e le immagini dei punti di campionamento sono visibili nella tavola VIII.

## **TEATRO ROMANO DI SESSA AURUNCA**

Il teatro Romano di Sessa Aurunca (Cascella 2002) fu costruito nel I secolo d. C., sotto l'impero di Augusto, e restaurato ed ampliato nel II secolo d. C. L'edificio scavato nel tufo, comprende una cava di 110 metri di diametro, con gradinate in calcare che potevano ospitare da 7000 a 10000 spettatori. Anche qui i prelievi dei sei campioni sono distribuiti all'interno della cavea, dove le condizioni ambientali, trattandosi di un sito completamente esposto, sono pressoché identiche in tutti i punti di campionamento; di conseguenza le patine biologiche presenti presentavano tutte un'uniformità cromatica. I punti di prelievo del *biofilm* sono visibili nella tavola IX.

## **ACCADEMIA DELLE BELLE ARTI**

L'ultimo sito di campionamento è stato l'edificio dell'Accademia di Belle Arti (De Fusco *et al.* 1962), istituita come Reale Accademia del Disegno in altro luogo nel 1752 da Carlo III di Borbone. La struttura di questo edificio è per la maggior parte composta di Tufo Giallo e i sei campioni sono stati raccolti ad a circa un metro da terra; l'esposizione luminosa di questo edificio è abbastanza limitata dalla presenza di altri edifici favorendo una condizione di penombra, che causa durante i periodi di pioggia il ristagno dell'acqua. Per tale motivo le superfici del sito sono caratterizzate da una patina sottile di *biofilm* di colore verde brillante; in alcuni punti più esposti al sole presentano un *biofilm* di colore verde chiaro a tratti giallo/marrone che ricopre in maniera uniforme le superfici di campionamento.(Tavola X)

## Substrato in Piperno: Cava di Piperno Masseria del Monte

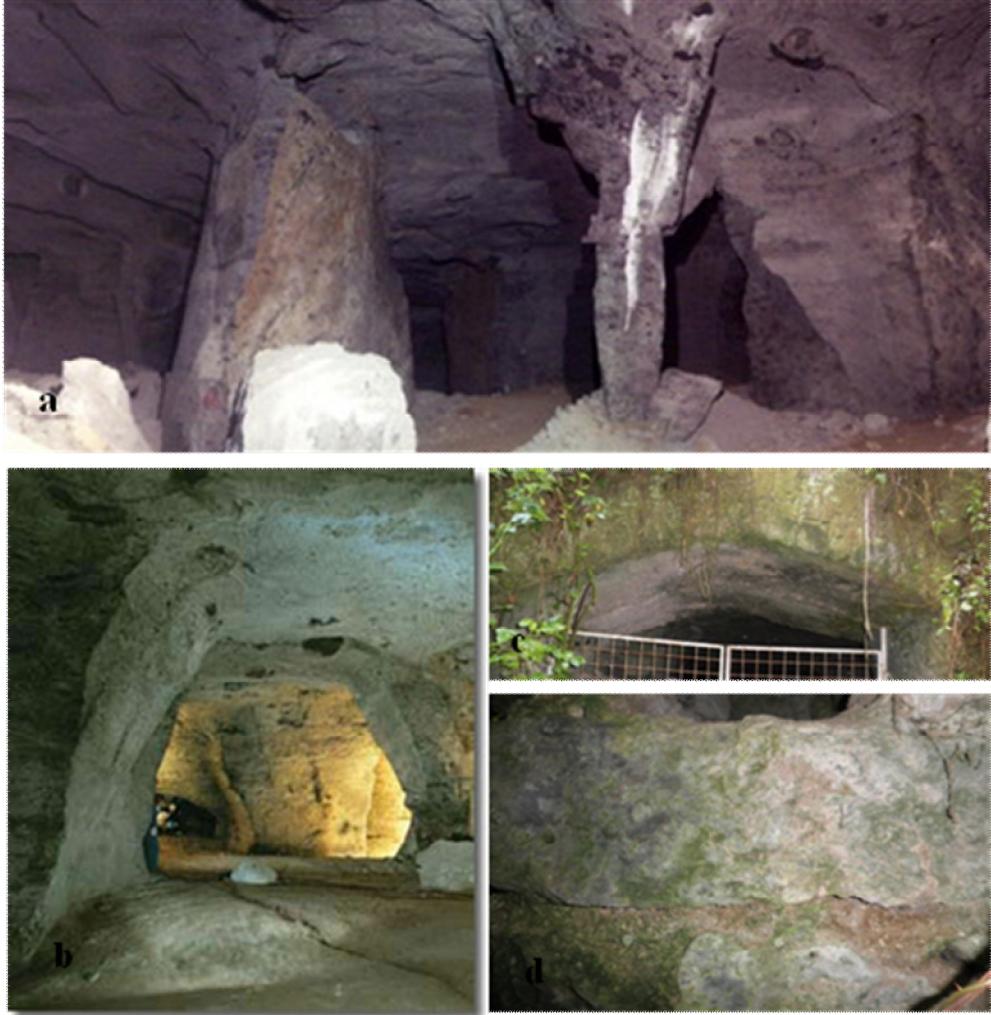
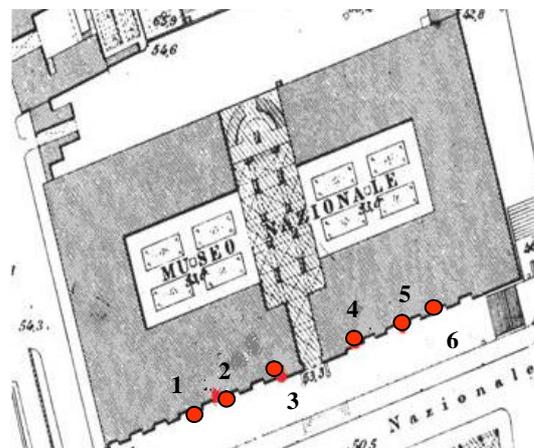


Tavola III: a) e b): interno della cava; c) punto di campionamento 1; d) punto di campionamento 3;

## Substrato in Piperno: Museo Archeologico Nazionale



**a**



**b**



**c**



**d**

**Tavola IV: a) Museo Nazionale; b)Mappa relativa ai punti di campionamento; c) punto di campionamento 1; d) punto di campionamento 4;**

## Substrato in Piperno: Convitto Vittorio Emanuele II

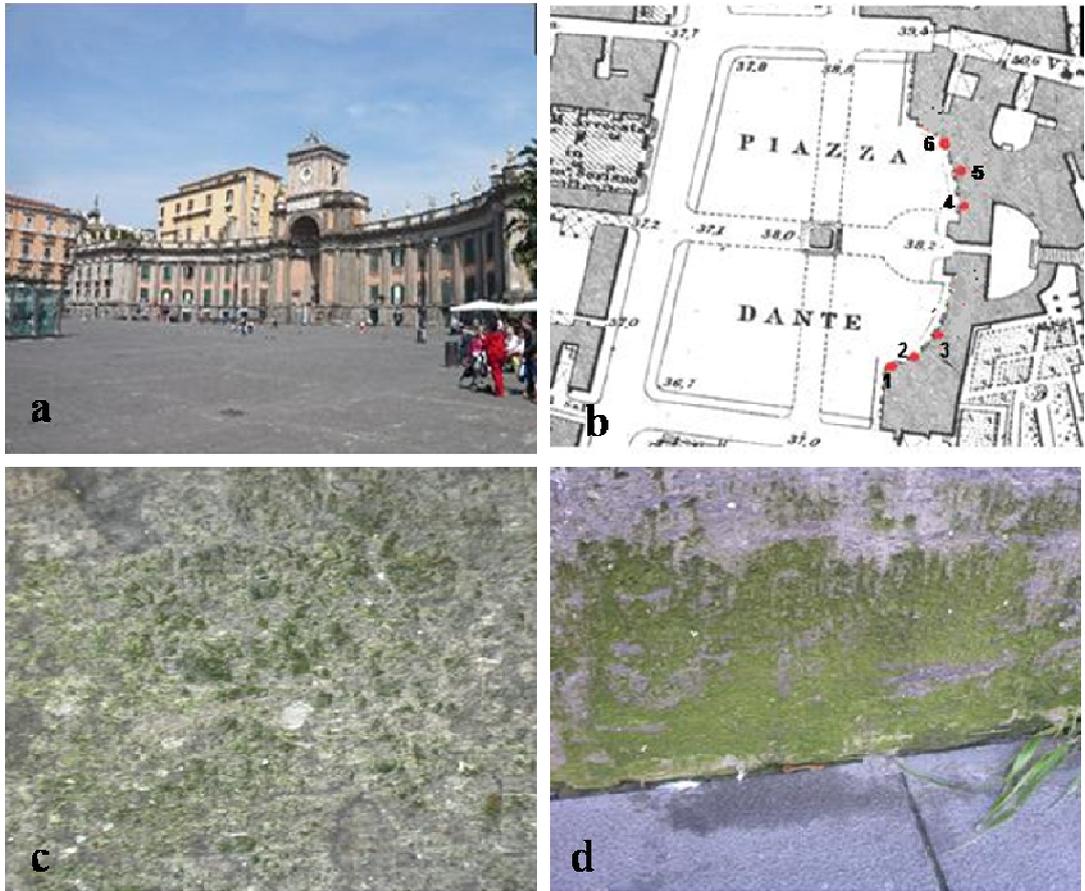


Tavola V: a) Convitto Nazionale Vittorio Emanuele II; b)Mappa relativa ai punti di campionamento; c) punto di campionamento 1; d) punto di campionamento 4;

## Substrato in Piperno: Chiesa di Santa Maria di Costantinopoli



Tavola VI: a) Chiesa; b) Mappa relativa ai punti di campionamento;  
c) punto di campionamento 2; d) punto di campionamento 6;

## Substrato in Tufo: *Piscina Mirabilis*

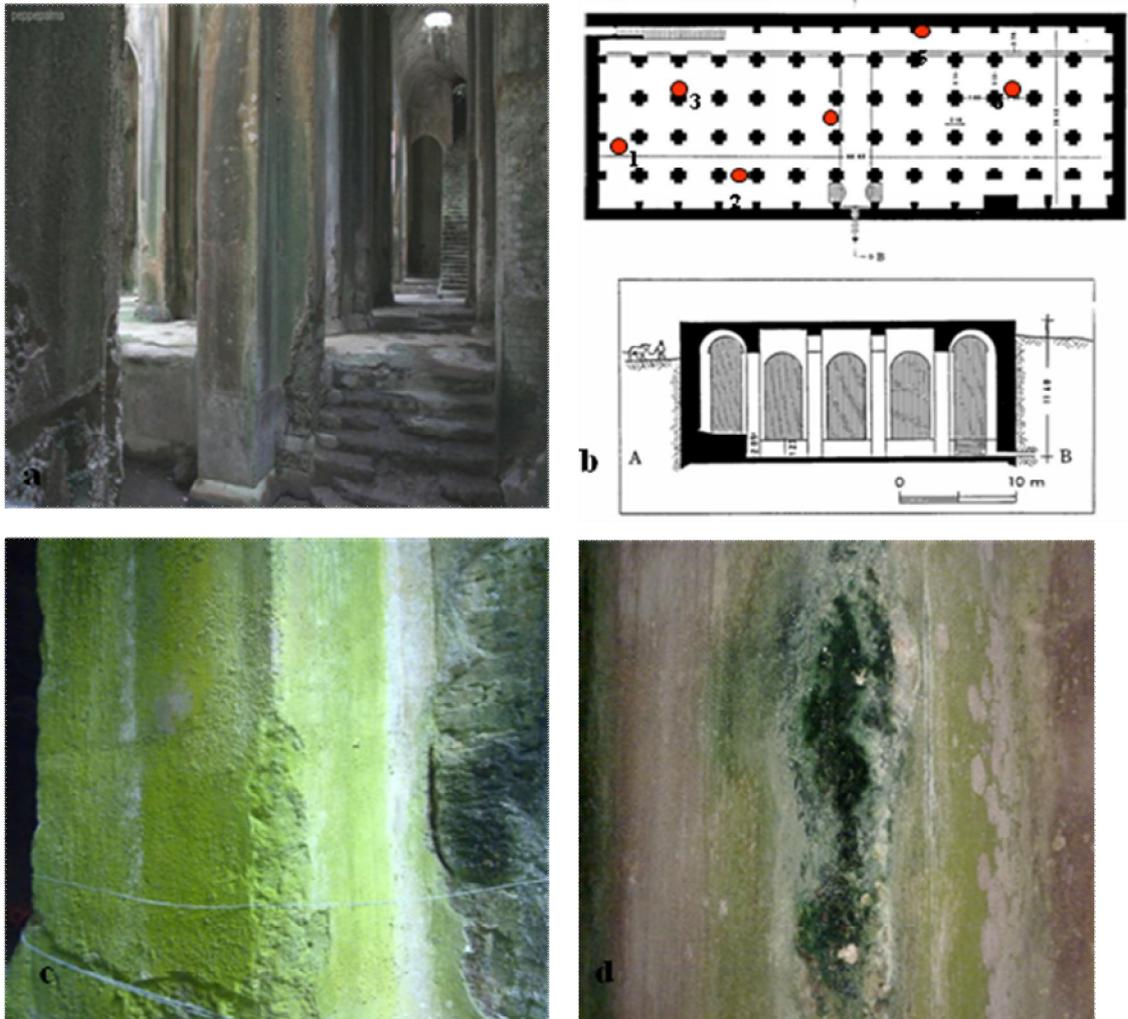


Tavola VII: a) Interno della *Piscina Mirabilis*; b) Mappa relativa ai punti di campionamento; c) punto di campionamento 2; d) punto di campionamento 5;

## Substrato in Tufo: Stadio Antonino Pio



Tavola VIII: a) Stadio Antonino Pio; b)Mappa relativa ad i punti di campionamento; c) Punto di campionamento 3; d) Punto di campionamento 6;

## Substrato in Tufo: Teatro Romano di Sessa Aurunca

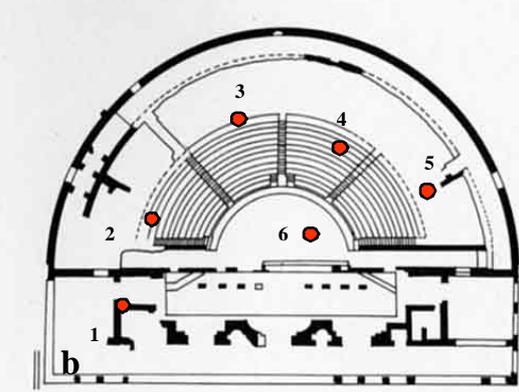


Tavola IX: a) Teatro Romano di Sessa Aurunca; b)Mappa relativa ai punti di campionamento; c) punto di campionamento 1; d) punto di campionamento 6;

## Substrato in Tufo: Accademia delle Belle Arti

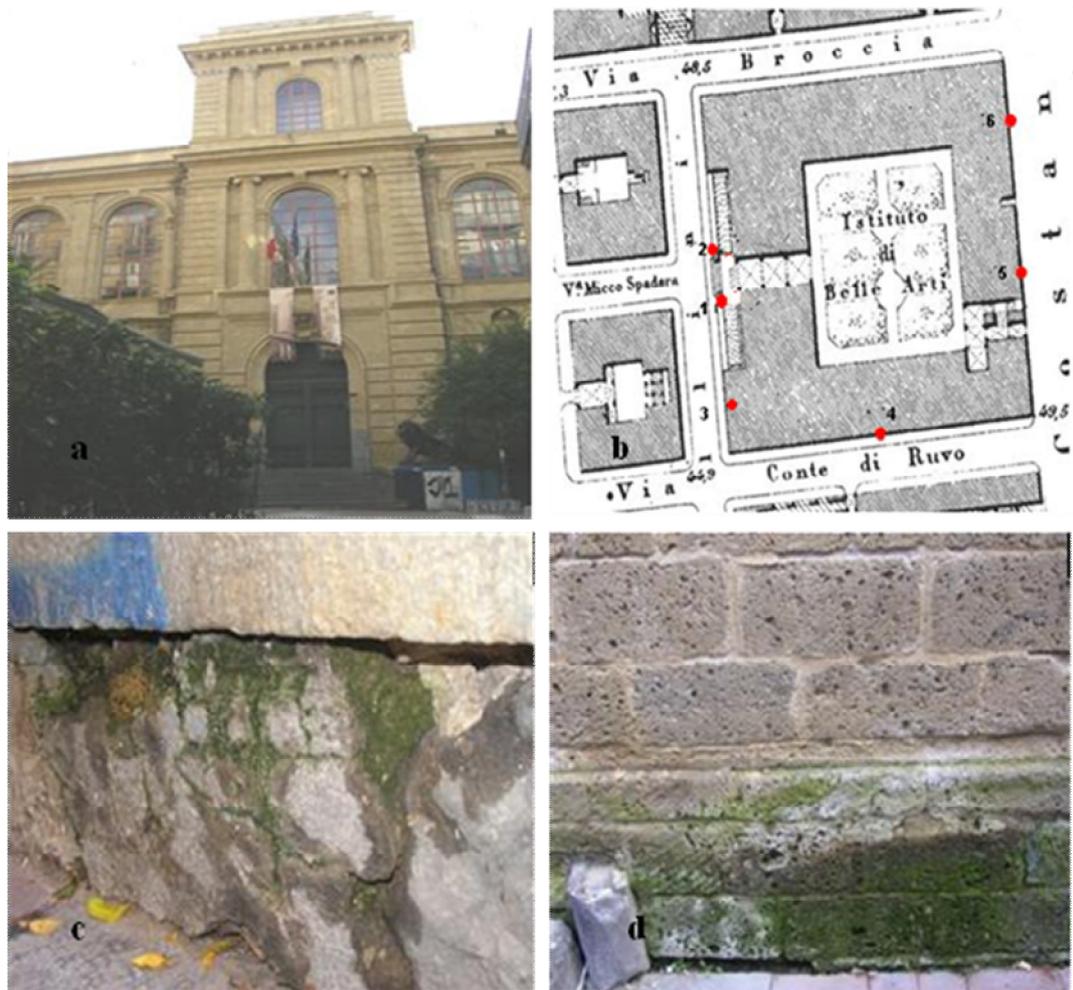


Tavola X: a) Accademia delle Belle Arti; b) Mappa relativa ai punti di campionamento; c) punto di campionamento 1; d) punto di campionamento 5;

## **2.5 Metodologie di prelievo e conservazione del *biofilm***

### **Caratterizzazione del *Biofilm* microbico**

I frammenti di *biofilm* sono stati prelevati direttamente da ciascun punto di campionamento dei singoli siti. Tutti i campioni sono stati asportati e trasportati in laboratorio in tubi Eppendorf sterili, dove sono stati sospesi in un volume noto di terreno di coltura al fine di conservarne nel tempo la biodiversità presente nei *biofilm* prelevati e mantenere inalterate le sue caratteristiche naturali.

La scelta dei terreni di coltura da utilizzare per mantenere in condizioni ottimali di crescita i *biofilm* raccolti si è concentrata su mezzi di coltura che soddisfacessero tutte le esigenze di fonti di carbonio, azoto, zolfo, ossigeno e nutrienti dei principali i microrganismi presenti nei campioni. Per evitare che si perdesse la variabilità di microrganismi del *biofilm* i terreni scelti sono stati due uno utilizzato per le alghe, il Bold's Basal Medium –BBM (Bischoff 1963); mentre per i cianobatteri è stato utilizzato un terreno di coltura specifico per questo tipo di cellule: il Blue Green 11 -BG11 (Castenholz 1988).

Le beute contenenti i campioni sono poi state conservate in termostato a 24°C a ciclo continuo luce/buio. Per conservare inalterate nel tempo le colture sono state sottoposte a intervalli regolari di tempo, circa una volta al mese, a inoculi in nuove beute ,con i terreni nuovi e sterilizzati, affinché gli organismi avessero sempre a disposizione elementi nutritivi ed evitando in questo modo condizioni di crescita sub-ottimali, che avrebbero potuto causare la perdita dei campioni prelevati.

Nelle seguenti tabelle II e III sono riportati i nutrienti contenuti nei due terreni di coltura scelti:

**Tabella II**

<b>BBM (BOLD'S BASAL MEDIUM)</b>		
<b>Descrizione</b>	<b>Composizione</b>	<b>Quantità per 1 litro</b>
<b>Soluzione di stock</b>		
NaNO <sub>3</sub>	20 g/800 ml	10 ml
CaCL <sub>2</sub>	1 g/400 ml	10 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3 g/400 ml	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g/400 ml	10 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7	7 g/400 ml	10 ml
NaCl	1 g/400 ml	10 ml
<b>Microelementi</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,142 g/l	1 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,498 g/l	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,882 g/l	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,144 g/l	
MoO <sub>3</sub>	0,071 g/l	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,157 g/l	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,049 g/l	
EDTA (sale disodico)	5,000 g/l	
KOH	3,100 g/l	
<b>Aggiustare il pH a 6.0</b>		

**Tabella III**

<b>BG11 (BLUE GREEN ALGAE MEDIUM)</b>		
<b>Descrizione</b>	<b>Composizione</b>	<b>Quantità per 1 litro</b>
<b>Soluzione di stock</b>		
NaNO <sub>3</sub>	1,5 g/l	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,040 g/l	10 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,075 g/l	10 ml
CaCL <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,036 g/l	10 ml
Acido citrico	0,006 g/l	10 ml
Citrato d'ammonio ferrico	0,006 g/l	10 ml
EDTA (sale disodico)	0,001 g/l	10 ml
NaCO <sub>3</sub>	0,020 g/l	10 ml
Mix di metalli (tracce)		1 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,860 g/l	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,810 g/l	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,222 g/l	
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,390 g/l	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,079 g/l	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	49,40 g/l	

## **2.6 Tecniche di osservazione di microscopia ottica ed elettronica**

### **Microscopia ottica**

Per una preliminare identificazione tutti i campioni di *biofilm* prelevati sono stati osservati direttamente attraverso tecniche di microscopia ottica (Santos 2003).

L'identificazione tassonomica dei biodeteriogeni presenti nei singoli campioni è stata compiuta utilizzando differenti caratteri diagnostici come la forma cellulare, le dimensioni, presenza/assenza del pirenoide e del vacuolo, numero e forma del plastidio. Le osservazioni dei campioni sono state effettuate grazie all'ausilio del microscopio ottico Nikon Eclipse E800 con sistema di interferenza Nomarski a contrasto di fase 100x e 60x; grazie alla presenza di una telecamera montata sul microscopio è stato possibile effettuare fotografie degli organismi osservati nei *biofilm* in esame.

### **Microscopia Elettronica**

Gli stessi campioni analizzati al microscopio ottico sono stati anche analizzati con la microscopia elettronica (Sutton *et al.* 2008 Lelittle *et al.* 1991). Le osservazioni sono state fatte con un microscopio elettronico a scansione (SEM Zeiss DSM 950 a 10 kV).

Per poter essere osservati tutti i campioni devono essere sottoposti a trattamenti di fissazione con formaldeide 2% e post-fissati con tetrossido di osmio 1%. Quest'ultimo reagente oltre ad essere un fissativo, funge anche da colorante, poiché gli atomi di osmio si legano alle strutture cellulari

provocandone una notevole rifrazione degli elettroni ed in questo modo l'immagine elettronica risulta più chiara grazie ad un notevole contrasto. La fissazione di colonie, o frammenti di esse, di circa 2-3 mm di diametro, è avvenuta secondo il seguente protocollo: I campioni vengono completamente coperti dalla formaldeide al 2% per 1h.; post-fissazione in tetrossido di osmio al 1% dei campioni per circa 1h.

Tutti i campioni vengono disidratati con una serie di lavaggi di 15' in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ed un lavaggio finale con etanolo puro (soluzione al 100%) per 1h a temperatura ambiente; l'essiccazione avviene mediante il Critical Point Drier CPD 020 balzers

I campioni infine vengono montati su supporti metallici "stub" ricoperti con oro per uno spessore di circa 60 nm.

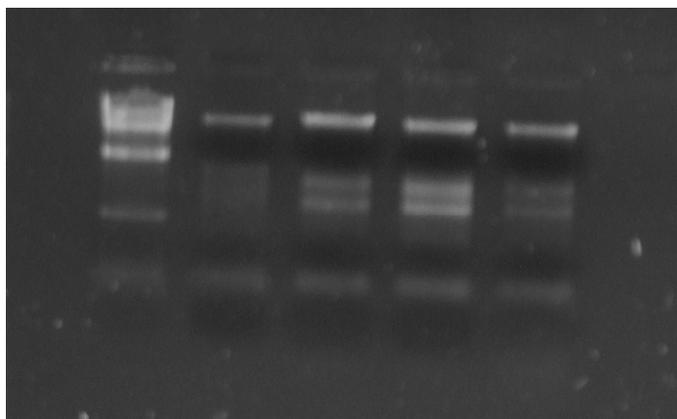
## 2.7 Tecniche di indagine molecolare

### Estrazione del DNA ed Elettroforesi

Il protocollo utilizzato per le estrazioni di DNA relative ai campioni prelevati è quello di Doyle & Doyle (Doyle & Doyle 1987, 1990) ed è il seguente (fig. 3):

1. prelevare 1.5 ml di campione e trasferirlo in un tubo tipo Eppendorf;
2. aggiungere al campione 700  $\mu$ l di CTAB 2<sup>x</sup> e 1.4  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanolo (10 mg/ml);
3. incubare i campioni a 65°C per 20 minuti e poi trasferirli in ghiaccio per 5-10 minuti. aggiungere 700  $\mu$ l di cloroformio/alcol isoamilico (24:1).
4. centrifugare per 10 minuti a 8.000 rpm, per rimuovere i residui delle pareti cellulari e le proteine, con successivo recupero della fase acquosa superiore;
5. aggiungere al solo surnatante (trasferito in nuovi tubi) un uguale volume di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) e ricentrifugare per 10 minuti a 8.000 rpm;
6. aggiungere al solo surnatante alcol isopropilico, 70% del volume raccolto;
7. lasciare il campione a - 80°C per 20 minuti per la precipitazione del DNA;
8. centrifugare a freddo, 13.200 rpm per 15 minuti ed eliminare il surnatante;
9. sottoporre il campione a 1-2 lavaggi con 500  $\mu$ l di etanolo al 70% e centrifugare a freddo per 10 minuti a 13.000 rpm.
10. dopo l'ultimo lavaggio svuotare le Eppendorf e far evaporare l'etanolo in eccesso mediante trattamento con calore;
11. sospendere il pellet in 50-100  $\mu$ l di acqua sterile;
12. conservare a - 20°C

La stima della purezza e la concentrazione del DNA estratto è stata fatta mediante l'utilizzo dell'elettroforesi su gel costituito dallo 0,8% di agarosio in TEB 1X (Tris base 10,8 g , Acido Borico 5,5 g , EDTA 0.5 M pH 8 4g) con l'aggiunta di bromuro di etidio in rapporto 1:10 con il volume del tampone di corsa utilizzato. Un'aliquota del campione di DNA estratto viene caricata sul gel e fatta migrare contemporaneamente ad un marcatore di peso molecolare noto (genoma del fago  $\lambda$  digerito con l'enzima di restrizione Hind III) per circa 40 minuti.



**Fig. 3: Esempio di DNA estratti secondo in metodo Doyle & Doyle da campioni di *Biofilm* raccolti da un punto di campionamento**

## PCR Ambientali

L'utilizzo della tecnica di PCR mi ha consentito di identificare di microrganismi presenti anche in tracce senza la necessità di doverli prima amplificare mediante crescita in coltura. Questa tecnica rappresenta senz'altro un vantaggio perché non per tutti i microrganismi è stato possibile effettuare una identificazione dettagliata mediante l'utilizzo delle due tecniche di microscopia ottica ed elettronica, poiché comunque non sempre sono conosciute le condizioni ottimali per la crescita in coltura.

Per le reazioni di amplificazione sono state utilizzate coppie di primer universali 16S e 18S (Diez *et al.* 2001; Muyzer *et al.* 1993) che producono frammenti di grandezza variabile ( 600-800bp) e circa 5-10 ng del DNA di ciascun campione come stampo. I primer utilizzati per le PCR dei campioni sono stati:

Per il frammento 18S:

**EukA F** 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'

**516 REV** 3'-ACCAGACTTGCCCTCC-5'

Per il frammento 16 S:

**PB38 F** 5'-GKTACCTTGTTACGACTT-3'

**765 REV** 5'-ACTWAGAGACGAAAGCTAGG-3'

**PB38 F** -GKTACCTTGTTACGACTT-3'

**16S R** 5'-CCCCAGTCACTAGCCCKRCCTTA-3'

Le reazioni di PCR sono state allestite con il seguente programma di 30 cicli utilizzando il termociclatore INGENY D-Code System (Biorad):

95 °C per 45 s per la denaturazione; 55 °C per 1 minuto per l'annealing ; 72 °C per 1 minuto e 15 s per l'estensione 72 °C per 7 minuti alla fine dell'ultimo ciclo.

## **DGGE**

Per discriminare i diversi amplificati è stata utilizzata la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), in grado di differenziare frammenti di DNA con sequenze molto simili, che differiscono anche solo per una coppia di basi. Il metodo DGGE è una tecnica elettroforetica per la separazione di frammenti di DNA in base alle loro differenti proprietà di dissociazione o “melting”. Il DNA amplificato è frazionato attraverso un gradiente chimico denaturante. Tutti i prodotti di PCR, caricati l'uno accanto all'altro su gel DGGE, si dissocieranno quindi in punti diversi del gradiente denaturante e saranno distinguibili in base alla diversa migrazione elettroforetica delineando in questo modo un profilo di composizione microbica del *biofilm*.

Per la reazione di PCR sono stati utilizzati primer specifici per l'amplificazione delle regioni del 18S del 16S dell'rRNA ma che avessero un GC-clamp, ( Diez *et al.* 2001; Muyzer *et al.* 1993) ovvero una “pinza” di basi formate unicamente da Guanina e Citosina per ottimizzare la corsa ed impedire il che il frammento di dsDNA ottenuto si dissociasse completamente.

Ciascun prodotto di PCR è stato caricato e fatto migrare per 6 ore in gel a gradiente denaturante con una percentuale di Urea che va dal 40 % al 60% con temperatura e voltaggio costante (60 °C e 55 V in un tampone TAE 1 usando l'INGENY D-Code System (Biorad). Il gel è stato successivamente colorato in bromuro d'etidio per 20 minuti, visualizzato agli UV e fotografato.

### **Clonaggio**

Tramite subclonaggio è stato possibile isolare un singolo gene o, più in generale, un frammento di DNA dal genoma di un organismo e produrne molte copie identiche. In questo modo è stato possibile identificare anche gli organismi meno rappresentati all'interno di un singolo campione. Per il clonaggio è stato scelto il Kit Fermentas™ PCR CloneJET che utilizza come vettore di clonazione linearizzato il pJET1.2/blunt, adatto ad inserti da 6 bp a 10 kb. Il protocollo utilizzato è il seguente.

<b><u>Componenti</u></b>	<b><u>Volume</u></b>
Tampone di reazione 2X	10 µl
Prodotto di PCR	2 µl
PJET1.2/blunt (50 ng / l)	1 µl
Acqua sterile	fino a 19 µl
T4 DNA ligasi	1 µl
<b>Volume totale</b>	<b>20 µl</b>

1. Agitare mediante Vortex e centrifugare brevemente per 3-5 s.
2. Incubare la reazione di ligasi a temperatura ambiente (22° C) da 5 a 30 minuti.
3. Utilizzare la ligasi direttamente per la trasformazione batterica.

## Preparazione di cellule competenti

Le cellule competenti di *Escherichia coli* si preparano per trattamento con soluzioni di  $\text{CaCl}_2$  a diversa concentrazione; le cellule risultano così più permeabili al DNA estraneo. A seconda dei ceppi di partenza, il massimo di competenza si raggiunge dopo 1-24 ore di incubazione a  $0^\circ\text{C}$  dopo il trattamento. Una singola colonia controllata del ceppo batterico desiderato viene inoculata in 2-3 ml di LB e incubata per 16 ore a  $37^\circ$  in agitazione. Successivamente un'aliquota della sospensione batterica (1/200-1/400 del volume) viene amplificata in 100-400 ml di LB-0.2% glucosio, incubandola a  $37^\circ\text{C}$  in agitazione fino ad ottenere una densità ottica di 0,3 O.D. La coltura cellulare viene raffreddata rapidamente in ghiaccio e poi incubata a  $0^\circ\text{C}$  per 10 minuti. Le cellule vengono raccolte per centrifugazioni successive a 4000 g a  $4^\circ\text{C}$  per 5 minuti e poi risospese in  $\frac{1}{4}$  del volume originale di  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Dopo incubazione a  $0^\circ$  per 10 minuti le cellule si raccolgono nuovamente con una centrifugazione di 3 minuti a 4000 g. Eliminato il surnatante si risospende il pellet in  $\frac{1}{40}$  del volume originale di  $\text{CaCl}_2$  0,05 M + 10 % glicerolo ghiacciato sterile. La sospensione è incubata per 1-24 ore a  $0^\circ\text{C}$  e poi aliquotata. A questo punto le cellule possono essere utilizzate per la trasformazione. Le cellule si conservano a  $-80^\circ\text{C}$  e si scongelano su ghiaccio prima dell'uso.

## **Trasformazione**

Un'aliquota di cellule competenti (50 $\mu$ l) viene aggiunta 5  $\mu$ l al prodotto di ligasi e incubata su ghiaccio per 15 minuti. Successivamente si provoca uno shock termico (5 minuti a 42°C, 2 minuti in ghiaccio) allo scopo di favorire l'assunzione del DNA esogeno da parte delle cellule competenti. Si lascia poi la reazione per circa 1 h a 37°C sotto agitazione. La sospensione cellulare viene quindi piastrata su terreno di coltura con agar, contenente ampicillina (60mg/ml), X-GAL (200mg/ml), IPTG (200mg/ml). Le piastre sono state incubate a 37°C overnight; in questo modo sono state selezionate solo quelle cellule che hanno assunto il DNA esogeno rappresentato dal nostro plasmide, che contiene il gene per la resistenza all'ampicillina.

## **Screening delle colonie**

E' stato effettuato uno screening in PCR di tali colonie utilizzando la coppia di primer universali pJET1.2 for e pJET1.2 rev; parte della colonia è stata prelevata in sterilità e trasferita in 5  $\mu$ l di acqua sterile posta in un tubi da 0,2 ml. Successivamente è stata aggiunta la miscela di reazione ed i campioni sono stati sottoposti al seguente programma di amplificazione: 95 ° C, 3 min; 94 ° C, 30 s, 60 ° C, 30 s, 72 ° C 1 min / kb, 25 cicli.

## Sequenziamento del DNA

I frammenti di DNA clonati vengono analizzati mediante sequenziamento per determinare la sequenza nucleotidica del DNA. Circa 100-200 ng del prodotto di amplificazione di ciascun campione sono stati utilizzati per allestire le singole reazioni di sequenza secondo il metodo enzimatico di Sanger et al. (1977), utilizzando l' ABI mod.3100 - AVANT Genetic Analyzer.

Ciascuna reazione ha volume finale di 5 $\mu$ l e contiene:

<u>Componenti</u>	<u>Quantità</u>
Big Dye	1 $\mu$ l
DNA	100-200 ng
Buffer	1 $\mu$ l
primer (forward o reverse)	1,6 $\mu$ M
acqua sterile	fino a 5 $\mu$ l

Utilizzando l'apparecchio PCR Perkin Elmer 9600, le condizioni di sequenziamento, per un totale di 25 cicli, sono le seguenti:

95°C per 10 secondi

50°C per 5 secondi

60°C per 4 minuti

I terminatori in eccesso vengono allontanati aggiungendo ad ogni reazione 1/10 del volume di reazione di acetato di sodio (3M, pH 4.6) ed il doppio del volume di reazione di etanolo assoluto (50 $\mu$ l). Dopo 20 minuti a -80°C, segue una centrifugazione a 4°C per 15 minuti a 11000 rpm. Dopo aver svuotato le Eppendorf sono stati aggiunti 180  $\mu$ l di etanolo al 70 % e i campioni sono stati

ulteriormente centrifugati per 10 minuti a 13.200 rpm (questi due ultimi passaggi vengono ripetuti per due volte).

Il precipitato è lavato per due volte con etanolo 70% freddo ed asciugato sottovuoto. Ogni campione è risospeso in 12 µl di formammide, poi denaturato a 94 °C per 2 minuti.

Le sequenze vengono successivamente caricate nel sequenziatore .

### **Analisi delle sequenze**

Per ciascun clone è stata ottenuta la sequenza consenso delle due sequenze Forward e Reverse e sono state successivamente confrontate su GenBank attraverso l'algoritmo di ricerca nel database on line del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizzando il programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## Risultati

Le indagini effettuate sulle comunità microbiche presenti sulle superfici degli otto siti presi in esame hanno permesso di rilevare la presenza di sei differenti specie cianobatteriche, tre alghe verdi, una alga rossa e di tre diverse briofite. L'identificazione di tali organismi e la loro classificazione sono stati possibili soprattutto con l'ausilio delle differenti tecniche di biologia molecolare sopra descritte. Invece l'identificazione delle due diatomee appartenenti al gruppo delle rafidee è stata resa possibile soprattutto attraverso l'osservazione al microscopio elettronico.

Tale tecnica poi ha evidenziato la presenza dei cianobatteri all'interno della struttura del *biofilm* in larga preponderanza rispetto alle alghe. Le osservazioni al microscopio elettronico hanno inoltre chiarito e sottolineato il ruolo fondamentale della popolazione cianobatterica all'interno del *biofilm*; tali microorganismi infatti non solo gli conferiscono spessore e resistenza, ma sono i maggiori responsabili del legame del *biofilm* con il substrato. Il notevole contributo che tali microorganismi danno alla complessa strutturazione del *biofilm*, attraverso intrecci ed associazioni con le diatomee e le alghe verdi è visibile nella tavola XI.

Nelle tabelle IV e V (relative agli otto punti di campionamento suddivisi per tipologia di substrato) sono riportati i risultati ottenuti dalle analisi morfologiche e molecolari.

Sono stati determinati diversi ceppi batterici delle specie *Bacillus* sp. e *Micrococcus* sp., oltre a vari ceppi di molte specie di cianobatteri; sono anche

presenti alghe verdi.

Tra i cianobatteri, sono state identificate le seguenti specie:

***Chroococcus* sp.** : include cianobatteri unicellulari della famiglia Chroococcaceae, tondeggianti, formanti colonie gelatinose non filamentose e generalmente microscopiche. Entrano nelle simbiosi licheniche e possono formare spore durature. Il genere è ampiamente distribuito nelle acque dolci, nei terreni e raramente in acque salate.

***Gloeocapsa* sp.** : Solitamente questo genere della famiglia delle Chroococcaceae si trova in aggregati pluricellulari, con piccoli gruppi di cellule disposte in modo irregolare, avvolte da una matrice gelatinosa e intensamente colorate, grazie alla presenza di diversi pigmenti (gloeocapsina, scytonemina), di giallo, arancio-marrone, rosso, blu o viola. Solo nelle specie planctoniche sono presenti vescicole di gas. La riproduzione avviene per scissione binaria all'interno della matrice circostante. La maggior parte delle specie si trova su rocce o muri a contatto con l'acqua predilige le zone umide ma si trova anche nelle aree del modo più secche e aride.

***Leptolyngbya* sp.** : appartenente alla famiglia delle Oscillatoriaceae, forma filamenti sottili lunghi solitari e avvolti su se stessi ed immersi in una matrice incolore; non forma eterocisti. La riproduzione avviene attraverso frammentazione con l'ausilio dei tricomi. Questo cianobatterio lo possiamo ritrovare in acqua dolce, in siti termali o nei terreni o su superfici rocciose.

***Nostoc* sp.** : della famiglia delle Nostocaceae è un genere di cianobatteri azotofissatori di acqua dolce che forma colonie di filamenti costituiti da cellule rotondeggianti avvolte in una massa gelatinosa.

Quando si trovano al suolo, le colonie di *Nostoc* non vengono normalmente notate, mentre dopo una pioggia si ingrossano fino a diventare un ammasso gelatinoso.

***Oscillatoria sp.*** : appartenente alla famiglia delle Oscillatoriaceae, forma tricoli per lo più cilindrici; è un genere privo di eterocisti ed è caratterizzato da movimenti oscillatori regolari; forma colonie, anche estese, caratterizzate dal tipico colore verde smeraldo e dal pungente odore di muffa.

***Phormidium autumnale*** : è un cianobatterio filamentoso appartenente alla famiglia delle Oscillatoriaceae. Generalmente si ritrova immerso in una matrice di colore verde brillantem, a formare colonie fino a diventare un tappeto capace di colonizzare substrati diversi anche in climi estremi. La riproduzione avviene attraverso frammentazione con l'ausilio dei tricoli ed è privo di eterocisti.

Per le Chlorophyceae, sono stati rinvenuti:

***Chlorella sp.***: appartenente alla famiglia delle Chlorellaceae. Le cellule sono sempre isolate, di forma sferica o ellissoidale, non mobili; all'interno della cellula sono presenti 1 o 2 plastidi; il pirenoide può essere presente o assente. La riproduzione, per autospore, avviene con formazione di 2-8 cellule figlie dalla cellula madre.

***Pseudococcomyxa simplex*** : è un'alga unicellulare dell'ordine delle Chlorococcales di forma allungata o reniforme, con una o entrambe le estremità protette da mucigel; si riproduce per formazione di autospore; al suo interno presenta cloroplasti parietali ed è priva di pirenoidi. Generalmente si trova nel suolo e sulla superficie delle pietre.

***Scenedesmus* sp.:** della famiglia delle Chlorococcaceae, ha cellule allungate, arrotondate o cilindriche, in colonie composte da 2 ad 8 cellule, tra loro fortemente cementate da una sostanza gelatinosa. Le due cellule terminali sono dotate ciascuna di due spine diritte o arcuate. Ogni singolo individuo, per successiva divisione, può organizzare minuscole colonie (autocolonie) che, una volta libere, si accrescono normalmente. Sono organismi fotosintetici, ma in assenza di luce possono comportarsi da chemioautotrofi, effettuando la sintesi di sostanze organiche utilizzando idrogeno.

Fra le Rhodophyceae, è stato rinvenuto:

***Cyanidium* sp. :** è un'alga rossa della famiglia delle Cyanidiaceae, dalla forma coccoidale. Sebbene le ficobiliproteine che conferiscono alla maggior parte delle alghe rosse il loro caratteristico colore non siano molto evidenti (e quindi il genere non sia facilmente identificabile in base al colore al microscopio ottico), da un'attenta analisi al microscopio ottico si può osservare che i pigmenti non sono distribuiti in tutta la cella, ma rinchiusi all'interno di un comparto. La maggior parte delle cellule vive solitaria, ma si possono anche trovare piccoli gruppi di cellule in divisione. Quest'alga rossa è stata ritrovata esclusivamente in *Piscina Mirabilis*, probabilmente perché questo tipo di organismo predilige ambienti molto umidi e condizioni di penombra.

Le diatomee rinvenute appartengono soprattutto al gruppo delle rafidee. L'osservazione al microscopio ottico ed elettronico dei *biofilm* ha consentito una preliminare analisi qualitativa dei campioni in base alla forma e la disposizione

dei plastidi, forma e dimensioni dei frustuli, valve e delle strie. Le diatomee sono state individuate in tutti i siti di campionamento analizzati, anche se con una percentuale più bassa rispetto a quella dei cianobatteri e di alcuni appartenenti alle alghe verdi.

I generi più abbondanti sono tra le Bacillariophyceae:

***Navicula sp.*** : appartenente alla famiglia delle Naviculaceae, ha i frustuli lanceolati e con apici leggermente assottigliati; hanno due grandi plastidi disposti lateralmente. Le valve mostrano strie parallele e in alcuni casi trasversali. Il rafe, presente su entrambe le valve, possiede terminazioni espanse.

***Pinnularia sp.***: appartenente alla famiglia delle Pinnulariaceae, presenta frustali di forma lineare-ellittica; i plastidi sono due ed appiattiti. Il rafe presenta terminazioni prossimali leggermente ricurve, e la fessura è circondata da un ispessimento siliceo.

Dalle analisi molecolari sono stati rilevati anche tre diverse specie di Briofite che sono state rilevate indistintamente in tutti i siti di campionamento, di cui di seguito riportiamo la descrizione:

***Hipnum linderbergii*** : appartenente alla famiglia delle Hypnaceae e di piccole-medie dimensioni, riesce a raggiungere anche i 5 centimetri di altezza .Il fusticino, di colore giallo o verde con sfumature marroni, è ramificato e ricoperto di foglioline. Ad intervalli regolari dal tallo si dipartono le *sete* o peduncoli, che sorreggono le capsule chiuse dall'opercolo, al di sotto del quale vi è una doppia fila di denti che formano il peristoma. Quando le spore contenute all'interno delle capsule raggiungono la maturità l'opercolo si apre rilasciandole nell'aria.

***Brachythecium salebrosum***: appartenente alla famiglia delle Brachytheciaceae si trova soprattutto in zone ombreggiate ed umide; distribuito dal sottobosco alle pareti rocciose, dai tronchi degli alberi ai pascoli aridi fino agli ambienti antropizzati di tutto il mondo. Le foglioline sono piegate su se stesse dando l'idea di una fisarmonica, sono libere e distribuite lungo tutto il tallo che non si presenta ramificato. La seta ha una lunghezza variabile da 10 ai 27 mm il colore può variare dal giallastro al rossastro. La capsula è piccola e l'opercolo può essere di forma conica o ovale.

***Pottia truncata***: pianta appartenente alla famiglia delle Pottiaceae, di solito molto piccola con 3-6 mm di altezza. Il tallo è semplice, raramente presenta delle ramificazioni. Le numerose foglioline si collocano sulla sommità del tallo, hanno forma ovale e sono in genere poco apiculate; i margini sono interi, semplici o talvolta seghettati vicino all'apice; le cellule della parte superiore delle foglioline sono corte, rettangolari o esagonali, a parete sottile, liscia.

## RISULTATI

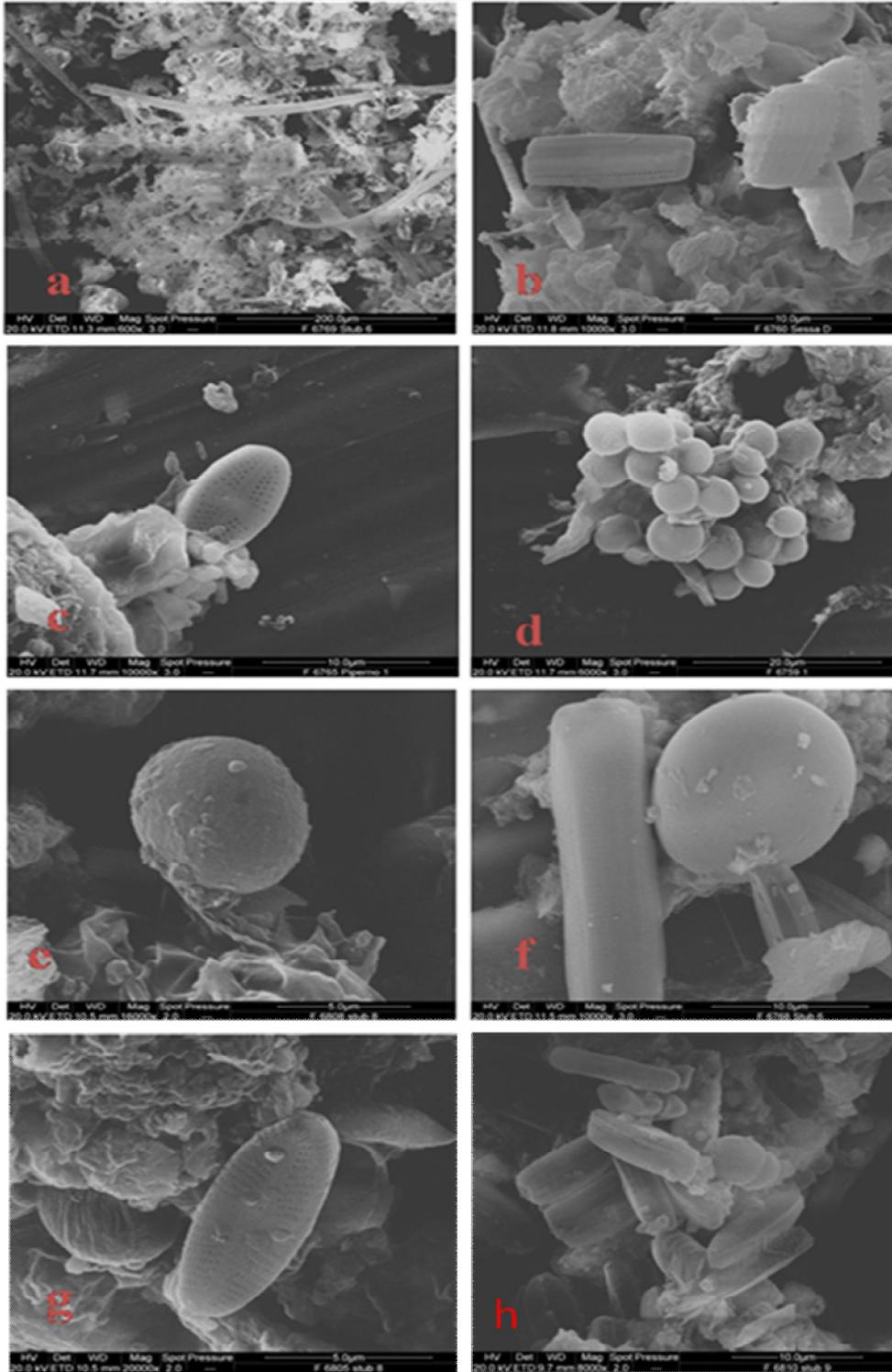
Tabella IV

Monumenti in piperno	Cava Masseria del monte	Museo nazionale	Chiasa Santa Maria	Convitto
	Inverno/Estate	Inverno/Estate	Inverno/Estate	Inverno/Estate
<i>Chlorella</i> sp.	+	+	+	+
<i>Gloeocapsa</i> sp.	+	+	+	+
<i>Pseudococcomyxa simplex</i>	-	-	-	+
<i>Scenedesmus</i> sp.	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	-
<i>Micrococcus</i> sp.	+	-	-	+
<i>Oscillatoria</i> sp.	+	-	+	-
<i>Chroococcus</i> sp.	-	+	-	+
<i>Navicula</i> sp.	+	-	-	-
<i>Pinnularia</i> sp.	-	+	+	+
<i>Nostoc</i> sp.	+	+	+	+
<i>Leptolyngbya</i> sp.	+	+	+	+
<i>Phormidium autumnale</i>	-	-	-	-
<i>Cyanidium</i> sp.	-	-	-	-

Tabella V

Monumenti in Tufo	<i>Piscina Mirabilis</i>	Stadio Antonino Pio	Accademia delle Belle Arti	Teatro Romano di Sessa Aurunca
	Inverno/Estate	Inverno/Estate	Inverno/Estate	Inverno/Estate
<i>Chlorella sp.</i>	+	+	+	+
<i>Gloeocapsa sp.</i>	+	-	+	+
<i>Pseudococcomyxa simplex</i>	-	-	+	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	+	+	+	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	+
<i>Micrococcus sp.</i>	+	-	+	-
<i>Oscillatoria sp.</i>	+	-	+	-
<i>Chroococcus sp.</i>	-	-	+	+
<i>Navicula sp.</i>	+	-	-	-
<i>Pinnularia sp.</i>	-	+	+	+
<i>Nostoc sp.</i>	+	+	+	+
<i>Leptolyngbya sp.</i>	+	-	+	+
<i>Phormidium autumnale</i>	+	-	+	-
<i>Cyanidium sp.</i>	+	-	-	-

## Tavola XI



**Tavola XI : a) Cianobatteri filamentosi legati al substrato; b) Diatomee e cianobatteri legati al substrato, c) Diatomee legate al substrato; d) colonia di cianobatteri coccoidi legati al substrato; e) microalga legata al substrato; f) Diatomee e microalga legata al substrato; g) Diatomee e cianobatterio coccoidi legati al substrato; h) Diatomee legate al substrato.**

## Discussione

I microrganismi fotoautotrofi, alghe e cianobatteri, presenti nei differenti *biofilm* rappresentano i produttori primari e sono considerati “organismi pionieri” dei materiali in pietra e quindi tra quelli più rappresentati e abbondanti sui monumenti; inoltre la loro presenza è responsabile della successiva colonizzazione da parte di altre specie opportunistiche quali muschi, funghi e licheni.

I diversi campioni prelevati dai siti oggetto di questo lavoro di tesi non hanno mostrato differenze di rilievo; infatti, i risultati di microscopia ottica ed elettronica e di biologia molecolare hanno evidenziato che le popolazioni dei microrganismi che compongono il *biofilm* risultano piuttosto omogenee, mostrando uniformità tassonomica.

Le tecniche di biologia molecole associate a quelle di microscopia ottica ed elettronica hanno poi permesso un’analisi della composizione della comunità microbica molto dettagliata; è stato anche possibile valutare in questo modo la presenza (o l’assenza) delle singole specie nei campioni analizzati. Grazie alla microscopia ottica e alla conta cellulare è stato inoltre possibile stabilire un rapporto quantitativo tra le specie presenti nei singoli punti di campionamento di ciascun sito e verificare la presenza/assenza di determinati organismi nei due differenti periodi di campionamento, inverno ed estate; tutti questi dati sono stati poi confermati anche dagli esiti delle analisi di biologia molecolare.

Le differenze relative alla biologia del *biofilm* riscontrate dai risultati ottenuti dall’unione di queste differenti tecniche consistono in una diversa frequenza di ricorrenza delle singole specie nei due periodi di campionamento;

non sono state invece riscontrate specificità per i due tipi di substrato nonostante le differenti composizioni mineralogiche che vengono riportate in tabella VI; tali differenze, si può affermare, non sono state determinanti nella composizione microbica dei *biofilm* raccolti e da noi analizzati.

La raccolta dei campioni prelevati durante il periodo estivo ha mostrato una diminuzione delle alghe verdi all'interno dei campioni dei vari siti, fatta eccezione per la *Piscina Mirabilis* e la Cava di piperno in Masseria del Monte, che essendo ambienti chiusi ed interrati, riescono a mantenere quasi inalterati durante tutto l'arco dell'anno i parametri ambientali (luce, umidità, temperatura) che più influiscono sulla crescita di *biofilm* microbici. Inoltre solo in *Piscina Mirabilis* è stata riscontrata la presenza di *Cyanidium* sp., un organismo che predilige ambienti poco illuminati e costantemente umidi.

Durante le fasi di campionamento è stato poi possibile osservare che la distribuzione del *biofilm* sui due tipi di substrato era visibilmente differente. Infatti sul tufo (tavola VIII) esso era equamente distribuito sull'intera superficie del sito anche sulle parti alte delle pareti; mentre per quanto riguarda il piperno il *biofilm* si concentrava esclusivamente sulla parte a contatto con il pavimento (tavola V) dove era possibile il ristagno dell'acqua e di conseguenza era anche maggiore la sua accessibilità. Questo dato si può spiegare facilmente osservando i dati riportati nella tabella VII, dove si possono notare le differenti proprietà petrofisiche dei principali litotipi vulcanici campani, tra le quali la maggiore porosità ed il maggiore coefficiente di assorbimento capillare ed imbibizione del tufo rispetto al piperno (Calcaterra 2000, 2005; De Gennaro *et al.* 1995, 2000).

Si può quindi affermare che il processo di biodeterioramento comprende

anche la capacità di un substrato di fornire una nicchia protettiva sulla quale i differenti microrganismi si possono sviluppare.

**Tabella VI**

**Composizione mineralogica quantitativa delle piroclastiti campane**

	feld	bio	sod	magn	pyrox	amph	phi	cha	ana	cm	am*
NYT	24.0	tr.	-	tr.	tr.	-	42.5	6.2	7.0	3.4	16.5
CIy	17.0	1.0	-	tr.	tr.	-	30.0	24.5	-	8.5	19.0
PI	85.5	0.4	3.5	0.3	tr.	tr.	-	-	-	-	10.3
CIg	88.9	1.0	-	0.3	tr.	-	-	-	-	-	9.8

**Note:** feld= K- e Na-feldspato, bio= biotite; sod= sodalite; magn= magnetite; amph= anfibolo; pyrox= pirosseno; phi= phillipsite; cha= cabasite; ana= analcime; cm= min. argillosi e am= vetro e ossidi di ferro idrati; \*= per differenza [Dati forniti dal Prof. Piergiulio Cappelletti (Dipartimento di Scienze della Terra, Facoltà di Scienze MM.FF.NN. Università di Napoli Federico II, al quale vanno i miei più sinceri ringraziamenti)].

**Tabella VII**

	Lave flegree	Lave vesuviane	Tufo Giallo Napoletano	Ignimbrite Campana	Piperno
Peso specifico (kN/m <sup>3</sup> )	26,37	28,04	22,16	25,18	25,71
Densità secca (kN/m <sup>3</sup> )	23,82	25,78	10,88	11,30	17,33
Porosità aperta (%)	7,5	7,1	50,8	55,1	32,8
Coeff. di assorbimento capillare (g/cm <sup>2</sup> × s <sup>0,5</sup> )	1,6*10 <sup>-4</sup>	6,7*10 <sup>-5</sup>	2,9*10 <sup>-3</sup>	3,3*10 <sup>-2</sup>	2,5*10 <sup>-2</sup>
Coefficiente di imbibizione (%)	1,84	1,54	32,66	45,6	18,8
Res. compressione uniaassiale (MPa)	161	171	7,6	3,3	20,9
Modulo elastico tangente (50%) (GPa)	53,9	37,9	-	0,47	2,5
Velocità ultrasonica "secca" (m/s)	4398	3174	2032	1586	2695
Velocità ultrasonica "satura" (m/s)	4795	3888	1992	1415	2891

[Dati forniti dal Prof. Piergiulio Cappelletti (Dipartimento di Scienze della Terra, Facoltà di Scienze MM.FF.NN. Università di Napoli Federico II, al quale vanno i miei più sinceri ringraziamenti)].

Si riportano di seguito (tabelle VIII e IX) gli estremi bibliografici di indagini di letteratura sulle comunità microbiche presenti su varie opere d'arte e monumenti in pietra presenti nel bacino del Mediterraneo ed i relativi risultati, poiché tali dati sono stati confrontati con quelli ottenuti qui. La diversità delle specie fototrofiche da me ritrovate tesi è simile a quella osservata in altri studi effettuati su monumenti ed edifici storici, presenti nell'area e costruiti con materiali differenti dal tufo e piperno, quali marmo, calcare, travertino, dolomite, arenaria e granito.

Quello che si evince dai dati riportati in queste due tabelle, è che i generi *Chroococcus*, *Phormidium* e *Gloeocapsa* sono quelli in grado di colonizzare quasi tutti i tipi di substrato

. Si può inoltre dire che *Phormidium*, *Chroococcus* *Nostoc* e *Gloeocapsa* sono tra i cianobatteri più comuni che colonizzano le superfici dei monumenti. Questi generi sono ubiquitari e quindi la loro presenza non è strettamente legata né ad un tipo particolare di substrato litico né al clima. Si può concludere che i dati riportati in letteratura (tabella VIII) ed i risultati qui riportati non sono permettono di stabilire un rapporto chiaro tra gli organismi e la natura del substrato.

## Tabella VIII

### Informazioni di letteratura sul biodeterioramento di monumenti, statue ed edifici storici nei paesi europei del Bacino del Mediterraneo e loro riferimenti bibliografici.

No.	Monumento	Riferimento Bibliografico
1	Giardino di Boboli Statue, Firenze (Italia)	Lamenti et al. (2000)
2	Brunelleschi Rotunda, Firenze (Italia)	Tomaselli et al. (2000b)
3	Facciata Ca' d'Oro, Venezia (Italia)	Salvadori et al. (1994)
4	Chiesa Carrascosa del Campo, Cuenca (Spagna)	Gómez-Alarcón et al. (1995)
5	Cattedrale di Siena (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
6	Chiesa di Cruz, Coimbra (Portogallo)	Santos (2003)
7	Forte Belvedere, Firenze (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
8	Palazzo Largo da Paço, Braga (Portogallo)	Leite Magalhães e Sequeira Braga (2000)
9	Fontana del Leone Alhambra, Granata (Spagna)	Sarró et al. (2006)
10	Chiesa Luterana, Firenze (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
11	Chiesa di Ordem de São Francisco, Oporto (Portogallo)	Pereira de Oliveira (2008)
12	Palazzo di San Giorgio e Michele, Corfù (Grecia)	Pantazidou and Theoulakis (1997)
13	Cattedrale di Salamanca (Spagna)	Ortega-Calvo et al. (1993)
14	Basilica di San Miniato Firenze (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
15	Monastero di Santa Clara-a-Velha, Coimbra (Portogallo)	Miller et al. (2008, 2009)
16	Fontana di Tacca, Firenze (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
17	Area Archeologica di Paestum, Salerno (Italia)	Altieri et al. (2000)
18	Palazzo Nazionale, Lisbona (Portogallo)	Miller et al. (2009)
19	Fontana di Bibatauín, Granada (Spagna)	Zurita et al. (2005)
20	Cattedrale di Siviglia (Spagna)	Miller et al. (2009)
21	La Fontana dei Quattro Fiumi, Roma (Italia)	Ricci and Pietrini (1994)
22	La Citadelle, Blaye (Francia)	Crispim et al. (2003)
23	La Mola quarry, Novelda Alicante (Spagna)	Ascaso et al. (2004)
24	Torre Pendente, Pisa (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
25	La fontana dell'Alhambra, Granada (Spagna)	Bolívar and Sánchez-Castillo (1997)
26	Scultura Paleolitica in Angles-sur-l'Anglin (Francia)	Dupuy et al. (1976)
27	Partendone di Atene (Grecia)	Anagnostidis et al. (1991)
28	Chiesa di Sant Quirze de Pedret church, Berga (Spagna)	Alvarez et al. (1994)
29	Scultura in Ostia Antica (Italia)	Giaccone et al. (1976)
30	La Piramide, Firenze (Italia)	Tomaselli et al. (2000)
31	La Cattedrale di Toledo (Spagna)	Ortega-Calvo et al. (1993)
32	Chiesa di Vilar de Frades, Barcelos (Portogallo)	Miller and Macedo (2006)

## Tabella IX

**Cianobatteri ed Alghe verdi rilevati sui monumenti, le statue e gli edifici storici nei paesi europei del Bacino del Mediterraneo, su differenti substrati**

Microrganismi presenti nei <i>biofilm</i>	Substrato	Monumento n. (si veda Tabella VI).
<b>Cianobatteri</b>		
<i>Chroococcus</i> sp.	Calcere, travertino arenaria dolomite	17, 19, 23, 28, 29
<i>Gloeocapsa</i> sp.	Calcere, travertino arenaria dolomite, marmo, granito	1, 3, 6, 14, 17, 19, 22, 23, 26, 28, 30, 32
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Calcere, marmo	1, 12, 14, 15, 20, 24, 27
<i>Nostoc</i> sp.	Calcere, travertino, marmo	1, 5, 12, 15, 17, 18, 25, 26, 27, 29
<i>Oscillatoria</i> sp.	Calcere	26
<i>Phormidium autumnale</i>	Travertino, marmo arenaria	4, 13, 21, 31
<b>Alghe verdi</b>		
<i>Chlorella</i> sp.	Calcere, arenaria marmo, granito	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
<i>Scenedesmus</i> sp.	Travertino, granito	17, 28
<i>Pseudococcomyxa simplex</i>	Calcere	6

## Capitolo III

### 3.1 Evoluzione del *biofilm* in condizioni ambientali controllate artificiali

Per studiare l'evoluzione e la successione ecologica del *biofilm* nella colonizzazione di materiali lapidei si è reso necessario l'impiego (previa accurato adattamento alle condizioni e necessità dello specifico particolare *biofilm* studiato) di un protocollo sperimentale che simulasse la successione in condizioni controllate.

Il controllo dei parametri ambientali rappresenta un notevole vantaggio nella comprensione dei meccanismi che influenzano la crescita di determinate specie microbiche (Bullini 1998, Sáiz Jiménez 1999, Berthlein 1983).

Mi sono avvalsa della collaborazione del Prof. Cesáreo Sáiz Jiménez dell'IRNAS, (INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA, Sevilla, Spagna), che qui ringrazio con molto rispettosa stima, per utilizzare una cella climatica non commerciale ( Miller et al. 2008), da lui realizzata, che riproduce le condizioni ambientali in cui si sviluppano le popolazioni microbiche su substrati lapidei.

Questo sistema ha permesso di riprodurre il più fedelmente possibile il comportamento e lo sviluppo del *biofilm* in condizioni naturali. I campioni ambientali prelevati da i due tipi di substrato in esame, tufo e piperno, sono stati inoculati in terreno di coltura BG11 e il loro sviluppo è stato monitorato nell'arco di 60 giorni.

A questi esperimenti di induzione di crescita dei *biofilm* sono state

associate analisi di biologia molecolare per conoscere la composizione microbica ad intervalli regolari di due settimane nell'arco dei sessanta giorni.

I campioni di *biofilm* sono stati raccolti dalle superfici del tufo e del piperno situati in ambiente esterno, nell'Orto botanico di Napoli (Facoltà di Scienze MM. FF. NN., Università di Napoli Federico II) e utilizzati per gli esperimenti di riproduzione del processo di colonizzazione di substrati lapidei da parte di microrganismi fototrofi in condizioni ambientali controllate.

Come controllo, sono state prelevate porzioni di *biofilm* dalle medesime rocce sulle quali è avvenuto il prelievo per l'esperimento, con la stessa tempistica, indicata oltre.

Di seguito sono riportate le varie fasi dell'esperimento.

## 3.2 Materiali e metodi

### Analisi preliminari

Prima di effettuare l'inoculo, i campioni di *biofilm* sono stati caratterizzati per mezzo di analisi di biologia molecolare (pcr, clonaggio e DGGE) al fine di identificare le specie presenti all'interno del campione naturale del *biofilm* raccolto dai due substrati scelti ufo e piperno. Sono stati utilizzati differenti primer per l'amplificazione di questi campioni.

Per i Eucarioti:

**EUKA F: AACCTGGTTGATCCTGCCAGT**

**516REV-GC:ACCAGACTTGCCCTCC- GC clamp**

Per i Procarioti:

**341 F- GC : GC clamp- CCTACGGGAGGCAGCAG**

**518 REV ATTACCGCGGCTGCTGG**

Le specie identificate sono riportati nella tabelle X.

I campioni inizialmente sono stati prelevati, sospesi in 15 ml di acqua sterile e raccolti mediante centrifugazione fino al momento dell'uso; una volta risospesi, i campioni sono stati inoculati in 500 ml di terreno liquido BG11. Le colture sono state incubate a temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), e sotto luce artificiale per 60 giorni Fig. 4.

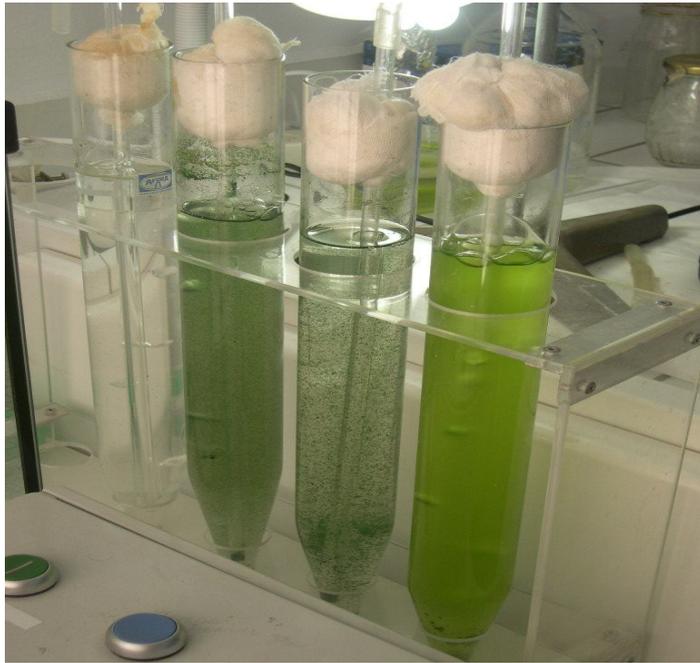


Fig. 4 Coltivazione del *biofilm* in terreno di coltura BG11

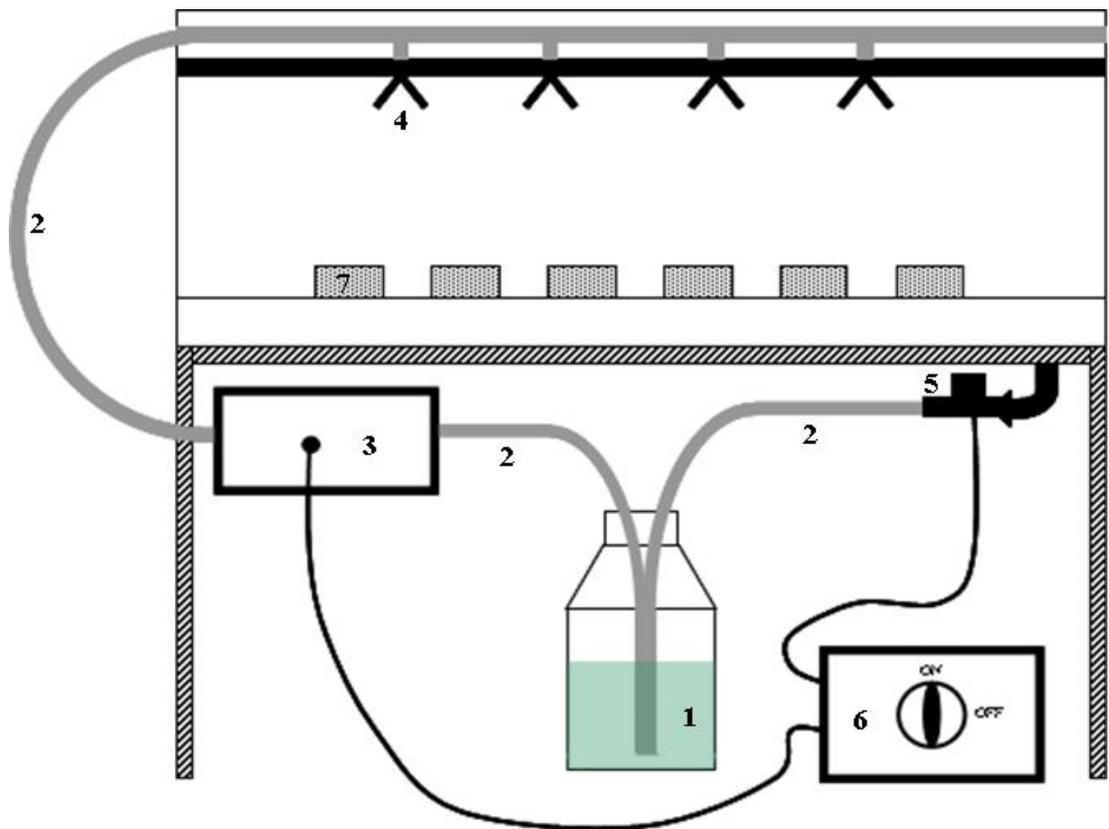


Fig. 5 : 1 - Coltura liquida del *biofilm*. 2 - Tubi di silicone. 3 - Pompa automatica.  
 4 - Nebulizzatori. 5 - Deposito per la valvola di scarico. 6 - Motore ed unità di controllo.  
 7 - Campioni di pietra

## **Colonizzazione dei campioni di tufo e piperno**

Otto campioni di tufo ed uno di piperno (parallelepipedi di 4 x 4 cm, alti 1 cm) sono stati lavati con acqua sterile e sterilizzati in liquido a 120° C, 20 min. Dopo il raffreddamento, i campioni sono stati disposti nella cella climatica per gli esperimenti di colonizzazione (Fig. 5).

La cella climatica permette l'inoculo di campioni di pietra attraverso un sistema di irrigazione automatica che nebulizza la coltura liquida del *biofilm* ad intervalli regolari prestabiliti sulle pietre. Durante le prime due settimane di questo esperimento, i campioni all'interno della cella sono stati nebulizzati con il *biofilm* proveniente dal campione in tufo e dal campione in piperno per 5 minuti ogni 8 ore. Dopo ogni irrigazione, il liquido depositato all'interno della cella climatica è stato raccolto e riciclato da una pompa che lo rimetteva nella coltura. Durante le seguenti due settimane, i campioni di pietra sono stati nebulizzati con il mezzo BG11 diluito 1000x per 5 minuti ogni 8 ore poi ogni 12 ore, per simulare in questo modo le condizioni ambientali esterne.

### **Caratterizzazione del *biofilm* cresciuto in condizioni artificiali**

La crescita, lo sviluppo e la composizione dei due *biofilm* fotosintetici sono stati monitorati ogni due settimane. Piccoli frammenti di *biofilm* venivano prelevati dai campioni di pietra e sottoposti a tecniche di biologia molecolare quali: estrazione di DNA, pcr, clonaggio, sequenziamento, e DGGE tecniche già descritte in precedenza.

I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con i campioni naturali prelevati dalle due pietre di controllo.

## Risultati

### 3.3 Caratterizzazione della composizione del *biofilm* presi da substrati di tufo e piperno in terreno coltura BG11

Lo sviluppo e la composizione del *biofilm* sono stati controllati per circa 60 giorni ad intervalli regolari di due settimane; sono stati prelevati come controllo interno circa 200 ml delle due colture utilizzate per la caratterizzazione molecolare del *biofilm* naturale messo in terreno di coltura BG11. Lo stesso approccio è stato utilizzato per gli inoculi su pietra dei due campioni da cui sono stati prelevati in modo sterile frammenti di *biofilm* agli stessi intervalli di tempo per tutta la durata dell'esperimento. Questo controllo è stato realizzato grazie all'utilizzo della DGGE, cioè mettendo a confronto le bande che si visualizzavano nel campione naturale in coltura e quelle dei due campioni raccolti sulle pietre inoculate che si presentavano nel gel durante la corsa. In questo modo è stato possibile verificare la presenza o l'assenza dei differenti microrganismi presenti nei due *biofilm* presi in esame.

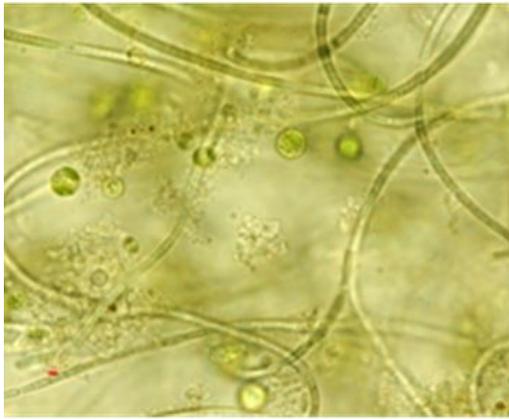
Come appare chiaro dai risultati delle analisi molecolari e di microscopia ottica, i biodeteriogeni maggiormente rappresentati all'interno dei due *biofilm* esaminati sono i cianobatteri, di cui vengono rilevate quattro specie; invece per le alghe verdi sono solo due le specie ritrovate (Tabella X). Tra i microrganismi procarioti dei due *biofilm*, i più rappresentati sono rispettivamente *Leptolygbya* sp. e *Oscillatoria* sp. Infatti su un totale di 40 cloni queste 2 specie rappresentavano quasi il 70% del totale. Per quanto riguarda invece le alghe verdi, entrambi i campioni mostrano la presenza sia di *Chlorella* sp. che di *Scenedesmus* sp., ma tra

le 20 sequenze dei cloni quella maggiormente rappresentata era *Scenedesmus* sp. per entrambi i campioni. Nella tavola XI sono riportate le immagini di questi microorganismi ottenute al microscopio elettronico nelle due colture. Nella tabella X in basso sono riportati i dati relativi alle sequenze ottenute dal clonaggio dei *biofilm* naturali messi in coltura in BG11.

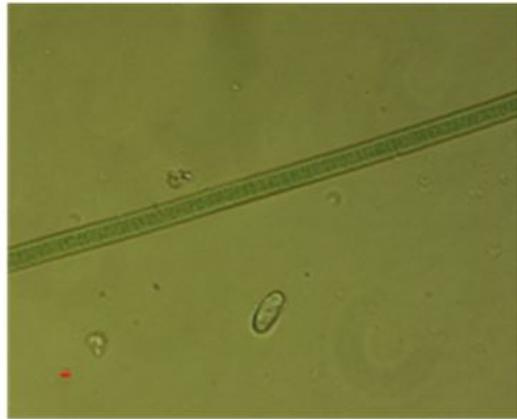
**Tabella (X)**

<b>Alghe</b>	<b>Accession number</b>	<b>Percentuale di similitudine</b>
<i>Chlorella</i> sp. (Tufo)	EF114778	99%
<i>Chlorella</i> sp. (Piperno)	EU282456	96%
<i>Scenedesmus</i> sp. (Tufo)	FJ946898	98%
<i>Scenedesmus</i> sp. (Piperno)	FJ946898	98%
<b>Cianobatteri</b>		
<i>Leptolyngbya</i> sp. (Tufo)	X84809	99%
<i>Leptolyngbya</i> sp. (Piperno)	EF545622	95%
<i>Nostoc</i> sp. (Tufo)	AM711541	98%
<i>Nostoc</i> sp. (Piperno)	AM711541	98%
<i>Oscillatoria</i> sp. (Tufo)	AB74509	99%
<i>Oscillatoria</i> sp. (Piperno)	FJ461751	98%
<i>Phormidium autumnale</i> (Tufo)	EU196633	98%
<i>Phormidium autumnale</i> (Piperno)	DQ493874	97%

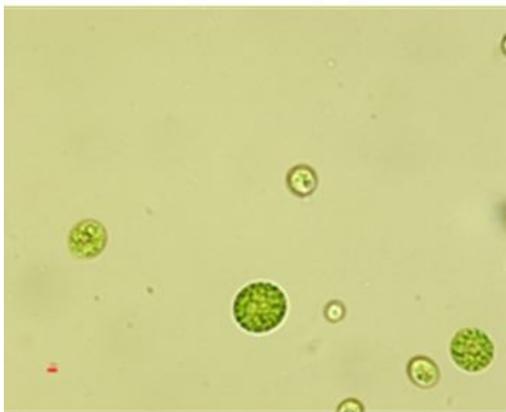
**Tavola XI**



**a**



**b**



**c**



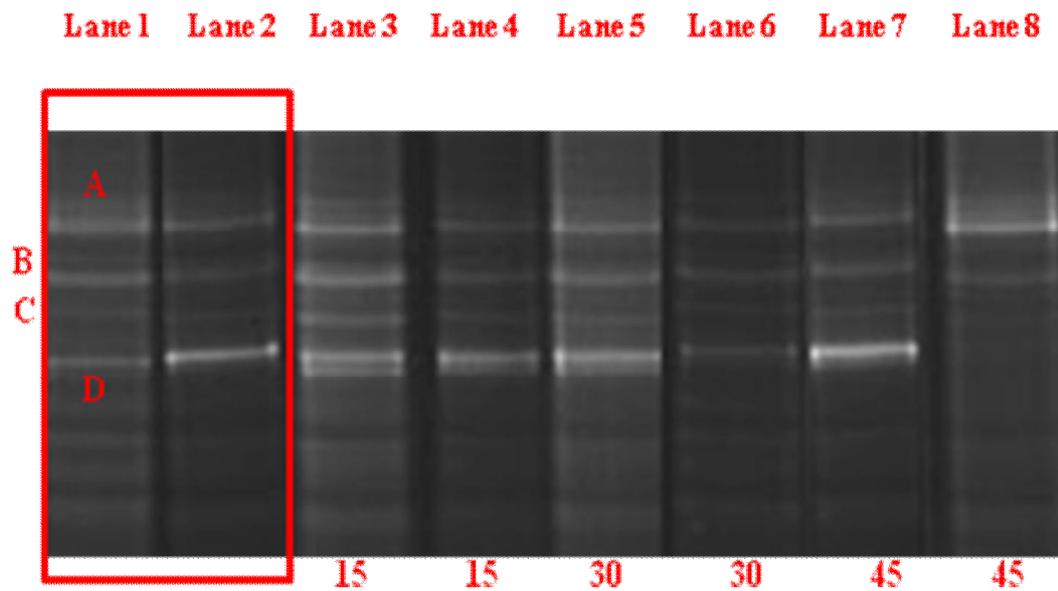
**d**

**Tavola XII: a) Tufo: *Chlorella* sp. e *Leptolygbya* sp.; b) Tufo: *Oscillatoria* sp.; c) Piperno: *Scenedesmus* sp.; d) Piperno: *Nostoc* sp.**

### **3.4 Esperimento di induzione del processo di biodeterioramento su i due campioni di Tufo e Piperno**

Da un punto di vista visivo il processo di biodeterioramento in condizioni artificiali si è sviluppato nelle stesse modalità in cui si svolge quello in condizioni naturali, infatti dopo circa quindici giorni dall'inizio dell'esperimento sono apparse le prime patine verde brillanti. Dopo circa un mese di incubazione, i campioni di pietra presentavano uno strato spesso e omogeneamente distribuito di *biofilm* verde sulla superficie superiore dei campioni di pietra. Per quanto concerne il campione di tufo, esso appariva quasi totalmente ricoperto dal *biofilm* anche nelle facce laterali, cosa che invece non si è verificata nel piperno, per le differenti caratteristiche petrografiche di cui abbiamo già discusso in precedenza (tabella VII).

Lo sviluppo del *biofilm* fotosintetico è stato monitorato poi con l'utilizzo della DGGE. I microrganismi rilevati nella coltura liquida dal clonaggio e dalla microscopia ottica sono gli stessi rilevati sui campioni in pietra, ma grazie alla DGGE è stato possibile anche verificare la presenza dei differenti biodeteriogeni presenti nelle colture liquide e confrontarle con quelle presenti nei campioni prelevati dai due substrati, tufo e piperno, ad intervalli regolari di tempo: 15, 30, e 45 giorni. Nella figura 6, è riportata l'immagine relativa al gel di corsa delle popolazioni cianobatteriche, mentre le figure 7 e 8 sono riportati i gel di corsa relativi alle alghe verdi.



**Figura 6**

**Lane 1:** *Biofilm* naturale in coltura liquida usato per l'inoculo della pietra di Tufo; Banda A *Leptolygbya* sp. Banda B *Oscillatoria* sp. ; Banda C: *Phormidium autmanle*; Banda D *Nostoc* sp.

**Lane 2 :** *Biofilm* naturale in coltura liquida usato per l'inoculo della pietra; Banda A *Leptolygbya* sp. Banda B *Oscillatoria* sp. ; Banda C: *Phormidium autmanle*; Banda D *Nostoc* sp. ;

**Lane 3, 5, 7:** profilo delle comunità microbiche dell'esperimento di colonizzazione dei campioni di pietra con indicato il tempo di raccolta del *biofilm* in giorni (Tufo)

**Lane 4, 6, 8:** profilo delle comunità microbiche dell'esperimento di colonizzazione dei campioni di pietra con indicato il tempo di raccolta del *biofilm* in giorni (Piperno)

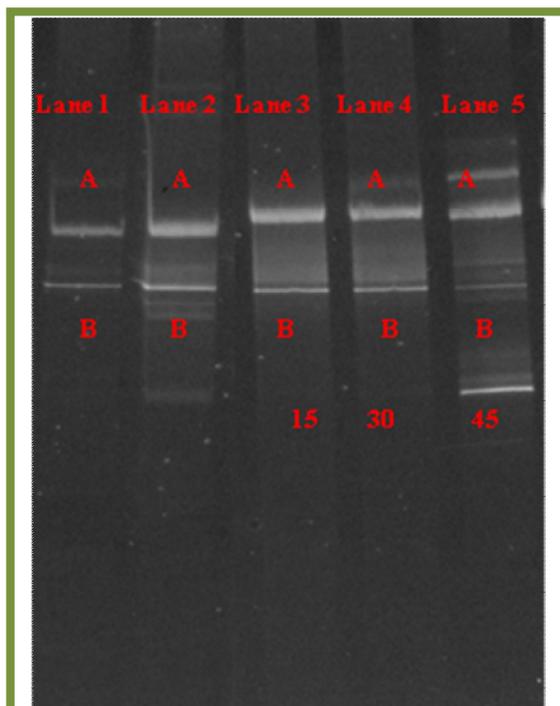


Figura 7 campione di Tufo : Lane 1: *Biofilm* naturale in coltura liquida usato per l'inoculo della pietra di Tufo ; Banda A *Chlorella* sp. Banda B *Scenedesmus* sp. ; Lane 2 : *Biofilm* naturale in coltura liquida usato per l'inoculo della pietra, di Piperno Banda A *Chlorella* sp. Banda B *Scenedesmus* sp. ; Lane 3 4 e 5 : profilo delle comunità microbiche dell'esperimento di colonizzazione dei campioni di pietra con indicato il tempo di raccolta del *biofilm* in giorni

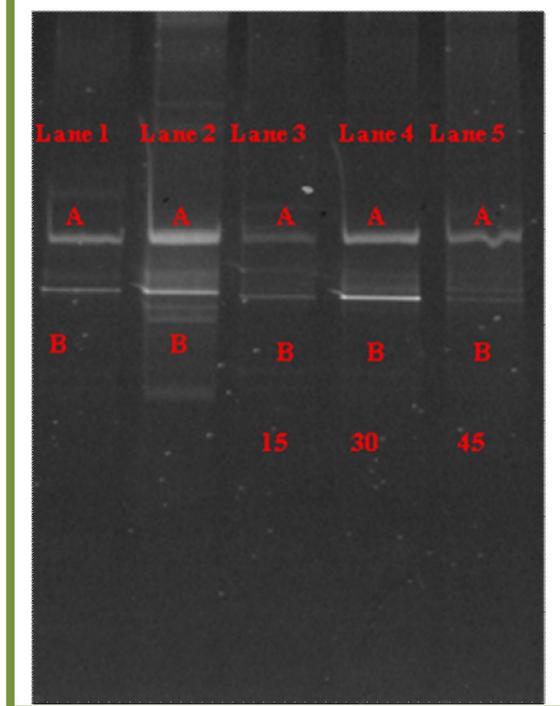


Figura 8 campione di Piperno : Lane 1: *Biofilm* naturale in coltura liquida usato per l'inoculo della pietra di Tufo; Banda A *Chlorella* sp. Banda B *Scenedesmus* sp. ; Lane 2 : *Biofilm* naturale in coltura liquida usato per l'inoculo della pietra, Banda A *Chlorella* sp. Banda B *Scenedesmus* sp. ; Lane 3 4 e 5 : profilo delle comunità microbiche dell'esperimento di colonizzazione dei campioni di pietra con indicato il tempo di raccolta del *biofilm* in giorni.

## Discussione

L'utilizzo della cella climatica ha permesso di studiare la successione ecologica ed il processo di biodeterioramento in modo più approfondito.

Lo studio della riproduzione nelle prime fasi del processo di colonizzazione dei monumenti in materiale lapideo è fondamentale per la creazione di protocolli finalizzati al restauro, recupero e conservazione del patrimonio storico artistico. Conoscere tale processo in modo dettagliato potrebbe consentire di mettere a punto una strategia di prevenzione che, essendo perfettamente in linea con le esigenze delle opere interessate dal biodeterioramento, impedisca ai biodeteriogeni di svilupparsi sulle superfici dei monumenti e di conseguenza non favorisca lo sviluppo di altri organismi molto più dannosi per l'integrità dell'opera stessa (funghi muschi e licheni).

Prima di iniziare l'inoculo sulle pietre e di avviare il processo di biodeterioramento artificiale, si è provveduto alla caratterizzazione molecolare (utilizzando primer 16s e 18s rDNA) e morfologica (microscopia ottica) del *biofilm* della coltura utilizzata come inoculo (*biofilm* del tufo e *biofilm* del piperno).

La composizione dei due *biofilm* è riportata in tabella X. Dalle immagini della DGGE (fig. 7, 8) si nota che per il tufo la presenza nel *biofilm* delle alghe verdi rimane costante sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo per i primi 30 giorni circa; verso la fine dell'esperimento, tuttavia, la presenza di *Scenedesmus* sp. tende a diminuire notevolmente: i tempi lunghi per la maturazione del *biofilm* hanno favorito una sorta di selezione all'interno del

*biofilm* stesso causandone una parziale perdita. Altrettanto si può osservare per il substrato in piperno, su cui di nuovo quest'alga tende a non essere più rintracciabile verso la fine dell'esperimento (45 giorni).

La perdita di tale organismo è dovuta al cambiamento dei parametri ambientali; infatti nell'ultima fase dell'esperimento abbiamo simulato condizioni ambientali che ricordano il periodo estivo: scarsa pioggia, alte temperature, elevata esposizione solare. Queste condizioni hanno rallentato lo sviluppo e la crescita di tale microorganismo fino alla sua quasi totale scomparsa. Tale dato risulta più evidente nel campione di piperno dove *Scenedesmus* risente maggiormente di tale stress ambientale, poiché tale substrato, per le sue caratteristiche petrofisiche, risulta più inospitale durante i periodi estivi.

Le differenze riscontrate fra i due tipi di substrato non sono qualitative, in quanto le due differenti specie di alghe verdi (*Clorella* sp. e *Scenedesmus* sp.) sono presenti in entrambi i casi, ma riguardano piuttosto i tempi di sviluppo del *biofilm* e la sua maturazione: per il piperno è necessario circa un mese affinché l'intensità delle bande nella DGGE sia paragonabile a quelle presenti sul gel di corsa del tufo dopo appena 15 giorni.

Lo stesso andamento si può riscontrare per la popolazione cianobatterica (fig.6) presente nei due *biofilm*; anche qui in quello prelevato dal piperno c'è una quasi totale perdita di due delle quattro specie caratterizzate dalla coltura liquida, già dal trentesimo giorno la banda corrispondente a *Phormidium autumnale* è quasi scomparsa, mentre al quarantacinquesimo giorno anche la banda corrispondente a *Nostoc* sp. perde notevolmente di intensità. Per il tufo invece solo per *Phormidium autumnale* si verifica una perdita dell'intensità della banda a partire dal trentesimo giorno; possiamo quindi dedurre che questa specie ha mostrato più difficoltà di

adattamento rispetto alle altre.

Dopo circa un mese e mezzo, avendo aumentato gli intervalli di tempo che ricorrevano tra una nebulizzazione e l'altra, si sono potute osservare una diminuzione nella crescita e una perdita di spessore del *biofilm* causata da una diminuzione dell'umidità relativa presente all'interno della cella climatica.

Queste osservazioni suggeriscono che la formazione del *biofilm* fotosintetico che si sviluppa su substrati lapidei dipende soprattutto da fattori ambientali (pioggia, intensità luminosa ed umidità) e dall'esposizione del monumento a tali fattori, se parzialmente riparato o completamente esposto, e dal periodo di esposizione ai fattori climatici, in particolare umidità e pioggia.

## Capitolo IV

### Metodologie di intervento per il restauro e recupero delle opere lapidee

#### 4.1 Metodi chimici

Un aspetto importante per la conservazione dei Beni Culturali è l'utilizzo di principi attivi dei biocidi al fine di ridurre e limitare la presenza di biodeteriogeni responsabili dell'alterazione e del degrado dei manufatti di interesse storico artistico (Bartolini 2000).

Questi microrganismi, già descritti nei precedenti capitoli, sono di varia natura e sono presenti in tutta l'area del Mediterraneo riuscendo ad adattarsi alle condizioni ambientali le più diversificate. La loro presenza causa sostanzialmente una impossibilità di lettura dell'opera dovuta ad una continua usura del materiale costitutivo.

L'interazione tra questi organismi e la superficie del manufatto ha una morfologia molto particolare che se non è tenuta in debita considerazione al momento della sua eliminazione può produrre danni superiori all'azione del microrganismo stesso.

Ad esempio i *biofilm* contengono quasi sempre sostanze di natura organica differentemente pigmentate che risultano essere solubili nei solventi normalmente impiegati nelle varie operazioni di restauro, per cui l'azione dei solventi può diffondere sul substrato tali sostanze organiche causando una alterazione nell'aspetto cromatico dell'opera.

La scelta dei biocidi deve essere quindi commisurata alle differenti problematiche che si possono riscontrare nella conservazione dei beni culturali. La sperimentazione diventa quindi indispensabile per cercare le soluzioni più adatte alla complessità indotta da un attacco microbiologico. Per valutare l'efficacia del biocida devono essere considerati diversi aspetti: la dose utilizzata; lo spettro di azione; e la durata della sua azione.

Un biocida per essere efficace deve quindi essere in grado di avere un ampio spettro di azione con effetti positivi che siano duraturi nel tempo, ma che allo stesso tempo non inquinino l'ambiente circostante anche se utilizzato a concentrazioni elevate.

L'utilizzo di tali sostanze su manufatti lapidei causa molto spesso alterazione cromatica, come macchie, sbiancamenti ed opacizzazioni dovute soprattutto ad interazioni che si instaurano tra il biocida e la superficie dei substrati trattati.

L'effetto negativo dei biocidi sulle superfici delle opere è in funzione di parametri quali: le caratteristiche chimiche del prodotto, la concentrazione utilizzata il tempo di esposizione della superficie del substrato allo stesso ed infine anche dalle caratteristiche chimiche e petrofisiche del substrato stesso.

Per la scelta il biocida da utilizzare nel nostro esperimento, si è fatto riferimento alla letteratura per poter optare per il più adatto al nostro substrato ed alla composizione del *biofilm* in studio, tale scelta è ricaduta sul Metatin.

## 4.2 Protocollo sperimentale con Metatin

Esperimenti condotti in laboratorio ci hanno permesso di testare l'efficacia di uno dei biocidi più diffusi in commercio: il Metatin (sale di ammonio quaternario+naftenato di tri-nbutil-stagno) (Tomaselli *et al.* 2002; Urzì *et al.* 2000). Tale prodotto è stato testato su campioni di tufo in cui si sviluppava il *biofilm* a differenti concentrazioni: 10%, 20%, 40% (Tabella XI). Ogni campione di tufo utilizzato per tale esperimento è stato poi ricondotto in ambiente naturale per verificare la sua reale efficacia. Dopo tre giorni dall'esposizione ciascun campione è stato poi ricondotto in laboratorio per verificare gli effetti positivi e negativi ottenuti dall'utilizzo del Metatin. In basso sono riportate le immagini relative a tale esperimento (Tavola XII).

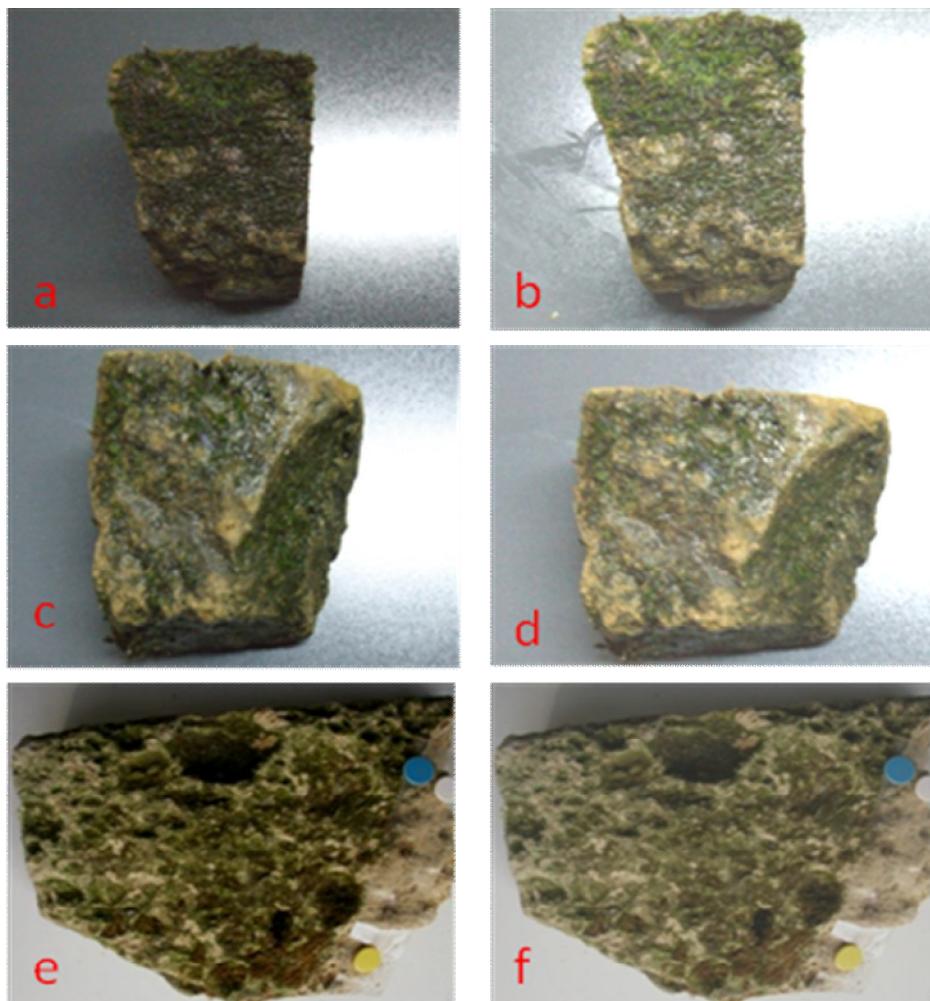
## Risultati

Come si può osservare dalle foto l'unico dei tre esperimenti condotti che ha ottenuto risultati discreti è stato quello dove la concentrazione del biocida era al 40% . Tale protocollo ha portato una diminuzione nella superficie occupata dal *biofilm* ed un minor ispessimento dello stesso. Purtroppo a tali risultati positivi si sono aggiunti anche effetti negativi: il primo riconducibile all'utilizzo di tutti i biocidi ad elevate concentrazioni, ossia l'inquinamento ambientale; il secondo invece legato al nostro campione di tufo il quale ha riportato dopo l'utilizzo del Metatin una opacizzazione e sbiancamento della superficie. Questa alterazione cromatica ci conferma un'elevata suscettibilità di questo tipo di materiale all'uso dei biocidi.

**Tabella XI**

CAMPIONE METATIN	CONTROLLO	TRATTATO
TRATTATO 10%	a	b
TRATTATO 20%	c	d
TRATTATO 40%	e	f

## Tavola XII



**Tavola XIII:** a)Controllo, b) trattato 10% dopo tre giorni; c)controllo; d) trattata 20% dopo tre giorni; e) controllo; trattata 40% dopo tre giorni.

### 4.3 Metodi fisici

Il trattamento fisico del processo di biodeterioramento su manufatti lapidei si è basato sull'utilizzo delle microonde; anche in questo caso è stato necessario uno studio preliminare della letteratura scientifica al fine di riscontrare eventuali precedenti (Yao 1970; Baranski *et al.* 1974; Lin 1979).

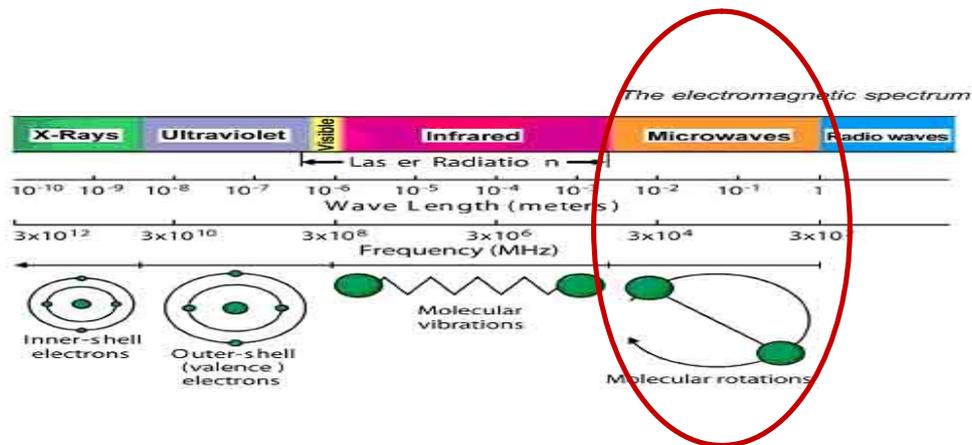


Fig 9: Spettro delle microonde

Abbiamo riscontrato che negli ultimi anni sono state messe a punto molte tecniche basate su metodi fisici poiché risultano essere meno invasive per le superfici dei substrati e soprattutto meno inquinanti. L'unico precedente riscontrato in letteratura per quanto concerne l'utilizzo delle microonde è nel caso della disinfestazione mediante riscaldamento di organismi viventi questa tecnologia è stata utilizzata in vari campi con diverso grado di successo. Le microonde possono avere, ad esempio, un' azione debiotizzante, caratteristica che è ampiamente sfruttata nel controllo e nella disinfestazione di alcuni tra i più comuni agenti infestanti come ad esempio gli insetti xilofagi, nel trattamento del legno. Le microonde non riscaldano l'aria ma invece hanno la capacità di agire direttamente sia sulla superficie del materiale sia al suo interno. Questo

grazie alla forte sensibilità dell'acqua all'assorbimento della frequenza delle microonde, che permette di riscaldare anche a discrete profondità un materiale che è ricco d'acqua senza che gli oggetti che lo circondano si riscaldino apprezzabilmente (se non per conduzione termica). Con la sperimentazione di tale tecnica è stato possibile verificare che a temperature superiori a 53 °C, si sono rivelate letali per ogni forma vitale degli insetti xilofagi (uova, larva, adulto), e tali condizioni possono essere raggiunte nell'insetto mantenendo però la temperatura del legno a valori di sicurezza.

Lo strumento che è in grado di realizzare il trasferimento della potenza alle microonde deve essere ovviamente scelto in base al trattamento, con l'obiettivo di indurre un riscaldamento selettivo che provochi un innalzamento termico della zona infestata ma con minimo stress del materiale circostante. Attualmente esistono alcune aziende italiane che producono sistemi per la disinfestazione a microonde di vari tipi di materiale. Per il trattamento a microonde di materiali lapidei infestati da biodeteriogeni (muschi, licheni, muffe etc.) si tratta invece di valutare la potenza, per poter mettere a punto un nuovo setup di prodotto che è in grado di rispondere alle diverse esigenze di trattamento.

#### 4.4 Protocollo sperimentale con le microonde

Nell'ambito del progetto di dottorato mi sono occupata anche della realizzazione di un protocollo di eliminazione di bioincrostazioni su materiali lapidei attraverso l'uso delle microonde. Tale protocollo è stato messo a punto attraverso una collaborazione tra il nostro dipartimento e il Laboratorio di Compatibilità Elettromagnetica del Dipartimento di Ingegneria Elettrica della Facoltà di Ingegneria del nostro Ateneo. Gli esperimenti sono stati condotti all'interno della camera semianecoida del suddetto dipartimento. La camera dispone di un'apparecchiatura formata da una antenna (Fig. 10), per l'applicazione del campo al campione, collegata ad un generatore di microonde, un amplificatore a radiofrequenza.



**Fig.10 : Antenna e camera semianecoida**

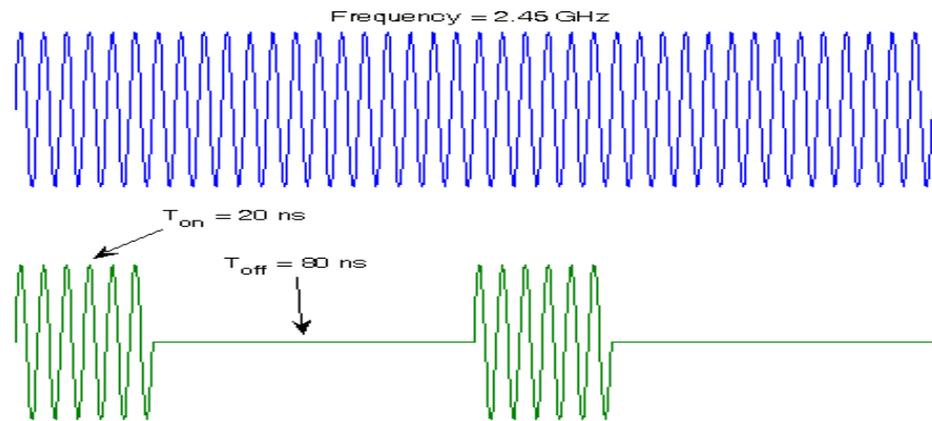
Per valutare i reali effetti che l'esposizione alle microonde ha sui campioni di *biofilm* sono stati realizzati due protocolli sperimentati in cui sono state utilizzati due differenti varietà di campo elettromagnetico ma con livelli di campo simili (Tabella XII). È importante sottolineare che ciascun protocollo è stato condotto in triplice copia, al fine di valutarne la reale efficacia.

**Tabella XII**

<b>Campo Elettromagnetico ad onda continua</b>	<b>Campione 1</b>	<b>Campione 2</b>	<b>Campione 3</b>
<b>Potenza V/m</b>	<b>350 V/m</b>	<b>340 V/m</b>	<b>340 V/m</b>
<b>Campo Elettromagnetico Con treno di impulsi (200 ns/20ns)</b>	<b>Campione 1</b>	<b>Campione 2</b>	<b>Campione 3</b>
<b>Potenza V/m</b>	<b>340 V/m</b>	<b>350 V/m</b>	<b>340 V/m</b>

Inizialmente per la sperimentazione delle microonde abbiamo seguito le stesse procedure usate nella disinfestazione delle termiti, ma alle potenze ottenibili con la strumentazione impiegata in tale protocollo si arriva alla applicazione di livelli di campo dell'ordine dei 300/350 V/m. Tali potenze non consentono un innalzamento della temperatura pari a quello utilizzato nel protocollo della disinfestazione delle termiti.

Allora si è pensato di utilizzare per gli esperimenti un campo elettromagnetico sinusoidale sempre ad una potenza di campo dell'ordine dei 300/350 V/m, a frequenza di 2.45 GHz la cui ampiezza è però modulata con un treno di impulsi di periodo 200 ns e durata del singolo impulso pari a 20 ns (Fig. 11) a cui sono stati esposti i campione.



**Fig. 11: Frequenza ed intervallo degli impulsi nel campo elettromagnetico**

Il tempo di esposizione delle pietra in tufo è stato di circa 6 ore, a cui è seguito un tempo di riposo di tre giorni, prima di valutare gli effetti reali dell'esposizione del campione al campo elettromagnetico.

E' importante sottolineare che i campioni di rocce sono stati trattati in laboratorio ma successivamente al trattamento sono stati riposti nel loro ambiente naturale e monitorati fino ad un periodo di tre mesi, per poter verificare gli effetti di tale metodologia anche a lungo termine.

Nei risultati sono riportate le immagini relative ai due protocolli sperimentali.

## Risultati

Il primo esperimento, quello basato solo sull'applicazione delle microonde ad una potenza 300/350 V/m ma senza impulsi non ha sortito grossi effetti (Tavola XIII campione A); mentre il secondo esperimento basato sull'utilizzo di microonde con treno di impulsi generati ad intervalli regolari ha ottenuto un discreto successo (Tavola XIII campione B).

Dalle immagini si può osservare la notevole diminuzione della superficie occupata dal *biofilm* dopo tre giorni dall'esposizione alle microonde. Si osserva inoltre un'assoluta assenza di effetti indesiderati nell'utilizzo di tale tecnica, come invece osservato nel protocollo sperimentale del Metatin. Qui non si rileva alcuna alterazione cromatica delle superfici del substrato e non si è riscontrata alcuna perdita di materiale che poteva essere indotta dall' utilizzo di tale tecnica. Dall'ultima foto, relativa al campione B, si può inoltre osservare che dopo tre mesi dall'esposizione non solo non è stata osservata ricrescita di *biofilm* sul substrato ma anzi la sua presenza è diminuita nel tempo decretando un effetto positivo anche a lungo termine.

Tale protocollo sperimentale è stato anche utilizzato sui campioni di tufo e piperno su cui era stato indotto il processo di biodeterioramento per poter verificare soprattutto gli stessi effetti positivi sul piperno.

Come si può osservare dalle foto (Tavola XIV) in questo caso il risultato è stato migliore ed anche più immediato grazie all'assenza dei muschi sulle superfici dei materiali. Infatti tale tecnica si è dimostrata molto efficace sui microorganismi da me analizzati nel lavoro di tesi ossia le alghe e cianobatteri.

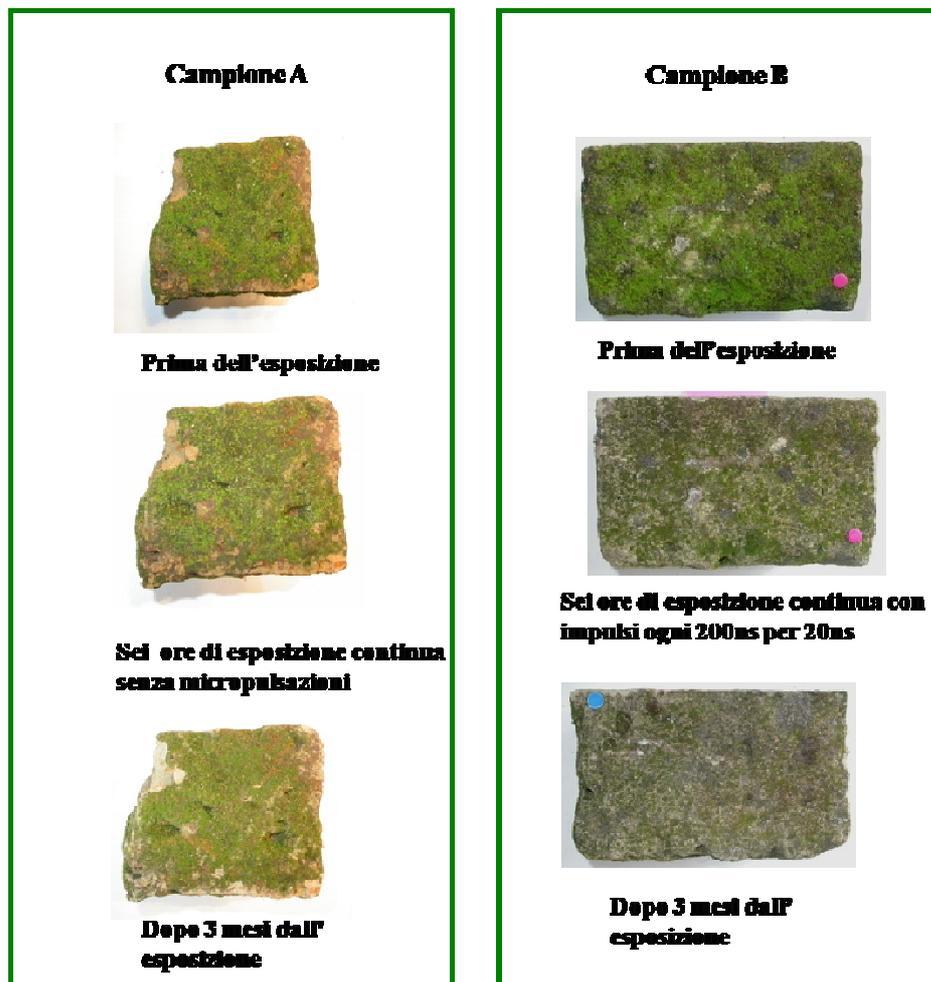
Per poter validare un dato puramente visivo con dati oggettivi, frammenti del *biofilm* sono stati prelevati dal substrato della roccia tufacea e del piperno sottoposte a tale trattamento, e sono stati poi analizzati al microscopio ottico prima e dopo l'esposizione; in questo modo è stata effettuata una conta cellulare dei microrganismi presenti nel *biofilm*, cianobatteri e microalghe, rilevabili con una risoluzione massima del 100X.

I campioni di *biofilm* prelevati prima e dopo l'esposizione alle microonde, sono stati risospesi in un volume noto (50 ml) di terreno di coltura ed infine analizzati al microscopio ottico. Attraverso la conta cellule effettuata con la camera di Burker è stato possibile rilevare la diminuzione delle specie, sia per le popolazioni cianobatteriche che algali, all'interno dei *biofilm* trattati.

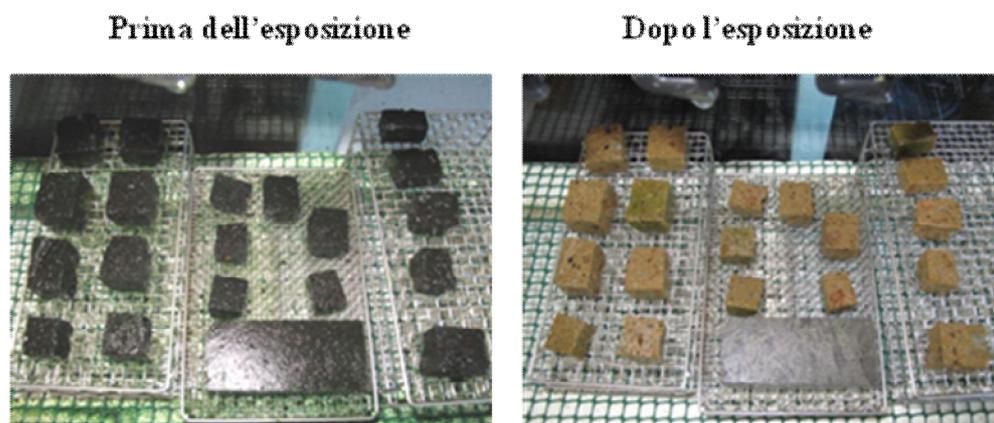
Ciò che abbiamo potuto osservare che tra queste due specie, quelle maggiormente sensibili erano soprattutto le alghe, dove la mortalità è stata dopo tre giorni dall'esposizione alle microonde è stata quasi del 60%; mentre per i cianobatteri è stata rilevata una mortalità di circa il 40%.

Da queste ultime osservazioni si può concludere che tale tecnica si è dimostrata molto efficace nell'eradicazione delle bioincrostazioni presenti sulle superfici del tufo e del piperno senza causare danni estetici e strutturali ai materiali utilizzati in tale protocollo sperimentale.

### Tavola XIII



### Tavola XIV



Campioni di tufo e piperno su cui era stato indotto il processo di biodeterioramento

## Conclusioni Generali

Questa tesi ha affrontato i diversi aspetti del processo di biodeterioramento causato dalla crescita di microorganismi foto autotrofi e che si è osservato sui monumenti campani costituiti in rocce di origine vulcanica quali il tufo ed il piperno.

Identificare i microorganismi coinvolti in tale processo è stato uno dei passi più importanti per lo studio dell'ecologia microbica dei *biofilm* presenti sui monumenti oggetto di tale lavoro di tesi.

L'identificazione delle popolazioni cianobatteriche e algali presenti nei *biofilm* raccolti dalle superfici degli otto monumenti presi in esame, è stata possibile grazie all'ausilio di diverse tecniche di indagini quali microscopia ottica ed elettronica, e tecniche di biologia molecolare.

Queste ultime hanno costituito un notevole vantaggio nella caratterizzazione delle popolazioni microbiche dei *biofilm* analizzati in questo lavoro di tesi consentendomi oltre che una conoscenza precisa e dettagliata della composizione microbica dei *biofilm* mi hanno anche permesso di seguire il loro sviluppo evolutivo e la loro suscettibilità ai differenti parametri ambientali nell'esperimento di induzione del processo di biodeterioramento in condizioni artificiali di crescita, soprattutto grazie all'ausilio della tecnica della DGGE che ha delineato i diversi profili di crescita durante i 60 giorni dell'esperimento.

La diversità della specie fototrofiche rilevata nel mio lavoro di tesi è molto simile a quella osservata in altri studi effettuati su monumenti storici costituiti in differenti materiali di costruzione (calcare, granito, arenaria,

travertino, marmo) e situati nell'arco bacino del mediterraneo.

Le analisi petrofisiche e petrochimiche hanno poi delineato due diversi profili dei materiali di costruzione presi in esame, caratteristiche che hanno notevolmente influenzato la distribuzione dei *biofilm* durante i differenti periodi dell'anno, ma senza invece essere determinanti nella sua composizione microbica, delineando in questo modo una aspecificità per il substrato. Gli elevati valori del coefficiente di assorbimento capillare dell'acqua, della permeabilità, della rugosità e della porosità del tufo rispetto al piperno lo rendono sensibilmente molto più predisposto al deterioramento biologico rispetto al piperno.

Tutti questi step sono stati fondamentali nella messa a punto delle due strategie per la prevenzione ed il recupero dei monumenti interessati al fenomeno del biodeterioramento.

Il primo protocollo sperimentale basato sull'uso del biocida Metatin ha causato un'alterazione cromatica delle superfici che ha reso questa tecnica inutilizzabile per quanto concerne l'eradicazione del *biofilm* da superfici tufacee. Invece la sperimentazione dell'uso delle microonde ad onda pulsata ha ottenuto ottimi risultati non solo nell'eliminazione delle bioincrostazioni ma non ha causato alcuna alterazione sia cromatica che strutturale nei campioni di pietra esposti al campo elettromagnetico.

Questi risultati sono stati possibili grazie ad un lavoro multidisciplinare che si rende sempre più indispensabile nello studio del fenomeno del biodeterioramento e nella realizzazione di protocolli sperimentali che siano effettivamente rispondenti alle esigenze dei monumenti interessati da tali processi.

Per concludere la ricerca interdisciplinare ha consentito e consente una conoscenza molto più approfondita del fenomeni biologici che interessano il patrimonio storico artistico ma permette anche di fornire strumenti necessari per l'attuazione di strategie che siano mirate alla conservazione del nostro patrimonio culturale sempre più innovative e meno invasive.

## BIBLIOGRAFIA

**ALISIO G.C.**, 1965. L' ambiente di Piazza Dante in antichi rilievi inediti, in Napoli Nobilissima, vol. IV, fascicoli V e VI, Napoli, pp. 185-192.

**ALTIERI A.**, Pietrini A.M., Ricci S., Roccardi A., 2000. The temples of the archaeological area of Paestum (Italy): a case study on biodeterioration. In: Fassina, V., (Ed), Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Elsevier, Venice, pp. 433-443.

**ALVAREZ A.**, Argemì M., Laorden V., Domenech X., Verbal J., Navarro A., Prada J. L., Puges M., Rocabayera R., Vilaseca L. 1994. Physical, chemical and biological weathering detected in the romanic portal of the Sant Quirze de Pedret church (XIIc.). In: Fassina, V., Ott, H., Zezza, F. (Eds), Proceedings of the 3rd International Symposium on the conservation of monuments in the Mediterranean Basin, Venice, Soprintendenza ai Beni Artistici e Storici di Venezia, pp. 365-369.

**ANAGNOSTIDIS K.**, Economou-Amilli A., Roussomoustakaki M., 1983. Epilithic and chasmolithic microflora (Cyanophyta, Bacillariophyta) from marbles of the Parthenon (Acropolis-Athens, Greece). Nova Hedwigia 38, 227-287.

**ANAGNOSTIDIS K.**, Gehrman C.K., Gross M., Krumbein W.E., Lisi S., Pantazidou A., Urzì C., Zagari M., 1991. Biodeterioration of marbles of the Parthenon and Propylaea, Acropolis, Athens – Associated organisms, decay and treatment suggestions. In: Decrouez, D., Chamay, J., Zezza, F. (Eds), Proceedings of the 2nd International Symposium on the conservation of monuments in the Mediterranean Basin, Geneve (Switzerland), Ville de Geneve-

Museum d'Histoire Naturelle & Musee D'Art et d'Histoire, pp. 305-325.

**ASCASO C.**, Wierzchos, J., Souza-Egipsy, V., De Los Ríos, A., Rodrigues, J.D., 2002. In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonatic rock of the Jeronimus Monastery, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, pp. 1.

**ASCASO C.**, Garcia Del Cura M.A., De Los Rios A., 2004. Microbial *biofilms* on carbonate rocks from a quarry and monuments in Novelda (Alicante, Spain). In: Clair, S., Seaward, M. (Eds), *Biodeterioration of Stone Surfaces*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 79-98.

**BALDRIAN P.**, Valášková V., May 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* Volume 32, Issue 3, pages 501–521.

**BARBERI F.**, Cassano E., La Torre P. Sbrana A., 1991. Structural evolution of Campi Flegrei Caldera in light of volcanological and geophysical data. *J. Volcanol. Geotherm. Res.*, 48 (1/2), pp. 33-49.

**BARANSKI S.**, Szmigielski S., Moneta J., 1974. Effects of microwave radiation in vitro on cell membrane permeability. In: *Biological effects and health hazards of microwaves*, p. 173. Edited by P. Czerski, K. Ostrowski, M. L. Shore, Ch. Silverman, M. J. Suess, and B. Waldesckog. Polish Medical Publishers.

**BARTOLINI A.**, 2000. Resistance to biodeterioration of some chimica products used for rising damp barrier, in Galan E., Zezza F., *Protection and conservation of the Cultural Heritage of the Mediteranean Cities. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium of the Conservation of the Monuments in the Mediterranean Basin*, Siviglia, pp. 397-400.

- BERTHLEIN J.**, 1983. Microbial weathering processes, in: KRUMBEIN W.E., (Ed.), *Microbial Geochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- BISCHOFF H.W.**, Bold, H.C. 1963. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological Studies IV. Univ. Texas Publ.* 6318: 1-95.
- BOLIVAR, F.C., Sanchez-Castillo P.M., 1997. Biomineralization processes in the Fountains of the Alambra, Granada, Spain. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40, 205-215.
- BULLINI L.**, Pignatti S., Virzo De Santo A. 1998. Ecosistemi artificiali in *Ecologia generale*. UTET, Torino , pp. 436-439.
- CALCATERRA D.**, Cappelletti P., Colella A., D'Albora M.P., De Gennaro M., De Gennaro R., Langella A., Morra V., 2000. Mineralogical and technological characterization of "Piperno", a widely used building stone of Napoli (Italy), in Rammlmair D., Mederer J., Oberthur Th., Heiman R.B, Pentinghaus H., *Applied Mineralogy in Research, Economy, Technology, Ecology and Culture*, 2, Balkema, Rotterdam, pp. 963-966.
- CALCATERRA D.**, Langella A., De Gennaro R., De' Gennaro M., Cappelletti P., 2005. Piperno from Campi Flegrei: a relevant stone in the historical and monumental heritage of Naples (Italy), in *Enviromental Geology*, Springer-Verlag, Vienna, pp. 341-352.
- CANEVA G.**, Salvadori O., 1989. Biodeterioration of stone, in LARRAINI L., PIEPER R., (Eds.), *The Deterioration and Conservation of stone*. UNESCO, Paris.
- CANEVA G.M.**, Nugari M.P., Salvadori O., 1991. *Biology in the Conservation of Works of Art*, ICCROM, Rome.
- CANEVA G.**, Nugari M.P., Pinna D., 1996. *Il controllo del degrado biologico*.

Nardini Editore, Firenze.

**CANEVA G.**, Nugari M.P., Salvadori O., 2002. La biologia nel restauro. Nardini Editore, Firenze..

**CANEVA G.**, Nugari M.P., Salvadori O., 2007. La biologia vegetale per i beni culturali. Biodeterioramento e conservazione, vol I, Nardini, Firenze 2007.

**CASCELLA S.**, 2002, Il teatro romano di Sessa Aurunca, Caramanica Editore, Marina di Minturno (Lt).

**COMMISSIONE Normal** 1991. Raccomandazioni Normal: 1/88 Alterazioni macroscopiche dei materiali lapidei: lessico. Roma: C.N.R. - I.C.R..

**CASTENHOLZ W.**, 1988. Culturing methods for Cyanobacteria. In: L. Packer and A.N. Glazer, eds., Cyanobacteria. Methods of Enzymology 167, 68-93.

**CRISPIM C.A.**, Gaylarde P.M., Gaylarde C.C., 2003. Algal and cyanobacterial *biofilms* on calcareous historic buildings. Current Microbiology 46, 79-82.

**CRISPIM C.A.**, Gaylarde C.C., 2005. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: A review. Microbial Ecology 49, 1-9.

**DAVEY M.E.**, O'toole G.A. 2000. Microbiology and Molecular Biology Reviews, December Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All rights reserved. Microbial *Biofilms*: from Ecology to Molecular Genetics Department of Microbiology, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire 03755 Vol. 64, No. 4 p. 847-867.

**DECHO A.W.**, 2000. Microbial *biofilm* in intertidal systems an overview, Cont. Shelf. Res 20, pp.1257-1273.

**DE CARO S.** 2002. I Campi Flegrei, Ischia, Vivara: storia e archeologia. Electa Napoli.

**DE FRANCISCIS A.**, 1963, Il Museo Nazionale di Napoli, Cava dei Tirreni.

DE FUSCO R., Bruno G., 1962 Alvino E., Architetto e urbanista napoletano dell' 800, Napoli.

**DE GENNARO M.**, Franco E., Rossi M., Langella A., Ronca A., 1987. Epigenetic minerals in the volcanoclastic deposits from central-southern Italy: a contribution to zeolite genesis. *Rendiconti Accademia di Scienze Fisiche e Matematiche*, Special Issue, Liguori, Napoli

**DE GENNARO M.**, Colella C., Langella A., Cappelletti P., 1995. Decay of Campanian Ignimbrite stoneworks in some monuments of the Caserta area. *Sci. Technol.Cultural Heritage* 4 (2), pp. 75-86.

**DE GENNARO M.**, Cappelletti P., Langella A., Perrotta A., Scarpati C., 2000. Genesis of zeolites in the Neapolitan Yellow Tuff: geological, volcanological and mineralogical evidence *Contrib Mineral Petrol* 139: 17±35.

**DEL PRETE S.**, 2005. Le cave ipogee di piperno. In Russo N., Del Prete S., Giulivo I., Santo A. editors: *Grotte e speleologia della Campania*, Sellino ed. Avellino, pp. 184-185).

**DIEZ B.**, Pedros-Alio C., Marsh T.L., Massana R., 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and environmental microbiology* 67, 2942-2951.

**DI BONAVENTURA M.P.**, Del Gallo M., Cacchio P., Ercole C., Lepidi A., 1999. Microbial Formation of Oxalate Films on Monument Surfaces: Bioprotection or Biodeterioration *Geomicrobiology Journal*, Volume 16, Issue 1 February , pages 55 – 64.

**DI GIROLAMO P.**, 1968. Petrografia dei Tufi campani:il processo di pipernizzazione (tufo → tufo piperno ide → piperno), XXXV, *Rendiconti*

Accademia di Scienze Fisiche e Matematiche, s. IV, Giannini, Napoli.

**DOMINIC W.**, Wong S., 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 157:174–209.

**DORNIEDEN T.**, Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., 2000. e al. Biodecay of cultural heritage as a space/time – related ecological situation - an evaluation of a series of studies, *Biodeterioration & Biodegradation* 46, pp. 261-270.

DOYLE J.J., and DOYLE J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues, *Phytochem Bull.* 19, pp.11-15.

DOYLE J.J., and DOYLE J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus* 12, pp. 13-15.

**DUPUY P.**, Trotet G., Grossin F., 1976. Protection des monuments contre les cyanophyces en milieu abrite et humide. In: *The Conservation of Stone I.*, Rossi-Manaressi, R. (Ed), Centro per la Conservazione delle Sculture all'Aperto, Bologna, pp. 205-219.

**EDWARDS H G.M.**, Russell N.C., Seaward M.R.D., Slarke D., November 1995. Lichen biodeterioration under different microclimates: an FT Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Volume 51, Issue 12, 16 Pages 2091-2100.

GARTY J., 1990. Influence of epilithic microorganisms on the surface temperature of building walls, *Can. J. Bot.* 68, pp. 1349-1353.

**GIACCONE G.**, Einaldi M.L.V., Giacobini C., 1976. Forme biologiche delle alghe esistenti sulle sculture all'aperto. In: Rossi-Manaresi (Ed), *The conservation of stone I. Proceedings of the International Symposium on the Conservation of Stone.* Bologna (Italy), Centro per la conservazione delle sculture all'aperto, pp. 245-256.

**GOLUBIC S.**, 1993. The relationship between blue-green algae and carbonate deposits. In CARR N.G., WITTON B.A. (eds.), *The Biology of blue-green algae*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 434-472.

**GOLUBIC S.**, 1969. Distribution, taxonomy and boring patterns of marine endolithic algae. *Am. Zool.* 9, pp. 747-751.

**GOMEZ-ALARCON G.**, Munoz M., Arino X., Ortega-Calvo J.J., 1995. Microbial communities in weathered sandstones: the case of Carrascosa del Campo church, Spain. *Science of the Total Environment* 167, 249-254.

**GONZALES J.M.**, 2003. Overview of existing molecular techniques with potential interest in cultural heritage. In SAIZ JIMENEZ C, (Ed.), *Molecular biology and cultural heritage, proceedings of International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage*, Servilla, Balkema Publisher, Lisse (NL) pp. 3-14.

**GUILLETTE O.**, 1995. Biorreceptivity: a new concept for building ecological studies, *The Science of the total Environment*, 167.

**HOSHINA R.**, Kamako S.-i., Imamura N., 2004. Green Algae in *Paramecium bursaria* Ehrenberg from Japan *Plant Biology* Volume 6, Issue 4, pages 447–453, Phylogenetic Position of Endosymbiotic.

**HUECK K.J.**, 1965. The deterioration and Conservation of stone. UNESCO Paris.

**HUECK K.J.**, 1968. The Biodeterioration of materials as part Hylobiology. *Mater. Org.* 1(1), (5-34).

**JAIN K.K.**, Mishra A.K., Singh T., 1993. Biodeterioration of stone: a review of mechanism involved, in *Recent advances in Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 1, Ed. GARG K. L., GARG N., and MUKERJI K.G.,

Calcutta Naya Prokash, pp. 323-354.

**KOESTLER R.J.**, Warscheid T., Nieto F., 1997. Biodeterioration risk factors and their management. In BAER N.S, SNETHLAGE R. (Eds.), Saving our architectural heritage: the conservation of historic stone structures, John Wiley & Sons Ltd., pp. 25-36.

**KRUMBEIN W.E.**, 1983. Microbial Geochemistry. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

**KRUMBEIN W.E.**, 1988. Microbial interactions with mineral materials. In: Houghton, D.R., Eggins, S. (Eds.), Biodeterioration 7, Elsevier Applied Science, pp. 78-100.

**LAMENTI G.**, Tiano P., Tommaselli L., 2000. Microbial communities dwelling on marble statues. In: M. Monte (ed.), Euromarble, Proc. 8th Workshop EURO CARE-EUROMARBLE EU 496. CNR, Rome (October 15-18, 1997): 83-87.

**LAMENTI G.**, Tommaselli L., 2003. Cyanobacteria and biodeterioration of monumental stones. Molecular Biology and Cultural Heritage

LARRY L., Clair St., Seaward M.R.D., 2004, Biodeterioration of stone surfaces lichens and *biofilm* as weathering agents of Rock and Cultural Heritage Kluwer Academic publishers.

**LEITE MAGALHAES S.**, 2000. Biodeterioração de um monumento da cidade de Braga. Estudo microbiológico da pedra granítica. MScE thesis, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

**LEITE MAGALHAES S.**, Sequeira Braga M.A., 2000. Biological colonization features on a granite monument from Braga (NW, Portugal). In: Fassina, V. (Ed), Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and

Conservation of Stone, Amsterdam, Elsevier, pp. 521–529.

**LELITTLE B.J.**, e al., 1991. *Biofilms*: an ESEM evaluation of artefacts introduced during SEM preparation. *J.Ind. Microbial*, , pp. 213-22.

**LIN J.C.**, Ottenbreit J ., Wang S ., Inone S., Bollinger R.O., Fracassa M., 1979. Microwave effects on granulocyte and macrophage precursor cells of mice in vitro. *Radiat. Res.* 80). 292.

**MAY E.**, Lewis F.J., Pereira, S., Tayler, S., Seaward, M.R.D., Allsopp D., 1993. Microbial deterioration of building stone – a review. *Biodeterioration Abstracts* 7,109-123.

**MILLER A.**, Macedo M.F., 2006. Mapping and characterization of a green *biofilm* inside of Vilar de Frades Church (Portugal). In: Fort, R., Alvarez de Buergo, M., Gomez-Heras, M., Vazquez-Calvo, C., (Eds), 1st International Conference Heritage, Weathering and Conservation, Taylor and Francis, London, pp. 329-335.

**MILLER A.Z.**, Dionisio A., Macedo M.F., 2006. *Primary bioreceptivity: A comparative study of different Portuguese lithotypes*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57, 136-142.

**MILLER A.Z.**, Laiz L., Gonzalez J.M., Dionísio A., Macedo M.F., Saiz-Jimenez C., 2008. Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions, *Science of The Total Environment* Volume 405, pp. 278-285.

**MILLER A.Z.**, Dionísio A., Laiz L., Macedo M.F., Saiz-Jimenez, C. 2009. The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. *Annals of Microbiology* 59, 1-9.

**MILLER A.Z.**, Laiz L., Dionísio A., Macedo M.F., Saiz-Jimenez, C. 2009.

Growth of phototrophic *biofilms* from limestone monuments under laboratory conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 860-867.

**MORTON L.H.G.**, Surman, S.B., 1994. *Biofilms* in biodeterioration a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 32, 203–221.

**MUYZER G.**, De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16Sr RNA, *Appl. Environ. Microbiol* 59, pp. 695-700.

**NIMIS P.L.**, Pinna D., Salvadori O., 1992. Licheni e conservazione dei monumenti. Bologna, CLUEB.

**NORMAL 3/80.** Materiali lapidei: campionamento. CNR – ICR, Comas grafica, Roma 1980.

**NORMAL 1/85.** Alterazioni macroscopiche dei materiali lapidei: lessico. CNR - ICR, Comas grafica, Roma 1985.

**ORTEGA-CALVO J.J.**, Sanchez-Castillo P. M., Hernandez-Marine M., Saiz-Jimenez C., 1993. Isolation and characterization of epilithic chlorophytes and cyanobacteria from two spanish cathedrals (Salamanca and Toledo). *Nova Hedwigia* 57, 239-253.

**PANTAZIDOU A.**, Theoulakis P., 1997. Cyanophytes and associated flora at the neoclassical Palace of Sts George and Michael in Corfu (Greece). Aspects of cleaning procedures. In: Moropoulou, A., Zezza, F., Kollias, E., Papachistodoulou, I. (eds), *Proceedings of the 4th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin*, Rhodes, Technical Chamber of Greece, pp. 355-368.

**PAOLILLO L.**, Giudicianni I., 2009. La diagnostica nei Beni Culturali.

Moderni metodi di indagine, Loghia, Napoli.

**PEREIRA DE OLIVEIRA B.**, Miller A., Sequeira Braga M.A., Macedo M.F., Dionisio A., Silveira T., 2008. Characterization of dark films in granites. The case study of Igreja da Ordem de São Francisco in Oporto (Portugal). In: Urzì, C. (Ed), Proceedings of the 14th Interational Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Messina (Italy), International Biodeterioration and Biodegradation Society, p. 72.

**REGINA V.**, Napoli 2004. Le chiese di Napoli. Viaggio indimenticabile attraverso la storia artistica, architettonica, letteraria, civile e spirituale della Napoli sacra.

**RICCI S.**, Pietrini A.M., 1994. Caratterizzazione della microflora algale presente sulla Fontana dei Quattro Fiumi, Roma. In: Fassina, V., Ott, H., Zezza, F. (Eds), Proceedings of the 3rd International Symposium on the conservation of monuments in the Mediterranean Basin, Venice, Soprintendenza ai Beni Artistici e Storici di Venezia, pp. 353-357.

**RODNEY M.**, Donlan E., 2002. *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. Infect Dis. September; 8(9): 881–890.

**SAIZ-JIMENEZ C.**, 1999. Biogeochemistry of weathering processes in monuments. Geomicrobiology Journal 16, 27-37.

**SALVADORI, O.**, Sorlini, C., Zanardini, E., 1994. Microbiological and biochemical investigations on stone of the Ca' d'Oro facade (Venice). In: Fassina, F., Ott, V., ZEZZA, F. (Eds), Proceedings of the 3rd International Symposium on the conservation of monuments in the Mediterranean Basin, Venice, Soprintendenza ai Beni Artistici e Storici di Venezia, pp. 343-347.

**SANMARTIN P.**, Aira N., Devesa-Rey R., Silva B., Prieto B., 2010.

Relationship between color and pigment production in two stone *biofilm*-forming cyanobacteria Biofouling, Volume 26, Issue 5 , pages 499 – 509 26 April 2010 (Nostoc sp. PCC 9104 and Nostoc sp. PCC 9025)

**SANTOS M.F.A.**, 2003. Optical microscopy of the microbial samples collected on the cloisters of church of Santa Cruz in Coimbra (Portugal). Internal Report, Coimbra, Universidade de Coimbra (Portugal).

**SARRO' M.I.**, Garcia A.M., Rivalta V.M., Moreno D.A., Arroyo I., 2006. Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada(Spain). Building and Environment 41, 1811-1820.

**SUTTON N.A.**, Hughes N., Handley P.S., 2008. A comparison of conventional SEM techniques, low temperature SEM and electroscan wet scanning electron microscopy to study the structure of a *biofilm* of Streptococcus crista C3, J. Appl. Bacteriol 76, 1994, pp. 448-454.

**TIANO P.**, 1995. Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules. Studies in Conservation, 40, 171–176,

TIANO P., 1998. Biodeterioration of Monumental rocks: decay mechanisms and control methods. Science and Technology for Cultural Heritage 7, 19-38.

**TOMASELLI L.**, Tiano P., Lamenti G., 2000. Occurrence and fluctuation in photosynthetic biocoenoses dwelling on stone monuments. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Eds), Of Microbes and Art – The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage, Kluwer Academic, New York, pp. 63-76.

**TOMASELLI L.**, Lamenti G., Bosco M., Tiano P., 2000. Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. International Biodeterioration and Biodegradation 46, 251-258.

**TOMASELLI L.**, Lamenti G., Tiano P., 2002. Chlorophyll fluorescence for evaluating biocide treatments against phototrophic biodeteriogens. *Annals of Microbiology* 52, 197-206.

**URZI' C.**, Krumbein W.E., Warscheid T., 1991. On The question of biogenic colour changes, in Decrouez D, Chamay J, Zezza F. La conservation des monuments in Decrouez D, Chamay J, Zezza F. La conservation des monuments dans le basin de la Méditerranée, Actes du 2ème symposium international, Genève 19-21 novembre 1991, Genève.

**URZI' C.**, De Leo F., Galletta M., Salamone P., 2000. Efficiency of biocide “in situ” and “ in vitro” treatment. Study case of the “temple De Mudejar”, Guadalupe, Spain. 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Vol. 1 pp 531-539.

**URZI' C.**, Albertano P., 2001. Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments, in Doyle R.J (Eds.) *Methods in Enzimology*, Vol. 336, Academic Press, S. Diego CA, pp. 340-355.

**URZI' C.**, 2003. Multiple approaches to study the structure and diversity of microbial communities colonizing artistic surfaces. In Saiz Jimenez C. (Ed.), *Molecular Biology and Cultural Heritage proceedings of International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage*, Servilla, Balkema Publisher, Lisse (NL), pp. 187-194.

**VAN DEN HOECK C.**, Mann D.G., Jahns H.M., 1995. *Algae: an introduction to phycology*, Cambridge, University Press, Cambridge pp. 1-627.

**WARSCHEID T.**, 2000. Integrated concepts for the protection of cultural artifacts against biodeterioration. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Eds) *Of microbes and Art – The role of microbial communities in the degradation and*

protection of cultural heritage, Kluwer Academic, New York, pp. 185-201.

**WIGGINS P.M.**, 1990. Role of water in some biological processes, Microbiological Review, vol 54, , pp. 432-439.

**YAO K.T.S.**, Jiles M., 1970. Effects of 2450 MHz microwave radiation on cultivated rat kangaroo cells. In: Biological effects and health implications of microwave radiation, p. 123. Symposium Proceedings. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Bethesda, Maryland.

**ZURITA, Y.P.**, Culturone G., Castillo P.S., Sebastian E., Bolivar F.C., 2005. Microalgae associated with deteriorated stonework of the fountain of Bibatauín in Granada, Spain. International Biodeterioration and Biodegradation 55, 55-61.

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei esprimere la mia più sincera gratitudine alla Dott.ssa Paola Cennamo che oltre ad avermi seguito per tutto il percorso del mio Dottorato, mi ha donato il suo costante incoraggiamento, aiuto, e sostegno, rendendo valido ed apprezzabile questo mio lavoro di tesi .

Vorrei anche esprimere riconoscenza al Prof. Aldo Moretti per il suo valido contributo al mio lavoro di tesi.

I miei ringraziamenti vanno anche alla Dott.ssa Olga De Castro per i suoi validi consigli.

Vorrei inoltre ringraziare il Prof. Piergiulio Cappelletti per aver dato il suo valido apporto allo studio dei substrati oggetto di questo tesi.

Un mio ulteriore ringraziamento va al Dott. Nicola Pasquino per la sua collaborazione nella messa a punto di nuovi protocolli sperimentali per la risoluzione del processo di biodeterioramento basati sull'utilizzo delle microonde.

La mia graditudine va anche al Prof. Cesareo Saiz-Jimenez del CSIC di Siviglia, per la sua ospitalità e per avermi dato la possibilità di approfondire sotto differenti aspetti il processo del biodeterioramento oggetto di studio della mia tesi.

Il mio ringraziamento va anche a Luca Paino che con la sua allegria e pazienza ha sempre contribuito alla serenità dell'ambiente lavorativo.

Il mio più sentito ringraziamento va infine al Prof. Paolo De Luca per i suoi validi consigli, la sua grande capacità di gestire la ricerca ed il Dipartimento dove io ho svolto il mio lavoro di tesi.

