

CARBONATOGENESIS: MICROBIAL CONTRIBUTION TO THE CONSERVATION OF MONUMENTS AND STONE ARTWORK

Swaranjit S. Cameotra , Tikam C. Dakal*

Institute of Microbial Technology, Sector-39A, Chandigarh-160036, India

Keywords: carbonatogenesis, historic monuments, stone artwork, bioconservation

1. Introduction

Throughout history, mankind has used the most beautiful, durable and strongest stones for the construction of civil structures. Limestone is one of these. It has also been used in the construction of many important historic monuments and sculptures, such as European Cathedrals (Milan Cathedral, Italy), Roman and Greek temples, the Taj Mahal and the Pyramids [1-2]. Limestones are highly porous and hydrophilic in nature, they are highly susceptible to water (such as acid rain) and environmental pollutants. The water often penetrates into the pores of the stones carrying harmful and corrosive ions such as chloride ions and acids. Furthermore, persistent environmental and industrial pollutants, particulate matters, fly ash and smog often get deposited on limestone monuments and stone works and as a result accelerate their deterioration [3]. Micro-organisms inhabiting monuments and stones, upon interaction with other detrimental biotic and abiotic factors, foster weathering and corrosion resulting in deterioration and discoloration of the monuments and stones by a number of known mechanisms. While weathering and corrosion contribute to the physical deterioration of these structures, discoloration does not affect the stone physically but harms its aesthetic appearance.

Over the last few decades there has been increasing global concern over the deterioration of historical monuments and stone works of art. Such deterioration poses a big challenge to archaeologists, geobiologists and bioconservators. Consequently, the immediate need to develop preventive and remedial methodologies is necessary to safeguard these cultural heritage monuments and stone works of art at their original locations. In recent years, great progress has been made in this form of preservative methodology [4-9]. Several physical, mechanical and chemical methods [10-11] have been devised and used for cleaning and restoration purposes but none of the tested treatment methods have proved to be satisfactory for the preservation, consolidation and impermeabilization of deteriorated monuments and works of art [12-13]. Some of these methods have yielded rather poor results and accelerated alterations in the treated stones in terms of texture, physical strength and aesthetic appearance [13]. The plugging of pores in stone works using conventional methods has also been inefficient [14] and the incompatibility of the methods has resulted in irreversible and

* Corresponding author: ssc@imtech.res.in

irreparable damage to the surface of the stone works, resulting in biodeterioration, discoloration and loss in aesthetic beauty of the treated structures [15]. The apparent incompatibility of conventional methods has consequently encouraged the search for newer compatible, effective and eco-friendly conservation treatments [16-17]. Recently, new advances and research in the field of cleaning procedures employing microbes for the bioconservation of marble monuments has shown promising results [12, 14, 18]. The use of well documented molecular biological techniques, such as 16s rRNA sequencing [19-21], denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [22], fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) [12], scanning electron microscopy (SEM) [23-24] and several phylogenetic analysis tools of bioinformatics [20, 25] have assisted researchers in studying the molecular mechanism of biodeterioration and the role of carbonatogenic microbes in bioconservation [26-30].

This review briefly summarizes the process of carbonatogenesis by various micro-organisms and its contribution to the protection of heritage buildings and artistic stone work. It examines several major specific investigations by a member of active research groups and others from the standpoint of dedicated/focused research projects. Future prospects for this technology are discussed.

2. Biomineralization of calcium carbonate: the process of carbonatogenesis

Limestone is mainly composed of calcium carbonate, which is one of the most common and widespread minerals present on the earth. It is widespread in nature and found extensively in fresh water, marine and terrestrial environments [31]. In nature, the production of calcium carbonate is mainly attributed to various physical and chemical processes. Its biological production was earlier suspected and remained controversial for a long time, until recent advances and research were made in this field. The bioremediating potential of the bacterium was envisaged in 1973 [32] but research work aimed at isolating the bacteria having the ability to produce calcium carbonate, has recently been valued for its application in the bioconservation of monuments and stone artwork [30]. These bacteria are widely distributed and have been ubiquitous since the Precambrian. They are found in soil [33-34], in fresh water [35], and in sea water [36]. These micro-organisms are currently the subject of extensive studies, which are yielding a fresh understanding about their role in carbonatogenesis, and aiding the development of new technologies for the bioconservation and consolidation of monuments and stone works of art [13-14, 37]. This group of micro-organisms is known as carbonatogenic micro-organisms or calcifying microbes because of their inherent capability of producing calcium carbonate.

Carbonatogenesis is a process of biomineralization which occurs as a result of biochemical reactions between ions and compounds under certain conditions. The process is induced by a micro-organism under optimal conditions, allowing the extracellular precipitation of calcium carbonate. Microbiological production of calcium carbonate (calcite) may occur autotrophically or heterotrophically [31, 38]. Autotrophic calcium carbonate precipitation is promoted by non-methylophilic methanogenic, anoxygenic, and oxygenic bacteria. These bacteria utilize carbon dioxide in either gaseous or dissolved form originating from a variety of sources, including respiration and fermentation. The utilization of carbon dioxide in a calcium rich environment favors the precipitation of calcium carbonate. Production of calcium carbonate by heterotrophic

bacteria is accomplished by two different mechanisms, active and passive [31, 38]. The passive production involvement of two metabolic cycles, nitrogen and sulfur cycle using three pathways, 1) ammonification of amino acids under anaerobic conditions in the presence of organic matter and calcium, 2) dissimilatory reduction of nitrates under anaerobic and microaerophilic conditions in the presence of organic matter, calcium and nitrate, and 3) hydrolysis of urea or uric acid in the presence of enzyme urease and in an environment rich in organic matters and calcium [31, 39-40]. The active precipitation is not dependent on a biochemical reaction sequence but is the result of ion-exchange through the cell membrane by a still poorly understood mechanism [31, 38]. The process of carbonatogenesis is governed by four factors, 1) calcium concentration, 2) carbonate concentration, 3) pH and 4) presence of nucleation sites [31].

3. Dedicated research project

At its 17th session in Paris in 1972, the general conference of UNESCO adopted the Convention Concerning the Protection of the World and Nature. The programme was aimed at cataloguing and conserving sites of outstanding heritage and natural beauty having scientific, cultural and natural importance. Under this programme many historic buildings and heritage sites of the world were identified and listed as cultural heritage which was in a state of progressive deterioration. Since then, many projects and programmes have been launched in order to safeguard and preserve these heritage buildings and sites. In a few countries, especially in the EU, some focused research projects have been launched to determine the role of biotechnology in conservation science. In addition, some dedicated research groups have aimed their research at the development of remedial methodologies for preserving heritage buildings from the detrimental effects of micro-organisms and air-borne pollutants. The necessary information regarding the contributions of some major EU funded projects in bioconservation and heritage sites can be retrieved from the EU commission, IST and respective project websites (http://ec.europa.eu/research/environment/index_en.cfm?pg=projects&area=all; <http://www.ist-world.org/>); a summary can be found below and is also described in Table 1.

Table 1. Role of some important EU projects in monuments and artworks preservation

Project*	Coordinator and Partners*	Treated Monuments, Stones and Artworks	References
<p>BIOBRUSH Start : 01/02/2002 End : 31/07/2005</p>	<p>Dr. Eric May (Coordinator) University of Portsmouth, UK</p> <p>Partners: Foundation Institute for Material sciences Athens Technical Uni- versity The University of Milano School of Biological Sciences Riga Technical University University of Portsmouth Syremont SpA School of Biological Sciences Biosciences Building</p>	<p>Candoglia marble Stone from Milan Ca- thedral Tholos Dome at Epi- dauros Riga's Brethren Ceme- tery Matera Cathedral Bolsover Castle</p>	<p>Cappitelli et al., 2006 [41]</p> <p>http://ec.europa.eu/research/rtdinfo/special_as/article_823_en.html</p> <p>http://www.graffitiremoval.org.uk/rs1-6.pdf</p> <p>http://www.bio-brush.org</p>
<p>BioDAM Start : 01/12/2002 End : 30/11/2005</p>	<p>Dr. Wolfgang E. Krumbein (Coordinator) Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment, University of Oldenburg, Germany</p> <p>Partners: Historic Scotland University of Oldenburg Fundacion Inasmet- As- sociacion de Investigation Me Institute of Chemistry and Biology of Marine Environment, Oldenberg, Germany Biogema Consulting The Robert Gordon University University of Barcelona VTT, Finland</p>	<p>Rocks samples from Negev Dessert A quarry near Piazza Armerina, Sicily 19th century painting of Parthenon, Athens A limestone (oolithic) sta- tue in the Market Square of Piazza Armerina , Sicily</p>	<p>Krumbien et al. 2003 [42]</p> <p>http://www1.biogema.de/biodam/htdocs/index.php</p>

<p>BIO-REINFORCE Start : 01/02/2001 End : 01/05/2004</p>	<p>Dr. Piero Tiano (Coordinator) Istituto per la Conservazione e La Valorizzazione dei Beni Culturali, Sesto Fiorentino, Italy</p> <p>Partners: Conservation and Valorization of the Cultural Heritage University of Florence Weizmann Institute of Science Loughborough University National Research Council of Italy Quelin SA Royal Institute for Cultural Heritage Trivella SpA University of Barcelona Cercle des partenaires du patrimoine</p>	<p>Pietra di Lecce Marble Gioia,</p>	<p>http://www.ub.es/rpat/bioreinforce/ICVBCreportWeb.PDF</p> <p>http://www.ub.es/rpat/bioreinforce/bioreinforce.htm</p>
<p>CAMEL Start : 01/01/2001 End : 31/12/2003</p>	<p>Dr. Hélène Cachier Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE), CNRS, France</p> <p>Partners: Direction Des Sciences De La Matière- Laboratoire Des Sciences Du Climat Et De L'Environnement Consejo Superior De Investigaciones Cientificas Commissariat a l'Energie Atomique Centre National De La Recherche Scientifique-Delegation Paris A University of East Anglia National Research Council</p>	<p>Milan Cathedral Seville Cathedral S. Maria del Fiore Cathedral, Florence Saint Eustache Church, Paris Tower of London, London Vittoriano Monuments Corner Palace, Venice Mechelen Cathedral, Belgium</p>	<p>http://ec.europa.eu/research/environment/newsanddoc/article_2387_en.htm</p> <p>http://www.caramel.cnrs-gif.fr/</p>

<p>CATS Start : 01/01/2001 End : 31/12/2003</p>	<p>Partners: Council for Scientific Research, Institute of Natural Resources and Agrobiol-ogy, Spain Hans-Knöll Institute for Natural Product Research, Germany University of Rome, Italy University of Barcelona, Spain University of Messina, Italy VTT Biotechnology, Finland University of Wales Swansea, UK IDRONAUT, S.R.L., Italy Pontificia Commissione Di Archaeologia Sacra, Italy</p>	<p>Catacombs of Domitilla, Rome, Italy Catacombs of St. Callistus, Rome, Italy Cave of Bats</p>	<p>Saarela et al. 2004 [43] http://www2.bio.uniroma2.it/biologia/laboratori/lab-botanica/Algae/CATS.htm</p>
<p>COALITION Start : 01/04/2000 End : 31/03/2003</p>			
<p>COMPASS Start : 01/09/2002 End : 31/08/2005</p>	<p>Rob P.J. van Hees Dept. of Building Systems , TNO Building and Construction Research, Delft, The Netherlands Partners: The Italian Ship Research Center Athens Technical University Izar Construcciones Navales S.A. Surface Effect Ship Europe AS-SES Europe AS Grandi Navi Veloci SPA-Grimaldi Group University of Strathclyde Germanischer Lloyd Netherlands Organization for Applied Research (TNO) Blue Star Ferries S.A. Viking Line ASP The University of Southampton</p>	<p>St. Barbara's Church in Culemborg Chapelle Notre-Dame des Anges à Perpignan, France</p>	<p>Sanders and Van-Hees 2005 [44] Groot, C. et al. 2009 [45] http://www.compass-salt.org/</p>

<p>Desalination Start : 12/03/2006 End : 11/03/2009</p>	<p>Dr. Fulvio Zezza (Coordinator) The IUAV, University of Venice</p> <p>Partners: GCI Eindhoven University of Technology Historical Monuments Research Laboratory of France (LRMH) TNO Built Environment and Geosciences, Delft Cologne Institute for Conservation Science, Cologne University of Applied Sciences The IUAV, University of Venice</p>	<p>Masonry in Venice</p> <p>Madame John's Legacy, New Orleans Saint Philibert Church, Dijon, France</p>	<p>http://getty.art.museum/conservation/science/desal/desal_images.html</p> <p>Doehne et al. 2008 [46]</p> <p>Bourgès and Vergès-Belmin, 2008 [47]</p> <p>http://www.bk.tudelft.nl/live/pagina.jsp?id=267cbaf8-92c8-4204-92c0-97c32fff7eb5&lang=en</p>
<p>EPISCON Start : Sep, 2006 End : Oct, 2009</p>	<p>Prof. Rocco Mazzeo (Coordinator) University of Bologna – Ravenna Campus, Ravenna, Italy</p> <p>Partners: University of Bologna School of Conservation Eotyos Lorand University Aristotle University of Thessaloniki Universidad de Oviedo Alexandru Ioan Cuza University of Iasi University of Perugia Instituut Collectie Nederland Hungarian National Museum Istituto Conservazione e Valorizzazione Beni Culturali</p>	<p>Tacca's Fountain, Florence, Italy Second Fountain from Villa la Pietra, Florence, Italy Fountain from Patio de la Sultana, Generalife, Granada, Spain Fountain from Patio de la Lindaraja, Alhambra, Granada, Spain</p>	<p>Cuzman et al. 2010 [48]</p> <p>http://www.episcon.scienze.unibo.it/episcon</p>

<p>McDUR</p>	<p>Dr. P. Tiano (Coordinator) ICVBC, CNR , Italy</p> <p>Partners: Conservation and Valorization of the Cultural Heritage Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation Building Research Establishment Ltd HESP Technology S.R.L. Institute of Physics-Slovak Academy of Sciences Laboratorio Nacional de Engenharia Civil Internazionale Marmi E Macchine Carrara SPA Politecnico De Torino Institute of fundamental Technological Research Bavarian State Conservation Office Technical University of Crete National Research Council of Italy National Research Council</p>	<p>Pedra de Ança belongs to Cretacic Ança limestone formation (Portugal) Monk Park, an oolitic limestone of Great oolitic formation (Middle Jurassic) Carrara Marble (Colonnata basin)</p>	<p>Fratini et al. 2006 [49] http://www.icvbc.cnr.it/mcdur/</p>
--------------	---	--	---

<p>SALTCONTROL Start : 01/01/2004 End : 30/06/2007</p>	<p>The University of Ghent (Coordinator) Belgium</p> <p>Partners: University College London Narodni Pamatkovi Ustav Consejeria De Cultura Remmers Bouwchemie B.V. Stichting Federatie Monumentenwacht Nederland University of Ghent Technische Universiteit Eindhoven Department of Geology and Soil Sciences Nederlandse Organisatie voor the Teogepadt Natuurwetenschappelijk Onderzoek-TNO Consejeria De Cultura De La Junta De Andalucia Netherlands Organisation for Applied Scientific Research Rijksdienst Voor De Monumentenzorg University of Granada Institute of Chemical Engineering and High Temperature Proce Foundation for Research and Technology Westfaelische Wilhelms-Universitaet Muenster ČVUT v Praze</p>	<p>Monastery of San Jerónimo, Granada The Cathedral, Granada The Royal Chapel, Granada</p>	<p>Ruiz-Agudo et al. 2007 [50] https://salt.ugent.be/</p>
--	--	--	--

<p>STONECORE Start : Sep, 2008</p>	<p>Prof. Dr. Johannes Weber (Coordinator) Division of Conservation Sciences, Institute of Art and Technology (IATCS), University of Applied Arts Vienna, Austria</p> <p>Partners and Host Institutes: Institute of Art and Technology, University of Applied Arts, Vienna University Pardubice – Faculty of Art Restoration Delft University of Technology ITAM AS CR, v.v.i., Prague Direction for the Restoration of Ancient Monuments (Greek Ministry of Culture) University of Fine Arts Industrial Microbiological Services LTD GEOTRON Restauro Strotmann & Partner Geoservice Ingenieurbuero Dr. Ziegenbalg GbR</p>	<p>Tower of St. John`s Church, Poland Church Santa Barbara, Czech Republic Tower in Litomysl Castle Pernstejn, Czech Republic Ancient Theatre of Skyion, Greece Theater of Megalopolis Greece Church Hochelten, Germany Leuben Castle, Germany Dahlen Castle, Germany Cathedral Xanthen, Germany 18th Century Marble Statue, Austria</p>	<p>http://www.stonecore-europe.eu/workpackage4.php</p> <p>http://www.stonecore-europe.eu/index.php</p>
--	--	--	---

4. Carbonatogenic bacteria: bioconservators of heritage buildings

The colonization of microbes on sculptural monuments has always been assumed detrimental or destructive and their potential as potent contributors in the protection of monuments has therefore been neglected. Recently, the role of microorganisms in the bioconservation and restoration of monuments and stone works has been acknowledged and evaluated. These microorganisms, though not limited to any specific taxonomic group share a common property: that of extracellular precipitation of calcium carbonate. The majority of microorganisms which are known to precipitate calcium carbonate thereby confer protection to monuments and stone works against biodeterioration (Table 2).

Table 2. Potent bioprotectors of the heritage monuments and art work

No.	Organisms	Phylum	Role/Applications	References
1	<i>Bacillus amilo-liquifaciens</i>	Firmicutes	Conservation of ornamental stones	Lee 2003 [51]
2	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	Biocement (Biocalcin) formation and limestone consolidation	Oriol et al. 1993 [52] Casteneir et al. 2000 [18]

3	<i>Bacillus lentus</i>	Firmicutes	Biocement (Biocalcin) formation and limestone consolidation	Dick et al. 2006 [53] Sarda et al. 2009 [40]
4	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes	Calcite Precipitation	Cacchio et al. 2003 [34]
5	<i>Bacillus pasteurii</i>	Firmicutes	Biocement formation and consolidation of sand column and repair of concrete cracks	Sarda et al. 2009 [40]
6	<i>Bacillus pumilus</i>	Firmicutes	Calcite precipitation	Baskar et al. 2006 [21]
7	<i>Bacillus sphaericus</i>	Firmicutes	Concrete consolidation Biocement (Biocalcin) formation	Hammes et al. 2003 [20] Muyneck et al. 2008a, b [17, 24] Dick et al. 2006 [53]
8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	Calcite precipitation	Baskar et al. 2006 [21]
9	<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	Reduction in water absorption of "Pietra di Lecce", a calcareous stone thereby rendering consolidation	Tiano et al. 1999 [14]
10	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Proteobacteria	Removal of black crust from marble surface	Gauri et al. 1992 [54]
11	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Proteobacteria	Removal of black crust from marble surface	Cappitelli et al. 2007 [12]
12	<i>Halobacillus trueperi</i>	Proteobacteria	Biom mineralization	Rivadeneira et al. 2004 [55]
13	<i>Morcella</i> sp.	Ascomycetes	Formation of carbonate concretions	Masaphy et al. 2009 [56]
14	<i>Myxococcus xanthus</i>	Proteobacteria	Consolidation of ornamental stones Bioconservation of cultural heritage structures	Rodriguez-Navarro et al. 2003 [57] Jroundi et al. 2010 [30]
15	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Proteobacteria	Biocleaning, restoration and removal of animal glue from fresco	Ranalli et al. 2005 [5]
16	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proteobacteria	Biocleaning and restoration of fresco Calcite precipitation	Anderson et al. 1992 [58] Ranalli et al. 2005 [5]

17	<i>Pseudomonas halophila</i>	Proteobacteria	Calcite precipitation	Rivadenerya et al. 2006 [59]
18	<i>Pseudomonas flavescens</i>	Proteobacteria	Biocleaning, restoration and removal of animal glue from fresco	Ranalli et al. 2005 [5]
19	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	Biocleaning, restoration and removal of animal glue from fresco	Ranalli et al. 2005 [5]
20	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobacteria	Consolidation of "Pietra di Lecce", a calcareous stone	Sprocati et al. 2008 [60]
21	<i>Thiobacillus sp.</i>	Proteobacteria	Removal of fouled layer of lichen from weathered concrete specimens	De Graef et al. 2005 [61]
22	<i>Pseudomonas and Bacillus sp.</i>	Proteobacteria	Removal of phenantrene deposit from weathered stones	Saiz-Jimenez, 1997 [62]
23	<i>Pseudomonas sp.</i>	Proteobacteria	Removal of nitrates from the weathered stones	Ranalli et al., 1997 [63]
24	<i>Pseudomonas sp.</i>	Proteobacteria	Limestone consolidation	Zamarreño et al., 2009 [35]
25	<i>Acinetobacter</i>	Proteobacteria	Limestone consolidation	Zamarreño et al., 2009 [35]
26	<i>Micrococcus</i>	Actinobacteria	Reduction in water absorption of "Pietra di Lecce", a calcareous stone thereby rendering consolidation	Tiano et al., 1999 [14]

They mainly belong to different genera within the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Actinomycetes* [30, 60]. Some sulfate reducing bacteria, cyanobacteria [61-62] and fungi [56] are also known to precipitate calcium carbonate but their bioconservation potential is still to be evaluated.

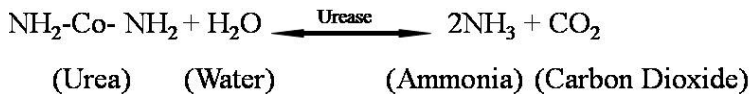
4.1. Role of *Firmicutes*

Major contributors to bioconservation from phylum *Firmicutes* are species of the genus *Bacillus*. Calcium carbonate precipitation by species of this genus is attributed to a ureolytic driven mechanism which operates anaerobically with the aid of *urease* enzyme. When hydrolysis takes place in the calcium rich environment, the precipitation of calcium carbonate is favored. Under optimized conditions (pH, temperature etc), reaction can be controlled to promote the precipitation of hard binding calcium carbonate called Biocement. The enzyme activity was found to be sufficiently high [40] to make its exploitation feasible for the production of biocement on a practical scale. The contribution of some specific microorganisms in the bioconservation of monuments is briefly discussed below.

Bacillus subtilis: The use of lime water as a consolidant of deteriorated calcareous stone has been known since Roman times [66]. This treatment, though highly efficient, has not been practiced for a long time. A similar treatment, which utilizes the precipitated calcium carbonate, a limestone consolidant, was used by Tiano and coworkers [14]. They found that upon treatment of stone samples of 'Pietra di Lecce' (a bioclastic limestone, consisting mainly of CaCO₃) with *Bacillus subtilis* and *Micrococcus*, water permeability of the stone was considerably reduced. This kind of treatment generally makes the stone more water-repellent or water-proof and thus less susceptible to decay by corrosive rain or polluted water.

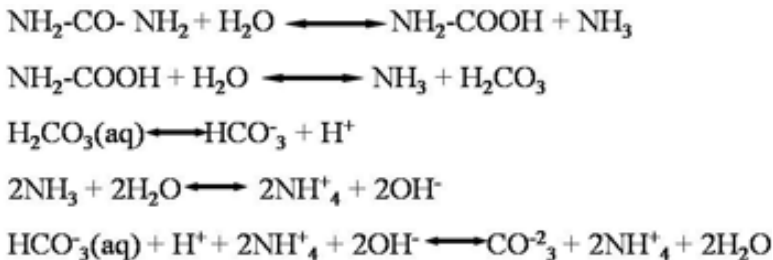
Bacillus pasteurii: This is an endospore-forming soil bacterium, which shows a significantly high urease activity [40]. In particular, *Bacillus pasteurii* intracellularly produces urease which constitutes close to 1% of the cell dry weight. The enzyme mediates the hydrolysis of urea and uric acid to form carbon dioxide and ammonia.

It appears that the ammonia produced as a result of hydrolysis of urea by urease increases the pH of the surroundings and subsequently induces CaCO₃ precipitation. The precipitated CaCO₃ has been used as a potent microbial sealant to remediate pores, cracks and fissures in granite stones and concrete [39]. Owing to the extremely high pH (around 12.5) of the concrete which inhibits growth of *Bacillus pasteurii* (for which the optimal pH for growth is 9.0), plugging of the pores, fissures and cracks in its structural formations is comparatively tedious. To overcome this drawback, a cell



immobilization technique which utilizes polyurethane (PU) is included in the remediation of concrete cracks to protect microbial cells from the high pH conditions [67]. In addition to *Bacillus pasteurii*, the carbonatogenic property of various bacteria of this genus was also evaluated and successfully applied for bioconservation strategies [53].

Bacillus sphaericus: *Bacillus sphaericus* is also a ureolytic bacterium which precipitates calcium carbonate in their micro-environment by converting urea into ammonia and carbon dioxide. Alone or in combination, with immobilization in silica gel, they have been used for reducing the capillary water absorption/uptake capacity and gas permeability of the carbonate [56, 68]. The mechanism of calcium carbonate precipitation by *Bacillus sphaericus* is described below.



Bacillus cereus: Under certain environmental conditions (optimal temperature and pH), the bacteria can be induced to precipitate calcium carbonate extracellularly in the form of a thin layer (biocalcin or biocement). Treatment of the stone with *Bacillus*

cereus led to significant loss of water sorptivity in the treated stone [18, 37, 52]. The formation of a new cement layer made the stone more resistant to physical stress, i.e., more consolidant. Because the thickness of the new cement layer formed by *B. cereus* was only a few microns, Rodriguez-Navarro and co-workers [57] proposed another method of biocement formation using *Myxococcus xanthus* which was thicker than that of *Bacillus cereus*.

Bacillus amyloliquefaciens: *B. amyloliquefaciens* is an alkalophile and is known to precipitate calcium carbonate under controlled culture conditions. The precipitated calcium carbonate is proposed to have a role in the consolidation of ornamental stones [51].

4.2. Role of Proteobacteria

The phylum Proteobacteria includes many sulfate- and sulfur-reducers (reducing sulfate and sulfur to sulfide, respectively) as well as nitrate-reducers (reducing nitrates to gaseous nitrogen or nitrous oxide), which have a great ability to remove or clean sulfate or nitrate salts from the stone surfaces. Below are listed several Proteobacteria that play a significant role in the preservation of ancient cultural heritage buildings and works of art.

Desulfovibrio desulfuricans: Marble stone works of art are highly susceptible to environmental pollutants and acid rain. Sulfuric acid present in acid rain reacts with the calcium carbonate of the marble and transforms it into calcium sulfate dihydrate commonly known as gypsum. During this transformation reaction some airborne pollutants such as carbonaceous particles also become entrapped in the mineral matrix and result in the formation of black crust. Gauri and co-workers [54] for the first time suggested and demonstrated the role of sulfate reducing bacteria in the removal of gypsum encrustation from a marble statue by converting the gypsum to calcite. Although the method was satisfactory enough for the intended purpose, it had two major drawbacks. Firstly, the method could only be applied to small gypsum encrusted works of art, and secondly, the items for treatment had to be made impermeable before immersion into the liquid culture medium [41]. Ranalli *et al.* (2007) and Cappitelli *et al.* (2006) [12,41] illustrated and evaluated the delivery of the microbial systems to large monumental stone works as a means of rendering such works water-impermeable and protecting them.

Desulfovibrio vulgaris: This is a sulfate-reducing bacterium which has a role in the removal of black crust from marble statues. Ranalli and co-workers [63] described that the bioconservation and consolidation properties of the bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* and *Desulfovibrio vulgaris* were greatly enhanced when the bacteria were entrapped in an inorganic mineral matrix Sepiolite, prior to use. The use of the Sepiolite as the delivery system resulted in four times more sulfate removal from the encrusted marble in colonized Sepiolite as compared to non-colonized Sepiolite. Later on, Cappitelli and co-workers [41] tested the potential of two other organic gels as the delivery system. They used Hydrobiogel-97 and Carbogel for the entrapment of bacteria *Desulfovibrio vulgaris* and found that Carbogel is more efficient for sulfate removal from the encrusted marble. Furthermore, the associated precipitation of iron sulfite by the bacteria as a result of reaction between the hydrogen sulfide and the iron of the iron-rich media was also drastically reduced. Cappitelli and co-workers compared chemical and biological methods for the conservation of Milan Cathedral. They used Ammonium car-

bonate-EDTA solution and *Desulfovibrio vulgaris* entrapped in Carbogel (an efficient delivery system whose potential was elucidated by Cappitelli and co-workers [12] for the chemical and biological treatment respectively). The deteriorated marble samples to be treated were allowed to undergo chemical and biological treatment for 24h under similar experimental conditions. After treatment, microscopic examination (SEM-EDS) and FTIR analysis were carried out to check the effectiveness of the treatment methods. The results showed that the chemical treatment removed the crust partially from the stone surface and a clear distinction between the cleaned and uncleaned area was visually apparent. Associated production of undesirable sodium sulfate crystal was also present.

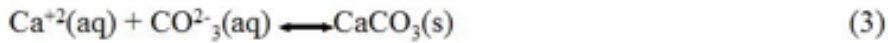
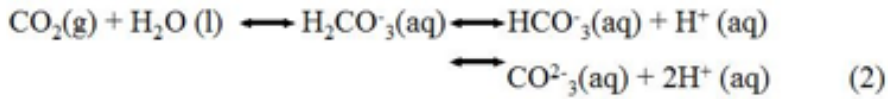
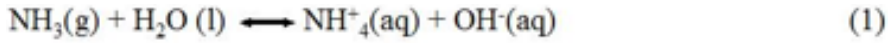
Thiobacillus sp.: Members of the genus *Thiobacillus* are gram-negative, acid tolerant and able to fix CO₂. *Thiobacillus* species may be used for safeguarding concrete structures from fouling by lichens that grow on their surface as a superficial black layer. De Graef and co-workers [61] applied a mixture of members of the genus *Thiobacillus* (mixture called Thio-S) to weathered concrete specimens by sprinkling the bacterial mixture on the surface of the specimens or by submerging the specimens in a suspension of the bacterial mixture, enabling the removal of the fouling layer of lichens.

Pseudomonas sp.: *Pseudomonas* is a gram-negative bacterium belonging to phylum Proteobacteria. Some bacteria are non-pathogenic and non-spore forming and, therefore, can be safely used for the purpose of biocleaning. A few strains such as *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *P. fluorescens*, *P. flavescens* and *P. stutzeri* along with a cocktail of collagenase and protease enzyme have been used to bioclean and restore the Spinello Aretino's painted fresco in Italy. The Fresco was affected by animal glue used in a past restoration. Of these strains, *P. stutzeri* showed highest cell density on the Fresco surface. A concentrated suspension of *P. stutzeri* was directly applied to the Fresco surface to efficiently digest the intricate mass of proteinaceous animal glue to an extent that the gauze clothing the fresco could be easily removed [5, 69]. Some species of *Pseudomonas* are among the most potent nitrate reducing bacteria and are found abundantly in a natural environment. *Pseudomonas sp.* cells also show an ability to remove nitrates from weathered stone [38] and *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.* have also been shown to degrade gypsum and phenantrene (a polycyclic aromatic compound) deposited on weathered stone [62].

Some bacterial isolates of species belonging to the genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter* are able to reduce the pore size of monumental stones by depositing calcium carbonate crystals around and inside the pores, thus suggesting their capability to act as limestone consolidants [35].

Myxococcus sp.: *Myxococcus xanthus* is a gram negative, non-pathogenic soil bacterium having the ability to precipitate calcium carbonate extracellularly. The metabolic activity of the bacteria results in the production of carbon dioxide and ammonia (Eq. 1). Extracellular release of ammonia increases the pH and CO₂ (aqueous) (Eq. 2). Precipitation of calcium carbonate occurs when supersaturation is achieved (Eq. 3). The precipitated calcium carbonate forms a coherent carbonate cement coating of 10-15µm thickness over the treated stone [70]. The micro-organism has been employed in the bioconservation/restoration of important cultural heritage, sculptural monuments, consolidation of ornamental stones [70] and sundried earth constructions, including the mending and repairing of con-

crete cracks. The peculiar gliding motion of the *Myxococcus xanthus* allows the bacterium to perform both, surface and in-depth consolidation[71].



4.3. Role of Actinomycetes

Few reports have been published on the application of Actinomycetes in monument preservation and restoration. This group of bacteria is mainly utilized for rendering calcareous stone impermeability [14, 60]. Significant reduction in capillary water absorption by a calcareous stone (*Pietra di Lecce*), by *Micrococcus sp.* and *Rhodococcus erythropolis* revealed the bioreinforcement and impermeabilizing capability of these microorganisms [14, 60]. Moreover, treatment with *R. erythropolis* showed no chromatic effect (discoloration) thereby preserving the original pristine color of the stone [60].

4.4. Role of Fungi

Although fungi are abundantly present in lime and calcareous soil, little has been reported in relevant literature about the role of fungi in carbonatogenesis [72-73]. Some soil fungi, mainly belonging to *Ascomycetes* are known to facilitate precipitation of calcium carbonate [56] but their role in the bioconservation and biorestitution of monuments is still to be investigated. One reason for this appears to be their secretion of organic acids, which may harm stone surfaces (biocorrosion) and may chelate certain cations to form stable, soluble complexes [74-75] thereby limiting their use as potent bioconservators.

4.5. Others

A few species of Firmicutes, Proteobacteria and Actinomycetes have been reported to produce calcium carbonate, but their potential as bioconservators has not been evaluated. These species include *B. pumilus*, *B. thuringiensis* [21], *Stenotrophomonas sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Lysobacter sp.*, *Microbacterium* [60].

5. Future Implications and Directions

While this technology has now become a routine practice for the cleaning and consolidation of heritage monuments, ornamental stones and art works affected by hazardous air pollutants, biofilms and metabolic pigments and excretates of microbial origin, its appli-

cation in soil stabilization and consolidation to reduce damage by earthquakes, to stabilize the ground for tunneling and mining, to mend cracks in roads, buildings and bridges, to improve the structural properties of bricks, or to sequester CO₂ from the atmosphere, is rarely acknowledged or practiced. In the past few years, natural calamities like earthquakes, storms and hurricanes have destroyed many cultural heritage buildings and damaged numerous artworks. Application of carbonatogenic bacteria for the consolidation of soil so as to render heritage buildings resistant to earthquakes could be a logical extension of the technique. Here in this review, we would also like to draw the attention of various government agencies towards the problem of global warming and would like to encourage them to start new projects with an aim to sequestering atmospheric CO₂ and reducing its concentration to safe limits. CO₂ is a major greenhouse gas responsible for global warming. Its increasing concentration in the atmosphere has been the subject of global concern over the past few decades and is generally known as the greenhouse effect or global warming. Global warming has many serious impacts on environment and organisms including human beings, which may result in immense disasters if not controlled. Several remedial measures, such as the use of clean fuel in automobiles and forest conservation have been considered, but no satisfactory solution has yet been found. In such a case the sequestration of atmospheric CO₂ by carbonatogenic bacteria [76] could be a promising approach. The aim of this review is also to draw the attention of various government agencies towards the problem of global warming and encourage them to start new projects with the aim of sequestering atmospheric CO₂ and reducing its concentration to a normal and safe level.

6. Concluding remark

Current research in the field of bioconservation has extended our knowledge and understanding of the mechanism and role of some organisms in the biodeterioration of historic monuments and consequently the application of carbonatogenic microbes in conferring protection to heritage buildings and sculptures. In our view, the process of bioconservation generally utilizes three strategies: 1) bio-deposition or superficial coating of calcium carbonate (biocalcin) on the degraded limestone structures [37, 53], 2) cleaning and removing outer encrusting layers of sulfate, nitrate and oxalate etc. [41] and 3) introducing calcium carbonate-forming bacteria in pores of limestone to promote consolidation [35, 57].

In the era of globalization and industrialization, protecting and restoring historic monuments and stone works seems to be a difficult task. Though research in this field has seen many advances in terms of the development of effective delivery systems [41], efficient algicides, biocides and photocatalytic based [77-78] technologies however, inefficient in-depth consolidation [37], resistance of some microbes to biocides treatments has raised another issue [79]. Therefore, the fruitfulness of the conservation treatment can be envisaged only if all necessary measures for preventing future growth of microorganisms are properly followed. Treatment aimed at conservation and restoration may prove useless if proper after-care is not applied to a conserved or restored monument [80].

Acknowledgements

We would like to thank the Director, IMTech, for providing the resources for writing the manuscript and CSIR India, for providing a research Fellowship to Tikam Chand Dakal.

References

- [1] GAURI K.L., BANDYOPADHYAY J.K., 1999, *Carbonate Stone: Chemical Behaviour, Durability, and Conservation*, Wiley-Interscience, New York.
- [2] CHAND T., CAMEOTRA S.S., 2011, Geomicrobiology of heritage monuments and artworks: Mechanisms of biodeterioration, bioconservation strategies and applied molecular approaches, in *Bioremediation: Biotechnology, Engineering and Environmental Management*, Nova Science Publishers, New York.
- [3] WEBSTER A.M., MAY E., 2006, *Bioremediation of weathered-building stone surfaces*, Trends in Biot. 24, pp. 255-260
- [4] SIANO S., SALIMBENI R., 2009, *Advances in laser cleaning of artwork and objects of historical interest: The optimized pulse duration approach*, Acc. Chem. Res., 43, pp. 739-750.
- [5] RANALLI G., ALFANO G., BELLI C., LUSTRATO G., COLOMBINI M.P., BONADUCE I., ZANARDINI E., ABBRUSCATO P., CAPPITELLI F., SORLINI C., 2005, *Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes*, J. Appl. Microbiol. 98, pp. 73–83.
- [6] DA SILVA NUNES-HALLDORSON V., DURAN N., 2003, *Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors*, Braz. J. Microbiol., 34, pp. 91–96.
- [7] SLATON D., NORMANDIN K.C., 2005, *Masonry cleaning technologies*, J. Architect. Conserv., 11, pp. 7–31.
- [8] FAVARO M., TOMASIN P., OSSOLA F., VIGATO P.A., 2008, *A novel approach to consolidation of historical limestone: the calcium alkoxides*, Appl. Organometal. Chem., 22, pp. 698–704.
- [9] BARABESI C., GALIZZI A., MASTROMEI G., ROSSI M., TAMBURINI E., PERITO B., 2007, *Bacillus subtilis gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization*, Journal of Bacteriology, 189, pp. 228–235.
- [10] SALVADORI O., 2003, *The control of biodeterioration*, Coalition, 6, pp. 16–20.
- [11] FERNANDES P., 2006, *Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, pp. 291–296.
- [12] CAPPITELLI F., LUCIA TONIOLO L., SANSONETTI A., GULOTTA D., RANALLI G., ZANARDINI E., SORLINI C., 2007, *Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments*, Appl. Environ. Microb., 73, pp. 5671–5675.
- [13] GONZÁLEZ-MUÑOZ M.T., 2008, *Bacterial biomineralization applied to the protection-consolidation of ornamental stone: current development and perspectives*, Coalition, 15, pp. 12–18.
- [14] TIANO P., BIAGIOTTI L., MASTROMEI G., 1999, *Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation*, J. Microbiol. Meth., 36, pp. 139–145.
- [15] SCHEERER S., ORTEGA-MORALES O., GAYLARDE C., 2009, *Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview*, Adv. Appl. Microbiol., 66, pp. 97-139.
- [16] HANSEN E., DOEHNE E., FIDLER F., LARSON J., MARTIN B., MATTEINI M., RODRIGUEZ-NAVARRO C., PARDO E.S., PRICE C., DE TAGLE A., TEUTONICO J.M., WEISS N., 2003, *A review of selected inorganic consolidants and pro-*

- tective treatments for porous calcareous materials*, Rev. Conser., 4, pp. 13–25.
- [17] DE MUYNCK W., COX K., DE BELIE N., VERSTRAETE W., 2008a, *Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete*, Const. Build. Mater., 22, pp. 875–885.
- [18] CASTANIER S., LE MÉTAYER-LEVREL G., ORIAL G., LOUBIÈRE J.F., PERTHUISOT J.P., 2000., *Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property*, in *Of microbes and art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp. 201–216, Plenum, New York.
- [19] PALLA F., FEDERICO C., RUSSO R., ANELLO L., 2002, Identification of *Nocardia restricta* in biodegraded sandstone monuments by PCR and nested-PCR amplification. FEMS Microbiology ecology. vol. 39/1, pp. 85–8.
- [20] HAMMES F., BOON N., DE VILLIERS J., VERSTRAETE W., SICILIANO S.D., 2003, *Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation*, Appl. Environ. Microbiol., 69, pp. 4901–4909.
- [21] BASKAR S., BASKAR R., MAUCLAIRE L., MCKENZIE J.A., 2006, *Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for Sahastradhara Caves, Dehradun, India*, Curr. Sci. India, 90, pp. 58–64.
- [22] NAKATSU C.H., 2007, *Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis*, Soil Sci. Soc. Am. J., 71, pp. 562–571.
- [23] PALLA F., TARTAMELLA E., 2007, Chromatic alteration on marable surfaces analyzed by molecular biology tools. Conservation Science in Cultural Heritage, 7, pp. 111–127.
- [24] DE MUYNCK W., DEBROUWER D., DE BELIE N., 2008b, *Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials*, Cement Concrete Res., 38, pp. 1005–1014.
- [25] JIMENEZ-LOPEZ C., 2007, *Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone*, Chemosphere, 68, pp. 1929–1936
- [26] PALLA F., BILLECI N., MANCUSO F.P., PELLEGRINO L., LORUSSO L.C., 2010, Microscopy and Molecular biology techniques for the study biocenosis diversity in semi-confined environments. Conservation Science in Cultural Heritage, 10, pp. 185–194.
- [27] PALLA F., ANELLO L., PECORELLA S., RUSSO R., DAMIAN F., 2003, Characterization of bacterial communities on stone monuments by molecular biology tools, in *Molecular biology and cultural heritage*, pp. 115–118, Swets & Zeitlinger BV, Lisse.
- [28] PIÑAR G., GURTNER C., LUBITZ W., RÖLLEKE S., 2001, *Identification of archaea in objects of art by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and shotgun cloning*, Meth. Enzymol., 336, pp. 356–366.
- [29] LAIZ L., PIÑAR G., LUBITZ W., SAIZ-JIMENEZ C., 2003, The colonisation of building materials by microorganisms as revealed by culturing and molecular methods, in *Molecular biology and cultural heritage*, pp. 23–28, Swets & Zeitlinger BV, Lisse.
- [30] JROUNDI F., FERNÁNDEZ-VIVAS A., RODRIGUEZ-NAVARRO C., BEDMAR E.J., GONZÁLEZ-MUÑOZ M.T., 2010, *Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity*, Microb. Ecol. 60, pp. 39–54.

- [31] HAMMES F., VERSTRAETE, W., 2002, *Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation*, Environ. Sci. Biotechnol., 1, pp. 3–7.
- [32] BOQUET E., BORONAT A., RAMOS-CORMENZANA A., 1973, *Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon*, Nature, 248, pp. 21–28.
- [33] CACCHIO P., CONTENUTO R., ERCOLE C., CAPPUCCIO G., MARTINEZ M.P., LEPIDI A., 2004, *Involvement of microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the Cervo Cave (L'Aquila-Italy)*, Geomicrobiol. J., 21, pp. 497–509.
- [34] CACCHIO P., ERCOLE C., CAPPUCCIO G., LEPIDI A., 2003, *Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from limestone cave and from a loamy soil*, Geomicrobiol. J., 20, pp. 85–98.
- [35] ZAMARREÑO D.V., MAY E., ROBERT I., 2009, *Influence of environmental temperature on biocalcification by non-spring freshwater bacteria*, Geomicrobiol. J., 26, pp. 1–12.
- [36] NOVITSKY, J.A., 1981, *Calcium carbonate precipitation by marine bacteria*, Geomicrobio. J., 2, 375–388.
- [37] LE MÉTAYER-LEVREL G., CASTANIER S., ORIAL G., LOUBIÈRE J.F., PERTHUISOT J.P., 1999, *Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony*, Sedi. Geol., 126, pp. 25–34.
- [38] CASTANIER S., LE MÉTAYER-LEVREL G., PERTHUISOT J.P., 1999, *Ca-carbonates precipitation and limestone génesis—the microbiogeologist point of view*, Sediment. Geol. 126, pp. 9–23.
- [39] RAMACHANDRAN S.K., RAMAKRISHNAN V., BANG S.S., 2001, *Remediation of concrete using microorganisms*, ACI Mater. J. 98, pp. 3–9.
- [40] SARDA D., CHOONIA H.S., SARODE D.D., LELE S.S., 2009, *Biocalcification by Bacillus pasteurii urease: a novel application*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36, pp. 1111–1115.
- [41 – 53] CAPPITELLI F., ZANARDINI E., RANALLI R., MELLO E., DAFFONCHIO D., SORLINI C., 2006, *Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria*, Appl. Environ. Microbiol., 72, pp. 3733–3737.
- [42] KRUMBIEN W.E., 2003, *Patina and Cultural Heritage – a Geomicrobiologist's Perspective*. Cultural Heritage Research: a Pan European Challenge, in 5th EC Conference, Cracow.
- [43] SAARELA M., ALAKOMI H.L., SUIHKO M.L., MAUNUKSELA L., RAASKA L., MATTILA-SANDHOLM T., 2004, *Heterotrophic microorganisms in air and biofilm samples from Roman catacombs, with special emphasis on actinobacteria and fungi*, Int. Biod. Biodegr., 54, pp. 27-37.
- [44] SANDERS M., VAN HEES R.P.J., 2005, *Monitoring of the moisture and salt load in restoration plasters in St. Barbara's Church in Culemborg*, Proceedings Rilem Workshop "Historic Mortars", Delft, The Netherlands.
- [45] GROOT C., VAN HEES R., WIJFFELS T., 2009, *Selection of plasters and renders for salt laden masonry substrates*, Construction and Building Materials, 23, pp. 1743-1750.
- [46] DOEHNE E., SCHIRO M., ROBY T., CHIARI G., LAMBOUSY G., KNIGHT H., 2008, *Evaluation of poultice desalination process at Madame John's Legacy, New*

- Orleans, in J. Lukaszewicz, P. Niemcewicz (eds.), Proceedings of 11th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Nicolaus Copernicus University Press, Torun, pp. 857-864.
- [47] BOURGÈS A., VERGÈS-BELMIN V., 2008, *Comparison and optimization of five desalination systems on inner walls of Saint Philibert Church in Dijon, France*, in Salt Weathering on Buildings and Stone Sculpture, SWBSS, Copenhagen, Denmark.
- [48] CUZMAN O.A., VENTURA S., SILI C., MASCALCHI C., TURCHETTI T., D'ACQUI L.P., TIANO P., 2010, *Biodiversity of phototrophic biofilms dwelling on monumental fountains*, Microb. Ecol., 60, pp. 81-95
- [49] FRATINI F., RESCIC S., TIANO P., 2006, *A new portable system for determining the state of conservation of monumental stones*, Materials and Structures, 39, pp. 139-147.
- [50] RUIZ-AGUDO E., MEES F., JACOBS P., RODRIGUEZ-NAVARRO C., 2007, *The role of saline solution properties on porous limestone salt weathering by magnesium and sodium sulfates*, Environ. Geol., 52, pp. 269-281.
- [51] LEE Y.N., 2003, *Calcite Production by Bacillus amyloliquefaciens CMB01*, J. Microbiol., 41, pp. 345-348.
- [52] ORIAL G., CASTANIER S., LE METAYER G., LOUBIÈRE J.F., 1993, *The biomineralization: a new process to protect calcareous stone applied to historic monuments*, in H. Ktoishi, T. Arai, K. Yamano (eds.), Proceedings of the 2nd International Conference of Biodeterioration of Cultural Property, International Communications Specialists, Tokyo, Japan, pp. 98-116.
- [53] DICK J., DE WINDT W., DE GRAEF B., SAVEYN H., VAN DER MEEREN P., DE BELIE N., VERSTRAETE W., 2006, *Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by Bacillus species*, Biodegradation, 17, pp. 357-367.
- [54] GAURI L.K., PARKS L., JAYNES J., ATLAS R., 1992, *Removal of sulphated crust from marble using sulphate-reducing bacteria*, in G.M. Robin (ed.), Stone cleaning and the nature, soiling and decay mechanisms of stone, Proceedings of the International Conference.: Donhead Publishing Ltd., Edinburgh, United Kingdom, pp. 160-165.
- [55] RIVADENEYRA M.A., PÁRRAGA J., DELGADO R., RAMOS-CORMERZANA A., DELGADO G., 2004, *Biomineralization of carbonates by Halobacillus trueperi in solid and liquid media with different salinities*, FEMS Microbiol. Ecol., 48, pp. 39-46.
- [56] MASAPHY S., ZABARI L., PASTRANA J., DULTZ S., 2009, *Role of fungal mycelium in the formation of carbonate concretions in growing media—An investigation by SEM and synchrotron-based X-ray tomographic microscopy*, Geomicrobio. J., 26, pp. 442-450.
- [57] RODRIGUEZ-NAVARRO C., RODRIGUEZ-GALLEGO M., CHEKROUN K.B., GONZALEZ-MUÑOZ M.T., 2003, *Conservation of ornamental stone by Myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization*, Appl. Environ. Microbiol., 69, pp. 2182-2193.
- [58] ANDERSON S., APPANNA V.D., HUANG J., VISWANATHA T., 1992, *A novel role for calcite in calcium homeostasis*, FEBS Lett., 308, pp. 94-96.
- [59] RIVADENEYRA M.A., DELGADO R., PÁRRAGA J., RAMOS-CORMENZA A., 2006, *Precipitation of minerals by 22 species of moderately halophilic bacteria in artificial marine salts media: influence of salt concentration*, Folia Microbiol., 51, pp. 445-453.

- [60] SPROCATI A.R., ALISI C., TASSO F., 2008, *A microbial survey of the Etruscan Mercareccia Tomb (Italy): Contribution of microorganisms to deterioration and restoration*, in 9th International Conference on NDT of Art, Jerusalem Israel.
- [61] DE GRAEF B., DE WINDT W., DICK J., VERSTRAETE W., DE BELIE N., 2005, *Cleaning of concrete fouled by lichens with the aid of Thiobacilli*, Materials and Structures, 38, pp. 875-882.
- [62] SAIZ-JIMENEZ C., 1997, *Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings*, Int. Biod. Biodegr., 40, pp. 225-232.
- [63] RANALLI G., CHIAVARINI M., GUIDETTI V., MARSALA F., MATTEINI M., ZANARDINI E., SORLINI C., 1997, *The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks*, Int. Biod. Biodegr., 40, pp. 255-261.
- [64] WRIGHT D.T., 1999, *The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia*, Sedimentary Geol., 126, pp. 147-157.
- [65] WARTHMANN R., VAN LITH Y., VASCONCELOS C., MCKENZIE J.A., KARPOFF M., 2000, *Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments*, Geol., 28, pp. 1091-1094.
- [66] PRICE C.A., 1984, *The consolidation of limestone using a lime poultice and lime-water*, in Proceedings of Adhesives and Consolidants IIC Meeting. Paris, IC, London. pp. 160-162.
- [67] BANG S.S., GALINAT J.K., RAMAKRISHNAN V., 2001, *Calcite precipitation induced by polyurethane immobilized Bacillus pasteurii*, Enz. Microb. Tech., 28, pp. 404-409.
- [68] TITTELBOOM K.V., DE BELIE N., DE MUYNCK W., VERSTRAETE W., 2010, *Use of bacteria to repair cracks in concrete*, Cement Concrete Res., 40, pp. 157-166.
- [69] ANTONIOLI P., ZAPPAROLI G., ABBRUSCATO P., SORLINI C., RANALLI G., RIGHETTI P.G., 2005, *Art-loving bugs: the resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery*, Proteomics, 5, pp. 2453-2459.
- [70] PIÑAR G., JIMENEZ-LOPEZ C., STERFLINGER K., ETTEAUER J., JROUNDI F., FERNANDEZ-VIVAS A., GONZALEZ-MOÑOZ M.T., 2010, *Bacterial community dynamics during the application of a Myxococcus xanthus-inoculated culture medium used for consolidation of ornamental limestone*. Microb. Ecol., 60, pp. 15-28.
- [71] MCBRIDE M.J., HARZELL P., ZUSMAN D.R., 1993, *Motility and tactic behaviour of Myxococcus Xanthus*, in *Myxobacteria II*, pp. 285-305, American Society for Microbiology (ASM), Washington.
- [72] BURFORD E.P., FOMINA M., GADD G.M., 2003, *Fungal involvement in bio-weathering and biotransformation of rocks and minerals*. Miner. Mag. 67, pp. 1127-1155.
- [73] BURFORD E.P., HILLIER S., GADD G.M., 2006, *Biominalization of fungal hyphae with calcite (CaCO₃) and calcium oxalate mono- and dihydrate in carboniferous limestone microcosms*, Geomicrobiol. J., 23, pp. 599-611.
- [74] WARSCHIED T., BRAAMS J., 2000, *Biodeterioration of stone: a review*, Int. Biod. Biodegr., 46, pp. 343-368.
- [75] MCNAMARA C.J., MITCHELL R., 2005, *Microbial deterioration of historic stone*, Fronti. Ecol. Envir, 3, pp. 445-451.

- [76] LEE B.D., APEL W.A., WALTON M.R., 2005, *Calcium carbonate formation by Synechococcus sp. strain PCC 8806 and Synechococcus sp. strain PCC 8807*, *Bioresour. Technol.*, 97, pp. 2427-2434.
- [77] GLADIS F., EGGERT A., KARSTEN U., SCHUMANN R., 2010, *Prevention of biofilm growth on man-made surfaces: evaluation of antifungal activity of two biocides and photocatalytic nanoparticles*, *Biofouling*, 26, pp. 89–101.
- [78] ALAKOMI H.L., PAANANEN A., SUIHKO M.L., HELANDER I.M., SAARELA M., 2006, *Weakening effect of the cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration*, *Applied and Environment Microbiology*, 72, pp. 4695-4703.
- [79] BOLÍVAR F.C., SÁNCHEZ-CASTILLO P.M., 1997, *Biominalization processes in the fountains of the Alambra, Ganada, Spain*, *Int. Biod. Biodegr.*, 40, pp. 205–215
- [80] DORNIEDEN T., GORBUSHIN A., KRUMBEIN W.E., 2000, *Patina: physical and chemical interactions of sub-aerial biofilms with objects of art*, in O. Ciferri, P. Tiano, G. Mastromei (eds.), *Of microbes and art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp. 105-120, Phenum, New York.

Carbonatogenesi: contributo microbico nella conservazione dei monumenti e delle opere d'arte in pietra

Parole chiave: carbonatogenesi, monumenti storici, materiali lapidei, bioconservazione

1. Introduzione

Nel corso della storia, l'umanità ha utilizzato le pietre più belle, resistenti e solide per la costruzione di opere civili. Il calcare è uno di questi materiali. Esso è stato anche utilizzato nella costruzione di molti importanti monumenti storici e manufatti scultorei come per le cattedrali europee (per es. il Duomo di Milano, Italia), i templi romani e greci, il Taj Mahal, le piramidi [1-2].

Dal momento che i calcari, di natura molto porosi e idrofili, sono altamente sensibili all'acqua (come le piogge acide) e agli inquinanti ambientali, l'acqua penetra spesso in profondità nei pori delle pietre trasportando ioni nocivi e corrosivi, come cloruri e acidi che le danneggiano. Inoltre, data la costante presenza di inquinanti ambientali e industriali, particolato, ceneri e smog spesso si depositano sui monumenti di pietra calcarea accelerando il loro deterioramento [3]. I microrganismi, presenti all'interno dei monumenti e delle pietre, a seguito di interazioni con altri fattori dannosi biotici ed abiotici e agenti atmosferici, causano il deterioramento e l'alterazione cromatica dei monumenti e delle pietre a causa di una serie di meccanismi noti. Mentre gli agenti atmosferici e la corrosione contribuiscono al deterioramento fisico di queste strutture, l'alterazione cromatica non incide sulla struttura della pietra, ma ne danneggia l'aspetto estetico.

Negli ultimi decenni c'è stata una crescente preoccupazione a livello mondiale per il deterioramento dei monumenti storici e di opere d'arte in pietra. Tale deterioramento rappresenta una grande sfida per archeologi, geo-biologi e bioconservatori e mette in evidenza l'immediata necessità di sviluppare metodologie preventive e correttive per tutelare questi monumenti e le opere d'arte in pietra. Negli ultimi anni vi sono stati grandi progressi nell'ambito della metodologia di prevenzione [4-9].

Diversi metodi fisici, meccanici e chimici [10-11] sono stati messi a punto e utilizzati per la pulitura e il restauro, ma nessuno dei metodi di trattamento testati si è dimostrato soddisfacente per la prevenzione, il consolidamento e l'impermeabilizzazione dei materiali lapidei [12-13]. Alcuni di questi metodi hanno dato risultati insoddisfacenti, causando rapide alterazioni delle pietre dal punto di vista sia strutturale che estetico [13].

Il riconsolidamento dei materiali lapidei mediante metodi convenzionali si è spesso rivelato inefficiente [14] e la non compatibilità dei metodi ha causato danni irreversibili e irreparabili alla superficie di questi materiali, con conseguente biodeterioramento e perdita dal punto di vista estetico delle strutture trattate negli ultimi anni [15].

L'apparente non compatibilità dei metodi convenzionali ha favorito la ricerca di nuovi trattamenti di conservazione compatibili, efficaci ed ecologici [16-17]. Recentemente, nuovi progressi e ricerche nel campo delle procedure di pulitura che utilizzano i microbi per la bioconservazione dei monumenti in marmo hanno mostrato risultati promettenti [12, 14, 18]. L'utilizzo di strumenti ben documentati di biologia molecolare quali 16s rRNA [19-21], elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE) [22], spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) [12], microscopia elettronica a scansione (SEM) [23-24] e diversi strumenti di analisi filogenetiche di bioinformatica [20, 25] ha permesso di studiare il meccanismo molecolare di biodeterioramento e il ruolo dei microbi carbonatogenici nella bioconservazione [26-30].

Questo lavoro riassume brevemente il processo di carbonatogenesi di vari microrganismi e il suo contributo alla tutela del patrimonio edilizio e culturale. Esso esamina alcune indagini specifiche da parte di alcuni importanti gruppi di ricerca attivi e di altri che si sono occupati di tali progetti di ricerca dal punto di vista tecnologico. Sono discusse le prospettive future.

2. Biom mineralizzazione di carbonato di calcio: il processo di carbonatogenesi

Il calcare è costituito da carbonato di calcio che è uno dei minerali più comuni e diffusi presenti sulla Terra. È molto diffuso in natura e si trova nell'ambiente acquatico, marino e terrestre [31]. In natura, la produzione di carbonato di calcio è principalmente attribuita a vari processi fisici e chimici. La produzione biologica è stata in precedenza supposta ed è rimasta controversa per lungo tempo, fino ai recenti progressi e ricerche in questo campo. Il potenziale di biorimedia del batterio è stato previsto nel 1973 [32] ma la ricerca, finalizzata all'isolamento di batteri che hanno la capacità di produrre carbonato di calcio, è stata soltanto di recente applicata nella bioconservazione di monumenti e opere d'arte di pietra [30]. Questi batteri sono ampiamente diffusi e sono conosciuti sin dal Precambriano. Si trovano nel suolo [33-34], in acqua dolce [35] e in acqua di mare [36]. Questi microrganismi sono attualmente oggetto di studi approfonditi riguardo al loro ruolo nella carbonatogenesi, al fine di sviluppare nuove tecnologie per la bioconservazione e il consolidamento di monumenti e di opere d'arte in pietra [13-14, 37]. Questi microrganismi sono noti come microrganismi carbonatogenici o microbi calcificanti per la loro intrinseca capacità di produrre carbonato di calcio.

La carbonatogenesi è un processo di biom mineralizzazione che si verifica come risultato di reazioni biochimiche tra ioni e composti in determinate condizioni. In condizioni ottimali il processo è indotto dal microrganismo che permette la precipitazione di carbonato di calcio extracellulare. La produzione microbiologica di carbonato di calcio (calcite) può verificarsi in modo autotrofico ed eterotrofico [31, 38]. La precipitazione di carbonato di calcio autotrofo è promossa da batteri metanogeni non-metilofili, atossici e ossigenici. Questi batteri utilizzano biossido di carbonio sia in forma gassosa che liquida proveniente da una varietà di fonti, comprese respirazione e fermentazione. L'utilizzo di anidride carbonica in un ambiente ricco di calcio favorisce la precipitazione di carbonato di calcio. La produzione di carbonato di calcio da parte di batteri eterotrofi è definita, in relazione ai diversi meccanismi, attiva o passiva [31, 38]. La produzione passiva coinvolge i due cicli metabolici, il ciclo dell'azoto e dello zolfo e utilizza tre vie: 1) l'ammonificazione di amminoacidi in condizioni anaerobiche in presenza di sostanza organica e di calcio, 2) la riduzione dissimilativa di nitrati in condizioni anaerobiche e microaerofile in presenza di materia organica, calcio e nitrato, 3) l'idrolisi di urea o acido urico in presenza di ureasi e in ambiente ricco di sostanze organiche e calcio [31, 39-40]. La precipitazione attiva non dipende da una sequenza di reazioni biochimiche, ma è il risultato di scambio ionico attraverso la membrana cellulare con un meccanismo ancora scarsamente compreso [31, 38]. Il processo di carbonatogenesi è governato da quattro fattori: 1) la concentrazione di calcio, 2) la concentrazione di carbonato, 3) il pH, 4) la presenza di siti di nucleazione [31].

3. Progetto di ricerca dedicato

In occasione della 17° sessione svoltasi a Parigi nel 1972, la Conferenza generale dell'UNESCO ha adottato la Convenzione per la protezione del mondo e della natura. Il programma riguardava la catalogazione e la conservazione dei siti del patrimonio culturale e ambientale di importanza storica e scientifica. Nell'ambito di questo programma molti edifici storici e siti del patrimonio culturale di tutto il mondo sono stati identificati ancorché in uno stato di progressivo deterioramento. Sono stati quindi avviati molti progetti e programmi al fine di salvaguardare e preservare questi edifici

e siti storici. In alcuni paesi, in particolare nell'UE, diversi progetti di ricerca si sono concentrati nello studio del ruolo della biotecnologia nella scienza della conservazione. Altri gruppi di ricerca si sono direzionati allo sviluppo di metodologie di recupero per la conservazione del patrimonio edilizio dagli effetti dannosi da parte di microrganismi e sostanze inquinanti aerodisperse. Le informazioni necessarie, per quanto riguarda i contributi di alcuni grandi progetti finanziati dall'UE in bioconservazione dei siti, sono riportate dalla Commissione Europea e dell'IST nei siti web relativi ai progetti

(http://ec.europa.eu/research/environment/index_en.cfm?pg~~V) progetti = area & = tutti; <http://www.ist-world.org/~V>) e i risultati sono riassunti qui di seguito e descritti anche nella Tabella 1.

4. Batteri carbonatogenici: bioconservatori del patrimonio culturale

La colonizzazione dei microbi su monumenti scultorei è, come è noto, dannosa o distruttiva ed il loro potenziale, come importante contributo nella protezione dei monumenti, è stato comunemente trascurato. Recentemente il ruolo dei microrganismi in bioconservazione e restauro di monumenti e opere in pietra è stato riconosciuto e valutato. Questi microrganismi, anche se non limitati ad alcun specifico gruppo tassonomico, condividono una proprietà comune relativa alla precipitazione di carbonato di calcio extracellulare. La maggior parte dei microrganismi che danno luogo alla precipitazione del carbonato di calcio sono potenzialmente in grado di consolidare monumenti e opere in pietra, andando in direzione opposta al biodeterioramento (Tabella 2). Essi principalmente appartengono a generi differenti all'interno dei phyla Firmicutes, Proteobacteria e Actinomycetes [30, 60]. Alcuni batteri solfato-riducenti, cianobatteri [61-62] e funghi [56] sono anche noti per la loro capacità di precipitare carbonato di calcio, ma il loro potenziale di bioconservazione è ancora da valutare.

4.1. Ruolo dei Firmicutes

Alcune specie appartenenti al genere *Bacillus* sono annoverate tra i principali microrganismi in grado di indurre la precipitazione di carbonato di calcio, mediante un meccanismo di tipo ureolitico, che opera in condizioni anaerobiche con l'aiuto dell'enzima ureasi, favorito da un ambiente ricco di calcio. In condizioni ottimizzate (pH, temperatura, ecc), la reazione può essere controllata per favorire la precipitazione di carbonato di calcio molto compatto chiamato Biocemento. L'attività dell'enzima è stata trovata essere sufficientemente elevata [40] per rendere il suo sfruttamento fattibile per la produzione di biocemento su scala pratica. Il contributo di qualche specifico microrganismo in bioconservazione dei monumenti è brevemente descritto di seguito.

Bacillus subtilis: l'uso di acqua di calce, come consolidante della pietra calcarea deteriorata, è conosciuta dal tempo dei Romani [66]. Questo trattamento però, altamente efficiente, non è stato praticato per lungo tempo. Un trattamento simile, che utilizza il carbonato di calcio precipitato, come consolidante calcareo, è stato utilizzato da Tiano e collaboratori [14]. Essi hanno scoperto che, dopo il trattamento dei campioni di 'Pietra di Lecce' (un calcare bioclastico costituito principalmente da CaCO_3) con *Bacillus subtilis* e *Micrococcus*, la permeabilità all'acqua della pietra è stata notevolmente ridotta. Questo tipo di trattamento rende in genere la pietra più idrorepellente o impermeabile e quindi meno suscettibile al deterioramento da piogge corrosive o acqua inquinata.

Bacillus pasteurii: questo è un batterio del suolo che produce endospore e che mostra una attività di ureasi notevolmente elevata [40]. In particolare il *Bacillus pasteurii* all'interno della cellula produce ureasi che costituisce circa l'1% del peso secco cellulare. L'enzima media l'idrolisi di urea e acido urico per formare biossido di carbonio e ammoniaca.

Sembra che l'ammoniaca, prodotta come risultato di idrolisi dell'urea tramite l'enzima ureasi, aumenti il pH degli ambienti e induca successivamente la precipitazione di CaCO_3 . Il CaCO_3 precipitato è stato utilizzato come potente sigillante microbico per rimediare pori, crepe e fessure in pietre di granito e in calcestruzzo [39]. A causa del pH estremamente elevato (circa 12,5) del calcestruzzo, che inibisce la crescita di *Bacillus pasteurii* (per il quale il pH ottimale per la crescita è 9,0), l'ostruzione dei pori delle fessure e delle crepe nelle sue formazioni strutturali è relativamente limitato. Per superare questo inconveniente, è impiegata una tecnica di immobilizzazione cellulare che utilizza poliuretano (PU) per proteggere le cellule microbiche dalle condizioni di pH elevato [67] nel trattamento delle fessure della pietra. Oltre al *Bacillus pasteurii*, la proprietà carbonatogenica di diversi batteri di questo genere è stata valutata e applicata con successo nelle strategie di bioconservazione [53].

Bacillus sphaericus: il *Bacillus sphaericus* è anche un batterio ureolitico che precipita il carbonato di calcio nel suo micro-ambiente convertendo urea in ammoniaca e biossido di carbonio. Questi batteri, da soli o in combinazione con l'immobilizzazione in gel di silice, sono stati usati per ridurre la capacità di assorbimento d'acqua capillare e la permeabilità ai gas del carbonato [56,68]. Il meccanismo di precipitazione di carbonato di calcio da *Bacillus sphaericus* è descritto di seguito.

Bacillus cereus: in determinate condizioni ambientali (temperatura ottimale e pH), i batteri possono dar luogo alla precipitazione del carbonato di calcio extracellularmente sotto forma di un sottile strato (biocalcio o biocemento). Dopo il trattamento della pietra con il *Bacillus cereus*, si ha una significativa perdita di water sorptivity della pietra trattata [18,37,52]. La formazione del nuovo strato di cemento ha reso la pietra più resistente allo stress fisico, cioè più consolidato. Poiché lo spessore del nuovo strato di cemento formato da *B. cereus* era di pochi micron, Rodriguez-Navarro e collaboratori [57] hanno proposto un altro metodo di formazione di biocemento utilizzando *Myxococcus xanthus*, che è più spesso di quello di *Bacillus cereus*.

Bacillus amyloliquefaciens: *B. amyloliquefaciens* è un alcalofilo ed è noto per la precipitazione del carbonato in condizioni di coltura controllata. Il carbonato di calcio precipitato viene impiegato nel consolidamento delle pietre ornamentali [51].

4.2. Ruolo dei Proteobatteri

Il phylum comprende numerosi solfato e zolfo-riduttori (riducono da solfato e da zolfo a solfuro, rispettivamente), così come nitrato-riduttori (riducono i nitrati ad azoto gassoso o protossido di azoto), che hanno una grande capacità di rimuovere o pulire sali di solfati o di nitrati dalle superfici in pietra. Di seguito sono elencati alcuni Proteobatteri che svolgono un ruolo significativo nella conservazione di antichi edifici storici e di opere d'arte.

Desulfovibrio desulfuricans: le opere d'arte in pietra di marmo sono molto sensibili agli inquinanti ambientali e alle piogge acide. L'acido solforico presente nelle piogge acide reagisce con il carbonato di calcio del marmo e lo trasforma in solfato di calcio bi-idrato, comunemente noto come gesso. Durante questa reazione di trasformazione alcune sostanze inquinanti presenti nell'aria come particelle di carbonio sono intrappolate nella matrice minerale e portano alla formazione di una crosta nera. Gauri e collaboratori [54] per la prima volta hanno proposto e dimostrato il ruolo dei batteri solfato-riducenti nella rimozione di incrostazioni di gesso da una statua di marmo convertendo il gesso in calcite. Anche se il metodo è stato abbastanza soddisfacente per gli scopi previsti, aveva due grossi inconvenienti. In primo luogo, il metodo potrebbe essere applicato solo a limitate opere d'arte in gesso incrostate e, in secondo luogo, i manufatti sottoposti al trattamento dovevano essere resi impermeabili prima dell'immersione nel terreno di coltura del liquido [41]. Alcuni ricercatori [12,41] hanno illustrato e valutato che l'impiego dei sistemi microbici per monumenti in pietra funziona come mezzo per rendere tali opere impermeabili all'acqua e proteggerle.

Desulfovibrio vulgaris: questo è un batterio solfato-riducente, che ha un ruolo nella rimozione della crosta nera sulle statue di marmo. Ranalli e collaboratori [63] hanno descritto che la bioconservazione e la proprietà consolidante dei batteri *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio vulgaris* sono notevolmente migliorate quando i batteri sono intrappolati in una matrice inorganica minerale, la Sepiolite, prima dell'uso. L'utilizzo della Sepiolite come sistema di trasporto ha portato a una rimozione di solfato dal marmo incrostato quattro volte maggiore con sepiolite colonizzata piuttosto che con sepiolite non colonizzata. Più tardi Cappitelli e collaboratori [41] e altri ricercatori hanno testato il potenziale di due altri gel organici come sistema di trasporto. Hanno usato Hydrobiogel-97 e Carbogel per l'intrappolamento dei batteri *Desulfovibrio vulgaris* e hanno scoperto che il Carbogel è più efficiente per la rimozione di solfato dal marmo incrostato. Inoltre, la precipitazione associata di solfito di ferro dovuto ai batteri, come risultato della reazione tra il solfuro d'idrogeno e il ferro dei materiali ricchi in ferro, è stata anche drasticamente ridotta in misura considerevole. Cappitelli e collaboratori hanno comparato il metodo chimico e biologico per la conservazione del Duomo di Milano. Hanno usato una soluzione di carbonato di ammonio-EDTA e *Desulfovibrio vulgaris* intrappolato in Carbogel (un sistema di trasporto efficiente il cui

potenziale è stato chiarito da Cappitelli e collaboratori [12] per il trattamento chimico e biologico, rispettivamente).

I campioni di marmo deteriorati che dovevano essere trattati sono stati sottoposti ad un trattamento chimico e biologico per due giorni sotto simili condizioni sperimentali.

Dopo il trattamento, sono state effettuate le analisi microscopiche (SEM-EDS) e FTIR per verificare l'efficacia dei metodi di trattamento. I risultati hanno mostrato che il trattamento chimico ha rimosso parzialmente la crosta dalla superficie in pietra, rendendo visibile la zona pulita da quella non pulita. C'era anche la produzione associata di cristalli di solfato di sodio non desiderato.

Thiobacillus sp.: i batteri del genere *Thiobacillus* sono gram-negativi e acido-resistenti, in grado di fissare CO₂. Le specie di *Thiobacillus* possono essere utilizzate per salvaguardare le strutture in pietra da incrostazione di licheni che crescono sulla loro superficie sotto forma di strato superficiale nero. De Graef e collaboratori [61] hanno applicato una miscela di batteri del genere *Thiobacillus* (miscela chiamata Thio-S) sui campioni di pietra degradata, spruzzando la miscela batterica sulla superficie dei campioni o anche immergendo i campioni in una sospensione della miscela batterica: ciò ha causato la rimozione dello strato di incrostazione dei licheni.

Pseudomonas sp.: *Pseudomonas* è un batterio gram-negativo appartenente al phylum Proteobacteria. Alcuni batteri sono non patogeni e non formano spore e, pertanto, possono essere tranquillamente utilizzati ai fini della biopulitura. Alcuni ceppi di esso, quali *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *P. fluorescens*, *P. flavescens* e *P. stutzeri*, insieme ad un cocktail di enzimi collagenasi e proteasi, sono stati utilizzati per la biopulitura dell'affresco di Spinello Aretino in Italia. L'affresco è stato trattato con colla animale in un precedente restauro. Questi ceppi di *P. stutzeri* hanno mostrato più alta densità di cellule sulla superficie dell'affresco. Una sospensione concentrata di *P. stutzeri* è stata direttamente applicata sulla superficie dell'affresco per interagire efficacemente con la massa di colla animale proteinaica, in modo che la garza utilizzata sull'affresco potesse essere facilmente rimossa [5,65]. Alcune specie di *Pseudomonas* sono tra i più forti batteri nitrato-riducenti e si trovano in abbondanza nell'ambiente naturale. Le cellule di *Pseudomonas* sp. mostrano anche la capacità di rimuovere i nitrati provenienti dalla pietra alterata dalle condizioni atmosferiche [38], mentre *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. hanno anche dimostrato la capacità di degradare gesso e fenantrene (un composto aromatico policiclico) depositati sulla pietra alterata [62].

Alcuni batteri isolati di specie appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Acinetobacter* sono in grado di ridurre la dimensione dei pori di pietre monumentali grazie alla deposizione di cristalli di carbonato di calcio intorno alle pareti dei pori e al loro interno, agendo come consolidanti del calcare [35].

Myxococcus sp.: *Myxococcus xanthus* è un batterio del suolo, gram negativo, non-patogeno che ha la capacità di precipitare il carbonato di calcio in modo extracellulare. L'attività metabolica dei batteri produce biossido di carbonio e ammoniaca (Eq.1); il rilascio extracellulare di ammoniaca cresce con il pH e il CO₂⁻³(aq) (Eq.2). La precipitazione di carbonato di calcio si verifica quando la sovra-saturazione è raggiunta (Eq. 3). Il carbonato di calcio precipitato forma un rivestimento coerente di cemento di spessore 10-15 µm sulla pietra trattata [70]. Il microrganismo è stato impiegato nella bioconservazione / nel restauro di importanti beni culturali, monumenti scultorei, nel consolidamento di pietre ornamentali [70], nelle costruzioni di terra secca, nella ricostruzione e riparazione delle fessure delle pietre. Il peculiare movimento lento del *Myxococcus xanthus* permette al batterio di svolgere il consolidamento sia in superficie che in profondità [71].

4.3. Ruolo degli Attinomiceti

Pochi rapporti sono stati pubblicati sull'applicazione degli Attinomiceti nella conservazione e nel restauro dei monumenti. Questo gruppo di batteri è principalmente utilizzato per rendere impermeabile la pietra calcarea [14,60]. Una significativa riduzione dell'assorbimento capillare di acqua da una pietra calcarea (Pietra di Lecce) da parte di *Micrococcus* sp. e *Rhodococcus erythropolis* ha rivelato la capacità di impermeabilizzazione e di biorinforzo di questi microrganismi [14,60]. Inoltre, il trattamento con *R. erythropolis* non ha mostrato alcun effetto cromatico (decolorazione) consentendo così che si mantenesse il colore originale della pietra [60].

4.4. Ruolo dei funghi

Anche se i funghi sono abbondantemente presenti nel suolo calcico e calcareo, poco è stato riportato in letteratura sul ruolo dei funghi per la carbonatogenesi [72-73]. Alcuni funghi del suolo, principalmente appartenenti ad Ascomycetes sono noti per facilitare la precipitazione di carbonato di calcio [56], ma il loro ruolo in bioconservazione e biorestauro dei monumenti è ancora da indagare. Una motivazione può ricondursi alla loro secrezione di acidi organici, che possono danneggiare le superfici in pietra (biocorrosione) e chelare certi cationi per formare complessi stabili e solubili [74-75], limitando così il loro uso come potenti bioconservatori.

4.5. Altri

Alcune specie di Firmicutes, Proteobacteria e Attinomiceti sono state segnalate per la produzione di carbonato di calcio, ma il loro potenziale come bioconservatori non è stato valutato. Queste specie includono *B. pumilus*, *B. thuringiensis* [21], *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Lysobacter* sp., *Microbacterium* [60].

5. Implicazioni future e indicazioni

Mentre l'impiego di batteri è ormai diventato una pratica di routine per la pulitura e il consolidamento di monumenti storici del patrimonio, pietre ornamentali e opere d'arte colpiti da sostanze inquinanti pericolose, da biofilm e da pigmenti di origine microbica prodotti a seguito di processi metabolici e secreti, la loro applicazione in materia di stabilizzazione del suolo e consolidamento, con lo scopo di ridurre i danni da terremoti, stabilizzare il terreno per tunneling e scavi, riparare crepe in strade, edifici e ponti, migliorare le proprietà strutturali di mattoni, o sequestrare CO₂ dall'atmosfera, è raramente riconosciuta e praticata. Negli ultimi anni, calamità naturali come terremoti, tempeste, uragani hanno distrutto molti edifici del patrimonio culturale e danneggiato numerose opere d'arte. L'applicazione di batteri carbonatogenici per il consolidamento del suolo, in modo da rendere gli edifici storici resistenti ai terremoti, potrebbe essere una logica estensione del loro impiego. In questa recensione vorremmo anche richiamare l'attenzione dei vari enti governativi nei confronti del problema del riscaldamento globale e incoraggiarli ad avviare nuovi progetti con l'obiettivo di sequestrare CO₂ in atmosfera e ridurre la sua concentrazione tornando ai limiti di sicurezza. La CO₂ è un gas serra, principale responsabile del riscaldamento globale. La sua crescente concentrazione in atmosfera è stata oggetto di preoccupazione mondiale negli ultimi decenni ed è generalmente nota come effetto serra o riscaldamento globale. Il riscaldamento globale ha molte gravi conseguenze sull'ambiente e sugli organismi, compresi gli esseri umani, che possono portare a grandi disastri, se non sono controllati. Diverse misure correttive come l'uso di combustibile pulito nelle automobili e la conservazione di foreste sono state considerate, ma nessuna soluzione soddisfacente è stata ancora trovata. In tal caso il sequestro di CO₂ atmosferico da parte di batteri carbonatogenici [76] potrebbe essere un metodo promettente.

6. Osservazioni conclusive

La ricerca attuale nel campo della bioconservazione ha esteso la nostra conoscenza e comprensione del meccanismo e del ruolo di alcuni organismi nel biodeterioramento dei monumenti storici e di conseguenza l'applicazione di microbi carbonatogenici nel conferire protezione a edifici storici e sculture. A nostro avviso, il processo di bioconservazione utilizza generalmente tre strategie: 1) bio-deposizione o rivestimento superficiale di carbonato di calcio (biocalcina) sulle strutture calcaree degradate [37,53], 2) pulitura e rimozione di strati esterni incrostanti di solfato, nitrato e ossalato, ecc [41] e 3) introduzione di batteri che producono carbonato di calcio nei pori di calcare per permettere il consolidamento [35,57].

Nell'era della globalizzazione e dell'industrializzazione, la protezione e il ripristino dei monumenti storici e delle opere in pietra sembrano rappresentare un compito difficile. Anche se la ricerca in questo campo ha visto molti progressi in termini di sviluppo di sistemi di trasporto effettivi [41], di efficienti alghicidi, biocidi e tecnologie a base fotocatalitica [77-78], inefficienti nella consolidazione in profondità [37], la resistenza di alcuni microbi ai trattamenti biocidi hanno presentato alcuni problemi [79]. Pertanto, il successo del trattamento di conservazione può essere previsto solo se tutte le misure necessarie per impedire la conseguente crescita di microrganismi sono adeguatamente seguite. Nel tempo, il trattamento finalizzato al restauro risulterà utile solo se seguito da un piano di manutenzione preventiva [80].

Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare il Direttore, IMTech, per aver messo a disposizione il materiale per la stesura del lavoro e CSIR India per aver permesso a Tikam Chand Dakal di ottenere una borsa di studio per la presente ricerca.

Summary

Over the last few decades there has been increasing global concern over the deterioration of historical monuments and stone works of art. It has posed a great challenge for the archaeologist, geobiologists and bioconservators and consequently encouraged the search for developing novel preventive and remedial methodologies for safeguarding these sculptural monuments and stone works of art. Many conventional methods which rely on the use of physical and chemical treatments have been applied but none of them have yielded satisfactory results. Recently, bioconservation and consolidation methods employing carbonatogenic microbes have received much attention. These microorganisms can precipitate calcium carbonate and, thereby, confer protection to historic monuments.

Riassunto

Negli ultimi decenni c'è stata una crescente preoccupazione a livello mondiale per quel che concerne il deterioramento dei monumenti storici e dei manufatti lapidei. Questa rappresenta una grande sfida per gli archeologi, geo-biologi e bioconservatori che ha promosso la ricerca e lo sviluppo di nuove metodologie preventive e di recupero finalizzate alla salvaguardia di questi monumenti e opere d'arte scultoree in pietra. Molti metodi convenzionali che si basano sull'uso di trattamenti fisici e chimici sono stati applicati, ma nessuno di essi ha dato risultati soddisfacenti. Recentemente, hanno destato molta attenzione i metodi di bioconservazione e consolidamento che impiegano la carbonato-genesi da microrganismi. Questi sono in grado di indurre la precipitazione di carbonato di calcio e, quindi, conferire protezione ai monumenti storici.

Résumé

Dans ces dernières décennies, il y a eu une croissante préoccupation au niveau mondial concernant la détérioration des monuments historiques et des ouvrages de pierre. Elle représente un grand défi pour les archéologues, les géo-biologistes et les bio-conservateurs et a promu la recherche et le développement de nouvelles méthodologies préventives et de récupération finalisées à la sauvegarde de ces monuments et œuvres d'art sculpturales en pierre. De nombreuses méthodes conventionnelles qui se basent sur l'usage de traitements physiques et chimiques ont été appliquées, mais aucune d'elles n'a donné de résultats satisfaisants. Récemment, les méthodes de bioconservation et consolidation qui emploient la carbonatogenèse de micro-organismes ont suscité beaucoup d'attention. Elles sont en mesure d'induire la précipitation de carbonate de calcium et, donc, de conférer une protection aux monuments historiques.

Zusammenfassung

Der Verfall historischer Denkmäler und von Steinarbeiten sorgte in den vergangenen zehn Jahren weltweit für wachsende Besorgnis. Für Archäologen, Geobiologen und Bio-Konservatoren stellt diese Situation eine große Herausforderung dar und fun-

giert als Ausgangspunkt für die Erforschung und Entwicklung neuer vorbeugender und rekuperativer Methodiken zum Schutz dieser Denkmäler und Steinskulpturen. Viele bisher angewendete und auf physischen sowie chemischen Behandlungen beruhende Verfahren brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

In der letzten Zeit stießen in der Biokonservation und Befestigung angewandte Methoden auf großes Interesse, die auf der Karbonatgenese durch Mikroorganismen beruhen. Diese Verfahren sind in der Lage, die Ausfällung von Kalziumkarbonat herbeizuführen und somit Denkmälern einen Schutz zu verleihen.

Resumen

En las últimas décadas hubo una creciente preocupación a nivel mundial por lo que se refiere al deterioro de los monumentos históricos y de las obras lapideas. Se trata de un gran desafío para los arqueólogos, geo-biólogos y bioconservadores que ha promovido la investigación y el desarrollo de nuevas metodologías preventivas y de recuperación encaminadas a proteger estos monumentos y las obras de arte escultóricas en piedra. Se han aplicado muchos métodos convencionales basados en el uso de tratamientos físicos y químicos, pero ninguno de ellos ha logrado resultados satisfactorios. De reciente, han suscitado mucha atención los métodos de bioconservación y consolidación basados en la génesis del carbonato desde microorganismos. Siendo capaces de inducir la precipitación del carbonato cálcico, estos microorganismos pueden proteger los monumentos históricos.

Резюме

В последние десятилетия во всем мире заметно возрастает тревога по поводу упадка исторических памятников и каменных артефактов. Это большой вызов археологам, геобиологам и биоконсерваторам, который дал начало поиску и развитию новых предохранительных и восстановительных методологий, направленных на сбережение этих памятников и каменных скульптур. Многие традиционные методы, основанные на использовании физических и химических процедур, были применены, но никакой из них не дал удовлетворяющих результатов. В последнее время вызывают большой интерес методы биоконсервации и консолидации, которые используют генезис карбонатов из микроорганизмов. Они способны вызывать осаждение карбоната кальция и, следовательно, обеспечить защиту исторических памятников.

Ամփոփում

Վերջին տասնամյակների ընթացքում աճող մտահոգություն է եղել աշխարհում պատմական հուշարձանների և քարարաշեն արտեֆակտների վատթարացման վերաբերյալ Սա մեծ մարտահրավեր է հնագետների, կենսաբանների ու բիոկոնսերվատորների համար, որը նպաստել է հետազոտման և զարգացման նոր մեթոդները օգտագործել կանխարգելիչ և վերականգնման նպատակով այդ հուշարձանների և քարի վրա քանդակված արվեստի գործերի պահպանությանը: Շատ մեթոդներ, որոնք հիմնված են ֆիզիկական և քիմիական տեխնիկայի վրա չեն տվել բավարար արդյունք: Վերջերս, մեծ ուշադրություն է գրավել բիոկոնսերվացիան ու ամրապնդումը օգտագործելով միկրոօրգանիզմների կողմից կարբոնատ-ծնող մեթոդներ: Դրանք կարող են առաջացնել կալցիումի կարբոնատի տեղումներ և, հետևաբար, ուժեղացնել պատմական հուշարձանների պաշտպանությունը