

APPLICAZIONI DELLE TECNICHE

▶ ANALITICHE

Il Bioconsolidamento e il Biorisanamento

TUTELA E RESTAURO DEI BENI CULTURALI

La tutela dei Beni Culturali rientra nell'Articolo 9 della Costituzione Italiana dove si legge:

«La Repubblica promuove lo sviluppo della cultura e la ricerca scientifica e tecnica.

Tutela il paesaggio ed il patrimonio storico e artistico della Nazione.»

La tutela, la conservazione e la valorizzazione sono le tre azioni fondamentali che guidano una corretta gestione dei beni culturali nelle quali di fondamentale importanza è il ruolo della biologia.

Per **restauro** si intende l'intervento diretto su un bene attraverso una serie di operazioni finalizzate al recupero del bene, alla conservazione, alla protezione e alla trasmissione dei suoi valori culturali.



BIO-CONSOLIDAMENTO

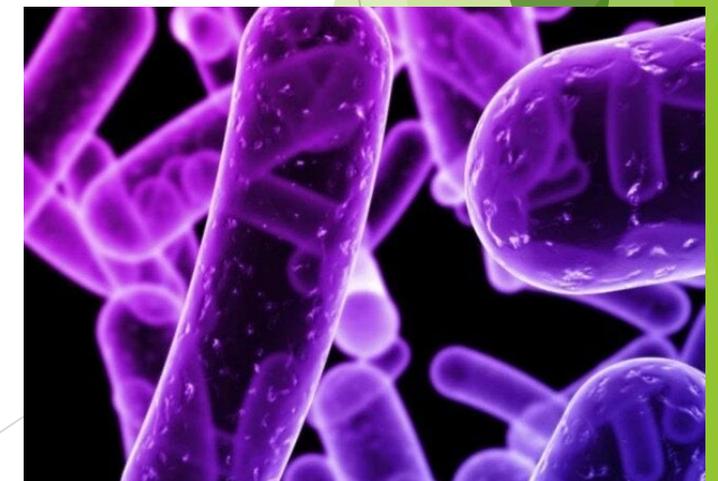


E' una procedura che utilizza, da soli o in combinazione, specifici batteri non patogeni che producono carbonato di calcio andando così a consolidare materiali calcarei come ad esempio i marmi.

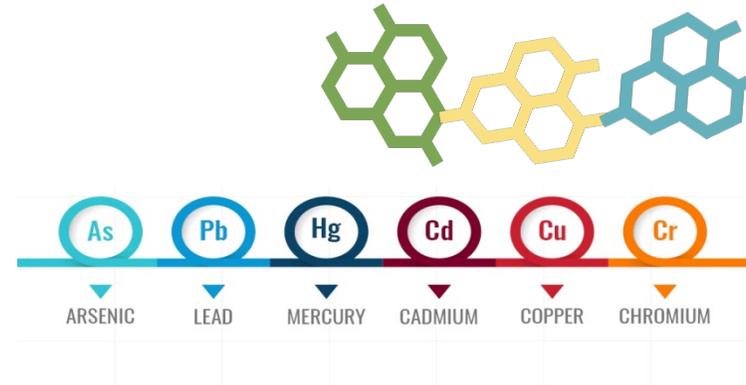
BIO-RESTAURO



E' una tecnica in cui i batteri sono impiegati per la pulitura selettiva di depositi, anche sovrapposti, senza danneggiare il materiale costitutivo di manufatti e senza lasciare residui.



METALLI PESANTI



I metalli pesanti sono naturalmente tossici, persistenti e bioaccumulabili quando presenti nell'ambiente.

Fonti di inquinamento da metalli pesanti:



Fonti naturali: includono eventi naturali (eruzione vulcanica e alterazione delle rocce/del suolo).



Fonti antropogeniche: includono attività umane (attività farmaceutiche, industriali, agricole e minerarie). Anche gli effluenti domestici rappresentano una fonte significativa di inquinamento da metalli pesanti.

La tossicità dei metalli pesanti è diffusa in tutto il mondo. Studi epidemiologici hanno dimostrato l'associazione tra esposizione a metalli pesanti e malattie croniche.

BIORISANAMENTO: TUTELA E RIPRISTINO DI REFLUI

- ▶ Il **biorisanamento** è una tecnologia di bonifica ambientale basata sul metabolismo microbico di determinati microrganismi in grado di biodegradare o detossificare sostanze inquinanti.
- ▶ È una tecnologia di bonifica efficace e versatile, applicabile in situ (senza rimuovere la matrice ambientale contaminata) o ex situ (con la rimozione e il trattamento della matrice contaminata in un'area dedicata all'interno del sito).
Le tecnologie di biorisanamento sono efficaci sulle più diffuse contaminazioni ambientali.
- ▶ Le principali tecnologie di bonifica basate sul biorisanamento sfruttano l'azione di microrganismi già presenti nelle matrici ambientali inquinate.

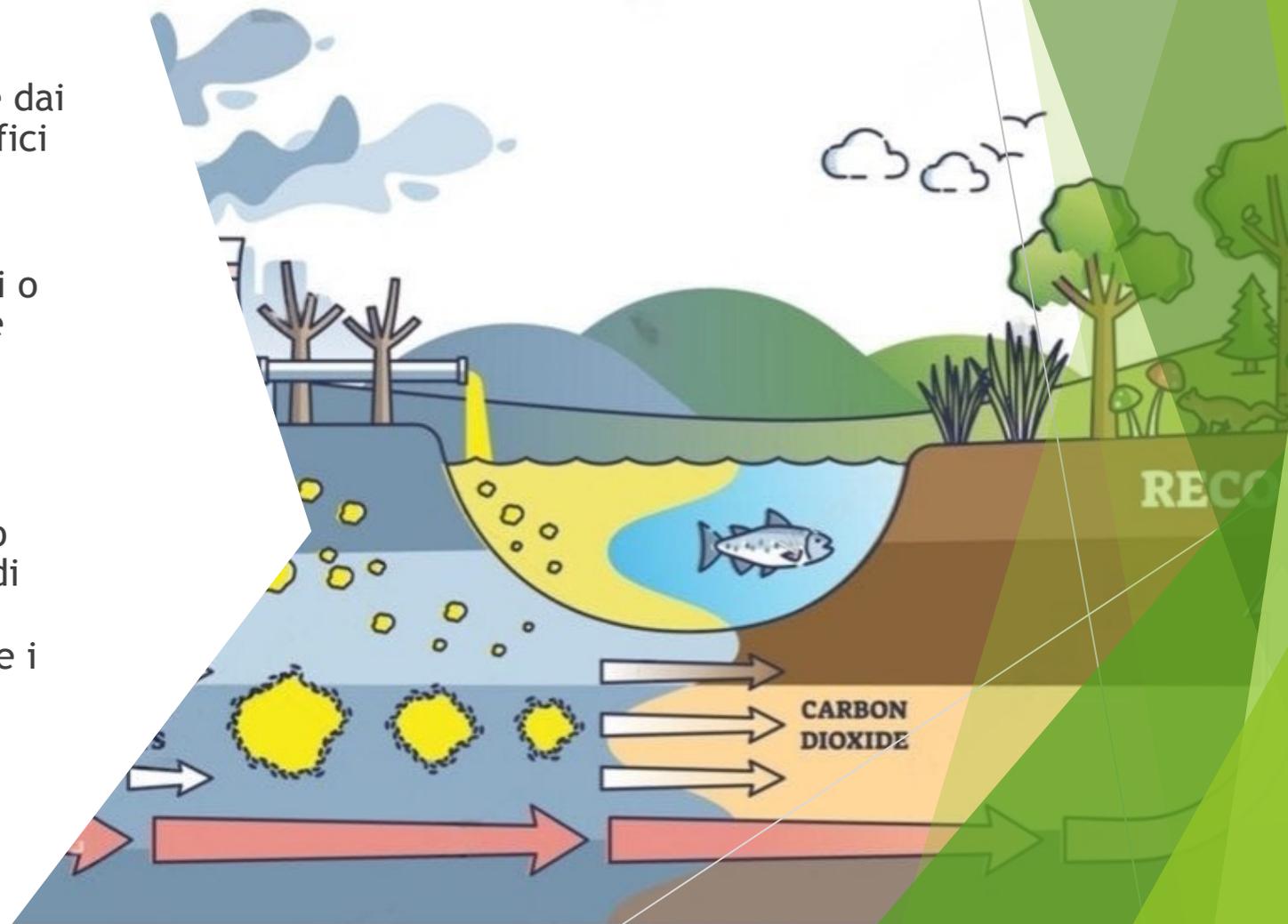
BIORISANAMENTO DI ACQUE REFLUE INQUINATE DA METALLI PESANTI

Il biorisanamento delle acque reflue dai metalli pesanti è mediato da specifici microrganismi non patogeni, in particolare, batteri ambientali.

Si utilizzano microorganismi naturali o ricombinanti per abbattere sostanze tossiche e pericolose attraverso processi aerobici e anaerobici.

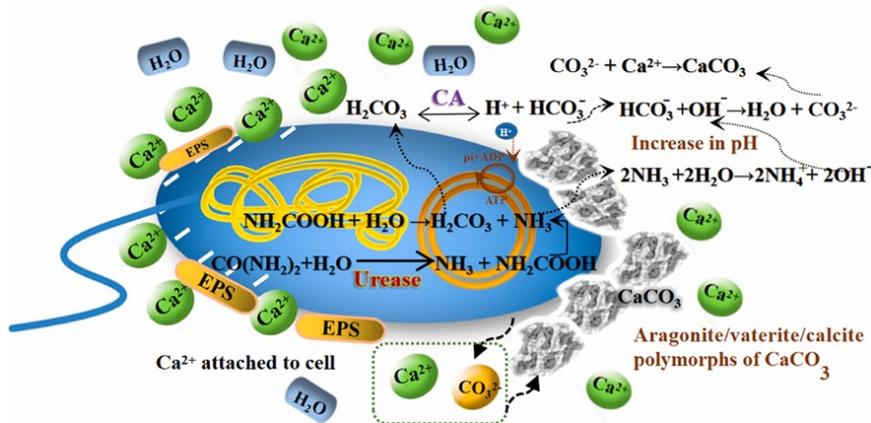
- Ceppi batterici specifici vengono selezionati per la loro capacità di co-precipitare metalli pesanti. Questi batteri possono rimuovere i contaminanti dall'ambiente, facendo co-precipitare i metalli pesanti dalla soluzione acquosa contaminata.

BIOREMEDIATION



METABOLISMO DEI BATTERI

PER LA PRODUZIONE DI CARBONATI



Il processo è governato da 4 fattori principali :

1. concentrazione di calcio
2. concentrazione di carbonio inorganico
3. pH
4. disponibilità di siti di deposito dei cristalli.

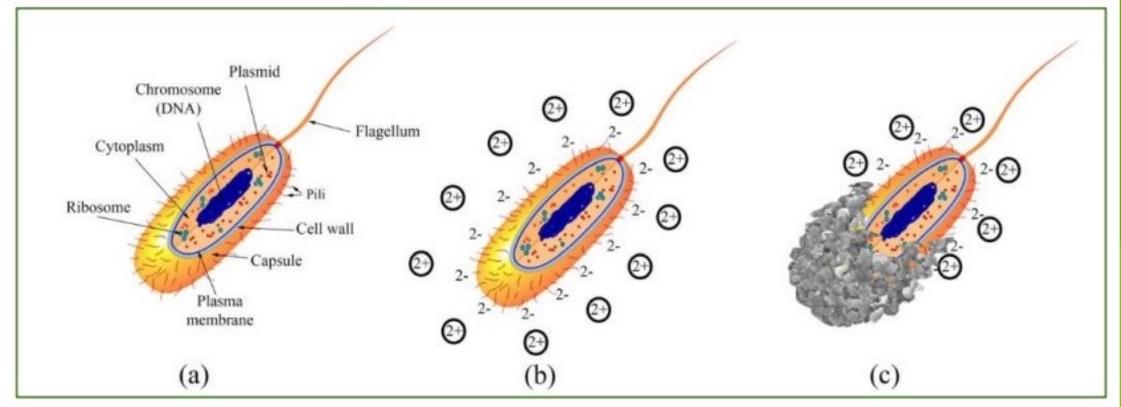
E' strettamente correlata all'attività metabolica della specie batterica e legata alla funzionalità della struttura superficiale della cellula.



LA BIOMINERALIZZAZIONE

Il processo di biomineralizzazione batterica è un fenomeno molto complesso e numerosi risultano essere i meccanismi attraverso i quali i batteri sono in grado di portarlo a termine.

La formazione di cristalli di carbonato di calcio avviene per i batteri ureolitici grazie ai metaboliti prodotti dal microrganismo, che reagiscono con il microambiente circostante ricco in ioni Ca^{2+} e che insieme al pH alcalino e alla disponibilità di siti di nucleazione costituiscono i fattori chiave di tutto il processo.



Un ruolo fondamentale è rivestito dalle strutture superficiali delle cellule, le quali fungono da siti di adsorbimento di cationi e conseguentemente da centri di nucleazione per la formazione dei cristalli.

Grazie all'elevato rapporto superficie/volume, le cellule batteriche interagiscono estesamente con il microambiente circostante.

PREPARAZIONE TERRENI DI COLTURA

La preparazione dei terreni di coltura microbiologica consiste nella miscelazione di nutrienti per ottenere un agar o un brodo che supporti la crescita e la differenziazione dei microrganismi.

La preparazione dei terreni di coltura microbiologica costituisce un'attività di routine nell'ambito dei test microbiologici effettuati per il monitoraggio dei batteri.

Composizione del brodo di precipitazione:

NB	3 g/L
NaCl	20 g/L
CaCl ₂	27.4 g/L
Urea	20 g/L



Composizione terreno solido:

HIB	37 g/L
AGAR	15 g/L
CaCl ₂	10g/L



Le soluzioni dopo essere state preparate sono sterilizzate in autoclave a 120°C alla pressione di 1 bar per 15 minuti (mentre l'urea è stata sterilizzata per filtrazione).

La coltivazione dei batteri in laboratorio richiede l'impiego dei cosiddetti "terreni" o "mezzi di coltura", con i quali si cerca di riprodurre artificialmente un ambiente in grado di soddisfare le esigenze metaboliche del microrganismo che si desidera coltivare.

In seguito alla sterilizzazione dei terreni di coltura si preparano falcon di solito da 50 ml contenenti terreno liquido inoculate con batteri e piastre contenenti terreno solido.

L'inoculazione avviene tramite anse sterili e sotto cappa a flusso laminare

INOCULAZIONE TERRENI DI COLTURA



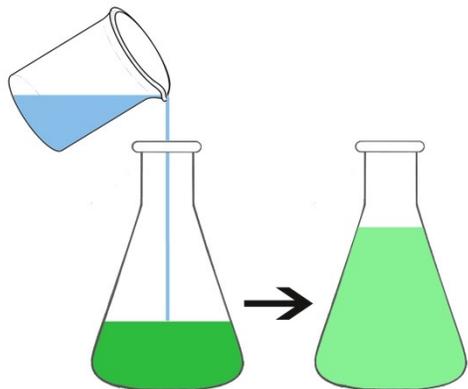
VALUTAZIONE VISIVA DEL PRECIPTATO:

Si valuta prima la crescita in piastra così da valutare anche la vitalità del batterio, e poi si controlla la precipitazione avvenuta nelle falcon.

Per i campioni nelle falcon si osservano dopo l'inoculazione in tempi stabiliti di solito dopo due giorni e dopo otto giorni.

E se ne preleva un aliquota e si congelerà per le analisi successive.





PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI:



Le aliquote precedentemente prelevate per essere lette al cromatografo ionico devono essere sottoposte a diluizione di solito in rapporto 1:10

Poiché essendo i campioni ricchi di materiale organico potrebbero ostacolare l'efficacia della misura se il campione è molto carico di materiale organico può essere aggiunta dell'acqua ossigenata

Successivamente i campioni vengono filtrati con filtri con una maglia di $0,20\mu\text{m}$ di diametro

L'analisi di gran parte dei campioni richiede generalmente uno stadio preliminare che consiste nel portare il campione o piuttosto l'analita nella forma più opportuna ai fini della determinazione analitica. L'insieme delle procedure richieste per avere l'analita o gli analiti di interesse in forma determinabile è definito pretrattamento ed è un punto essenziale del metodo analitico, importante quanto la determinazione quali-quantitativa.

EFFICACIA DI PRECIPITAZIONE VALUTATA MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA:



La cromatografia ionica è una tecnica di separazione analitica basata su interazioni ioniche.



Gli analiti disciolti in una fase mobile competono con gli ioni eluenti per adsorbirsi sulla superficie di una fase stazionaria contenente siti attivi ionizzati.



Durante la separazione, gli ioni presenti nella fase mobile vengono separati gli uni dagli altri in base alla diversa affinità per ciascuno dei siti ionizzati della fase stazionaria e alla loro carica elettrica. Per questo viene chiamata anche cromatografia a scambio ionico.



Come le altre metodiche cromatografiche è in grado di effettuare determinazioni sia qualitative che quantitative.

IL CROMATOGRAFO IONICO

FUNZIONAMENTO: sono necessari due eluenti uno per gli anioni e uno per i cationi e rispettive due colonne.

Per gli anioni si utilizza come eluente una soluzione di carbonato e bicarbonato con cariche negative perché infatti trascina gli anioni

Per i cationi si utilizza una soluzione di acido metansolfonico che invece ha lo scopo di attirare le cariche positive.

Le colonne degli anioni e dei cationi sono principalmente basate su una fase stazionaria ed una fase mobile che permettono la separazione di carica.

Le composizioni dell'eluente non sono sempre uguali ma dipende dal tipo di soppressore, dal tipo di colonna e anche dal tipo di separazione che si vuole effettuare.

L'IC è controllato dal software Chromeleon.

L'IC può lavorare su serie di campioni avendo un autocampionatore collegato alle due colonne.



VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI PRECIPITAZIONE:

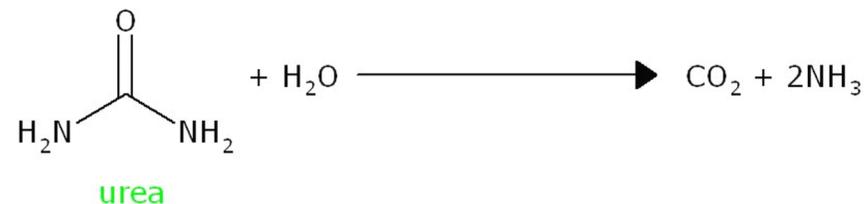
DUE GIORNI:

NOME	TEMPO	ammonio mg\L	calcio mg\L
BIANCO	T2	0	101.9
C 1-8	T2	0	96.6
MT10	T2	0	94.9
BET2	T2	0	101.9
BET CALC	T2	0	98.4
BET 5	T2	0	101.8
s. p.	T2	0	101.9
BAC 2-2	T2	0	101.2
MT19	T2	0	101.6
F3	T2	0	100.8

OTTO GIORNI:

NOME	TEMPO	ammonio mg\L	calcio mg\L
BIANCO	T8	0	101.9
C 1-8	T8	**	2.38
MT10	T8	6.98	101.3
BET2	T8	11.7	100.7
BET CALC	T8	19.9	55.5
BET5	T8	10.2	90.5
s. p.	T8	0	101.9
BAC 2-2	T8	0	101.1
MT19	T8	0	100.9
F3	T8	**	1.43

IDROLISI DELL'UREA



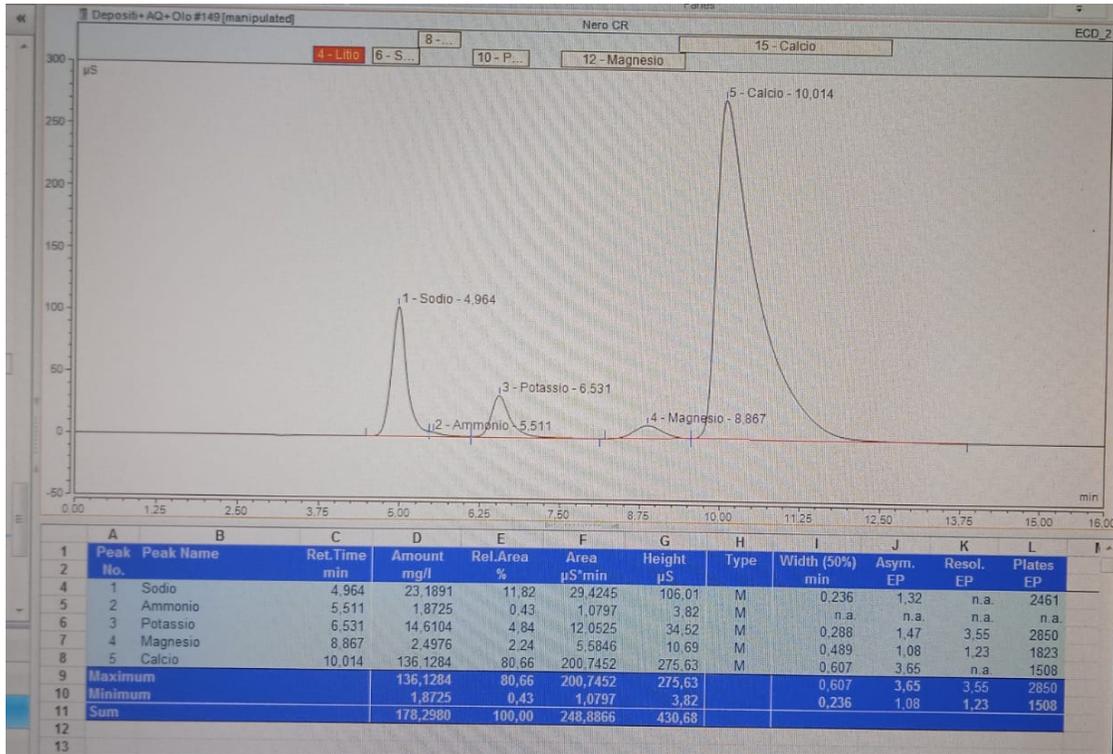
Sono stati analizzati all'IC i campioni prelevati dopo due giorni dall'inoculazione e dopo otto giorni dall'inoculazione.

Dopo due giorni il calcio era ancora in soluzione ma l'efficacia si riscontra in questo caso dopo otto giorni.

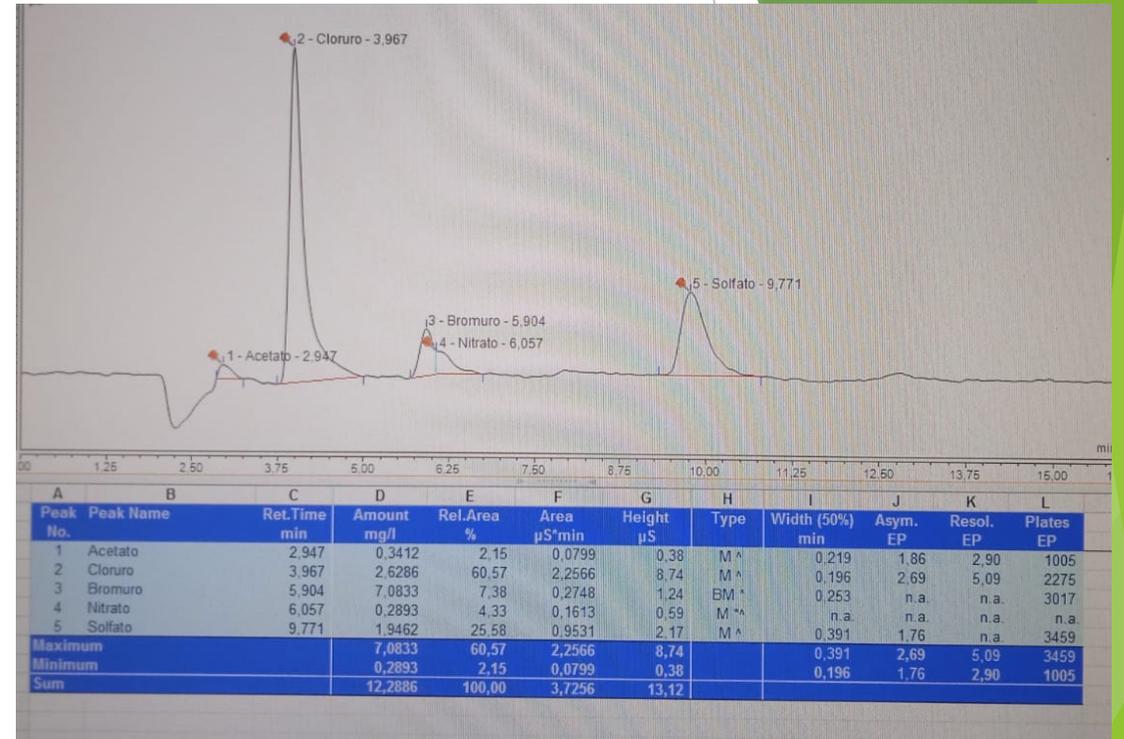
SONO STATI SELEZIONATI:

NOME	TEMPO	ammonio mg\L	calcio mg\L
C 1-8	T8	**	2.38
BET CALC	T8	19.9	55.5
F3	T8	**	1.43

ESEMPIO DI CROMATOGRAMMA



CROMATOGRAMMA ANIONI



CROMATOGRAMMA CATIONI

POLAROGRAFIA

- ▶ E' una tecnica elettroanalitica che permette di condurre delle analisi qualitative e quantitative tramite la misurazione della corrente che fluisce in una cella elettrochimica durante un'elettrolisi a tensione controllata.
- ▶ Un polarografo è costituito da un elettrodo a goccia di mercurio (*DME Dropping Mercury Electrode*), che funge da elettrodo di lavoro e da un elettrodo di riferimento a potenziale costante (costituito in genere da un elettrodo a calomelano o un elettrodo ad argento).
- ▶ L'elettrodo a goccia di mercurio è costituito da un capillare dal quale cadono gocce di mercurio, le quali hanno un tempo di vita breve, durante il quale interagiscono con la soluzione elettrolitica, dando luogo al fenomeno dell'elettrolisi.
- ▶ È un metodo voltmetrico, a differenza dell'IC che registra un segnale di corrente elettrica legato al passaggio degli ioni, questo registra un segnale di potenziale di ossidoriduzione, ovvero registra la presenza di un elemento (un metallo) in base al potenziale di ossidoriduzione, quindi, avviene proprio una reazione redox.

IL POLAROGRAFO

E' uno strumento concepito per fare misure in traccia.

Non si possono effettuare degli screening, cioè non si può eseguire una lettura complessiva dei metalli presenti nel campione ma solo di alcuni set di essi.

La metodica utilizzata sul software dello strumento può essere scelta dall'operatore, comunemente è utilizzata la metodica che consente di leggere piombo cadmio rame e zinco che, come metalli ambientali, sono tra i più importanti perché si trovano abitualmente nell'ambiente, sono legati all'attività antropica ed hanno un effetto biologico.

Lo strumento presenta una cella di misura all'interno della quale avviene la reazione di ossidoriduzione ed è qui che si registra il segnale.

Sono presenti 2 elettrodi: un elettrodo di riferimento e un elettrodo di misura.

L'elettrodo di misura, quando inizia la misura fa scendere una goccia di mercurio che è il sistema all'interno del quale avviene la reazione, quindi per ogni campione che deve leggere, genera la goccia, all'interno della goccia vengono assorbiti i metalli che stanno in soluzione quindi si forma l'amalgama ed è qui che avvengono le reazioni di ossidoriduzione.

Il sistema, che è collegato all'elettrodo, poi registra i potenziali e fornisce risposte qualitative. Nella cella di misura c'è una soluzione satura di cloruro di potassio (soluzione di mantenimento).

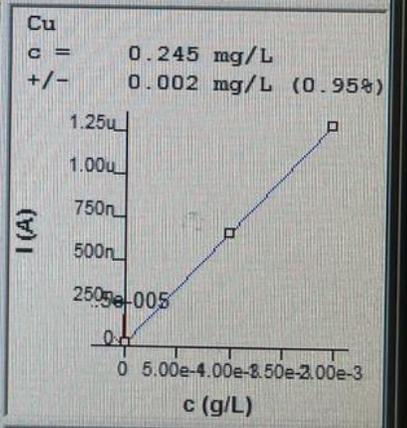
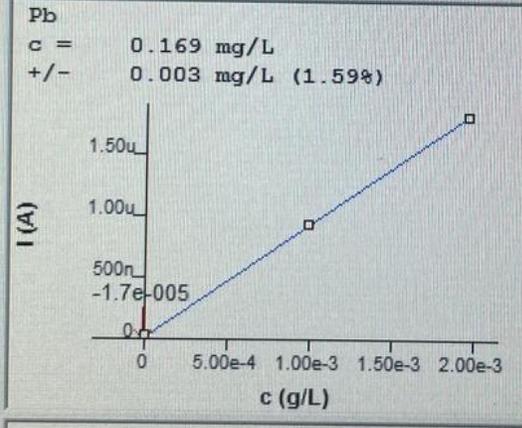
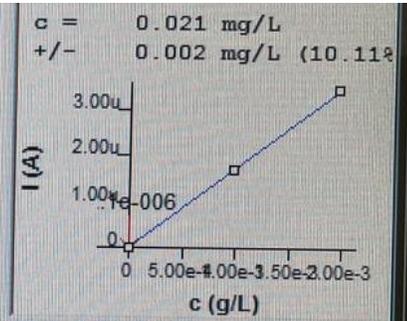
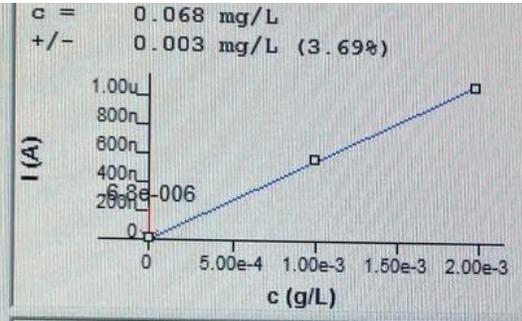
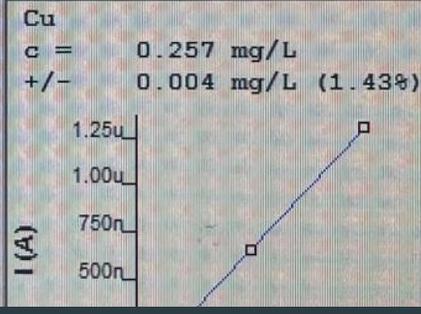
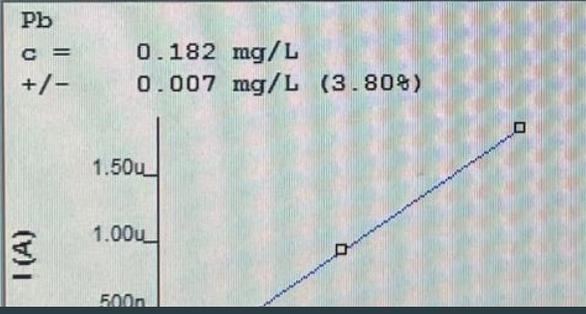
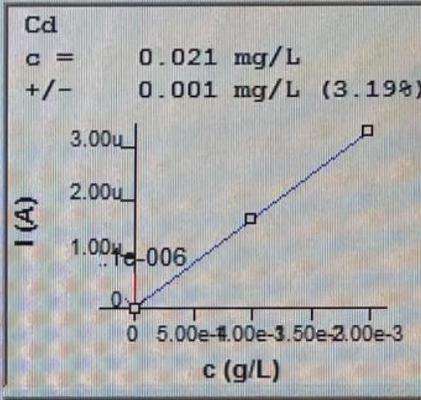
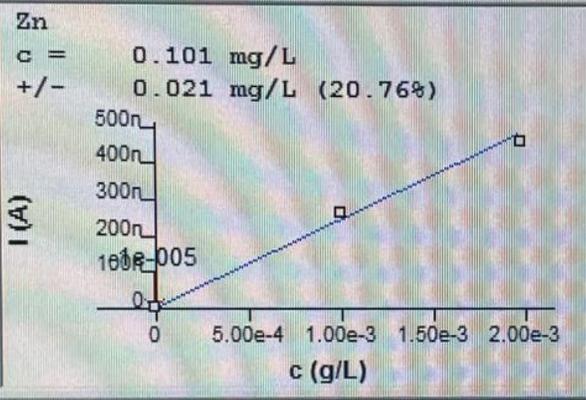
Nella cella di misura si crea l'ambiente di reazione, ma bisogna far attenzione perché avvenendo reazioni di ossidoriduzione è necessario lavorare in presenza di azoto; pertanto, si utilizza un generatore di azoto.



3.21 uA 1.80 uA 1.29 uA
 3.22 uA 1.81 uA 1.29 uA
 3.33 uA 1.87 uA 1.33 uA

06/16

l, and



ANALISI AL POLAROGRAFO

ESEMPIO DI ANALISI AL POLAROGRAFO

	Brodo precipitazione con cadmio e calcio		Brodo precipitazione con Cd	
	T ₂	T ₈	T ₂	T ₈
	Cd	Cd	Cd	Cd
BIANCO	10,917 (±0,256)	9,356 (0,242)	10,466 (0,117)	10,174 (0,215)
MT19	10,077 (±0,646)	8,868 (0,386)	10,16 (0,085)	7,692 (0,406)
F3	10,067 (±0,212)	10,301 (0,325)	10,9 (1,107)	9,694 (0,103)
BET-CALC	9,081 (±0,529)	3,618 (0,215)	8,874 (0,104)	1,202 (0,008)
BET2	8,891 (±0,177)	1,733 (0,075)	7,106 (0,093)	1,502 (0,018)
C1-8	10,654 (±1,097)	10,05 (0,12)	9,736 (0,017)	8,186 (0,014)

CALIBRAZIONE

CROMATOGRAFIA: Standard Interno

Lo standard viene definito prima dell'analisi, con la costruzione della curva di calibrazione prima di iniziare le misure.

POLAROGRAFIA: Standard Esterno

Lo standard viene aggiunto durante la misura in aliquota fissa (300 μ l) durante le tre repliche.



CASO STUDIO

RESTAURO E
BIOCONSOLIDAMENTO DI
BENI CULTURALI

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI PRECIPITAZIONE:

DUE GIORNI:

NOME	TEMPO	ammonio mg\L	calcio mg\L
BIANCO	T2	0	101.9
C 1-8	T2	0	96.6
MT10	T2	0	94.9
BET2	T2	0	101.9
BET CALC	T2	0	98.4
BET 5	T2	0	101.8
s. p.	T2	0	101.9
BAC 2-2	T2	0	101.2
MT19	T2	0	101.6
F3	T2	0	100.8

OTTO GIORNI:

NOME	TEMPO	ammonio mg\L	calcio mg\L
BIANCO	T8	0	101.9
C 1-8	T8	**	2.38
MT10	T8	6.98	101.3
BET2	T8	11.7	100.7
BET CALC	T8	19.9	55.5
BET5	T8	10.2	90.5
s. p.	T8	0	101.9
BAC 2-2	T8	0	101.1
MT19	T8	0	100.9
F3	T8	**	1.43

IDROLISI DELL'UREA



Sono stati analizzati all'IC i campioni prelevati dopo due giorni dall'inoculazione e dopo otto giorni dall'inoculazione.

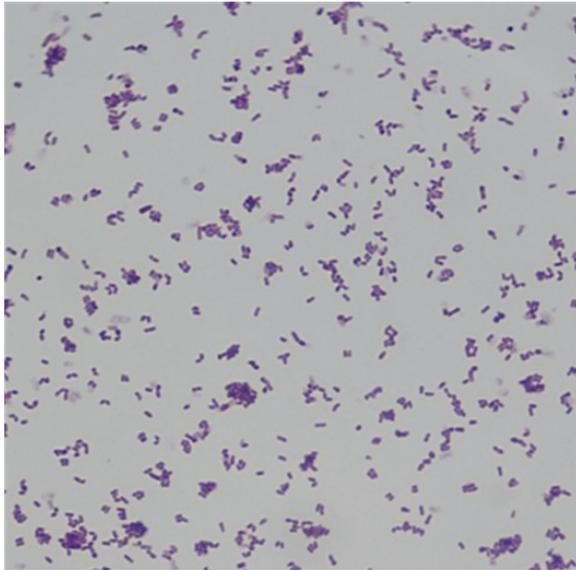
Dopo due giorni il calcio era ancora in soluzione ma l'efficacia si riscontra in questo caso dopo otto giorni.

SONO STATI SELEZIONATI:

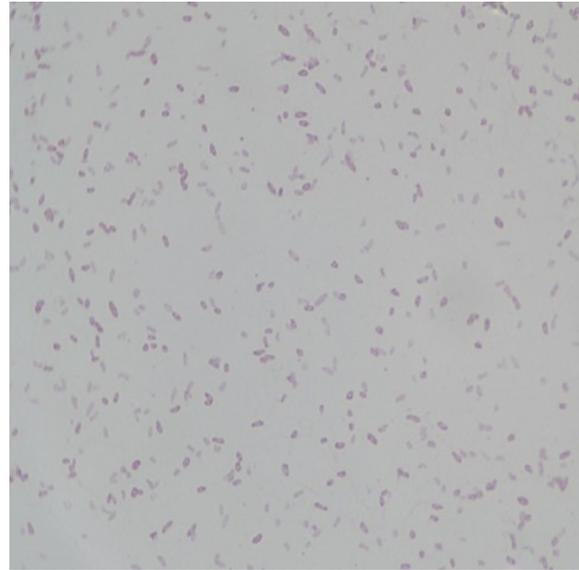
NOME	TEMPO	ammonio mg\L	calcio mg\L
C 1-8	T8	**	2.38
BET CALC	T8	19.9	55.5
F3	T8	**	1.43

I CEPPI SELEZIONATI

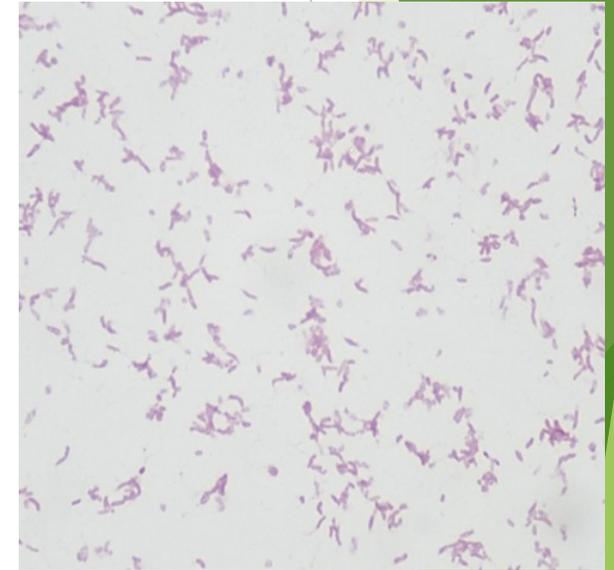
I tre ceppi con maggiore capacità di precipitazione (C 1-8, F3 e Bet calc) al tempo T8 sono stati selezionati per effettuare i test sulle superfici marmoree.



Bet cal è un ceppo batterico, isolato da una concrezione a forma di stalattite formatasi alla base di un manufatto in cemento, rappresentato da bacilli Gram positivi



C1-8 è un ceppo batterico isolato da sedimenti marini prelevati nel Golfo di Pozzuoli, rappresentato da bacilli Gram negativi



F3 è un ceppo batterico isolato da fitoplancton raccolto dal Golfo di Napoli, rappresentato da bacilli Gram negativi

TIPOLOGIE DI TEST EFFETTUATI



Test per valutare la precipitazione di carbonato lungo una frattura creata artificialmente



Test per valutare la bioprecipitazione sopra una superficie irregolare e, dunque, per stimare la capacità riempitiva



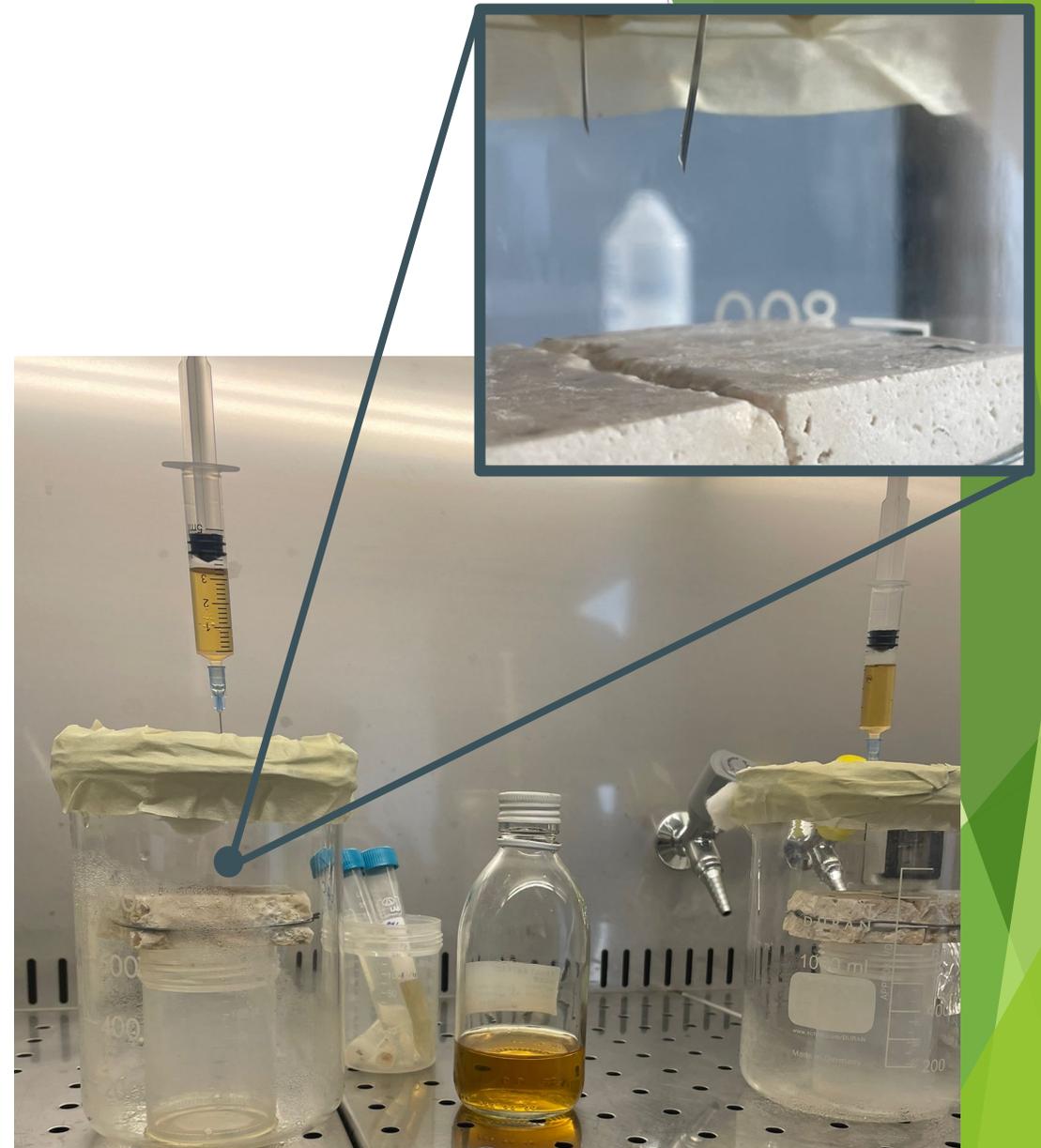
Test per valutare la capacità di consolidamento di frammenti di marmo molto friabile, definito “zuccherificato”

TEST DI BIOPRECIPITAZIONE

I provini in marmo selezionati sono stati sistemati, al di sopra di un supporto in plastica, in un becher di vetro che è stato poi sigillato con cartone e nastro adesivo.

Tutto l'apparato, contenente il provino di marmo, è stato sterilizzato in autoclave per 15 minuti a 120 °C.

Successivamente, dopo aver fatto sviluppare per 24 h a 30°C i batteri in BHI, le brodocolture, mediante siringhe, sono state lasciate scorrere lentamente sui provini di marmo in modo da indurre la formazione di biofilm microbici. E' stato poi lasciato scorrere terreno di precipitazione per 5-7giorni.



BIOPRECIPITAZIONE PER RINSALDAMENTO DI FRATTURE

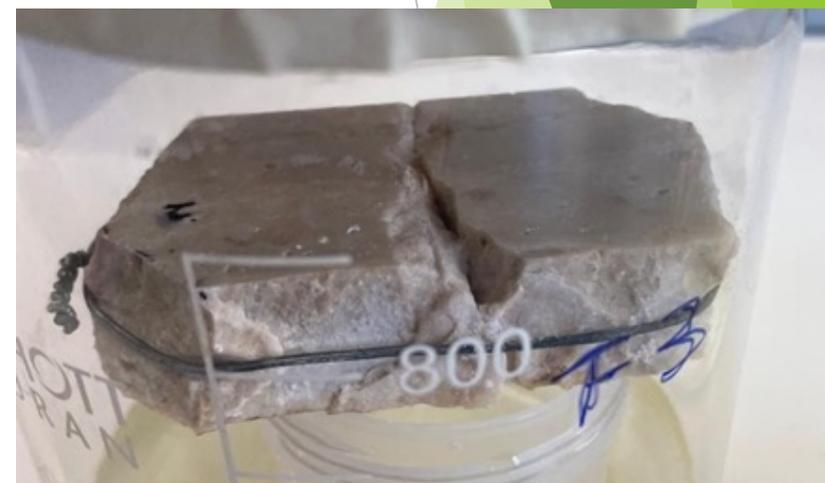
Dopo circa cinque giorni si è notata chiaramente la precipitazione di carbonato che è riuscita a riunire le superfici; il precipitato ha continuato, inoltre, a formarsi anche sulla superficie del provino. Il ceppo batterico Bet Calc è risultato più efficace, rispetto agli altri due ceppi in cui la precipitazione è appena visibile.



BET CALC



C 1-8



F3

BIOPRECIPITAZIONE SU SUPERFICIE IRREGOLARE

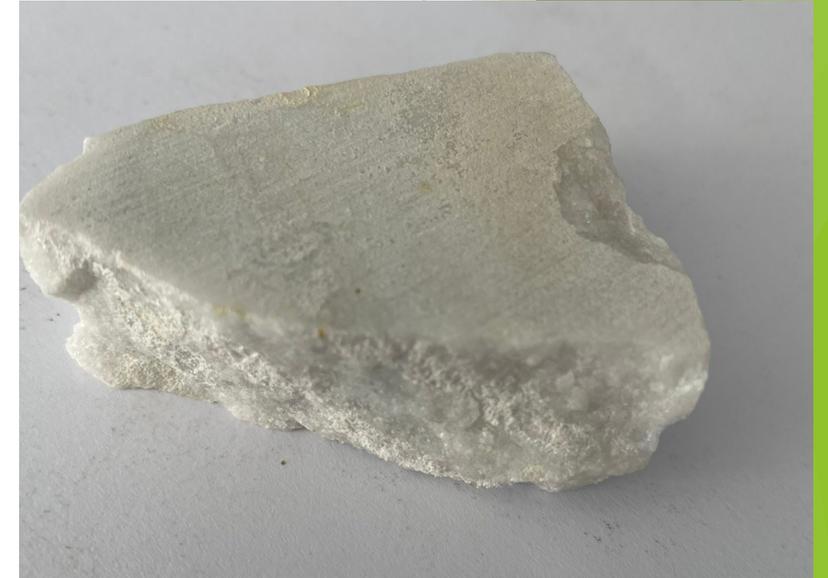
Dopo circa sette giorni si è notata la formazione di una patina mineralizzata sull'area trattata; in particolare per Bet Calc e C 1-8 che è risultato il più efficiente nella formazione di uno strato mineralizzato. Mentre F3 è risultato meno efficace perché il carbonato non è rimasto coeso alla superficie.



C 1-8



BET CALC

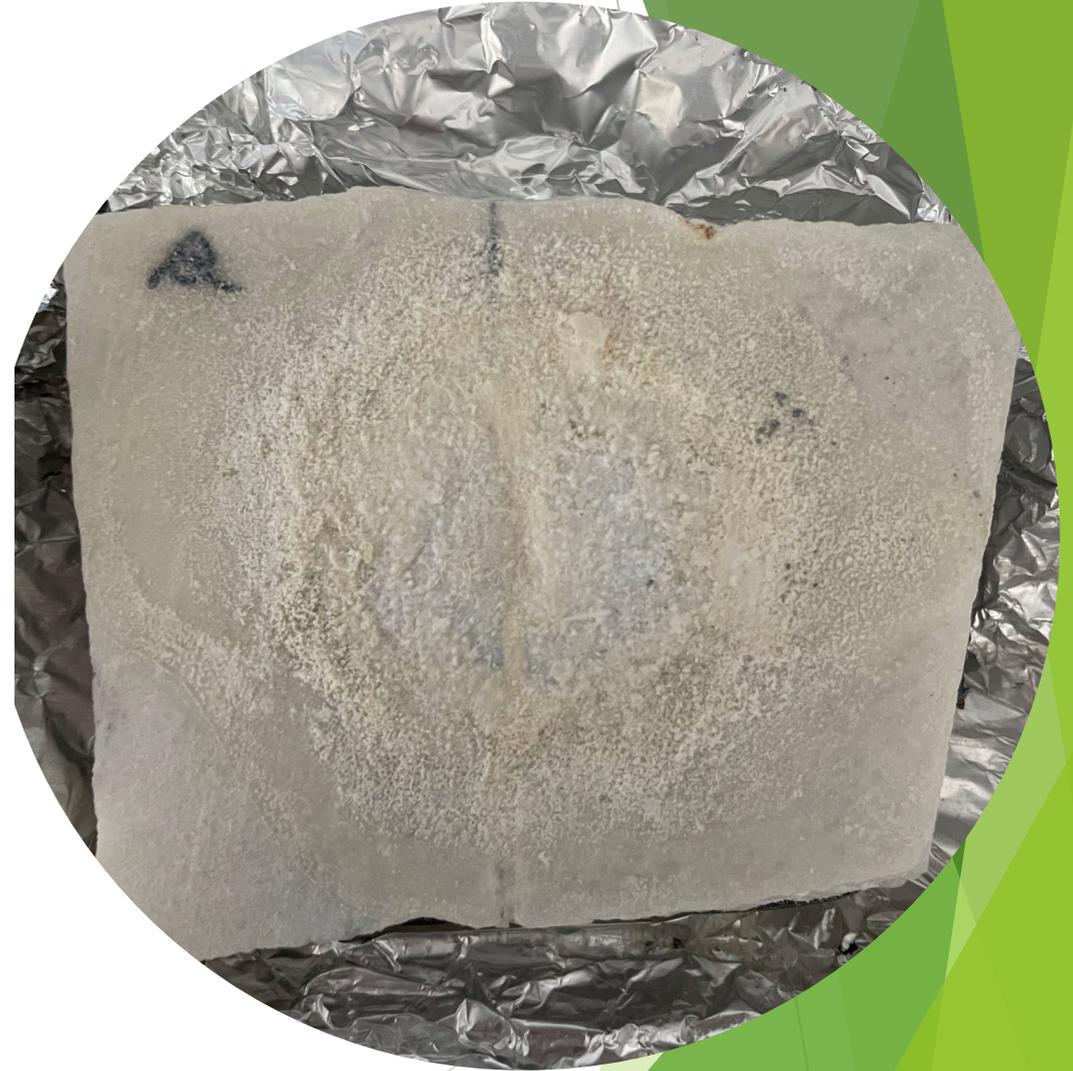


F3

BIOPRECIPITAZIONE SU SUPERFICIE IRREGOLARE

E' evidente che questo tipo di test per C1-8 dopo quindici giorni ha dato ottimi risultati, poiché il precipitato è diventato più chiaro questo perché i batteri presenti sul marmo si sono naturalmente degradati post mortem, lasciando esclusivamente il carbonato al di sopra della superficie.

Questo denota una buona riuscita del test poiché arrivare ad avere il colore del precipitato simile a quello del marmo è necessario ai fini dell'efficacia dell'restauro.



BIOPRECIPITAZIONE PER RICOMPATTARE SUPERFICIE ZUCCHERIFICATA

Il terzo test non ha dato risultati
soddisfacenti: nessuno dei ceppi
considerati ha evidenziato un
significativo consolidamento del
materiale trattato



IN CONCLUSIONE



Questo nuovo approccio al restauro richiede, tuttavia, approfondimenti per definire dei protocolli di applicazione *in situ*.

Ma si può comunque affermare che:

- ✓ Non presenta effetti tossici per gli operatori
- ✓ Garantisce sicurezza per l'opera d'arte
- ✓ Garantisce compatibilità con il materiale costruttivo
- ✓ Garantisce compatibilità ambientale
- ✓ Promuove la bioeconomia



**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**