

CHROMATIC ALTERATION ON MARBLE SURFACES ANALYSED BY MOLECULAR BIOLOGY TOOLS

Franco Palla

Dipartimento di Scienze Botaniche, Laboratorio di Biologia Molecolare
Università degli Studi di Palermo

Elena Tartamella

Dottore in Restauro, Recupero e Riqualificazione delle Architetture, Facoltà di Architettura
Università degli Studi di Palermo

1. Introduction

The surfaces of works of art exposed to a specific environment with which they interact, are subject to a high number of exchanges and reactions leading to the creation of the “natural patina” through the alteration of the surface. That definition already explains its genesis and stands as the consequence of a natural phenomenon of surface alteration of the matter. Cesare Brandi [1] defined patina as “*that particular characterization of the surface of a historical, cultural, artistic work deriving exclusively from the natural and usual stabilization and modification process that the materials of the surface undergo because of the interaction with outdoor agents characterizing the surrounding environment, in particular with the light energy, the air and its components, the temperature and the humidity that characterize it*”. The legislation called NorMal 1/88 defined it as “*the alteration strictly limited to natural modifications of the surface that is not linked to an obvious phenomenon of degradation that can be noticed through a change in the original colour of the matter*” [2].

The patina is considered a very complex process due to an exchange of matter and energy between two open systems, i.e the work of art and the environment; thus the patina arouses an additional fascination onto the surface of the work, *except if it alters the interpretation of the work too much* [3]. This is often the case when we talk about “biological patina” or bio-films, usually generated by macro and/or micro-organic colonization (fungi, bacteria, alga) which contribute to the surface bio-deterioration and thus lead to the formation of pigmented areas [4-5]. The presence of chromatic alterations (rose-

coloured areas), as a consequence of bacterial colonization, were particularly pointed out in different sites, such as in the marble slabs on the facades of both the Cathedral of Siena (Duomo di Siena) [6-7] and the Certosa of Pavia [8].

The present study shows an example of chromatic alteration of the surfaces of marble works due to some bacterial species, such as *Micrococcus*.

2. Study case

The monumental complex of Fontana Pretoria (Pretoria Fountain) is situated in one of the richest sites in terms of history and meaning [9] of the Historical Centre of Palermo. It offers the monumental water machine [10], extraordinary scenographic complex which, in the collective psyche, represents, with the flow of water, one of the souls of the city. The Pretoria Fountain is even more highlighted by the unusual architectural structure, adorned with numerous marble elements, statues of various sizes, basins, steps and terrace easing a closer view onto the work (fig. 1). That was the intent of the Senate of Palermo when they decided in 1573 to buy the fountain from the Toledo family. Twenty years earlier, the fountain had been ordered by the Toledo family to Francesco Camilliani, a Tuscan mannerist sculptor, for their private Florentine villa. Later on, his son, Camillo Camilliani created the miscellaneous marble elements giving life to the great water machine of Palermo.

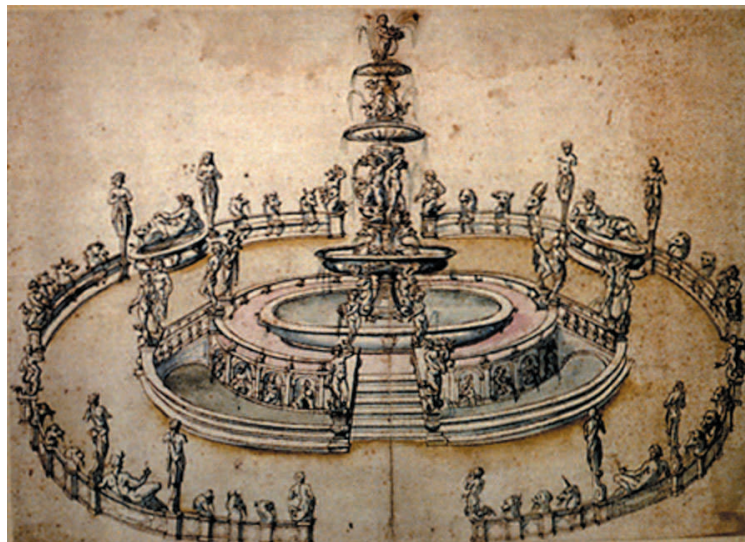


Figure 1. Camillo Camilliani, Pretoria Fountain: preliminary drawing for the definitive stage, Berlin, Kunstbibliothek.

Pretoria Fountain, best known as “*Fontana delle Vergogne*” (Fountain of the Shames) probably because of the suggestive sculptural elements, also represents an important example of stony works in outdoor environment and degraded both for natural causes and for inappropriate choices made in previous restoration interventions [11].

The latest restoration of the whole fountain including the water machine started in 1998 under the direction of the architect G. Favara (Sovrintendenza per i BB. CC. AA. of Palermo) and the Dr M.P. Demma (Centro Regionale di Progettazione e Restauro della Regione Siciliana). This restoration shall contribute to gathering a complex basis of knowledge, studies and researches [12-13].

The sculptural-architectural work shows a widespread and complex state of alteration: the marmoreal surfaces were almost completely covered by calcareous deposits and encrustations mostly grey-brown, stratified and very homogeneous that hid the modelled marbles of the central stem, the zoomorphic heads of the fish pond and also large parts of the full relief statues. Besides, the water belt of the fountain and the presence of an inappropriate hydraulic system, go back as early as the restoration of the 1950s and have contributed to creating optimal conditions for the growth of weeds and abundant microflora [14].

The encrustations and the deposits created a “uniform mantle” that covered the whole structure and hid the real tone of the work. This point made it impossible to precisely know the general conservation state of the marmoreal materials (fig. 2A-B). The cleaning



Figure 2. Sediments on the surfaces of the marble samples: A) piece of the thick layer of deposit/encrustation covering the works; B) algal patina on anthropomorphic element [9].



Figure 3. Chromatic alteration of the stem basin caused by the old metallic reinforcement rings [9].

carried out in the first stage of the latest restoration (finished in 2003), have pointed out for the statues a phenomenon of loss of cohesion. Parts of the stony shapes gathered lots of cracks and fractures; numerous interventions and/or remaking were therefore realized thanks to iron pins and flasks (fig. 3) which provoked the breaking of the parts of the weaker material as well as a disjointedness of the moulded levels because they underwent oxidation and an increase in volume.

Pigmented areas were discovered around the water pipe and classified as chromatic alterations deriving from the diffusion of the product of iron oxidation (red-orange colour) or were correlated to the presence of metallic elements in copper alloy (green sky-blue colour) [15]. A particular attention was drawn on the pigmented areas that came out, after the cleaning stage, on the marmoreal surfaces of the statues of Ebe and Naiade-Caratide, on the pleats of the dress of Cerere (fig. 4A), on the Child with jug of the central stem (fig. 4B) and on the balustrade facing the Pretorio Palace (fig. 4C). It was concluded that these pigmented areas were gradually spreading and increasing and that the chemical-petrographical analysis put some biological cause forward.

Scientific literature indicates that epi- and endolytic micro-organisms have an important role in most parts of the processes, they indeed contribute both to chemical-physical alteration of the constituent materials and to the formation of pigmented patina on the surfaces [16-18]. These micro-organisms are able to produce fast colouring pigments such as chlorophyll, carotenoid, melanin that may generate chromatic variations towards yellow, orange, red, or even brown colour [4]; as an example, the reaction of the carotenoid pigments with the calcareous groundmass leads to the formation of very strong chemical bonds, the product of which is almost insoluble under organic solvents or inorganic ones [7]. The marmo-



Figure 4. Pigmented areas: A) Cerere, pleats of the dress, B) Child, central stem, C) Balustrade facing Pretorio Palace.

real works of the Pretoria fountain presented no thick encrustations and were then probably in thermo-hygrometric, lighting and nutrition conditions that may trigger micro-biotic growth.

The samples from the pigmented areas, useful to the characterisation of the species of the possible microbial gathering, were taken either by means of a sterile tampon (dampened with solution of 0.9% NaCl-0.02% Tween-80-polyoxyethylene sorbitan monooleate) or, when possible, micro samples of material were taken by means of disposable sterile equipment.

When the sample was taken by a damp plug, the solution in which the stick was dipped was diluted (1:10) and afterwards incubated at 30°C for 16-24 hours.

The morphological analysis of the bacterial typologies grown on agar plate that was carried out through examination under direct microscopic observation, has allowed to distinguish bacterial colonies, either pigmented ones (yellow, red) and colourless ones (fig. 5).

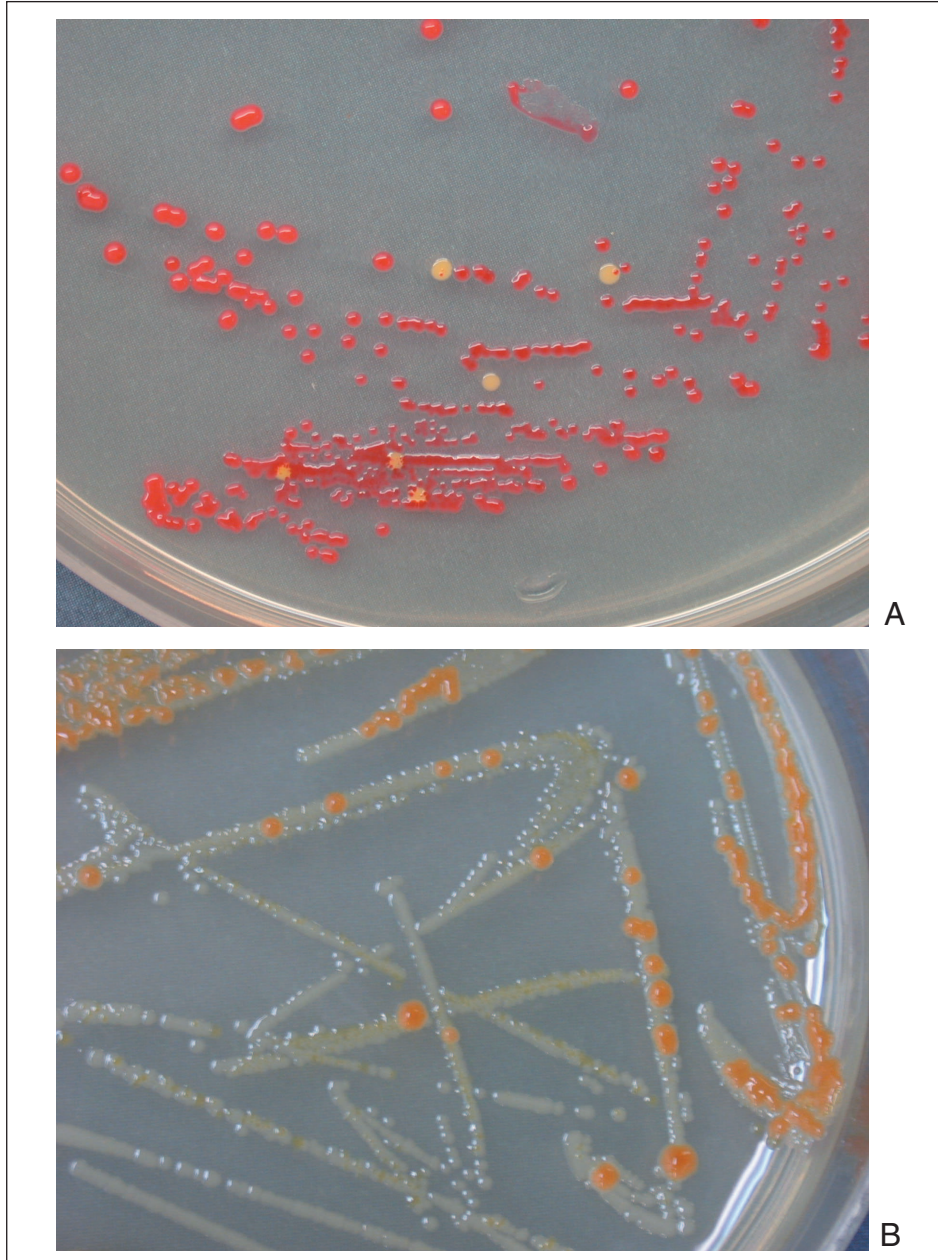


Figure 5. Bacterial colony cultured on agar plate: A) pigmented; B) pigmented and colourless [19].

At the scanning electron microscope, they respectively appear as bacilliform and coccus-form bacteria [19].

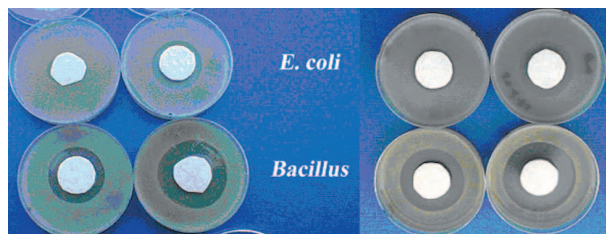
When it happened possible to execute micro sample, 200 mg of stony material were submitted to cycles of freezing (-80°C) and unfreezing ($+55^{\circ}\text{C}$) in presence of 250 μl of 10 mM Tris HCl pH 8.0 / 1mM EDTA (1XTE) to induce the lysis of the microbial cells and to extract the bacterial DNA using the kit "QIAmp DNA stool" according to the protocol given by QIAGEN and slightly modified by the authors. This methodology was also chosen to extract the DNA of the bacterial colony isolated on agar plate.

Aliquots of bacterial DNA were successively used as template molecule in the reactions of *in vitro* molecular amplification (PCR) [19], according to specific protocols.

The determination of the nucleotide sequence of the PCR fragments and the comparison with the corresponding parts of microbial genomes deposited in the database EMBL-Germany and NIH USA [20], allowed us to identify *Arthrobacter*, *Bacillus* and *Micrococcus* as the prevailing microbial species to be found on the pigmented areas. They belong to bacterial species able to produce pigmentations, crystalline aggregates, effluorescence and patina [4].

The characterisation and identification of the bacterial colonies is also of major importance in terms of treatment of the marble surfaces with biocides, so as to be able to evaluate their efficiency and to determine the appropriate concentration of each biocide to be used. In the present case, the *Benzalconium chloride* in aqueous solution and the *Algophase* in isopropyl alcohol were used. Then, by means of tests of "inhibition of bacterial growth", the action of each biocide in concentrations from 0,1 to 3% was valued for each bacterial species. The analysis of the ring of inhibition of bacterial growth emphasizes that *Bacillus* (fig. 6) and *Arthrobacter* have a high degree of sensitivity under the action of either the Benzalconium chloride or the Algophase, while the test colonies of *Escherichia coli*, strain 71/18, (fig. 6) are less sensitive to the product. Indeed the inhibition of the growth is much smaller.

Figure 6. Test of inhibition of bacterial growth: effect of biocide (concentrations 0.3 and 3%) benzalconium chloride (plate on the left side) / Algophase (plate on the right side) on the growth of the bacteria *Bacillus* and *E. coli*.



3. Conclusion

The stony works located outside display an acceleration of the natural ageing of the materials owing to physical, chemical and biological factors. The physical causes can be assimilated to purely mechanical and thermal actions. The chemical causes derive from the interaction of the compounds with the constitutive elements of the works of art; they are often induced by macro and micro biological systems (especially weeds, alga, fungi and bacteria).

According to the metabolic and anchorage process to the substratum, these systems cause the alteration of the work, well-known as *bio-deterioration*, that appears on the surfaces modifying its geometry and the eye-perception. The formation of biological patina is usually a consequence of a colonization by various bacterial genera able to produce pigmentations, crystalline aggregations and mineral precipitates of carbonate and phosphate, efflorescence and patina. It is therefore one of the superficial alterations that is most frequently detected [4].

In the marble pieces of the Pretoria Fountain, some areas showing an expanding and intensifying reddish chromatic alteration were pointed out. These alterations as showed by the chemical-stratigraphical analysis have a biological origin.

The study shows that, in the pigmented areas, various bacterial species are present. The prevalent ones, *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Micrococcus*, were detected by a combination of techniques of *in vitro culture* and molecular investigations, according to protocols carried out in our laboratory for different study cases [21-24].

Concerning the genus *Bacillus*, we know that it includes aerobes and facultative aerobes, bastoncellar bacteria, able to produce endospore allowing the survival of organism even if the environmental conditions in terms of nutritious, temperature and water activity, suddenly change [25].

The bacteria of *Arthrobacter* genus, even though they don't create spores or other quiescent forms, are particularly resistant to the drying process and nutritious lack. They constitute a heterogeneous group of bacteria characterised by a great nutritional versatility able to degrade herbicides, caffeine, nicotine, phenols and other organic compounds that are not so much common [25]. Some *Arthrobacter* species present different morphologies during the cycle of life starting from a single element with a form of coccus and transforming into a rod form that then constitutes the most important form of microcolony and that is successively retransformed into coccus form [25].

As it was supposed from the beginning of the study, the presence of bacteria of *Micrococcus* genus was definitely confirmed. Finally, the presence of corineform bacteria belonging to the *Cellulomonas* family facultative aerobes with variable morphology is not to be excluded.

The inhibition test of bacterial growth have provided information on the efficiency and on the optimal concentration of biocide to use in the frame of this restoration project. They also show how important is the concentration of the bacterial species present in a microbial consortium is. As a matter of fact, different bacterial species show a different sensitivity to the same biocide, as it was showed in this work through the different inhibition mark of the *Arthrobacter* and *Bacillus* growth compared to that of *Escherichia coli*. The use of molecular biotechnologies for a quick and accurate characterisation of the existing bacterial species, appears as one of the starting points of a project of conservation/restoration because it provides fundamental information regarding the choice of the right biocide and the optimal concentration to use.

The restoration yard of Pretoria Fountain stands as a real laboratory of research under progress, and above all, it allowed to develop interesting biotechnological applications for an efficient and specific diagnosis of microbial communities on marble works of art. If we consider these applications in terms of scientific capitalization [26], they constitute a surveying methodology in the field of microbial colonisation that proves to be useful to the prevention and preservation of the cultural heritage.

Acknowledgements

Particular thanks are directed to Dr Demma and architect Favara, for the constant and faithful collaboration and also to the Soprintendenza BB.CC. of Palermo that partially financed the present research. Moreover, we wish to thank Professor Tomaselli and the architect Smecca for their precious collaboration. The survey was carried out in the frame of the research activity (ex 60%) MIUR.

Bibliography

- [1] BRANDI C. 1994, *Il restauro: teoria e pratica* (a cura di Michele Cordaro), edizioni Roma, Edizioni Riuniti.
- [2] ISTITUTO CENTRALE PER IL RESTAURO 1988, *Raccomandazioni Normal, alterazioni macroscopiche dei materiali lapidei*, Roma, ICR-CNR.

- [3] GORBUSHINA A.A., KRUMBEIN W.E., HAMMAN C.H., PANINA L., SOUKHARJEVSKI S., WOLLENZIEN U. 1993, *Role of black fungi in colour change and biodeterioration of antique marbles*, Geomicrobiology Journal, 11, 205-220.
- [4] KRUMBEIN W.E. 2003, *Patina and cultural heritage – a geomicrobiologist's perspective – How microbes change surfaces*, in R. Kozłowski (ed), *Cultural Heritage Research: a Pan European Challenge*, Proceedings of the 5th European Commission Conference (Cracow, 16-18 May 2002), 1-9.
- [5] STERFLINGER K., KRUMBEIN W.E., RULLKOTTER J. 1999, *Patination of marble and granite by microbial communities*, Z. dtsh. Geol. Gesellsch., 150, 299-311.
- [6] TIANO P., TOMASELLI L. 1989, *Un caso di biodeterioramento del marmo*, Arkos, 6, 12-18.
- [7] TIANO P., TOMASELLI L. 2004, *Red staining and heterotrophic bacteria*, Coalition, 8, 2-4.
- [8] ABBRUSCATO P., SORLINI C., ZANARDINI E. 2003, *Molecular characterisation of lead-resistant isolates from Certosa di Pavia red strains*, in C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse/Abingdon/Exton (PA)/Tokyo: A.A: Balkema Publishers, 109-113.
- [9] DEMMA M.P. 2006, *Da Firenze a Palermo: rilettura delle vicende storiche e artistiche della Fontana Pretoria*, in G. Favara & M.P. Demma, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Assessorato BB CC e AA. e P.I.
- [10] CASSARÀ S. 2006, *La macchina dell'acqua*, in G. Favara & M.P. Demma, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Ass.to BB CC e AA. e P.I., 225-245.
- [11] DEMMA M., FAVARA G. 2006. *Un problema di metodo: il restauro*, in G. Favara & M.P. Demma, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Assessorato BB CC e AA e P.I., 281-307.
- [12] DEMMA M., FAVARA G. 2006, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Assessorato BB CC e AA. e P.I. (731.7209458231 CDD-20).
- [13] TARTAMELLA E. 2006, *Fontana Pretoria: Studio e ricerca delle alterazioni naturali ed artificiali sulla superficie marmorea dello stelo centrale*, Palermo, Thesis University.
- [14] FAVARA G. 2006, *La conoscenza dello stato di conservazione prima del restauro*, in G. Favara & M.P. Demma, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Assessorato BB CC e AA. e P.I., 11-18.
- [15] RIZZO G., ERCOLI L. 2006, *Indagini chimiche-petrografiche sui materiali lapidei e sul loro degrado*, in G. Favara & M.P. Demma, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Assessorato BB CC e AA. e P.I., 249-257.
- [16] BRIMBLECOMBE P., GROSSI C. 2003, *Blackening of buildings*, in H. CACHIER

- (ed.), *Air pollution & cultural heritage*, Workshop Abstracts (Seville, Spain, 1-3 december 2003), Seville, 21-22.
- [17] 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.
- [18] URZÍ C., KRUMBEIN W.E., WARSCHIED T. 1992, *On the Question of Biogenic Colour Changes of Mediterranean Monuments* in D. DECROUEZ, J. CHAMAY and F. ZEZZA (eds.), Geneva, Proceedings 2nd International Symposium. Musée d'art et d'histoire, 397-420.
- [19] PALLA F. 2006, *Analisi per l'identificazione di microorganismi deterioranti sulle superfici marmoree delle statue di Fontana Pretoria*, in G. Favara & M.P. Demma, *La Fontana Pretoria in Palermo*, Palermo, Assessorato BB CC e AA. e P.I., 261-266.
- [20] ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. 1997, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- [21] FEDERICO C., RUSSO R., ANELLO L., PALLA F. 1999, *Biotechnologies tools to test biodeteriogens in stone specimens*, in O. CIFFERI, P. TIANO, G. MASTROMEI (eds), *Microbes and Art, the Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*, ICMC Abstracts (Florence, 16-19 June 1999) Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche.
- [22] PALLA F., FEDERICO C., RUSSO R., ANELLO L. 2002, *Identification of *Nocardia restricta* in biodegraded sandstone monuments by PCR and nested-PCR DNA amplification*, *FEMS Microbiol Ecol.*, 39, 85-89.
- [23] PALLA F., ANELLO L., PECORELLA S., RUSSO R., DAMIANI F. 2003, *Characterisation of bacterial communities on stone monuments by molecular biology tools*. C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse/Abingdon/Exton (PA)/Tokyo: A.A: Balkema Publishers, 115-118.
- [24] PALLA F., ANELLO L., MARINEO S., LOMBARDO G., 2006. *Characterisation of bacterial communities in indoor environment*, in R. FORT, M. ALVAREZ de BUERGO, M. GOMEZ-HERAS & C. VAZQUEZ-CALVO (eds), *Heritage, Watering and Conservation*, London/Leiden/NewYork/Philadelphia/Singapore, Taylor & Francis Group, 361-365.
- [25] MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J. 2003, *Brock, Biologia dei microrganismi*, 10 ed, Milano, Casa Editrice Ambrosiana.
- [26] GONZALEZ J.M. 2003, *Overview on existing molecular techniques with potential interest in cultural heritage*. C. Saiz-Jimenez (ed), *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Lisse/Abingdon/Exton (PA)/Tokyo: A.A: Balkema Publishers, 3-13.

ALTERAZIONI CROMATICHE SU SUPERFICI MARMOREE: ANALISI MEDIANTE TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

1. Introduzione

Le superfici dei manufatti artistici, esposte all'ambiente circostante con cui interagiscono, attivano un elevato numero di scambi e reazioni che, generando modifiche della superficie, portano alla formazione delle "patine naturali" – il nome già ne spiega la genesi – che sono la conseguenza di una naturale alterazione superficiale della materia. Cesare Brandi [1] definiva la "patina" come «quella particolare caratterizzazione della superficie di un manufatto di interesse storico, culturale, artistico, dovuta unicamente al naturale e normale processo di assestamento e modificazione che i materiali costitutivi della superficie subiscono per l'interazione con gli agenti esterni caratterizzanti l'ambiente in cui è conservato, in particolare con l'energia luminosa, l'aria e i suoi componenti, la temperatura e l'umidità che la caratterizzano». La Raccomandazione NorMal 1/88 la identificava come «alterazione strettamente limitata a quelle modificazioni naturali della superficie dei materiali non collegabili a manifesti fenomeni di degradazione e percepibili come una variazione del colore originario del materiale» [2].

La "patina" è certamente un processo molto complesso, dovuto a scambi di materia ed energia tra due sistemi aperti come il manufatto e l'ambiente, che genera un fascino aggiuntivo alla superficie dell'opera, a meno che non alteri profondamente la lettura del manufatto [3] come spesso accade nel caso delle "patine biologiche", dovute generalmente a colonizzazioni da macro e/o microrganismi (funghi, batteri, alghe) che, inducendo il biodeterioramento della superficie, portano alla formazione di aree pigmentate [4-5]. In particolare, la presenza di alterazioni cromatiche (aree rosate), conseguenza di colonizzazioni batteriche, sono state evidenziate in diversi siti come nelle lastre marmoree delle facciate del Duomo di Siena [6-7] e della Certosa di Pavia [8].

Lo studio qui riportato mostra un esempio di alterazione cromatica della superficie di manufatti marmorei indotta da alcune specie batteriche con particolare riferimento al genere Micrococcus.

2. Caso di studio

Il complesso monumentale della Fontana Pretoria si trova in uno dei siti del Centro Storico di Palermo più densi di storia e di significato [9] e ospita la monumentale macchina dell'acqua [10], straordinario apparato scenografico che, nell'immaginario collettivo, rappresenta con il fluire delle acque una delle anime della città. Il fascino della Fontana Pretoria è ancor più esaltato dall'insolito impianto architettonico, adorno di numerosi elementi marmorei, statue dalle diverse dimensioni, vasche, scalinate e terrazzamenti per permetterne l'ammirazione ancor più da vicino (fig. 1): questo l'intento del Senato palermitano che nel 1573, non badando ai costi, acquistò la fontana dalla famiglia Toledo che circa un ventennio prima l'aveva commissionata a Francesco Camilliani, scultore manierista toscano, per la propria villa fiorentina. Successivamente, il figlio, Camillo Camilliani, compose i molteplici elementi marmorei dando vita alla monumentale macchina d'acqua palermitana.

Fontana Pretoria, a molti nota come "Fontana delle Vergogne" a causa, probabilmente, degli elementi scultorei, rappresenta anche un significativo esempio di manufatti lapidei esposti all'aperto, degradati sia per cause naturali sia per non corrette scelte in precedenti interventi di restauro [11]. Nel 1998, diretto dall'Arch. G. Favara (Sovrintendenza per i BB. CC. AA. di Palermo) e dalla Dott.ssa M.P. Demma (Centro Regionale di Progettazione e Restauro della Regione Siciliana), inizia questo ultimo intervento di restauro dell'intera fontana, compresa la macchina dell'acqua, che fornirà un complesso ordine di conoscenze, studi e ricerche [12-13].

Il manufatto scultoreo-architettonico mostrava un esteso e complesso stato

di alterazioni: le superfici marmoree erano quasi completamente ricoperte da depositi e incrostazioni prevalentemente calcaree grigio-brune, stratificate e molto coerenti che nascondevano i marmi modellati dello stelo centrale, le teste zoomorfe della peschiera e grandi porzioni delle statue a tutto tondo. Inoltre, l'acqua di alimentazione della fontana e la presenza di un inadeguato impianto idraulico, risalente al restauro degli anni 50 del 1900, avevano creato le condizioni ottimali per la crescita di piante infestanti e di un'abbondante microflora [14].

Le incrostazioni e i depositi creavano una "cappa uniforme" che ricopriva l'intera struttura e celava la reale cromia del manufatto non permettendo l'esatta valutazione dello stato di conservazione generale dei sottostanti materiali marmorei (fig. 2A-B). L'opera di ripulitura e liberazione, effettuata nella prima fase del più recente restauro (terminato nel 2003), aveva evidenziato fenomeni di decoesione nella parte statuaria, porzioni del modellato lapideo apparivano gravemente fessurate e fratturate, numerosi interventi e/o rifacimenti erano stati realizzati ricorrendo all'uso di perni e staffe di ferro che, ossidandosi e aumentando di volume (fig. 3), avevano causato la rottura delle parti di materiale più debole oltre alla sconnessione dei piani del modellato.

Aree pigmentate erano state riscontrate intorno ai tubi di uscita dell'acqua e classificate come alterazione cromatica dovuta alla diffusione dei prodotti di ossidazione del ferro (colore rosso arancio) o correlabili alla presenza di elementi metallici in leghe di rame (colore verde azzurro) [15]. Particolare attenzione è stata rivolta alla comparsa, dopo la fase di pulitura, di aree pigmentate sulle superfici marmoree delle statue di Ebe e Naiade-Caratide, nelle pieghe del vestito di Cerere (fig. 4 A), del Fanciullo con brocca dello stelo centrale (fig. 4B) e della balaustra prospiciente il Palazzo Pretorio (fig. 4C), che si diffondevano e intensificavano nel tempo e che l'analisi chimico-petrografica ipotizzava essere di probabile origine biologica.

La letteratura scientifica riporta che microrganismi epi ed endolitici giocano un ruolo importante nella maggior parte dei processi sia di alterazione chimico-fisica dei materiali costituenti sia nella formazione di patine pigmentate sulle superfici [16-18]. Questi microrganismi sono in grado di produrre pigmenti stabili come clorofille, carotinoidi, melanine in grado di generare variazioni cromatiche di colore giallo, arancio, rosso, sino al bruno [4]; ad esempio la reazione dei pigmenti carotinoidi con la matrice calcarea dà vita alla formazione di legami chimici molto forti, il cui prodotto è praticamente insolubile sia a solventi organici che inorganici [7]. Probabilmente i manufatti marmorei della fontana Pretoria, liberati dalle spesse incrostazioni, si sono ritrovati in quelle condizioni termoigrometriche, d'illuminazione e di nutrizione che hanno innescato la crescita microbica.

Per la caratterizzazione delle specie che componevano il possibile consorzio microbico, i prelievi sulle aree pigmentate sono stati eseguiti sia dalle superfici mediante tamponi sterili (inumiditi con soluzione di 0.9% NaCl-0.02% Tween-80-polyoxyethylene sorbitan monooleate) sia eseguendo, quando possibile, microprelievi di materiale mediante attrezzature monouso sterili.

Nel caso in cui il prelievo è stato effettuato mediante tamponi umidi, la soluzione in cui era stato immerso il tampone è stata diluita (1:10) con soluzione fisiologica sterile e un volume pari a 25 ml è stato utilizzato per inoculare piastre di Nutrient-Agar (Nutrient Broth-Difco 25 g/ litro - 2% Agar-Difco), successivamente incubate a 30°C per 16-24 ore.

L'analisi morfologica delle tipologie batteriche cresciute sui terreni agarizzati condotta per osservazione diretta al microscopio ottico delle colonie, ha permesso di distinguere colonie batteriche sia pigmentate (giallo, rosse) sia incolori (fig. 4), che al microscopio elettronico a scansione appaiono come batteri bacilliformi e cocchiformi [19].

Nei casi in cui è stato possibile eseguire i micro prelievi, 200 mg di materiale lapideo sono stati sottoposti a cicli di congelamento (-80°C) e scongelamento (+55°C) in presenza di 250 ml di 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 1mM EDTA (1XTE) per indurre la lisi delle cellule microbiche ed estrarre il DNA batterico uti-

lizzando il kit "QIAmp DNA stool", secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice QIAGEN e da noi parzialmente modificato. Questa metodologia è stata utilizzata anche per estrarre il DNA dalle colonie batteriche isolate su terreni agarizzati.

Successivamente, piccole aliquote di DNA batterico sono state utilizzate come molecole stampo nelle reazioni di amplificazione molecolare in vitro (PCR) [19], secondo specifici protocolli.

La determinazione della sequenza nucleotidica dei frammenti PCR e il confronto con le corrispondenti porzioni dei genomi microbici, depositati nella banca dati EMBL- Germany e NIH-USA [20], ha permesso di identificare *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Micrococcus* come le specie prevalenti nel consorzio microbico presente sulle aree pigmentate: specie batteriche in grado di produrre pigmentazioni, aggregati cristallini, efflorescenze e patine [4].

La caratterizzazione e l'isolamento delle colonie batteriche trova una notevole valenza anche nella prospettiva del trattamento con biocidi delle superfici marmoree, al fine sia di valutare l'efficienza sia per determinare la concentrazione più opportuna di ciascun biocida che s'intenda utilizzare. In questo caso sono stati utilizzati il Benzalconio cloruro in soluzione acquosa e l'Algophase in alcool isopropilico e, ricorrendo ai saggi di "inibizione della crescita batterica", è stata valutata l'azione di ciascun biocida, in concentrazioni comprese tra 0,1 e 3%, nei confronti di ciascuna specie batterica isolata. In particolare, l'analisi degli aloni di inibizione della crescita batterica mostra che *Bacillus* (fig. 6) e *Arthrobacter* presentano un elevato grado di sensibilità all'azione sia del Benzalconio cloruro sia dell'Algophase, mentre le colonie controllo di *Escherichia coli*, ceppo 71/18, (fig. 6) sono meno sensibili: infatti, è presente un alone di inibizione della crescita di gran lunga inferiore.

3. Conclusioni

I manufatti lapidei esposti all'aperto presentano un'accelerazione del naturale invecchiamento dei materiali dovuta essenzialmente a fattori di tipo fisico, chimico e biologico. Le cause fisiche possono essere ricondotte a fatti puramente meccanici e termici, le cause chimiche sono attribuibili alla conseguente interazione con composti che reagiscono con gli elementi costituenti dei manufatti, spesso indotti da macro e micro-sistemi biologici (principalmente erbe infestanti, alghe, funghi e batteri). Questi, in base ai loro processi metabolici e d'ancoraggio al substrato, inducono il deterioramento del manufatto, noto con il termine di biodeterioramento, che si manifesta visivamente con il cambiamento delle superfici dell'opera, alterando la leggibilità e la geometria del manufatto. Una delle alterazioni superficiali maggiormente riscontrate è la formazione di patine biologiche, conseguenza spesso di colonizzazioni da parte di diversi generi batterici, in grado di produrre pigmentazioni, aggregati cristallini e precipitati minerali di carbonato e fosfato, efflorescenze, patine [4].

Nei manufatti marmorei della Fontana Pretoria sono state individuate delle aree che presentavano un'alterazione cromatica tendente al rosso che si estendeva e intensificava nel tempo e che, come riportato anche dall'analisi chimico-stratigrafica, era possibile imputare ad un'origine biologica. Questo studio mostra che nelle aree pigmentate sono presenti diverse specie batteriche le cui predominanti sono state identificate in *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Micrococcus*, ricorrendo alla combinazione di tecniche di coltura in vitro e di indagini molecolari, secondo protocolli messi a punto nel nostro laboratorio anche per altri casi di studio [21-24].

Per quanto concerne il genere *Bacillus*, è noto che comprende specie aerobiche e aerobie facoltative bastoncelliformi, in grado di produrre endospore che permettono la sopravvivenza dell'organismo anche se le condizioni ambientali, in termini di nutrienti, temperatura e attività dell'acqua cambiano in maniera repentina [25]. I batteri del genere *Arthrobacter*, nonostante non formino spore o altre forme quiescenti, sono particolarmente resistenti all'essiccamento e alla carenza di nutrienti. Essi formano un gruppo eterogeneo di batteri, caratterizzato da notevole versatilità nutrizionale tanto che sono stati isolati ceppi capaci di degradare erbicidi, caffeina, nicotina, fenoli e altri composti organici poco

comuni [25]. Alcune specie di *Arthrobacter* presentano, durante il ciclo vitale, morfologie diverse che, da singolo elemento coccoide, si trasforma in bastoncino che costituirà la forma principale della microcolonia, per ritrasformarsi successivamente in forme coccoidi [25].

La presenza di batteri del genere *Micrococcus*, ipotizzata sin dall'inizio è stata confermata. Infine, non è da escludere la presenza di batteri corineformi appartenenti al genere *Cellulomonas*, aerobi facoltativi con morfologia variabile.

I saggi d'inibizione della crescita batterica hanno fornito informazioni sull'efficacia e sulla concentrazione opportuna di biocidi da utilizzare nell'ambito di questo progetto di restauro e, nello stesso tempo, mostrato quanto sia importante la caratterizzazione delle specie batteriche presenti in un consorzio microbico. Infatti, differenti specie batteriche presentano diversa sensibilità ad uno stesso biocida, come mostrato in questo lavoro dal differente alone d'inibizione della crescita di *Arthrobacter* e *Bacillus* rispetto a *Escherichia coli*. Il ricorso alle biotecnologie molecolari, per una rapida e precisa caratterizzazione delle specie batteriche presenti, risulta quindi uno dei punti di partenza in un progetto di conservazione/ restauro perché fornisce informazioni sostanziali anche per la scelta del biocida e dell'opportuna concentrazione da utilizzare.

Il cantiere di restauro di Fontana Pretoria ha rappresentato un vero e proprio laboratorio di ricerca, in continua evoluzione, che ha permesso lo sviluppo d'interessanti applicazioni biotecnologiche per una diagnosi rapida e specifica di comunità microbiche in opere d'arte marmoree e, senz'altro tali applicazioni, vista la loro potenzialità [26], costituiscono una metodologia di rivelazione delle colonizzazioni microbiche da utilizzare dal punto di vista della prevenzione e conservazione di un bene culturale.

Ringraziamenti

Particolari ringraziamenti vanno alla Direzione dei Lavori (Dott.ssa M.P. Demma, Arch. Giuseppina Favara) per la continua e proficua collaborazione e alla Soprintendenza BB.CC. di Palermo per avere parzialmente finanziato questo lavoro di analisi e ricerca. Inoltre, si ringrazia il Prof. F. Tomaselli e l'Arch. L. Smecca per la preziosa collaborazione.

Studio effettuato nell'ambito dell'attività di ricerca (ex 60%) MUR.

Summary

The patina represents a superficial natural alteration of the constituting matter of the work of art. It emerges from the natural and usual stabilization process that the materials of the surface undergo because of the interaction with outdoor agents characterizing the surrounding environment. Besides, it is not linked to an obvious phenomenon of degradation that can be noticed through the change in the original colour of the matter.

This is what we intend when we talk about biological patina usually generated by macro and/or micro-organic colonization (fungi, bacteria, alga) which contributes to surface bio-deterioration and thus lead to the formation of orange, red or even brown and dark pigmented areas.

The presence of chromatic alterations (rose-coloured areas), as a consequence of bacterial colonization, was most particularly pointed out in different sites, such as in the marble slabs on the facades of both the Cathedral of Siena (Duomo di Siena) and the Certosa of Pavia.

The present study shows an example of chromatic alteration of the surface of marble works due to bacterial colonization.

Riassunto

La patina, naturale alterazione superficiale della materia che costituisce un'opera d'arte, è dovuta al normale processo d'assestamento che i materiali costitutivi della superficie subiscono per l'interazione con gli agenti esterni caratterizzanti l'ambiente in cui è conservata, non collegabile a manife-

sti fenomeni di degradazione e percepibili come una variazione del colore originario del materiale. Questo è il caso delle patine biologiche, dovute generalmente a colonizzazioni da macro e/o microrganismi (funghi, batteri, alghe) che, inducendo il biodeterioramento della superficie, portano alla formazione di aree con pigmentazione arancione, rossa, sino al bruno e al nero. In particolare, la presenza di alterazioni cromatiche (aree rosate), conseguenza di colonizzazioni batteriche, è stata evidenziata in diversi siti come nelle lastre marmoree delle facciate del Duomo di Siena e della Certosa di Pavia.

Lo studio qui riportato mostra un esempio d'alterazione cromatica della superficie di manufatti marmorei indotto dalla colonizzazione batterica.

Résumé

La patine, altération naturelle superficielle de la matière qui constitue une oeuvre d'art, dérive du processus naturel de stabilisation que les matériaux qui constituent la surface subissent du fait de l'interaction avec les agents extérieurs caractérisant le milieu dans lequel l'oeuvre est exposée. Elle n'est pas liée à un phénomène évident de dégradation perceptible par une variation de la couleur d'origine du matériau. C'est ce que nous entendons lorsque nous parlons de patines biologiques, qui sont généralement dues à des colonisations de macro et/ou microorganismes (champignons, bactéries, algues) qui entraînent la biodétérioration de la surface, d'où résulte la formation de zones de pigmentation orange, rouge, voire même brune ou noire. La présence d'altérations chromatiques (zones rosées) suite aux colonisations de bactéries a tout particulièrement été mise en lumière sur différents sites, comme c'est par exemple le cas sur les plaques en marbre des façades du Duomo à Siena et de la Certosa à Pavia.

L'étude présente un exemple d'altération chromatique de la surface des oeuvres en marbre du fait de la colonisation de bactéries.

Zusammenfassung

Die Schicht, natürliche oberflächliche Veränderung des Stoffs, der ein Kunstwerk bildet, ist von dem üblichen Setzung Verfahren verursacht, dem die konstitutiven Stoffen der Oberfläche sich unterziehen, wegen der Interaktion mit den äußeren Agenten, die die Umgebung charakterisieren, in der es aufbewahrt wird. Sie ist nicht verbindbar zu Phänomena von Degradierung, die als ein Wechsel der Originalfarbe wahrnehmbar sind. Das ist der Fall der biologischen Schichten, die gewöhnlich von der Besiedelung aus Makro- und/oder Mikroorganismen (Pilze, Bakterien, Algen) verursachte sind, die zur Entstehung von Zonen mit orange, roter, sogar brauner und schwarzer Pigmentierung bringen, weil sie zur Biobeschädigung der Oberfläche verleiten. Besonders ist das Vorhandensein von Farbenwechseln (rosa Zonen), Folge von Bakterienbesiedelungen, in verschiedenen Stellen, als in den Marmorplatten der Fassade des Doms von Siena und der Kartause von Pavia, hervorgehoben worden.

Die hier wiedergegebene Studie zeigt ein Beispiel von Farbenwechsel der Oberfläche von Marmormanufakturen, der von der Bakterienbesiedelung verleitet worden ist.

Resumen

La pátina, o sea la natural alteración superficial de la materia que constituye una obra de arte, se debe al proceso normal de asentamiento que los materiales que constituyen la superficie sufren por la interacción con los agentes externos del ambiente en que se conserva, sin que sea necesariamente en relación con manifiestos fenómenos de degradación perceptibles como variación del color originario del material. Es éste el caso de las pátinas biológicas, debidas por lo general a colonizaciones de macro y/o microorganismos (hongos, bacterias, algas) que inducen al biodeterioro de la superficie y llevan a la formación de áreas con pigmentación naranja, roja, hasta parda y negra. En particular, la presencia de alteraciones crómicas (áreas rosadas) por colonizaciones bactericas se ha relevado en diferentes sitios, como por ejemplo en las losas de mármol de las fachadas de la

Резюме

Патина, это естественное изменение поверхности материала, из которого изготовлено произведение искусства, происходит в процессе, вызванном неблагоприятным воздействием факторов окружающей среды. Очевидные явления деструкции проявляются в виде изменения первоначального цвета материала. Именно такой характер имеет патина биологического происхождения (главным образом из-за скоплений макро и / или микроорганизмов, таких как плесенные грибки, бактерии, водоросли). Присутствие этих организмов способствует биоразложению поверхностного слоя, что приводит к появлению зон пигментации оранжевого и красного цветов, а иногда даже оттенков от коричневого до чёрного. В частности, наличие хроматических видоизменений (розовые пятна), следствие присутствия бактерий, было обнаружено в ходе анализа состояния различных памятников искусства, например, на мраморных плитах фасада Сиенского собора (Duomo di Siena) и в Картезианском монастыре в Павии (Certosa di Pavia). В представленной статье приведён пример хроматического изменения поверхности мраморных сооружений, изменения, вызванного наличием бактерий.