



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dottorato di ricerca:**

**Scienze Applicate per la Protezione  
dell'Ambiente e dei Beni Culturali**

**Dipartimento di Scienze della Terra**

Coordinatore: **Adriana MARAS**

Tutore: **Corrado FANELLI**

Co-Tutori: **Flavia PINZARI**

**Anna Rosa SPROCATI**

Revisori: **Maria Lina BERNARDINI**

**Clara URZI'**

Docenti Esaminatori: **Paolo BALLIRANO**

**Gianluigi DE GENNARO**

**Alessio LANGELLA**

**Aniello SCALA**

## **Restauro di superfici cartacee biodeteriorate: batteri pulitori e nuovi metodi enzimatici integrati**

**Restoration of biodeteriorated paper surfaces:  
bacteria cleaners and new integrated enzymatic**

**Vanja CIALEI**

**XXVI Ciclo**

### ***Abstract***

Biological methods that use enzymes and microorganisms as cleaning agents represent a potential alternative to traditional restoration methods which can provide good results, but unfortunately not without drawbacks.

The aim of the PhD project is to develop a non-invasive method of cleaning for archive and library materials suffering from deterioration caused by fungal pigments.

In order to reproduce the different biological damages caused by fungi on paper, a series of "spot-tests" were prepared by inoculating three fungal species: *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus terreus* and *Eurotium chevalieri*, on three different papers: Mezzofino, Perugia and Whatman.

Afterwards, the capacity of an enzyme mixture (chitinase, lipase and protease) to remove the fungal spots was tested. Following the application of the enzymes on the paper samples inoculated with *A. terreus* and *E. chevalieri*, there was a visible reduction of the fungal damage, as shown by colorimetric data. Conversely, the enzymatic treatment of the melanic stain caused by *A. pullulans* caused the darkening and the widening of the spot, probably due to the hyphae breakage and to the subsequent release of the melanic pigment.

Therefore a different approach based on the application of bacterial cells was experimented on

melanic stain caused by *A. pullulans*. The tested bacterial strains belong to the *ENEA-Lilith* microbial collection of the Laboratory of Environmental Microbiology and Microbial Biotechnology (ENEA Casaccia-Rome) that include environmental strains from different matrices, as contaminated and archeological sites. The strains were selected for chitinolytic activity, in order to be exploited for the fungal hyphae breakage, and/or ligninolytic activity for the degradation of melanic pigment. Nine strains were selected: UI5 *Serratia ficaria*, MCC-Z *Flavobacterium sp.*, CONC12 *Pseudomonas stutzeri*, UI28 *Bacillus cereus* UW28 *Arthrobacter sp.*, UW11 *Acinetobacter lwoffii*, UI3 *Bacillus cereus* and H7 *Chitinophaga sp.*, UR2 *Streptomyces coelicolor*. As observed for enzymatic treatments, the application of the bacterial strains caused a significant worsening of the melanic stain probably due to the leaching of melanic pigment from the broken hyphae. Unfortunately, the desired degradation of melanin was not achieved.

The examination of the effectiveness of enzymatic and bacterial treatments was carried out by a combined approach using different analytical techniques: SEM+EDX to analyze the sample surface and to determine any change in the elemental composition of the paper samples; colorimetric analysis to evaluate the aesthetic effectiveness of the bio-cleaning; pH measures to constantly monitor the paper acidity.

The experimental results show that both the enzymatic and the bacterial treatments were effective in breaking fungal hyphae but not in degrading melanin. Anyway, the leached melanic pigment can be more vulnerable to further treatments necessary to accomplish the biocleaning procedure.

This PhD work fits into a very large and innovation research context and represents one of the firsts attempts in the field of bio-cleaning of paper materials given that previous studies related to the ability of bacteria to remove organic and inorganic substances from the archive and library assets appear to be almost non-existent.

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>2. BIODETERIORAMENTO E RESTAURO DEI MATERIALI CARTACEI</b>	<b>12</b>
<b>2.1. La carta ed i biodeteriogeni</b>	<b>12</b>
2.1.1 Struttura, composizione e fabbricazione della carta	12
2.1.2 Il biodeterioramento: caratteristiche dei danni di origine microbica	14
<b>2.2. Le macchie fungine su carta</b>	<b>17</b>
2.2.1 I pigmenti fungini	17
2.2.2 Il restauro: metodi utilizzati in passato	24
<b>2.3. Uso di enzimi nelle operazioni di conservazione e restauro</b>	<b>29</b>
2.3.1 Meccanismi d'azione e criteri di selezione degli enzimi	29
2.3.2 La scelta degli enzimi per la rimozione delle macchie fungine	30
<b>2.4 I batteri impiegati nelle operazioni di pulitura dei beni culturali</b>	<b>36</b>
2.4.1 I batteri nel restauro	36
2.4.2 Azione dei complessi enzimatici chitinolitici	42
<b>2.5 Biodegradazione delle melanine</b>	<b>45</b>
2.5.1 I coloranti ed i meccanismi di decolorazione	49
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Riproduzione del danno biologico su provini cartacei</b>	<b>57</b>
3.1.1 Caratterizzazione e preparazione dei campioni di carta	57
3.1.2 Coltura <i>in vitro</i> dei ceppi fungini	59
3.1.3 Inoculi dei funghi sui campioni di carta	61
<b>3.2 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei trattamenti enzimatici</b>	<b>61</b>
3.2.1 Trattamento enzimatico dei campioni di carta inoculati	61
<b>3.3 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei trattamenti batterici</b>	<b>63</b>
3.3.1 Ceppi batterici	63
3.3.2 Rivitalizzazione e coltura <i>in vitro</i> dei ceppi batterici	65
3.3.3 <i>Screening</i> dell'attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica	67
3.3.4 Prove di biopulitura	71
<b>3.4 Gli strumenti di misura per la valutazione dell'efficacia e dell'innocuità dei trattamenti di biopulitura</b>	<b>73</b>
3.4.1 Osservazioni delle carte prima e dopo i trattamenti mediante	

Stereomiscopio, Microscopio Ottico, Microscopio Elettronico a Scansione + Spettroscopia in Dispersione di Energia (SEM+EDS)	73
3.4.2 Misure di pH	76
3.4.3 Misure colorimetriche	77
<b>3.5 Metodi di analisi statistica: elaborazione ed interpretazione dei dati</b>	<b>79</b>
3.5.1 Analisi in Componenti Principali (PCA)	79
3.5.2 Analisi Fattoriale Discriminante (DFA)	80
3.5.3 Analisi della Varianza (ANOVA)	81
3.5.4 Test di confronto (t-Student)	82
<b>4. RISULTATI</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Caratterizzazione dei campioni di carta</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei trattamenti enzimatici</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Verifica dell'attività chitinasica dell'enzima utilizzato nelle prove di biopulitura</b>	<b>91</b>
<b>4.4 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei trattamenti batterici</b>	<b>106</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>140</b>
<b>6. CONCLUSIONI</b>	<b>148</b>
<b>7. RINGRAZIAMENTI</b>	<b>151</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>152</b>

## 1. INTRODUZIONE

Ciascun libro porta con sé un messaggio che non è rappresentato solamente da quanto è contenuto nel testo, ma anche da tutta la sua complessità materiale. La carta, le filigrane, i pigmenti e gli inchiostri, le colle, i cuoi, il tipo di cucitura della legatura: tutti quegli elementi del libro, che costituiscono una testimonianza dell'ingegno umano non devono andare perduti. Affinché ciò sia fattibile è necessario considerare tutti gli aspetti della conservazione e del restauro, da quello storico a quello scientifico, senza trascurare quello estetico, ed è opportuno fare ogni sforzo possibile per conservare i materiali librari nella loro completezza.

I manufatti cartacei sono costituiti fondamentalmente da sostanze organiche che rappresentano un potenziale substrato di sviluppo per determinate categorie di agenti biologici che hanno una spiccata attività degradativa. Si tratta principalmente di organismi eterotrofi che utilizzano le sostanze organiche quale fonte di carbonio ed azoto e sono per la maggior parte aerobi, cioè necessitano di ossigeno per il loro metabolismo. I microrganismi sono in grado, quindi, di innescare fenomeni di biodeterioramento che può essere definito come l'insieme dei processi di natura fisica e chimica indotti dalla crescita di organismi che, trasportati principalmente dall'aria, si depositano sulle superfici delle opere d'arte causandone alterazioni (Caneva *et al.*, 2005). Oltre alla deposizione del materiale biologico su un substrato idoneo, i fenomeni di biodeterioramento dipendono anche dalla concomitanza di vari fattori che, in linea generale, sono rappresentati dalla quantità e qualità dei contaminanti microbici che vengono a contatto con le opere d'arte, dalle condizioni ambientali che permettono la crescita biologica e dalla tipologia dei materiali oggetto di conservazione.

Inoltre la particolarità delle reazioni causate dai microrganismi è che esse non si arrestano al raggiungimento delle condizioni di equilibrio, come avviene per le reazioni chimiche, in quanto i prodotti che si formano vengono utilizzati come nutrienti da altre specie in una catena alimentare sempre più complessa.

L'insieme dei processi metabolici dei funghi rappresenta una delle maggiori problematiche nella conservazione del materiale cartaceo per la molteplicità di tipologie di danno che sono in grado di provocare. Innanzitutto questi microrganismi utilizzano i costituenti base dei supporti quali cellulosa, emicellulose, lignina ecc. come fonte di nutrimento, trasformandoli in molecole più semplici ed assimilabili. L'azione di degradazione viene svolta attraverso la produzione di un sistema di enzimi (eso- $\beta$ -glucanasi, endo- $\beta$ -glucanasi e  $\beta$ -glucosidasi) noti come complesso della cellulasi, che idrolizzano la cellulosa producendo zuccheri. Le emicellulose vengono idrolizzate dalla maggior parte dei funghi attraverso la produzione di emicellulasi, mentre la lignina, che

rappresenta la componente più resistente al deterioramento, viene idrolizzata principalmente attraverso tre enzimi fungini: la lignina-perossidasi, la manganese-perossidasi e la laccasi (Caneva *et al.*, 2005). Gli effetti della decomposizione operata dai funghi sono spesso chiaramente visibili: la carta perde struttura e diventa soffice e spugnosa (Price *et al.*, 1994), arrivando a volte ad una distruzione sostanziale di essa. Oltre al danno di tipo strutturale, i funghi sono responsabili di alterazioni cromatiche dovute alla formazione di macchie che presentano caratteristiche varie sia per forma che per colore. I pigmenti riscontrati possono essere classificati in endopigmenti, che conferiscono un colore agli organismi, ed esopigmenti (flavonoidi, chinoni e melanine), che vengono secreti nell'ambiente circostante. La funzione biologica di numerosi pigmenti fungini non è ancora nota; alcuni di essi agirebbero da filtro contro le radiazioni luminose nocive, altri sarebbero dotati di proprietà antibiotiche (Frisvad *et al.*, 2008). Inoltre la loro produzione è influenzata dalle caratteristiche ambientali, quali disponibilità di nutrienti, reazione del mezzo (pH), luce e temperatura (Caneva *et al.*, 2005).

L'alterazione prodotta può essere di varia entità, ma trattandosi di manufatti di interesse artistico la presenza di macchie risulta comunque dannosa e può compromettere gravemente la corretta lettura dell'opera d'arte. Infine bisogna considerare l'attacco fungino a carico di quei materiali quali collanti, pigmenti, riempitivi (*fillers*), inchiostri e residui organici ed inorganici della manifattura che pur facendo parte del materiale non ne rappresentano l'elemento principale, ma il cui processo di degradazione può portare alla perdita di alcune caratteristiche peculiari del supporto stesso (Caneva *et al.*, 2005).

La rimozione delle macchie fungine e del micelio stesso dalla carta rappresenta quindi un passaggio importante nelle operazioni di restauro e di conservazione, sia per permettere una migliore fruizione dell'opera, sia per garantire le condizioni igieniche idonee alla conservazione. Le tecniche, prevalentemente di tipo chimico o meccanico, utilizzate fino ad oggi in questo ambito non hanno portato a risultati soddisfacenti o comunque, pur eliminando il problema, non possono essere applicate per i danni che nell'immediato o nel tempo provocano al materiale (Santucci *et al.*, 1984-85; Szczepanowska *et al.*, 1992; Sterlini, 1995).

Negli ultimi decenni, la ricerca scientifica ha giocato un ruolo importante nello studio dei processi di restauro, conservazione e valorizzazione del patrimonio culturale; oggi la scena è dominata dalle biotecnologie, ossia l'applicazione di tecnologie che utilizzano sistemi biologici, organismi viventi e loro prodotti, per creare o modificare prodotti o processi per uno specifico impiego (Convenzione sulla Diversità Biologica - Nazioni Unite del 1992). Le metodologie biotecnologiche hanno permesso di migliorare e sviluppare nuove tecniche diagnostiche sia per la rilevazione e l'identificazione dei microrganismi, sia per approfondire il loro ruolo nei processi di deterioramento dei beni culturali

(Fernandes *et al.*, 2006). Questo nuovo approccio ha anche messo in evidenza la possibilità di sfruttare l'attività microbica per migliorare le condizioni delle opere d'arte deteriorate, con un effetto di biorestauro. Il biorestauro si adatta a due tipi di applicazioni: il bioconsolidamento, mediante il quale gli organismi coinvolti nel processo di mineralizzazione vengono utilizzati per il consolidamento di monumenti in pietra, e la biopulitura, che impiega cellule batteriche vitali ed enzimi per rimuovere patine organiche o inorganiche deturpanti le opere d'arte (Palla *et al.*, 2006). Infatti, i microrganismi mostrano enormi potenzialità come strumenti per l'induzione di trasformazioni chimiche sia perché utilizzano il substrato come fonte di carbonio e azoto sia perché rilasciano enzimi nell'ambiente circostante.

L'importanza delle biotecnologie nel campo dei beni culturali è testimoniata dallo sviluppo di diversi progetti in Europa negli ultimi 20 anni basati su un approccio multidisciplinare e finalizzati alla conservazione ed al restauro sia di manufatti organici che inorganici (<http://ec.europa.eu/research>).

Di seguito vengono elencati gli obiettivi di alcuni progetti finanziati negli ultimi anni dalla Comunità Europea.

Uno dei principali obiettivi di *BACPOLES (Preserving cultural heritage by preventing bacterial decay of wood in foundation poles and archaeological sites)*, ad esempio, è stato quello di fornire le conoscenze di base sugli effetti della degradazione batterica su legno conservato in diverse condizioni ambientali, come le fondamenta ed i resti archeologici. Un altro problema è stato quello di proteggere il legno immerso in acqua contro la carie batterica sviluppando nuovi metodi di conservazione.

L'obiettivo fondamentale di *BIOBRUSH (Bioremediation for building restoration of the urban stone heritage)*, invece, è stato quello di fornire uno strumento biotecnologico efficace ed ecologico da impiegare nella conservazione e nel restauro dei materiali lapidei sottoposti a diverse condizioni climatico/ambientali. Le metodologie biotecnologiche sono state impiegate principalmente per la rimozione di sostanze organiche deturpanti e per il consolidamento della pietra mediante biocalcificazione.

*BIODAM (Inhibitors of biofilm damage on mineral materials)* si è posto come obiettivo lo sviluppo di prodotti di conservazione e metodologie per inibire la formazione di nuovi *biofilm* sui materiali lapidei trattati e valutare l'efficacia dei trattamenti nonché la loro tossicità nei confronti degli operatori che dell'ambiente. Inoltre il progetto si prefiggeva lo scopo di stabilire l'applicabilità di questi metodi in sostituzione, o in aggiunta, ai biocidi industriali tradizionalmente utilizzati.

Un altro progetto importato è stato il *BIOREINFORCE (Biomediated calcite precipitation for monumental stones reinforcement)* mirato allo sviluppo di una nuova metodologia per la

conservazione dei monumenti mediante processi di biomineralizzazione. Questi strumenti sono stati applicati per sviluppare un trattamento di calcite utilizzando batteri (*Bio-Mediate calcite Treatment - BMT*) e valutando la loro efficacia nel rafforzamento della pietra a seguito di nuove precipitazioni di calcite all'interno della porosità del materiale. La crescita di questi nuovi cristalli è avvenuta grazie ad un processo di mineralizzazione mediato da bioinduzione di soluzioni macromolecolari (*Bio-Inducing Macromolecules Solutions - BIMs*).

*CATS (Cyanobacteria attack rocks: control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman hypogean monuments)* è un altro esempio di progetto europeo nato con lo scopo di capire meglio i processi di biotrasformazione e biodecadimento di substrati litici causati dalla crescita di *biofilm* di cianobatteri in ambienti ipogei, e di valutare l'applicabilità di una strategia a due fasi (fisica e biotecnologica) per ridurre ed inibire la crescita di microrganismi fototrofi ed eterotrofi che causano gravi danni, soprattutto a superfici calcaree.

Infine è stato realizzato il network *COALITION (Concerted action on molecular microbiology as an innovative conservation strategy for indoor and outdoor cultural assets)* che aveva lo scopo di fornire, in primo luogo, una revisione delle attuali conoscenze sia sulla biologia molecolare che sulle tecniche di biotecnologia adatte alla diagnosi di problemi di biodeterioramento e, in secondo luogo, di fornire agli scienziati, conservatori, restauratori e agli utenti finali, a livello comunitario e nazionale, un migliore accesso alle informazioni ed ai risultati finora ottenuti in tale ambito (Chapuis *et al.*, 2009).

Il presente Progetto di Dottorato ha come scopo lo studio di un metodo non invasivo di pulitura dei materiali archivistici e librari affetti da alterazioni cromatiche provocate dalla colonizzazione fungina. In questo contesto, le biotecnologie possono supportare o sostituire i tradizionali metodi di conservazione e restauro quando questi si rivelano inefficaci o pericolosi per l'opera d'arte, l'operatore e/o l'ambiente.

Dall'analisi della letteratura specifica, numerosi sono gli studi circa la capacità degli enzimi di rimuovere sostanze organiche ed inorganiche dai materiali archivistici e librari. Quasi inesistente, invece, risultano essere gli studi condotti finora sulla capacità dei microrganismi di rimuovere le macchie fungine dai supporti cartacei.

Pertanto il presente lavoro si inserisce in un contesto di ricerca molto ampio, innovativo e all'avanguardia, focalizzandosi sulla valutazione dell'efficacia di trattamenti enzimatici e batterici per la biopulitura di supporti cartacei con lo scopo di rimuovere sia il materiale fungino che le alterazioni cromatiche da esso provocate.

Il progetto di ricerca è stato svolto presso l'Istituto Centrale per il Restauro e la Conservazione del Patrimonio Archivistico e Librario (Laboratorio di Biologia, di Fisica e di Restauro) in collaborazione con l'Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie, l'Energia e lo Sviluppo Economico Sostenibile (ENEA - Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biotecnologie Microbiche dell'Unità di Caratterizzazione, Prevenzione e Risanamento Ambientale).

La sperimentazione si è articolata in quattro fasi principali. Una prima fase dedicata alla preparazione di una serie di colture con tre specie fungine: *A. terreus*, *A. pullulans* ed *E. chevalieri*, differenti per tipo di micelio e pigmentazione, da utilizzare per l'inoculo su frammenti cartacei per la riproduzione di diverse tipologie di macchie. Inoltre sono state selezionate tre carte: Mezzofino, Perugia e Whatman, diverse per caratteristiche e composizione, in modo da poter valutare la variabilità dell'attacco fungino in base al substrato di crescita e le eventuali differenze nell'efficacia dei trattamenti di rimozione delle macchie. I campioni di carta, tal quali ed inoculati con i funghi, sono stati caratterizzati mediante microscopia elettronica a scansione corredata di microanalisi, analisi colorimetriche e misure di pH indirizzate a documentare l'effetto dell'infezione fungina sulla cellulosa e sugli altri componenti dei supporti cartacei.

Nella seconda fase si è proceduto all'applicazione di diversi trattamenti enzimatici sulle macchie fungine riprodotte su provini cartacei. Gli enzimi, scelti prendendo in considerazione le caratteristiche fisico-chimiche delle differenti tipologie di macchia ("macchie-test"), sono stati impiegati singolarmente o in combinazione. La sperimentazione ha previsto l'impiego di lipasi, proteasi e chitinasi per agire sia sulle ife fungine atte all'ancoraggio al supporto cartaceo provocandone il distacco (Florian, 2002; Caneva *et al.*, 2005; De Mico *et al.*, 2009; Tavzes *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2009) sia sulla parete cellulare del fungo, costituita principalmente da chitina, liberando il pigmento ivi contenuto (Florian, 2002; Caneva *et al.*, 2005). In questo modo il problema si è spostato sulla ricerca di metodi biologici atti alla rimozione sia degli esopigmenti rilasciati dai funghi *A. terreus* ed *E. chevalieri* che dal pigmento melanico rilasciato sul supporto cartaceo a seguito della rottura delle strutture fungine dell'*A. pullulans*.

Nella terza fase è stato sperimentato un diverso approccio di pulitura basato sull'impiego di cellule batteriche vitali. Come nel caso dei trattamenti enzimatici, l'attenzione è stata rivolta verso ceppi batterici proteolitici e chitinolitici al fine di ottenere il distacco delle ife fungine o la loro apertura. Ciò ha comportato, successivamente, la ricerca di ceppi batterici in grado di attuare un processo di degradazione nei confronti delle melanine, liberate a seguito dell'apertura delle cellule fungine, mediante attività enzimatica ligninolitica (AA.VV., 2010; Desai *et al.*, 2011; Le Roes-Hill *et al.*, 2011; Imran *et al.*, 2012). La ricerca è stata effettuata sulla base degli studi finora condotti sui funghi della carie bianca (*white rot fungi*) capaci di degradare sia la lignina che la cellulosa

coinvolgendo l'intera struttura del legno. Essendo le caratteristiche chimico-fisiche della melanina molto simili a quelle della lignina, si è ipotizzato di poter ricercare quei batteri aventi caratteristiche simili a quelle dei *white rot fungi*, ovvero complessi enzimatici ligninolitici potenzialmente capaci di rimuovere i pigmenti melanici (Desai *et al.*, 2011; Dhillon *et al.*, 2012; Plačková *et al.*, 2012; Hariharan *et al.*, 2013).

La selezione di batteri competenti è stata rivolta esclusivamente a ceppi ambientali ed ha riguardato batteri presenti nella collezione *ENEA-Lilith* del Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biotecnologie Microbiche (ENEA Casaccia-Roma), quali UI5 *Serratia ficaria*, MCC-Z *Flavobacterium sp.*, CONC12 *Pseudomonas stutzeri*, UI28 *Bacillus cereus*, UW28 *Arthrobacter sp.*, UW11 *Acinetobacter lwoffii*, UI3 *Bacillus cereus* e H7 *Chitinophaga sp.*, ed un ceppo della specie *Streptomyces coelicolor* (UR2) appartenente alla collezione ceppi dell'Università Friedrich Schiller di Jena (Germania). Chiaramente è stato opportuno escludere i microrganismi patogeni o, in qualche modo, nocivi per i materiali che si vogliono pulire e i ceppi sporigeni, cioè capaci di sopravvivere in forma di spora quiescente anche dopo lunghi intervalli di tempo.

I ceppi batterici selezionati per la sperimentazione sono stati saggiati per verificare la loro attività cellulosolitica, proteolitica e chitinolitica. L'attività cellulosolitica è stata ricercata al fine di escludere tutti quei batteri in grado di attuare un processo di degrado dei materiali cartacei. Il test per l'attività proteolitica ha permesso, invece, di individuare quei ceppi batterici che, impiegati per la biopulitura, sarebbero in grado di rompere il legame tra il fungo ed il substrato cartaceo a cui il fungo si ancora attraverso sostanze proteiche. Il test per l'attività chitinolitica ha avuto lo scopo di studiare la capacità dei microrganismi di degradare la chitina, la componente strutturale fondamentale della parete cellulare fungina, attraverso l'attività degli enzimi chitinolitici.

Infine, è stata analizzata la produzione di enzimi ligninolitici da parte dei batteri scelti, attraverso la decolorazione di diversi coloranti azoici. Il test è stato realizzato utilizzando piastre Petri contenenti quattro coloranti azoici: Orange G, Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico (Selvam, 2003).

Le prove di pulitura mediante l'impiego dei batteri sono state effettuate su campioni di carta "vivi", cioè inoculati con il fungo, e "morti", ovvero campioni inoculati e sottoposti a sterilizzazione in autoclave al fine di uccidere l'*A. pullulans*. I campioni hanno subito un trattamento batterico con tre tempi di posa differenti: 24h, 48 h e 7gg. Infine, metà campioni, sia "vivi" che "morti", sono stati poi sottoposti a delle prove di lavaggio con un tensioattivo (Tween 40 all'1%) per eliminare sia eventuali depositi fungini superficiali sia possibili tracce del terreno utilizzato nel trattamento. Si è ricorso all'utilizzo del tensioattivo poiché agente emulsionante in grado di facilitare la rimozione del materiale superficiale.

L'ultima fase ha previsto la valutazione dell'efficacia delle prove di biopulitura, enzimatica e con batteri vitali, confrontando i risultati con quelli ottenuti con metodi di pulitura tradizionali,

meccanici e chimici, descritti in letteratura per la rimozione delle macchie fungine da carta (Santucci *et al.*, 1984-1985; Copedé, 1991; Szczepanowska *et al.*, 1992; Szczepanowska *et al.*, 1994; Florian, 2000; Caneva *et al.*, 2005).

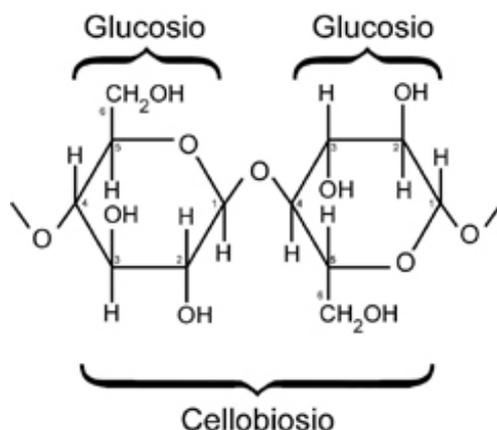
E' stata impiegata la microscopia elettronica a scansione per l'analisi della superficie dei campioni e la microanalisi per determinare l'eventuale cambiamento della composizione elementare dei campioni di carta; le analisi colorimetriche hanno consentito di studiare, in termini quantitativi, i cambiamenti nei parametri che definiscono il colore di tutti i campioni utilizzati nella sperimentazione al fine di valutare in maniera oggettiva l'efficacia estetica delle prove di biopulitura; il monitoraggio del pH ha consentito di valutare costantemente le condizioni chimiche di lavoro in modo tale da determinare la nocività o meno dei trattamenti nei confronti del materiale cartaceo.

## 2. BIODETERIORAMENTO E RESTAURO DEI MATERIALI CARTACEI

### 2.1 La carta ed i biodeteriogeni

#### 2.1.1 Struttura, composizione e fabbricazione della carta

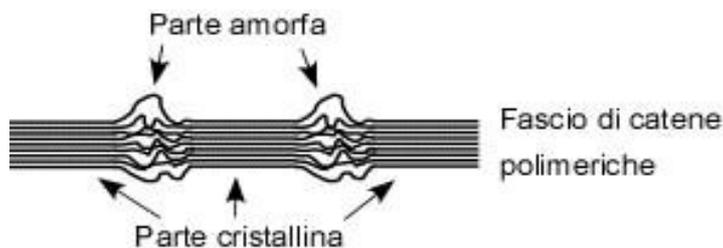
La carta, uno dei più antichi materiali realizzati dall'uomo, è costituita da cellulosa e da altre sostanze quali lignina, emicellulose, pectine, cere, tannini, proteine e costituenti minerali. La natura e la quantità di questi composti è variabile in funzione delle caratteristiche delle materie prime utilizzate e dei processi di manifattura adottati. La cellulosa è un polisaccaride formato da un gran numero di molecole di glucosio (300÷4.000 unità circa) unite tra loro da legami  $\beta$ -1→4 glucosidici ed ogni unità di base ripetuta viene definita cellobiosio (Fig. 1).



**Figura 1.** Struttura chimica del cellobiosio: unità costitutiva della cellulosa.

Le catene di cellulosa sono fra loro legate chimicamente in fasci che danno vita a zone ben diverse:

- *cristalline*, compatte ed altamente resistenti a idrolisi chimiche o fisiche;
- *amorfe*, libere e distanti con orientazione disordinata (Fig. 2).



**Figura 2.** Struttura dei fasci delle catene polimeriche della cellulosa.

La cellulosa si ricava per la maggior parte dal legno di tronchi di pioppi, gelsi, eucalipti, pini, abeti, faggi, larici, ecc.. Altre materie prime, che per secoli hanno costituito le sole fonti per la produzione delle paste cellulosiche per carta, sono stati gli stracci di cotone, canapa e lino, la paglia e, attualmente, la cosiddetta cartaccia a base di scarti di carta. Il legno, che rappresenta la principale

materia prima per la produzione della cellulosa, deve essere trattato in modo da separare le fibre cellulosiche dagli altri costituenti quali:

- la *lignina*, un polimero tridimensionale molto complesso composto di alcoli aromatici legati da vari tipi di legami tra atomi di carbonio. La lignina è una molecola particolarmente resistente tanto che solo alcuni funghi e pochissimi batteri possono decomporla;
- le *emicellulose*, includendovi sostanze pectiche ed etero-polisaccaridi vari, sono polisaccaridi scarsamente solubili e strettamente associati alla cellulosa. La maggior parte dei batteri e dei funghi è in grado di idrolizzarle mediante esoenzimi detti emicellulasi.

In aggiunta a cellulosa, lignina ed emicellulose, la carta contiene altre componenti che conferiscono caratteristiche particolari richieste dall'uso specifico. Tra le sostanze aggiunte si riscontrano: il *collante*, che ha lo scopo di limitare la rapidità di assorbimento degli inchiostri liquidi da parte della carta impedendo il loro spandimento e la penetrazione attraverso tutto lo spessore del supporto; le *cariche minerali*, generalmente di colore bianco, che fungono sia da riempitivi dei pori della carta creando una superficie più liscia e più bianca sia da opacizzanti migliorando la lettura del testo; i *coloranti*, che conferiscono alla carta una colorazione stabile e distribuita uniformemente nello spessore del foglio (Caneva *et al.*, 2005).

Nel corso dei secoli la fabbricazione della carta ha subito continui cambiamenti rispetto sia alle fibre vegetali che ai processi di fabbricazione. Si possono delimitare due caratteristici periodi storici nella fabbricazione della carta: il primo precedente ai primi anni del XIX secolo ed il secondo successivo, fino ai giorni nostri. Lo spartiacque è determinato dall'inizio della fabbricazione della carta per mezzo di macchine (carta moderna, fatta con pasta di legno ottenuta meccanicamente) invece che a mano (carta antica). La materia prima utilizzata per la carta prodotta manualmente era rappresentata da pura cellulosa ricavata da stracci principalmente di cotone, lino e canapa. La preparazione delle paste di legno, invece, avviene attraverso tre tipologie di processo che producono rispettivamente:

- *paste meccaniche*, ottenute per semplice sfibratura meccanica dei tondelli di legni poveri di resine ed è per questo che in essa rimangono tutte le sostanze insolubili presenti originariamente nel materiale. La carta prodotta con questo tipo di pasta è sicuramente più economica, ma ha una qualità decisamente più scadente, ingiallisce facilmente ed è altamente degradabile;
- *paste meccano-chimiche o semichimiche*, ottenute attraverso un processo di indebolimento del legame tra le fibre del tessuto legnoso mediante un blando trattamento chimico del legno di conifera e latifoglia, ed in un completamento della sfibratura realizzato meccanicamente;

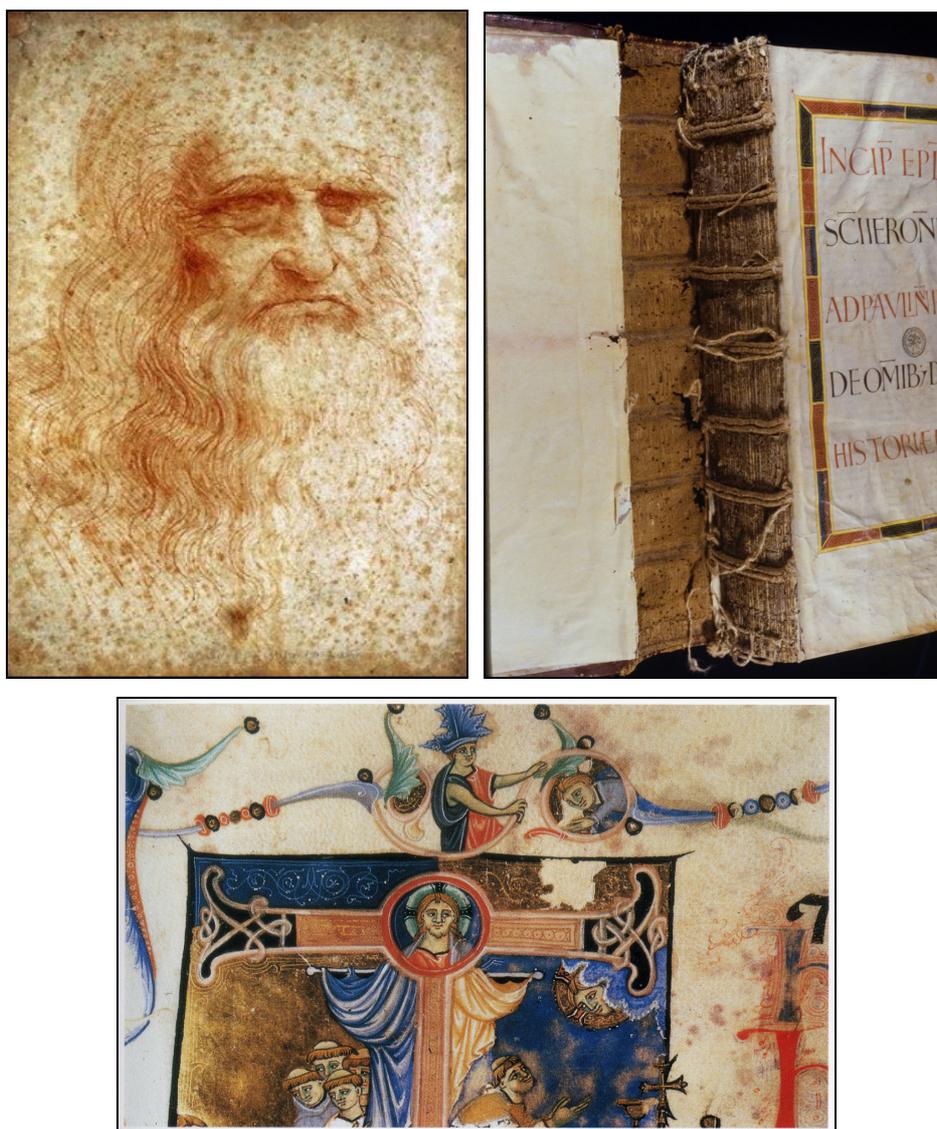
- *paste chimiche*, anch'esse ricavate dal legno di conifere e latifoglie, ma in questo caso il trattamento termochimico a cui è sottoposto il materiale è completo e comporta una totale eliminazione di lignina ed emicellulose. La carta costituita da cellulosa pura è chimicamente molto più resistente nel tempo rispetto alle carte contenenti anche lignina poiché i processi chimici hanno lo scopo di solubilizzare la lignina e le componenti incrostanti lasciando intatta la cellulosa.

Tutte le paste cellulose grezze sono più o meno scure e pertanto sono sottoposte al trattamento sbiancante o di candeggio che comporta una decolorazione delle sostanze estranee od una loro eliminazione con processi chimici. La formazione del foglio, a partire dall'impasto raffinato e opportunamente addizionato, si compie in macchine da carta continue nelle quali possono essere impartiti determinati caratteri al foglio che permettono agli esperti di riconoscere le carte antiche da quelle moderne per le diverse caratteristiche (AA.VV., 2002).

### 2.1.2 Il biodeterioramento: caratteristiche dei danni di origine microbica

Il biodeterioramento può essere definito come un qualsiasi cambiamento indesiderato nelle proprietà di un materiale, causato dall'attività vitale degli organismi (Caneva *et al.*, 2005). Tale fenomeno si determina non appena le condizioni microclimatiche, in particolare temperatura ed umidità relativa, diventano favorevoli alla crescita dei microrganismi che agiscono a livello chimico, fisico o meccanico (Berthelin, 1983; Eckhardt, 1985; Allsopp *et al.*, 2004). I danni che gli agenti microbici arrecano ai materiali cartacei possono assumere aspetto e gravità diversi e sono essenzialmente riconducibili ad:

- *alterazioni cromatiche* provocate da pigmenti ed essudati che possono essere classificati in *endopigmenti*, in grado di conferire un colore agli organismi essendo legati ad alcune strutture cellulari (micelio e spore fungine), ed *esopigmenti* secreti nell'ambiente circostante. Ciò porta alla formazione di macchie che presentano caratteristiche molto varie dal punto di vista del colore, della forma e della dimensione;
- *alterazioni strutturali delle componenti di base dei materiali* causate da particolari enzimi, quali cellulasi, proteasi, lipasi, ecc., e si manifestano con la fragilità dei materiali che, a volte, porta alla loro distruzione. Generalmente questa tipologia di danno si verifica negli stadi più avanzati dell'infezione e rappresenta quella più devastante;
- *alterazioni delle componenti additive essenziali* poiché, in alcuni casi, i microrganismi si sviluppano a spese di particolari sostanze che, pur facendo parte del materiale, non ne costituiscono l'elemento principale (collanti, plastificanti, antiossidanti, ecc.). Ciò porta alla perdita di caratteristiche peculiari del supporto che, talvolta, diviene inutilizzabile (Gallo, 1992; Caneva *et al.*, 2005) (Fig. 3).



**Figura 3.** Immagini relative alle diverse tipologie di danno causate da fenomeni di biodeterioramento:

- a. alterazioni cromatiche diffuse presenti sull'intera superficie dell'Autoritratto di Leonardo;
- b. distacco della coperta dal corpo del Manoscritto Vat. Lat. 10404;
- c. distacco della foglia d'oro, dilavamento del pigmento azzurro ed alterazioni cromatiche diffuse presenti sul Pontificale 492 di Salerno.

Pertanto il biodeterioramento della carta è dovuto essenzialmente all'attività dei microrganismi che utilizzano i suoi costituenti (cellulosa, emicellulose, lignina, ecc.) trasformandoli in molecole più semplici ed assimilabili ai fini nutrizionali. In particolare, i funghi rappresentano gli agenti di degrado più ricorrenti (Tab. 1) in quanto molte specie possiedono una grande capacità di adattamento alle condizioni ambientali in cui vengono a trovarsi (Caneva *et al.*, 2005).

**Tabella 1. Specie fungine e tipi di attività degradativa della carta e dei suoi costituenti**

(Fonte: Caneva *et al.*, 2005).

<i>Acremonium charticola</i>	B
<i>Alternaria alternata</i>	A
<i>Alternaria tenuissima</i>	B
<i>Aspergillus candidus</i>	B
<i>Aspergillus flavus</i>	B
<i>Aspergillus fumigatus</i>	A
<i>Aspergillus sydowii</i>	C
<i>Aspergillus versicolor</i>	B
<i>Aspergillus terreus</i>	A
<i>Aspergillus wentii</i>	B
<i>Aureobasidium pullulans</i>	C
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	C
<i>Chaetomium bostrycodes</i>	B
<i>Chaetomium chartarum</i>	A
<i>Chaetomium elatum</i>	B
<i>Chaetomium globosum</i>	A
<i>Chaetomium indicum</i>	A
<i>Chrysonilia sitophila</i>	B
<i>Cladosporium herbarum</i>	A
<i>Doratomyces stemonitis</i>	A
<i>Epicoccum purpurascens</i>	C
<i>Eurotium herbariorum</i>	C
<i>Fusarium culmorum</i>	A
<i>Fusarium solani</i>	A
<i>Geomyces pannorum</i>	C
<i>Mariannea elegans</i>	B
<i>Myrothecium verrucaria</i>	C
<i>Myxotrichum chartarum</i>	A
<i>Myxotrichum deflexum</i>	A
<i>Oidiodendron cerealis</i>	A
<i>Penicillium brevicompactum</i>	C
<i>Penicillium canescens</i>	B
<i>Penicillium citrinum</i>	C
<i>Penicillium decumbens</i>	B
<i>Penicillium funiculosum</i>	A
<i>Penicillium luteum</i>	A

Segue a pag. 17...

<i>Penicillium miczynskii</i>	B
<i>Penicillium oxalicum</i>	C
<i>Penicillium puberulum</i>	C
<i>Penicillium purpurogenum</i>	A
<i>Phialophora fastigiata</i>	C
<i>Preussia fleischhაკii</i>	C
<i>Rhodotorula glutinis</i>	C
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	A
<i>Sordaria fimicola</i>	B
<i>Stachybotrys chartarum</i>	A
<i>Trichoderma koningii</i>	A
<i>Trichoderma viride</i>	A
<i>Trichothecium roseum</i>	B
<i>Ulocladium chartarum</i>	B
<i>Verticillium tenerum</i>	A

**Legenda.** A sempre isolati dalla carta, penetrano le fibre e causano la disintegrazione del substrato;

B spesso isolati dalla carta e causano danni alla tessitura;

C assimilano solo alcuni specifici componenti della carta (paraffine, polimeri sintetici, cere, gomme, ecc.).

Infatti i funghi occupano praticamente tutti gli habitat terrestri del nostro pianeta con una varietà di forme e di specializzazioni spesso incredibili grazie alla capacità di produrre strutture che garantiscono la sopravvivenza della specie, tra le quali sclerozi e rizomorfe. Tali strutture specializzate, infatti, risultano importanti nei processi di colonizzazione del substrato poiché in grado di favorendo l'adesione e la penetrazione dei microrganismi contribuendo al biodeterioramento dei manufatti artistici. L'azione meccanica, generalmente, è accompagnata e supportata dalla contemporanea interazione chimica col substrato stesso per opera di processi metabolici quali produzione di CO<sub>2</sub>, alcali, acidi inorganici ed organici, enzimi e, soprattutto, pigmenti (Gareth Jones, 1994; Deacon, 1997; Jennings *et al.*, 1999; Caneva *et al.*, 2005; Mapari *et al.*, 2005; Frisvad *et al.*, 2008).

## 2.2 Le macchie fungine su carta

### 2.2.1 I pigmenti fungini

Raramente le colonie fungine piccole ed immature determinano fenomeni di alterazione cromatica del materiale infestato. Una volta che le colonie maturano, però, sono in grado di elaborare numerosi pigmenti quali flavonoidi (antociani e flavoni) colorati in rosso, blu e violetto,

chinoni (naftochinoni, antrachinoni, antraciclioni, naftodiantroni) di colore variabile e melanine di colore bruno-nerastro.

La funzione biologica dei numerosi pigmenti non è ancora nota. Alcuni di essi agirebbero da filtro contro le radiazioni luminose nocive, altri sarebbero dotati di proprietà antibiotiche (Frisvad *et al.*, 2008). Inoltre la loro produzione è influenzata dalle caratteristiche ambientali quali disponibilità di nutrienti (in particolare fonte di C e di N), presenza di metalli nel substrato, pH e capacità tampone del substrato, temperatura e luce (Szczepanowska *et al.*, 1992; Nyuksha *et al.*, 1993; Florian, 2000).

In campo alimentare l'utilità dei funghi in grado di produrre pigmenti è stata messa in evidenza da studi condotti da Mapari (Mapari *et al.*, 2005) (Tab. 2) e da Dufossé (Dufossé, 2006).

**Tabella 2. Pigmenti fungini non carotenoidi potenzialmente utilizzabili come coloranti alimentari (Fonte: Mapari *et al.*, 2005).**

Some promising non-carotenoid fungal pigments as potential food colorants.			
Fungal source	Pigment	Colour	Comments
<b>Ascomycetes</b>			
<i>Monascus</i> spp.	Monascorubrin	Orange	Well-known pigments of the Orient, authorized in Japan, heat- and pH-stable, give rise to water-soluble red pigments on reacting with amino acids in the media
	Rubropunctatin	Orange	
	Monascin	Yellow	
	Ankaflavin	Yellow	
	Monascusones	Yellow	
<b>Anamorphic Ascomycetes</b>			
<i>Epicoccum nigrum</i>	Flavipin	Yellow	Water-soluble, antioxidant, high colouring power, reported to stimulate astaxanthin production in yeast
	Orevactaene	Orange	
	Unknown	Yellow	
<i>Paecilomyces sinclairii</i> <sup>a</sup>	Unknown	Red at pH 3–4, violet at pH 5–9 and pink at pH 10–12	Light-stable, high production by submerged cultivation, chemical characterization is needed
<i>Penicillium herquei</i> ,	Atrovenetin	Yellow	Atrovenetin is an antioxidant and might exert a dual functionality as a functional food additive, because it potentiates the antioxidant activity of tocopherol (likely mechanism: regeneration of tocopherol by hydrogen donation)
<i>Roesleria hypogea</i> and <i>Penicillium atrovenetum</i>	Herqueinone	Red	
	Norherqueinone Several others	Red Bluish green	
<i>Penicillium oxalicum</i> var. <i>ameniaca</i>	Arpink Red <sup>TM</sup>	Dark red	Commercially produced, pH- and heat-stable, patented in more than 120 countries
<i>Penicillium purpurogenum</i> <sup>b</sup>	Purpurogenone	Orange-yellow	Characteristic extracellular red-pink pigment depending on media
	Mitorubrin	Yellow	
	Mitorubrinol	Orange to red	
<i>Penicillium persicinum</i>	Unknown	Reddish pink	High amount of exogenous pigment, not yet characterised
<i>Penicillium fagi</i>	Unknown	Greenish blue	Mostly trapped in mycelium, uncharacterised

<sup>a</sup>Insect pathogen, correct name *Isaria sinclairii*. <sup>b</sup>According to the present classification.

L'alterazione indotta dai pigmenti può essere più o meno rilevante in funzione del legame che tali sostanze stabiliscono con il substrato, ma è evidente che, trattandosi di manufatti d'interesse artistico, anche se non si determinano danni strutturali, la presenza di macchie colorate risulta comunque sgradita e può compromettere gravemente la corretta lettura dell'opera d'arte (Caneva *et*

*al.*, 2005). Uno dei problemi principali è rappresentato infatti dalla difficoltà d'individuare il solvente idoneo per la rimozione dei pigmenti soprattutto dai materiali archivistici e librari.

Sono stati realizzati diversi studi sui pigmenti fungini e sulle alterazioni cromatiche che descrivono la difficoltà di rimozione degli stessi dal supporto cartaceo. I solventi organici hanno dato scarsi risultati o comunque, pur eliminando il problema, non possono essere applicate per i danni che nell'immediato o nel tempo provocano al materiale (Santucci *et al.*, 1984 e 1985; Szczepanowska *et al.*, 1992; Sterlini, 1995). E' fondamentale, quindi, considerare la solubilità specifica dei pigmenti prima di attuare il processo di pulitura. Infatti i pigmenti presenti nei conidi e secreti nell'ambiente circostante possono essere solubili in acqua o in solventi polari. Un esempio è dato dagli antrachinoni (rosso-bruno) solubili in alcali; carotenoidi (giallo, arancione) solubili in solventi grassi; carotenoidi legati alla chitina e solubili in etanolo o acetone; antocianine rosse solubili in acqua. La maggior parte dei pigmenti solubili in acqua sono indicatori di pH ed alcuni contengono piccole quantità di rame, zinco e ferro. Il pigmento presente nelle ife, invece, è solitamente melanina insolubile (Florian, 2000).

Uno studio importante sulla tipologia delle macchie fungine è stato condotto da Florian (Florian, 2000) ed ha avuto per oggetto 20 libri datati tra il 1568 ed il 1902. Il risultato delle osservazioni e delle analisi effettuate ha permesso di classificare le macchie in base alla forma, al colore ed agli elementi chimici presenti (Tab. 3).

**Tabella 3. Classificazione delle macchie fungine in base alla forma, al colore ed agli elementi chimici presenti (Fonte: Florian, 2002).**

	<b>Macchie fungine irregolari</b>  Comune su carta stracci della metà del XIX° sec. Contaminazione è avvenuta durante la fabbricazione della carta o del libro.	<b>Macchie fungine circolari</b>  Occasionalmente riscontrate su carte vecchie e/o danneggiate dall'acqua, a causa della contaminazione aerea durante l'uso di libri o carta.	<b>Recenti macchie fungine circolari</b>  Recente contaminazione aerea che mostra il colore dei conidi.	<b>Recenti macchie fungine irregolari</b>  Recente contaminazione per contatto con materiali contaminati o danneggiati dall'acqua. Le macchie mostrano il colore conidi.
<b>Osservazione Visiva</b>	Di forma irregolare, rosso ruggine, uniformemente scolorite. Casualmente presente in tutte le parti di una pagina e su tutte le pagine di un libro. Dimensione varia: da appena visibile a grandi aree su una pagina e, di solito, migrati alle pagine adiacenti.	Macchie color rosso ruggine di forma circolare, uniformemente scolorite o concentrate nel centro. Il fenomeno si verifica più comunemente verso i margini della pagina ed è comune su carte danneggiate dall'acqua. Le dimensioni sono varie e dipendono dalla crescita. In genere le macchie migrano verso pagine adiacenti.	Colonia fungina circolare che può avere un soffice margine bianco ed una regione centrale del colore dei conidi (verde, grigio, nero, bianco, ecc.), di dimensioni variabili a seconda della crescita. Presenti su un lato della pagina.	Dimensioni variabili ed aree di forma irregolare su tutta la superficie. Possono avere crescita superficiale ridotta o abbondante. Le macchie possono avere il colore dei conidi (verde, grigio, nero, bianco, ecc.), presenti solo su un lato della pagina, nessuna alterazione superficiale della carta.
<b>Stereomicroscopio</b>	Nessuna alterazione sulla superficie della carta. Strutture fungine superficiali raramente osservabili.	Solitamente nessuna alterazione alla superficie della carta, anche se sembra polverosa e ciò è dovuto alla presenza delle colonie fungine. Macchie rare. La digestione fungina della cellulosa può causare la degradazione delle fibre di carta.	Massa di ife e conidi colorati.	Ridotta o abbondante crescita di funghi che assumono il colore dei conidi. La carta può essere colorata (rosso, giallo, ecc.) dai pigmenti secreti dai funghi.
<b>Microscopio Ottico</b>	Presenti alcune ife, conidi e raramente conidiofori. Materiale proteico associato alla presenza di strutture fungine. Le pareti cellulari delle fibre di carta, sotto le strutture fungine, sono scure in modo non uniforme.	Numerose strutture fungine. Le pareti cellulari delle fibre di carta, sotto le strutture fungine, sono scure in modo non uniforme. La digestione fungina della cellulosa può causare la degradazione delle fibre di carta.	Abbondanti strutture fungine. La carta può essere colorata (rosso, giallo, ecc.) dai pigmenti secreti dai funghi.	Poche o abbondanti strutture fungine. Possono essere presenti anche ascocarpi e ascospore.
<b>SEM</b>	Isolate strutture fungine.	Presenti ife, conidi e conidiofori, raramente ascocarpi o cleistotecie.	Presenti abbondanti ife, conidi e conidiofori. Possono essere presenti anche ascocarpi e ascospore.	Presenti poche o molte ife, conidi e conidiofori. Possono essere presenti anche ascocarpi e ascospore.
<b>EDS</b>	Nessuna modifica elementale della carta sotto la macchia.	Nessuna modifica elementale della carta sotto la macchia.	Nessuna modifica elementale della carta sotto la macchia.	Nessuna modifica elementale della carta sotto la macchia.

Particolare rilievo ha avuto lo studio delle alterazioni cromatiche color ruggine, comunemente note come *foxing* o *fox spots* in riferimento alla colorazione del manto della volpe rossa (*fox* in inglese). Il *foxing* è un fenomeno complesso che si manifesta come piccole macchie isolate di differenti forme e di color ruggine, bruno e giallo. L'osservazione delle macchie di *foxing* alla luce ultravioletta mette in evidenza una risposta di tipo fluorescente.

Sulla sua origine da decenni si discute nel mondo scientifico e a tutt'oggi non è stato possibile individuarne inequivocabilmente le cause. Le ricerche si sono sviluppate principalmente in due direzioni: indagini e sperimentazioni microbiologiche per verificare l'origine biologica delle macchie e fornirne una caratterizzazione, studi chimici per stabilire sia i rapporti esistenti tra la presenza di elementi metallici (come per esempio il ferro) all'interno della carta e la loro ossidazione sia la definizione dei diversi tipi di *foxing* (Gallo *et al.*, 1989; Florian, 2000 e 2002; Arai, 2000; Szczepanowska *et al.*, 2000; Rebrikova *et al.*, 2000; Bicchieri *et al.*, 2001; Montemartini Corte *et al.*, 2003).

Gli studi più recenti e più esaustivi sugli aspetti legati all'ipotesi biologica sono stati condotti da Florian (Florian, 2000) ed Arai (Arai, 2000) riuscendo ad isolare dalle macchie esaminate funghi xerofili obbligati e funghi xerofili facoltativi. Inoltre, analizzando gli acidi organici, gli zuccheri e gli amminoacidi nelle zone color ruggine dalle quali erano stati isolati i funghi, è stata dimostrata la presenza di acidi organici (fumarico, malico, lattico, acetico); zuccheri (glucosio, cellobiosio, cellotriosio, cellotetraosio, cellopentaosio, celloesaosio); vari amminoacidi di cui il più frequente è quello  $\gamma$ -amminobutirrico. I funghi xerofili obbligati producono una maggior quantità di acido malico e di glucosio rispetto ai funghi xerofili facoltativi. In base a tali risultati il colore ruggine è dovuto alle melanoidine, prodotti a seguito della reazione di Maillard che avviene tra gli amminoacidi e gli zuccheri formati dai funghi. Gli studi di Florian (Florian, 2000) ed Arai (Arai, 2000) evidenziano, quindi, inequivocabilmente l'associazione tra *fox spots* e sviluppo fungino, ma certamente non risolvono la questione se il fenomeno *foxing* sia sempre causato esclusivamente da funghi in quanto, in concomitanza, concorrono altri fattori sia fisici (ambientali) che chimici, tutti aspetti da considerare nel loro effetto sistemico (Caneva *et al.*, 2005).

### *Le melanine fungine*

Le melanine sono macromolecole composte da vari tipi monomeri fenolici o indolici ad elevato peso molecolare, di colore bruno-nerastro e prodotte da microrganismi, animali, protozoi e piante (Urzi *et al.*, 1992; Bilińska, 1996; Butler *et al.*, 1998; Nosanchuk *et al.*, 2003; Tavzes *et al.*, 2009 e 2013). Una definizione precisa, tuttavia, risulta difficoltosa come testimoniato da Prota (Prota, 1992) “sebbene test chimici specifici per caratterizzare la melanina siano inesistenti, è possibile

identificare almeno provvisoriamente un pigmento presente in natura di colore marrone o nero come la melanina purché esso mostri alcune caratteristiche quali la resistenza ai solventi, lo sbiancamento se sottoposto all'azione di ossidanti e la capacità di ridurre direttamente soluzioni ammoniacali di nitrato d'argento" (Butler *et al.*, 1998). Secondo Nicolaus (Nicolaus *et al.*, 1964) i criteri chimici, generalmente accettati, utilizzati per definire un pigmento fungino quale la melanina sono: colore, insolubilità in acqua fredda e calda ed in solventi organici, resistenza alla degradazione mediante acidi concentrati impiegati sia a caldo che a freddo, sbiancamento tramite agenti ossidanti come perossido di idrogeno e solubilizzazione grazie all'uso di soluzioni alcaline calde. Swan (Swan, 1963) aggiunge che la difficoltà di caratterizzare tale polimero deriva anche dal fatto che le preparazioni di melanina pura da microrganismi possono essere ottenute solo con l'impiego di rigorosi metodi chimici che, probabilmente, sono in grado di modificarne la struttura. Finora nessuna tecnica biochimica e biofisica ha consentito la corretta identificazione delle unità monomeriche che costituiscono il polimero anche se sono state usate una serie di tecniche di indagine che hanno fornito importanti informazioni sulla struttura e sulle proprietà delle melanine (Nosanchuk, 2003) quali ad esempio la spettroscopia IR è un metodo di indagine utilizzato per studiare le strutture di melanine naturali e sintetiche. Malama (Bilińska, 1996) descrive in dettaglio gli spettri da cui è possibile interpretare le bande dell'Ammide I, Ammide II e Ammide III. Questo indica che alcuni pigmenti isolati sono melano-proteine. Le bande vicine a  $1700\text{ cm}^{-1}$  sono attribuite al gruppo carbossilico libero  $\text{COOH}$ , mentre la banda a  $1400\text{ cm}^{-1}$  è ascrivibile al gruppo carbossilico ionizzato  $\text{COO}^-$ . Le bande delle regioni spettrali  $1100\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$  e  $1240\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  sono attribuite rispettivamente ai gruppi ossidrilico, alcolico e fenolico. Infine si ipotizza che le bande della regione  $1600\text{ cm}^{-1}$  siano dovute alle vibrazioni che avvengono sul piano dei legami  $\text{CH}=\text{CH}$  (Bilińska, 1996). Tra le varie tecniche di indagine impiegate si annovera la risonanza paramagnetica elettronica, la diffrazione ai raggi X, la spettroscopia UV e nel visibile e la risonanza magnetica nucleare (Gonçalves *et al.*, 2012). Questi studi hanno dimostrato che i funghi possono sintetizzare diversi tipi di melanine per polimerizzazione ossidativa di composti fenolici o indolici. Sintesi, struttura chimica, funzionalità e distribuzione delle diverse melanine fungine sono state esaminate da Butler (Butler *et al.*, 1998); mentre questioni in materia di modifiche alla struttura della melanina ed i processi chimici che avvengono durante la sua degradazione abiotica sono stati proposti e discussi da diversi ricercatori (Blois, 1978; Bell *et al.*, 1986; Koritowski *et al.*, 1990; Kaim *et al.*, 1994; Jacobson, 2000; Tavzes, 2009 e 2013).

La *via* di biosintesi metabolica, che meglio caratterizza le melanine fungine, è rappresentata dall'1,8-diidrossinaftalene (DHN) altresì denominata melanina polichetide, anche se alcuni funghi sono in grado di sintetizzare sia la L-diidrossifenilalanina (DOPA) che la glutaminil-3,4-

diidrossybenzene (GDHB). Gran parte delle conoscenze sulle proprietà chimiche di tali polimeri deriva da studi condotti su melanine DOPA sintetiche o animali che, a differenza di quelle DHN, contengono azoto e gruppi carbossilici. Sebbene le melanine DOPA siano state sottoposte a diverse tecniche d'indagine, pochi studi sono stati condotti sulle melanine DHN da cui è emerso che si tratta di polimeri con anelli aromatici e gruppi idrossilici disponibili (Bell *et al.*, 1986; Butler *et al.*, 1998).

Le melanine DHN sono prodotte a seguito della congiunzione e ciclizzazione di cinque subunità chetidi ottenute da cinque molecole acetate mediante una sintesi pentachetide e grazie alla presenza di diversi intermediari, secreti attraverso la membrana cellulare nel mezzo circostante anche se in parte rimangono nella parete cellulare. Al di fuori della cellula si ossidano o subiscono polimerizzazione ossidative da parte di fenolossidasi (Tokousbalides *et al.*, 1979; Siehr, 1981; Carlile *et al.*, 1994; Fogarty *et al.*, 1996; Butler *et al.*, 1998).

Secondo Nicolaus (Nicolaus, 1968) le melanine possono essere divise in tre gruppi: eumelanine, feomelanine ed allomelanine. Le eumelanine, pigmenti neri o marroni contenenti azoto, derivano da tirosina, di-idrossifenilalanina (DOPA), dopamina e tiramina nel processo di polimerizzazione ossidativa. Le feomelanine, pigmenti con colori più chiari che vanno dal giallo al rosso, sono sintetizzate dalla tirosina tramite la stessa *via* delle eumelanine, ma in questo processo sono coinvolti la cisteina o il glutatione (Swan, 1974). Le allomelanine, presenti nel mondo vegetale, sono pigmenti formati durante la polimerizzazione ossidativa di substrati fenolici in presenza di polifenolossidasi (Plonka *et al.*, 2006).

Nel caso dei funghi sono presenti nelle pareti cellulari di spore, sclerozi, miceli e corpi fruttiferi o come polimeri extracellulari formati nel mezzo presente intorno alle cellule fungine (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1964; Durrell, 1964; Belle *et al.*, 1986; Takano *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 1998). Questo processo può avvenire in due modi: le fenolossidasi, enzimi in grado di catalizzare l'ossidazione di composti fenolici in chinoni, rilasciate dai funghi ossidano particolari componenti presenti nei terreni di coltura in melanine oppure i composti fenolici secreti nel mezzo si ossidano lentamente per formare melanine che, in alcuni casi, possono aderire alle pareti cellulari dando la falsa impressione di essere al loro interno (Butler *et al.*, 1998).

Le melanine assolvono diverse funzioni quali l'attività antibiotica, in quanto il polimero rappresenta un elemento importante nel rafforzamento delle pareti delle piante e nelle cuticole degli insetti. Inoltre l'ampia assorbanza spettrale da parte delle melanine comporta numerosi ed importanti processi come il mimetismo e la termoregolazione, ad esempio nei rettili agendo come un dissipatore di calore; la chemo-protezione, agendo come pozzo di radicali liberi o come mezzo per

legare cationi tossici, quali metalli di transizione; la fotoprotezione, proprietà sfruttata in commercio per la produzione di creme fotoprotettive (Riley, 1997). Henson (Henson *et al.*, 1999) sottolinea come la produzione di melanine sia strettamente legata a stress ambientali quali esposizione ai metalli tossici, disseccamento, temperature estreme, microbi antagonisti, limitazione di nutrienti, repentini cambiamenti del pH, raggi UV, enzimi idrolitici, ecc. (Florian, 1997; Butler *et al.*, 1998; Henson *et al.*, 1999; Nosanchuk *et al.*, 2003; Plonka *et al.*, 2006).

Secondo Zhdanova (Zhdanova *et al.*, 1980), *Streptomyces galbus* produce melanina soltanto ad elevate temperature di crescita (42-47°C) e sembra che la produzione del pigmento raddoppi lo spessore della parete cellulare. La capacità di assorbire radiazioni luminose nelle lunghezze d'onda del visibile e nell'UV è stata confermata da Kollias (Kollias *et al.*, 1991). La protezione dalla lisi enzimatica è stata studiata da Lockwood (Lockwood, 1960) su colture in agar di venti funghi patogeni di piante verificando come i funghi con parete pigmentata, quali *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia* sp. e *Verticillium* sp., risultino più resistenti a questo trattamento.

### 2.2.2 Il restauro: metodi utilizzati in passato

Nonostante l'applicazione di tutte le tecniche di controllo del biodeterioramento note, spesso non è possibile evitare completamente l'attacco dei microrganismi ai materiali archivistici e librari. In questo caso la rimozione delle macchie fungine e del micelio stesso dalla carta rappresenta un passaggio importante nelle operazioni di restauro e di conservazione sia per permettere una migliore fruizione dell'opera sia per garantire le condizioni igieniche idonee alla conservazione. Infatti, per la rimozione delle macchie fungine dal supporto cartaceo il principale fattore da tenere in considerazione riguarda la valutazione dei rischi per l'opera d'arte che possono derivare dall'operazione di pulitura, qualora questa sia giustificata dai danni prodotti dalla crescita biologica. In base alle specie di organismi presenti, agli elementi costitutivi del substrato e del suo stato di conservazione, si deve valutare l'opportunità di un metodo di rimozione meccanico, fisico o chimico, valutando caso per caso i vantaggi e gli svantaggi di ciascuno.

Parallelamente alle metodologie impiegate devono essere programmati ed eseguiti interventi volti ad agire sulle condizioni ambientali che hanno reso possibile lo sviluppo biologico, affinché i risultati della metodologia applicata siano di lunga durata (Caneva *et al.*, 2005).

#### *Metodi meccanici*

I metodi meccanici consistono nella rimozione fisica dei biodeteriogeni attraverso strumenti manuali quali bisturi, spazzole, spatole, raschietti, microaspiratori, ecc. Questi metodi sono ampiamente utilizzati per la facilità d'impiego e per l'immediatezza dei risultati che forniscono.

Tuttavia è molto difficile avere un totale controllo dell'operazione e questo è potenzialmente causa di gravi danni durante il processo di rimozione (Sterlini, 1995). Il vantaggio che presentano questi metodi, oltre ad una semplicità d'uso, consiste nel non aggiungere alcuna sostanza estranea al substrato. Questi metodi potrebbero essere efficaci nel caso di macchie provocate dalla presenza di micelio pigmentato, ma è necessario tener presente come una completa rimozione delle strutture vegetative sia molto difficile. Infatti queste, durante l'attacco, penetrano all'interno del substrato, rendendo praticamente impossibile una loro rimozione senza causare danni a quest'ultimo che risulta, oltretutto, già fortemente danneggiato per la presenza stessa della colonia microbica (Florian, 2000; Caneva *et al.*, 2005).

### *Metodi fisici*

L'impiego di metodologie fisiche, basato principalmente sull'applicazione di radiazioni elettromagnetiche di varia lunghezza d'onda (pulitura laser), non è ancora ampiamente utilizzato nel campo del restauro soprattutto per i costi elevati, il rischio per gli operatori e la difficoltà nell'applicazione. Accanto a questi svantaggi, non facilmente trascurabili, è stata però dimostrata l'efficacia, in alcuni casi, nella rimozione di macchie dovute alla produzione di pigmenti fungini. Szczepanowska (Szczepanowska *et al.*, 1994), infatti, ha valutato l'efficacia del trattamento con laser sulle macchie prodotte su campioni di carta da quattro specie fungine: *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum* e *Chaetomium globosum*. Le macchie sono state trattate con un laser YAG Quantel modello YG580, con una luce di lunghezza d'onda corrispondente a 532nm, sperimentando varie intensità e numero di pulsazioni. I risultati hanno dimostrato come il trattamento sia stato efficace nella completa rimozione delle macchie prodotte da *Alternaria solani* e da *Penicillium notatum*, dopo l'impiego di 3-10 pulsazioni. Inoltre le analisi effettuate con il microscopio ottico e con il microscopio a scansione elettronica hanno dimostrato l'assenza di danni al supporto cartaceo. Tuttavia, le macchie prodotte da *Chaetomium globosum* e da *Fusarium oxysporum* non hanno subito alcun cambiamento a seguito del trattamento, dimostrando come questa tecnica possa essere potenzialmente applicabile ed efficace, ma non in tutti i casi.

Attualmente i metodi fisici vengono impiegati prevalentemente per la disinfezione dei materiali cartacei poiché consentono di controllare l'attività dei microrganismi responsabili del biodeterioramento.

### *Metodi chimici*

Gli studi condotti da Copedé (Copedé, 1991) sottolineano l'importanza di individuare la sostanza estranea o la causa dell'alterazione cromatica affinché sia possibile scegliere il tipo di intervento ed

il mezzo chimico da utilizzare. I metodi di smacchiamento chimico possono essere eseguiti per solubilizzazione o per reazione chimica.

La solubilizzazione, nella quale è compreso anche il *lavaggio*, prevede che la sostanza da eliminare (*soluto*) possa essere allontanata dalla carta ed essere dispersa in un mezzo liquido (*solvente*). Tale operazione naturalmente non deve procurare alterazioni ai materiali che vengono trattati e non deve creare problemi di tossicità per l'operatore. La tecnica maggiormente utilizzata è l'estrazione della macchia per tamponamento: con un batuffolo di cotone imbevuto di solvente viene bagnata la sostanza da estrarre, cercando di farla assorbire da una carta assorbente posta sotto il foglio. Per facilitare l'estrazione si può "ammorbidire" la macchia esponendola per un certo numero di ore ai vapori del solvente; oppure si può utilizzare un piano aspirante, che favorisca la fuoriuscita della soluzione e la concentrazione del solvente solo nel punto desiderato, evitando in tal modo la formazione di gore o aloni.

Non tutte le macchie, però, possono essere tolte con l'ausilio di un solvente: per alcuni smacchiamenti è necessario intervenire con una reazione chimica. La sostanza che ha procurato l'alterazione cromatica deve cioè subire una trasformazione molecolare che porti, come conseguenza, l'annullamento del colore. Fra le macchie di questo tipo che si riscontrano più frequentemente sulla carta vi sono quelle procurate dai microrganismi, e gli imbrunimenti, spesso diffusi su tutta la superficie del foglio. La reazione chimica che generalmente viene utilizzata per questa operazione è l'*ossidazione*, e l'intervento è chiamato *imbiancamento o sbianchimento*. Le sostanze utilizzate non possono operare un'ossidazione selettiva reagendo solo con le sostanze colorate, ma tutto ciò che è presente nella e sulla carta viene ad essere attaccato. Questo accade durante il trattamento, ma può anche continuare nel tempo se sono utilizzati particolari ossidanti oppure se non vengono prese alcune precauzioni. Per tale ragione, prima di prendere la decisione di intervenire, è necessario fare accuratamente alcune indagini per stabilire se le condizioni che sussistono permettono di operare senza provocare gravi danni e, qualora si decidesse di sbiancare, per individuare anche il reagente più opportuno ed i modi ottimali d'impiego.

In passato gli ossidanti utilizzati nel campo del restauro sono stati l'ipoclorito di sodio, l'ipoclorito di calcio, il diossido di cloro, l'acido ipocloroso ed il perossido di idrogeno.

L'ipoclorito di sodio (NaOCl), per la sua facile reperibilità in commercio e per il suo alto potere sbiancante, è stata la sostanza ossidante più utilizzata nei laboratori di restauro. Questa alta capacità, però, lo rende fortemente degradante: il suo uso è pertanto consigliabile solo in casi estremi, quando le macchie compromettono molto seriamente la leggibilità dell'opera. Conseguentemente è ancora più importante che le procedure da seguire per questo intervento siano molto curate, onde ridurre al minimo i danni. La forte alcalinità dell'ipoclorito di sodio (pH 11,4 circa), e la pericolosità di

eventuali residui, sia per il supporto che per l'operatore, hanno portato alla sua sostituzione con l'ipoclorito di calcio ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) pur avendo un potere sbiancante leggermente inferiore. Dopo la sbianca, il foglio doveva essere risciacquato in acqua corrente, immerso quindi in una soluzione anticloro, lavato ed infine deacidificato. La soluzione anticloro era assolutamente indispensabile per evitare che l'ipoclorito continuasse ad agire nel tempo. Le sostanze utilizzate a questo scopo sono state il tiosolfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), l'acido acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ed il boroidruro di sodio ( $\text{NaBH}_4$ ).

Il diossido di cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e l'acido cloroso ( $\text{HClO}_2$ ) sono stati impiegati, generalmente, nei trattamenti acquosi, per immersione. Anche in questi casi è stato necessario un trattamento anticloro seguito da un lavaggio in acqua corrente e da una deacidificazione.

Il perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anche se meno aggressivo dei precedenti composti, è un mezzo che non riesce ad eliminare molte macchie presenti sulla carta se non gore ed imbrunimenti.

Szczepanowska (Szczepanowska *et al.*, 1992) ha testato l'efficacia di alcuni solventi nella rimozione di macchie prodotte da differenti specie fungine, rilevando come l'esposizione ai vari solventi per un tempo ridotto non abbia avuto effetti su alcuna delle macchie presenti. L'esposizione al 1,4-diossano per 24h ha completamente rimosso le macchie prodotte da *Fusarium oxysporum* ed in maniera significativa quelle di *Penicillium notatum* e *Chaetomium globosum*. L'esposizione al N,N-dimetilformammide per 24h ha ridotto significativamente le macchie prodotte da *Chaetomium globosum* e da *Penicillium notatum* e debolmente quelle di *Fusarium oxysporum*; mentre l'azione della piridina per 24h sulle macchie di *Chaetomium globosum* e *Fusarium oxysporum* ha portato solo ad una rimozione parziale. Le prove effettuate con i solventi più comuni come acetone, etanolo e xilene non hanno portato a nessun risultato, così come l'utilizzo del dimetilsolfossido e della trietilammina. Inoltre, i test eseguiti sulla resistenza della carta dopo una continua esposizione a ciascuno dei solventi, non hanno mostrato differenze rispetto ai campioni di carta non trattati. Tuttavia i solventi che hanno mostrato capacità di pulitura delle macchie fungine sono tossici e vanno utilizzati seguendo tutte le necessarie precauzioni.

Come precedentemente detto, le melanine sono insolubili in acqua, in soluzioni acide e nei comuni solventi organici, ma possono essere sbiancate con l'acqua ossigenata che risulta comunque dannosa per il supporto cartaceo. Infatti spesso e per molto tempo le melanine sono state considerate come polimeri non biodegradabili in base all'inerzia della loro presunta resistenza all'attacco chimico (Prota, 1992). Tuttavia diversi studi hanno dimostrato un lento degrado delle melanine fungine dell'*Aspergillus fumigatus* (Luther *et al.*, 1980); mentre il lavoro di Liu (Liu *et*

al., 1995) ha evidenziato una maggiore degradazione batterica delle melanine presenti in funghi isolati dal suolo. Infine i risultati ottenuti da Rättö (Rättö *et al.*, 2001) mostrano come la capacità di alcuni *white rot fungi*, come *Bjerkandera adusta*, *Galactomyces geotrichum*, *Trametes hirsuta* e *Trametes versicolor*, supera qualsiasi altro taxon fungino nella decolorazione della melanina presente nell'*Aureobasidium pullulans* cresciuto in vitro.

Un altro esempio è lo studio condotto da Florian (Florian, 2000) in cui le melanine presenti nelle pareti dei conidi dell'*Aspergillus phoenicis*, nelle pareti cellulari dell'*Aspergillus nidulans* e negli sclerozi del *Cladosporium rolfii* sono state disciolte impiegando idrossido di potassio 1M e sbiancate con 5% di ipoclorito di sodio e 30% di perossido di idrogeno causando lisi delle strutture pigmentate. Lo sbiancamento delle melanine è stato completato utilizzando perossido di idrogeno, raggi UV(A) e pH elevato. Tutti questi trattamenti, però, sono risultati dannosi per la conservazione dei beni archivisti e librari.

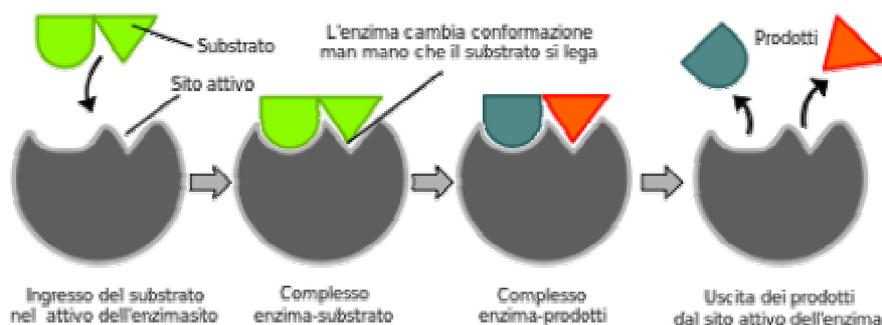
Studi più recenti sono stati condotti da Bicchieri (Bicchieri, 2002; Bicchieri *et al.*, 2007) ed incentrati sulla ricerca di riducenti delle funzioni ossidate, responsabili di variazioni nella stabilità meccanica e nel colore, soprattutto nella cellulosa. Le indagini condotte hanno permesso di scegliere dei composti appartenenti alla classe degli amminoborani (terz-butilammino borano e complesso boranoammoniacale), altamente selettivi, efficaci e in grado di sbiancare otticamente la carta, eliminando i gruppi cromofori e ripristinando le originali funzioni alcoliche nella catena di cellulosa (Bicchieri, 2002; Bicchieri *et al.*, 2007; Casetti Brach *et al.*, 2010).

Uno studio importante è stato realizzato da Tavzes (Tavzes *et al.*, 2013) sulla rimozione delle macchie fungine di natura melanica da supporti cartacei mediante un sistema biomimetico industriale di ossidazione. Tale procedura è in grado di causare forti cambiamenti chimici e/o degradativi sui polimeri melanici extracellulari. Inoltre da una prima ispezione visiva i campioni di carta sottoposti al trattamento Cu-py-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*copper pyridine complex*) non hanno evidenziato alcun danno significativo dell'integrità del foglio questo perché gli intermediari della reazione ossidativa sono altamente selettivi per le strutture aromatiche, pertanto ossidano le strutture lignine aromatiche selettivamente, evitando di arrecare danni alla cellulosa. I risultati ottenuti, quindi, sono incoraggianti e sembrano molto promettenti per la rimozione delle macchie fungine di natura melanica da supporti cartacei, ma è necessario ottimizzare la procedura per evitare possibili danni ossidativi al supporto stesso. Un'attenta valutazione del grado di polimerizzazione della cellulosa, e di altri indicatori di degradazione, risulta estremamente importante per l'applicabilità del sistema di pulitura che potrà essere impiegato anche su altri supporti che presentano la stessa problematica una volta sviluppato e testato.

## 2.3 Uso di enzimi nelle operazioni di conservazione e restauro

### 2.3.1 Meccanismi d'azione e criteri di selezione degli enzimi

Gli enzimi sono proteine complesse, solitamente con pesi molecolari variabili tra  $10^4$  e  $10^6$  Dalton (unità di massa atomica) presenti all'interno delle cellule di tutti gli organismi viventi. Certi microrganismi hanno anche la capacità di secernere enzimi all'esterno: in questo caso l'attività enzimatica avviene al di fuori della cellula. Gli enzimi svolgono il ruolo di catalizzatori, ossia accelerano le reazioni biochimiche di conversione di un substrato, restando inalterati alla fine del processo. Una delle principali caratteristiche degli enzimi è quella di essere altamente specifici, cioè sono in grado di catalizzare una o al massimo pochi tipi di reazione con un substrato simile, rendendone sicuro l'utilizzo anche su materiali costituiti da più componenti. A permetterne questa selettività è la loro stessa conformazione: ogni enzima, infatti, è costituito da una regione, detta "sito attivo", con una struttura tale da consentire l'interazione solamente con un substrato di struttura spaziale ben precisa, proprio come una chiave si adatta ad una determinata serratura. Infatti, tra le numerose molecole che si trovano ad avvicinarsi, l'enzima è in grado di "riconoscere" quella che ha la giusta struttura, che andrà dunque a posizionarsi entro quel sito, dando inizio ad una serie di processi che costituisce il ciclo catalitico enzimatico. Le altre molecole del substrato, che non hanno forma appropriata per interagire col "sito attivo" dell'enzima, non si potranno associare e non saranno dunque soggette all'azione enzimatica. Il "riconoscimento" del substrato da parte dell'enzima è quindi basato sulla somiglianza strutturale tra la particolare conformazione spaziale del "sito attivo" e la forma tridimensionale del substrato (Fig. 4) (De Santis, 1983; Cremonesi, 1999).



**Figura 4.** Interazione dell'enzima con il substrato specifico.

Molti enzimi richiedono la presenza di alcuni cofattori non proteici, come ioni metallici o piccole molecole organiche chiamate coenzimi. Inoltre l'attività enzimatica è fortemente influenzata da alcuni fattori quali la temperatura ed il pH, poiché possono modificare la struttura terziaria dell'enzima o spezzare il legame tra l'enzima ed il substrato ed è per questo motivo che è necessario

monitorare accuratamente le condizioni sperimentali durante il loro impiego (Lehninger *et al.*, 1994).

### 2.3.2 La scelta degli enzimi per la rimozione delle macchie fungine

Gli enzimi che possono avere un'applicazione pratica nel campo dei beni culturali appartengono alle idrolasi (es. glicosidasi, lipasi, proteasi, ecc.) e sono in grado di catalizzare il degrado di macromolecole insolubili in acqua come macromolecole insolubili in acqua, ma diventano idrosolubili quando ridotte in frammenti più piccoli.

Attualmente è possibile rimuovere patine costituite da polisaccaridi (amido, cellulosa, gomme vegetali, ecc.), proteine (albumine, caseine, colle, collagene, gelatine animali, uovo, ecc.) e lipidi (cere, grassi, oli, ecc.).

Di seguito vengono riportate alcune proteine enzimatiche:

- ✓ le *Amilasi* che possono essere sia d'origine animale (amilasi pancreatica, ptialina della saliva) sia di derivazione batterica (es. *Bacillus*) o fungina (es. *Aspergillus*);
- ✓ le *Lipasi* che possono derivare da tessuti animali (pancreas), da tessuti vegetali (germi di avena, frumento e simili), da specie batteriche come *Bacillus* e da funghi come *Aspergillus* e *Penicillium*;
- ✓ la *Pepsina*, la *Tripsina* e le *Proteasi* che possono essere sia di origine animale se estratte dai tessuti di alcuni organi, quali pancreas e stomaco, sia di origine microbica quando isolati da varie specie di batteri, soprattutto *Bacillus*, e funghi, in particolare *Aspergillus*.

L'utilizzo razionale di un enzima, o di una miscela di enzimi, richiede alcune informazioni preliminari come la natura dei manufatti che devono essere preservati, le caratteristiche chimiche dei materiali che devono essere rimossi (proteine, amidi, oli e grassi, ecc.), l'attività idrolitica e la specificità d'azione dell'enzima, la temperatura, il pH e la concentrazione salina per il corretto funzionamento. Infine è necessario considerare anche il costo dell'enzima che varia fortemente a seconda della tipologia e del grado di purezza determinando una maggiore o minore specificità ed attività (De Santis, 1983; Di Majo, 1984 e 1985; Cremonesi, 1999; Palla, 2006).

Nel campo del restauro l'utilizzo degli enzimi è applicato già a partire dagli anni '70, principalmente per operazioni di pulitura - rimozione di colle animali ed adesivi - e consolidamento delle opere d'arte. Tali esperienze, rimaste purtroppo isolate per molto tempo, furono realizzate inizialmente su manufatti di natura cartacea e successivamente su opere policrome su tele e tavole. Cremonesi (Cremonesi, 1999) riporta un breve *excursus* sui principali autori che si sono occupati dell'argomento.

- ✓ Wendelbo (Wendelbo, 1970) ha effettuato un trattamento enzimatico su libri in cui le pagine erano incollate per la presenza di colla animale, utilizzando la Tripsina in un buffer fosfato a pH 8 applicata per immersione del foglio a 40°C per 5-10 minuti, con successivo lavaggio acquoso.
- ✓ O'Hoski (O'Hoski, 1976) ha sviluppato uno studio sulla possibile formulazione di una saliva artificiale a partire da quella naturale per operazioni di pulitura.
- ✓ Segal (Segal *et al.*, 1977) ha studiato la rimozione di adesivi a base di amido su carta e di colle animali su pergamena attraverso l'utilizzo di  $\alpha$ -amilasi derivante da *Bacillus subtilis* in buffer fosfato a pH 6,95 a 37-39°C per 10-60 minuti per la carta e di proteasi derivante da *Streptomyces griseus* in buffer fosfato a pH 7,45 a 40°C per la pergamena, trattamenti sempre seguiti da un lavaggio acquoso e dalla denaturazione degli enzimi con alcool al 95%.
- ✓ Hatton (Hatton, 1977) è stato il primo ad utilizzare gli enzimi in soluzioni addensate con 2% di Metilcellulosa.
- ✓ Makes (Makes, 1979) ha descritto l'utilizzo enzimatico per la rimozione di sostanze filmogene applicate al retro di un dipinto; l'uso di Amilasi e Proteasi per la rimozione di colla di pasta dal retro di un dipinto ad olio (Makes, 1982) e l'uso di una miscela di enzimi per la rimozione di un legante proteico/oleoso da una superficie pittorica (Makes, 1988).
- ✓ Cooper (Cooper *et al.*, 1980) ha descritto l'utilizzo degli enzimi in soluzioni parzialmente acquose nel caso di supporto suscettibile all'acqua.
- ✓ Wolbers (Wolbers, 1988) ha utilizzato una lipasi fungina in buffer Tris a pH 8,4 ed un tensioattivo non ionico per la rimozione di una patina oleo-resinosa alterata.
- ✓ Larminie (Larminie, 1992) ha illustrato l'impiego di una lipasi fungina in tamponi a pH 8,4 e 8,8 sia in forma gelificata che per immersione per 10-30 minuti per la rimozione di patine e macchie di oli siccativi da un disegno a carboncino e da acquerelli.
- ✓ Bellucci (Bellucci *et al.*, 1994) ha descritto l'utilizzo di una proteasi microbica per la rimozione di una spessa patina proteica dalla superficie di un dipinto ad olio su tela e di una lipasi per la rimozione di una vernice oleo-resinosa dalla superficie di una tempera su tavola.
- ✓ Gallo (Gallo *et al.*, 1994) ha approfondito l'utilizzo di amilasi e proteasi per il distacco di carte foderate.

Sebastianelli riporta l'utilizzo di Lipasi *Type VII* per la rimozione di residui di sostanze grasse e cerosi dalla superficie di dipinti staccati e collocati su supporti in gesso. Dopo un trattamento iniziale di pulitura (con tampone di cotone idrofilo) con soluzioni di *White spirit* (70%) + alcool Isopropilico (30%) e diluente nitro (40%) + alcool Isopropilico (40%) + Metil Etil Pirrolidone (20%), era stata riscontrata la presenza di cere e lipidi. Per la rimozione di queste sostanze è stato

utilizzato l'enzima Lipasi *Type VII* ad una temperatura di 38°C e ad un pH compreso tra 8,0 e 9,0, in presenza di basse percentuali di carbonato d'ammonio. Per quanto concerne i tempi d'applicazione, è stata valutata l'efficienza enzimatica a due e sette minuti. Quest'ultimo tempo d'incubazione, si è rivelato il più idoneo ed ha permesso di eliminare tutti i residui di sostanze grasse e cerose in maniera selettiva senza interagire con i materiali costitutivi. La superficie pulita enzimaticamente è stata rifinita ricorrendo a mezzi acquosi a tampone e miscele di solventi, al fine di inibire un'eventuale attività enzimatica residua (Palla, 2006).

Cremonesi (Cremonesi, 2006), invece, utilizza gli enzimi in soluzione gelificata sia per localizzare meglio l'azione ed agevolare la rimozione dei residui sia per una questione di praticità. Un tipico gel enzimatico è così composto: 100ml di acqua deionizzata sono tamponati al pH desiderato, variabile a seconda del tipo di enzima e del manufatto da trattare. Successivamente si può aggiungere un tensioattivo non ionico per facilitare la diffusione dell'enzima verso il substrato da idrolizzare, ma in percentuale bassissima (0,1% in peso/volume) per non provocare fenomeni di inibizione dell'enzima stesso. La soluzione viene poi gelificata per aggiunta di un etere di cellulosa (idrossipropilcellulosa o metilcellulosa) in quantità sufficiente per ottenere un gel di media viscosità, tipicamente 2-4gr a seconda del tipo di addensante. Quando il gel è omogeneo, uniforme e privo di grumi, si aggiunge l'enzima. Possono bastare quantità basse a seconda del tipo di trattamento, dello spessore del materiale da asportare e della fragilità del supporto stesso che condiziona la possibilità di fare più o meno lavaggi per la rimozione dei residui. Mentre le soluzioni enzimatiche sono utilizzabili al massimo entro pochi giorni poiché gli enzimi si degradano velocemente una volta sciolti in acqua, i gel enzimatici possono essere conservati refrigerati per alcune settimane (Palla, 2006; Iannuccelli *et al.*, 2010).

Blüher (Blüher, 1997) ha condotto degli studi per valutare la possibilità di utilizzare trattamenti enzimatici per la rimozione di particolari macchie causate dall'essiccamento di alcuni oli, come l'olio di semi di lino, su manufatti cartacei. Le macchie oleose possono provocare gravi danni quali l'aumento di fragilità del materiale e, se combinate con alcuni pigmenti o vernici, possono essere molto difficili da rimuovere, anche impiegando solventi organici.

Le indagini sono state effettuate su oltre 300 campioni di prova e sottoposti a trattamenti con diverse condizioni di invecchiamento artificiale dal momento che il degrado dell'olio di lino è un processo molto complesso. Sono stati utilizzati vari enzimi appartenenti alle lipasi e sono stati testati anche i tamponi, il pH ed il tensioattivo. I dati ottenuti evidenziano che non è stato possibile rimuovere in modo prevedibile e controllato, nonché completamente, le macchie di olio di lino che,

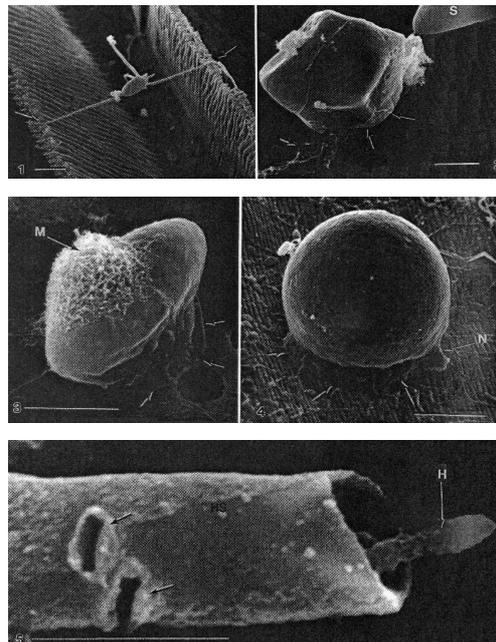
in alcuni casi, apparivano addirittura più scure dopo i trattamenti enzimatici. Pertanto gli enzimi attualmente disponibili in commercio non sono adatti come alternativa ai solventi comunemente utilizzati. Numerose, inoltre, sono le problematiche che devono essere affrontate quando vengono impiegate le lipasi nella rimozione di macchie di olio su carta. Il successo del trattamento enzimatico è fortemente dipendente dall'età e dal grado di degradazione del film oleoso, così come dalla presenza di additivi quali pigmenti o resine. Infine non è ancora chiaro se le lipasi siano in grado di attaccare l'intera struttura dell'olio di semi di lino essiccato o semplicemente le parti non reticolate del film oleoso. Il lavoro svolto ha mostrato che, nella maggior parte dei casi, si verificano delle reazioni enzimatiche sia sulle macchie di olio di lino essiccato che non ed i prodotti generati sono insolubili in acqua (a parte il glicerolo). Pertanto è necessario un post-trattamento in ambiente alcalino, o con l'aiuto di solventi organici, per la rimozione degli acidi grassi rilasciati.

Anche l'utilizzo degli enzimi per la rimozione di macchie fungine da supporti cartacei rappresenta un nuovo tipo di applicazione enzimatica tuttora in fase sperimentale. De Mico (De Mico *et al.*, 2009) ha valutato l'efficacia di soluzioni enzimatiche nella rimozione del micelio fungino di *Aspergillus terreus* Thom da diversi tipi di carte. Sono stati eseguiti quattro diversi trattamenti: lipasi+tween 40, lipasi+tween 20, alcool deidrogenato+triton 100x e alcalasi+triton 114x, applicati in gocce e lasciati agire per 5 minuti, quindi lavati con acqua. I campioni analizzati con il colorimetro e con il microscopio a scansione elettronica hanno mostrato che il trattamento con lipasi+tween 40 ha rimosso con successo sia le macchie che il micelio, mentre l'alcalasi+triton è stato il trattamento che ha dato i risultati peggiori.

Altri studi sono stati effettuati sull'efficacia degradativa da parte di alcuni enzimi ligninolitici sulla melanina. L'efficacia dell'azione litica delle ligninasi verso le melanine dipende dalla somiglianza fisica e chimica della melanina con la lignina, il principale costituente del legno, degradata da particolari complessi enzimatici quali laccasi, manganese perossidasi e lignina perossidasi, presenti nei funghi ligninolitici. I trattamenti effettuati con il sistema laccasi-HBT (1-idrossibenzotriazolo), soprattutto ad alta pressione, hanno comportato i cambiamenti più evidenti nella composizione della melanina, confermati dalle analisi colorimetriche (Tavzes *et al.*, 2009). Anche Koestler (Koestler *et al.*, 2003) ha testato l'efficacia di enzimi ligninolitici prodotti dai funghi della carie bianca del legno nella degradazione della melanina. Attualmente la capacità di alcuni enzimi di origine fungina di degradare la melanina viene studiata soprattutto per applicazioni in campo cosmetico (Mohorčič *et al.*, 2007) poiché una forma di essa è presente anche nella pelle umana e ne determina la pigmentazione. Oltre alla melanina presente nella parte stessa del micelio fungino, alcuni funghi

sono in grado di produrre degli essudati colorati di natura chimica riferibili a tre gruppi principali, derivati del toluchinone, del naftochinone e del beta-metil-antrachinone ed anche sostanze flavonoidi (antociani, flavoni ed altri). Alla luce di una tale variabilità chimica identificare di volta in volta il solvente idoneo per la rimozione delle macchie fungine dai supporti cartacei non sempre risulta semplice ed immediato (Caneva *et al.*, 2005).

Un altro aspetto dell'azione enzimatica da valutare è quello inerente il distacco e la rimozione del micelio fungino dal substrato, che in alcuni casi si presenta solo superficiale, ed è quindi rimovibile anche con una semplice spolveratura, mentre in altri penetra ed aderisce all'interno rendendone impossibile la rimozione senza arrecare danni al medesimo. La capacità del micelio fungino di penetrare ed aderire al substrato non è ancora pienamente nota, ma alcuni studi hanno dimostrato il ruolo fondamentale giocato da alcune componenti della parete cellulare. Gareth Jones (Gareth Jones, 1994) si è occupato delle modalità di adesione dei funghi filamentosi al substrato, notando che quando un propagulo di conidio germina, il tubo germinativo si estende fino a formare un'ifa o un appressorio, il quale può aderire strettamente al substrato, penetrando attraverso una semplice forza meccanica o con l'aiuto di fattori chimici o enzimatici (Fig. 5).

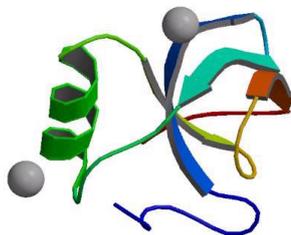


**Figura 5.** Esempi di adesione dei funghi filamentosi a diversi substrati mediante osservazione al SEM.

1. *Nia vibrissa*: basidiospora intrappolata dalle sue appendici polari ed equatoriali (freccia) sul bordo di taglio della parete del legno – 2. *Halosarpheia retorquens*: ascospora (s) con appendice filiforme (indicata dalla freccia) legata ad un granello di sabbia – 3. *Nimbo spora effusa*: ascospore con appendici a formare un attacco a “cuscinetto” (freccia) al substrato ed un’appendice mucillaginosa secondaria (M) – 4. *Corollospora marittima*: ascoma attaccato da un subiculum (freccia) ad una foglia di *Posidonia oceanica* – 5. *Paria placenta*: ife cristalline rotonde (HS) attorno ad un ifa (freccia H). Le cicatrici sulle ife (freccia) indicano dove sono caduti dei piccoli cristalli (Gareth Jones, 1994).

Inizialmente gli appressori sono ialini, ma successivamente la parete cellulare diventa melanica. Secondo Howard (Howard *et al.*, 1989) la melanina non giocherebbe un ruolo fondamentale nell'adesione ma, mantenendo un'alta concentrazione interna dei soluti e un'alta pressione idrostatica, assicurerebbe un'efficace penetrazione nel substrato stesso. I dati disponibili sugli adesivi fungini non sono molti, ma gli studi disponibili identificano come componenti principali i soli carboidrati o le sole proteine, anche se la maggior parte è costituita da carboidrati misti a proteine.

In seguito Jayatilake (Jayatilake, 2011), in uno studio sulla *Candida* sp., ha individuato in speciali costituenti della parete cellulare di questo lievito, noti come idrofobine, la facilità di adesione che il microrganismo presenta sui tessuti epiteliali umani. Le analisi eseguite al TEM hanno evidenziato come lo strato della parete cellulare del lievito a contatto con la superficie epiteliale appaia fioccoso, poiché gli enzimi fungini degradano i filamenti intercellulari delle cellule epiteliali oltre a conferire proprietà adesive alle cellule del lievito. Linder (Linder *et al.*, 2005) ha individuato nelle idrofobine prodotte dai funghi filamentosi degli elementi fondamentali nella crescita fungina come componenti strutturali e nell'adesione dei funghi ai substrati solidi. Nel 1994 Wessels divise le idrofobine conosciute in due gruppi in base al modo di assemblarsi dei gruppi idrofobici e idrofilici che esse contengono. Questi due gruppi vengono chiamati classe I e classe II e la differenza tra di essi può essere individuata nella solubilità degli aggregati che formano: gli aggregati appartenenti alla classe I possono essere disciolti solamente in acidi forti come l'acido trifluoroacetico (TFA), mentre gli aggregati appartenenti alla classe II possono essere disciolti utilizzando solventi organici diluiti in soluzioni acquose. La struttura di queste proteine è stata compresa grazie all'estrazione da *Trichoderma reesei* di idrofobine appartenenti alla classe II, dove si è resa evidente la loro struttura tridimensionale (Linder *et al.*, 2005) (Fig. 6).



**Figura 6.** Struttura tridimensionale di HFBII.

## 2.4 I batteri impiegati nelle operazioni di pulitura dei beni culturali

### 2.4.1 I batteri nel restauro

L'introduzione delle biotecnologie nello studio dei fenomeni di biodeterioramento rappresenta un nuovo e prezioso strumento per la diagnostica e la conservazione preventiva, che ha permesso in pochi anni di ampliare notevolmente le conoscenze sulle complesse interazioni tra i microrganismi e l'opera e di capire in modo più mirato il ruolo che i singoli microrganismi, all'interno della comunità microbica, svolgono nei processi di degrado. Lo studio degli ecosistemi microbici che si instaurano sull'opera d'arte ha inoltre, solo di recente, messo sotto una nuova luce i batteri: i microrganismi, da sempre confinati al ruolo di deterioranti, possono rivelarsi utili come agenti di biorisanamento dei manufatti di interesse storico-artistico (Fernandes, 2006). Infatti solo una minoranza dei microrganismi noti svolge un ruolo negativo (patogeni alterativi), mentre la grande maggioranza è responsabile di "processi" virtuosi, come quello di rimuovere sostanze organiche non gradite. Inoltre i microrganismi, in alcuni casi, presentano dei vantaggi sia rispetto agli enzimi che ai metodi classici in particolare quando la sostanza organica da rimuovere è particolarmente complessa e incrostata. In questi casi, i batteri sono in grado, per effetto di meccanismi d'induzione genica, di sintetizzare gli enzimi adatti alla degradazione del materiale con il quale si trovano a contatto, reagendo in modo "intelligente" alle condizioni ambientali in cui si trovano. Infatti grazie alla loro versatilità e plasticità genetica i batteri sono in grado di favorire reazioni chimiche che trasformano un substrato agendo in maniera specifica e in tempi molto rapidi (Cremonesi, 1999 e 2006; Tiano, 2002; Ranalli *et al.*, 2003 e 2005; Caneva *et al.*, 2005; Palla, 2006; Sprocati *et al.*, 2007; Sorlini *et al.*, 2008).

Questa applicazione è mutuata dal settore della microbiologia ambientale, dove lo sfruttamento del metabolismo microbico per la decontaminazione di matrici inquinate è da tempo consolidato. La ricerca nel campo della biologia molecolare e della microbiologia ha permesso la selezione e caratterizzazione di numerosi ceppi batterici con specifiche attività cellulari applicabili con buoni risultati. In particolare, è stato possibile identificare e purificare un ampio numero di molecole biologiche di cui è stata valutata l'efficienza e la selettività d'azione, proprio da quei biodeteriogeni (batteri, funghi, attinomiceti) in grado di innescare il deterioramento di substrati organici ed inorganici.

L'impiego controllato dei microrganismi offre uno strumento utile per lo sviluppo di nuove metodologie di restauro, che vanno sotto il nome di biorestauro. Le tecniche di biorestauro prevedono lo sfruttamento di microrganismi con potenzialità metaboliche utili per affrontare diverse problematiche conservative, consentono interventi *soft* per le opere d'arte ed offrono una maggiore sicurezza ambientale (Tasso *et al.*, 2011). Ciò prevede l'esclusione di microrganismi patogeni per

l'uomo e l'ambiente, l'adozione di ceppi batterici preferibilmente non sporigeni, cioè incapaci di sopravvivere nel tempo in forma di spora quiescente anche dopo lunghi intervalli di tempo ed infine un'ideale e adeguata fase finale di delicato lavaggio operata al termine dei trattamenti di pulitura (Cremonesi, 1999; Caneva *et al.*, 2005).

In questi ultimi anni le biotecnologie hanno fornito procedure innovative utilizzabili, per la caratterizzazione del deterioramento di substrati sia organici che inorganici, in progetti di conservazione/restauro delle opere d'arte. L'applicazione di questi protocolli fornisce informazioni sulla natura dei consorzi microbici che colonizzano un substrato, sulle loro potenzialità biodeteriogene e sulla possibilità di controllarli nonché l'opportunità di sviluppare nuove procedure per la pulitura ed il consolidamento dei manufatti deteriorati (Tasso *et al.*, 2011).

In particolare le metodologie basate sull'impiego di ceppi batterici con specifiche attività metaboliche trovano un'interessante applicazione per trattamenti di pulitura, azione che permette la rimozione dei materiali depositati sulla superficie modificando immediatamente l'aspetto estetico del manufatto. Poiché i materiali da rimuovere si trovano a diretto contatto con la superficie dell'opera, la pulitura può causare dei danni irreversibili quindi deve essere seguita in modo selettivo, deve avvenire attraverso la rimozione di strati successivi di deposito, differenziando l'azione tra zona e zona, alleggerendo o rimuovendo in profondità, senza entrare in contatto diretto con i materiali originali, e la biopulitura sembra soddisfare proprio questi canoni d'accuratezza (Cremonesi, 1999).

L'approccio del biorestauro vede le sue applicazioni pioniere nel campo della conservazione dei materiali lapidei ed, in particolare, della problematica delle "croste nere", una delle più importanti cause di degrado per i monumenti calcarei. Si tratta di un prodotto dell'inquinamento atmosferico, a seguito della conversione del carbonato di calcio in solfato di calcio (gesso), che poi ingloba nella matrice minerale idrocarburi policiclici aromatici e particelle carboniose. Ciò determina la formazione di patine nere che tendono a creare degli accumuli che si accrescono, induriscono e generano tensioni meccaniche che producono rigonfiamenti e fessurazioni. Le tecniche tradizionali di restauro si sono rivelate o troppo rischiose per l'opera d'arte o poco efficaci. Nel 1970, Moncreiff e Hempel (Moncreiff *et al.*, 1970) hanno descritto l'impiego di un "impacco biologico", ma le prime vere applicazioni di biorestauro sono descritte da Atlas (Atlas, 1988), che dimostrò la capacità del batterio solfo-riduttore *Desulfovibrio desulfuricans* di riconvertire il solfato di calcio in carbonato di calcio, e da Gauri (Gauri *et al.*, 1988), che ha usato il batterio *Desulfovibrio desulfuricans* per la rimozione di solfati da croste nere. Tale capacità metabolica è stata sfruttata da

Ranalli (Ranalli *et al.*, 1997) per mettere a punto una metodologia per la rimozione delle croste nere da marmo, mediante l'uso di *Desulfovibrio vulgaris*. L'applicazione di questa tecnica di biopulitura si è rivelata efficace a tal punto da poter legittimamente sostituire i protocolli tradizionali, come dimostrato dai casi studio della rimozione di croste nere da fregi ornamentali sulla facciata del Duomo di Milano (Cappitelli *et al.*, 2007).

Sulla base di queste ricerche, Ranalli (Ranalli *et al.*, 1997) ha dimostrato la possibilità di utilizzare diversi ceppi di batteri solfo-riduttori, quali il *D. vulgaris* ed il *D. desulfuricans*, e batteri denitrificanti, come lo *Pseudomonas stutzeri* e lo *Pseudomonas aeruginosa*, al fine di ottimizzare rispettivamente una strategia per la rimozione di solfati e nitrati da manufatti artistici.

Nell'esperimento effettuato su campioni di marmo, circa l'80% dei nitrati e solfati sono stati rimossi mediante applicazione batterica dopo 36 ore di trattamento.

La procedura per la rimozione biotecnologica di croste nere è stata ottimizzata mediante l'uso di un filtro che permette ai batteri di attraversarlo bloccando, però, la deposizione di altri aggregati (Cappitelli *et al.*, 2006). La sepiolite (Ranalli *et al.*, 1997) è stata sostituita con Carbogel che consente una maggiore rimozione dei solfati (98%) ed una più semplice eliminazione delle cellule batteriche al termine del trattamento (Fig. 7).



**Figura 7.** Immagine di un frammento di pietra ricoperto da una crosta nera prima (a) e dopo l'applicazione del *D. vulgaris* (Cappitelli *et al.*, 2006).

Le convenzionali tecniche chimiche o meccaniche utilizzate per la rimozione di croste di sale da materiale lapideo presentano diversi svantaggi: variazioni di colore, movimento di sali all'interno della struttura in pietra, rimozione di quantità eccessive di materiali originali, ecc.. Al fine di mettere in evidenza le potenzialità dei metodi biotecnologici rispetto a quelli tradizionali, Capitelli (Cappitelli *et al.*, 2007) ha messo a confronto due metodi di pulitura: il trattamento chimico è stato effettuato miscelando 30g di EDTA, 50g di carbonato di ammonio e 10ml di tensioattivo Contrad 2000; mentre il trattamento biologico è consistito in una sospensione di *D. vulgaris* applicata

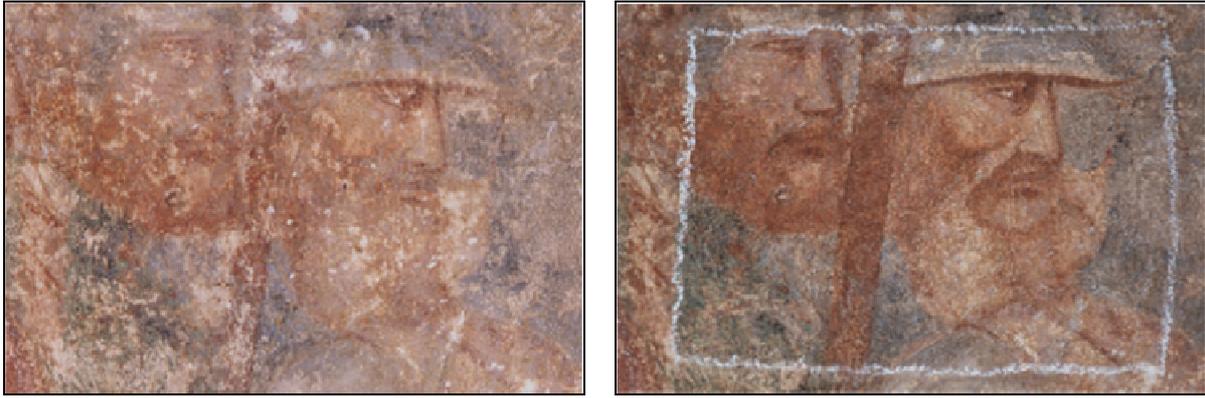
mediante Carbogel. E' stato rilevato che entrambi i trattamenti sono in grado di convertire il gesso in calcite consentendo il consolidamento della pietra, ma con il metodo biologico si ottiene una rimozione più omogenea dei depositi superficiali, preservando la patina nobile sotto la crosta nera cosa che non accade nel caso dell'applicazione del trattamento chimico che comporta piccoli residui di crosta di colore grigio-nero.

Negli ultimi anni Ranalli (Ranalli *et al.*, 2005) ha messo a punto un protocollo che prevede la combinazione sinergica dell'azione enzimatica idrolitica con il metabolismo microbico per interventi di pulitura sui dipinti murali. L'occasione è stata offerta dal restauro di uno degli affreschi del XIV secolo del Camposanto Monumentale di Pisa, "La Conversione di S. Efsio e battaglia" di Spinello Aretino, deteriorato da uno strato compatto di colla animale che era stata precedentemente stesa per un'operazione di "a strappo", ovvero coprendo la superficie con un panno forte legato con strati generosi di colla trattata con formaldeide (Antonioli *et al.*, 2005). Vent'anni dopo i curatori, cercando di rimuovere il panno, hanno riscontrato che la colla riusciva a resistere a qualsiasi trattamento quale tensioattivi, agenti solubilizzanti ed anche miscele di enzimi proteolitici più aggressivi. Pertanto il biorestauro era l'unico modo per ripristinare l'affresco danneggiato quindi si è proceduto con l'applicazione diretta di cellule batteriche intere di *Pseudomonas stutzeri* A29 sulla superficie pittorica per 10-12 ore (Fig. 8).



**Figura 8.** Applicazione e rimozione di impacchi contenenti *Pseudomonas stutzeri* A29 sulla superficie dell'affresco "La Conversione di S. Efsio e battaglia" di Spinello Aretino del XIV secolo presente nel Camposanto Monumentale di Pisa.

Il trattamento batterico è riuscito a rimuovere tra l'80-100% della colla (Fig. 9) lasciando solo residui di piccole dimensioni (mai superiori a ~0,5mm) eliminati, poi, con gli enzimi purificati quali collagenasi e proteasi.



**Figura 9.** Particolare dell'affresco prima e dopo la rimozione della colla animale impiegata nella procedura "a strappo".

Il successo di questa procedura è la dimostrazione di come il biorestauro possa fornire uno strumento alternativo ove le tecniche tradizionali di restauro falliscano (Caneva *et al.*, 2005; Tasso *et al.*, 2011).

Il Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biotecnologie Microbiche dell'Unità Tecnica di Caratterizzazione, Prevenzione e Risanamento Ambientale dell'ENEA Casaccia-Roma ha condotto uno studio sull'impiego di batteri per la rimozione di colla animale su scarti di fodere in pura cellulosa, rimosse durante lo smontaggio di una collezione di stampe del XVII secolo appartenenti all'Istituto Nazionale per la Grafica. I campioni mostravano uno strato compatto di colla, lungo i bordi su cui erano originariamente incollate le stampe, che risultava difficilmente rimovibile con metodi meccanici o chimici. Per la pulitura è stato scelto il ceppo TSNRS 15 *Ochrobactrum sp.* che aveva mostrato, *in vitro*, la migliore reattività verso le colle animali, rispetto ai diversi ceppi testati. Il protocollo sperimentale ha previsto l'applicazione della sospensione batterica mediante un gel di agar in grado di ridurre il rilascio di acqua garantendo l'integrità del supporto cartaceo. Il trattamento si è rivelato efficace nella pulitura dei campioni già dopo 4h di applicazione. L'osservazione mediante microscopio elettronico a scansione (SEM) dei campioni mostra che la maggior parte della colla viene rimossa rendendo visibili le fibre di cellulosa del supporto cartaceo. I cambiamenti cromatici misurati indicano che l'applicazione del gel determina uno sbiancamento della carta più marcato in presenza delle cellule batteriche. Sono attualmente in corso ulteriori analisi per valutare se il trattamento non risulti aggressivo per l'integrità della carta e per studiare il sistema per ridurre l'alterazione del colore (Tasso *et al.*, 2011).

L'uso di questi sistemi biologici prevede, a livello di laboratorio, una prima fase di *screening*, cioè di selezione di microrganismi adatti a rimuovere croste e/o patine, che dovrà essere ripetuta caso per

caso sulla base della natura del danno estetico da rimuovere e del materiale dell'opera stessa. La selezione di batteri può essere fatta sia ricorrendo alle collezioni internazionali di microrganismi sia isolando nuovi microrganismi da diverse matrici ambientali tra le quali anche le stesse opere d'arte. Il vantaggio spesso ottenibile in quest'ultimo caso è rappresentato dal fatto che i microrganismi provenienti da materiali di base, in genere, risultano essere più idonei a crescere sugli stessi materiali perché già adattati rispetto agli altri provenienti da matrici diverse, ambientali e non. L'identificazione e la caratterizzazione dei microrganismi isolati dall'ambiente deve essere eseguita in modo accurato e preciso così da essere assolutamente certi della loro non patogenicità. Un aiuto in tal senso è offerto dall'impiego di tecniche molecolari finalizzate alla rilevazione nel loro DNA di quei geni che codificano per gli enzimi utili all'intervento.

La messa a punto e l'ottimizzazione di un processo biologico di pulitura applicato ai beni culturali può richiedere il ricorso all'impiego di *carrier* specifici. Si tratta di materiali inorganici sui quali i batteri aderiscono formando un *biofilm*, oppure materiali organici gelificati all'interno dei quali le cellule vengono immobilizzate. Il vantaggio di questi ultimi sta nel fatto che sono capaci di fornire, durante il trattamento di pulitura biologica, acqua e nutrienti eventualmente richiesti per la funzionalità delle colture batteriche selezionate e impiegate.

Un aspetto particolarmente importante dell'intera fase di biorestauro è quello rappresentato dal monitoraggio del processo stesso, condotto fin dalle prove preliminari di laboratorio con tecniche fisico-chimiche e microbiologiche consolidate. Ad esse si possono aggiungere tecniche avanzate e rapide, anche se non sempre specifiche, quali per esempio il dosaggio del contenuto in ATP mediante bioluminescenza. L'ATP, in virtù del fatto di essere una molecola energetica comune a tutti gli organismi, può essere adottato validamente come bioindicatore di livelli di attività microbica, con tempi analitici di risposta minori di dieci minuti. In aggiunta, l'abbinamento a tecniche di acquisizione rapida di basse intensità di luce in bioluminescenza (*imaging*) e analisi computerizzate dei dati, può rappresentare un ulteriore vantaggio nella definizione di una complessa strategia di monitoraggio, capace di offrire risposte relative sia agli aspetti quali-quantitativi dei biodeteriogeni sia alla loro distribuzione spaziale. Inoltre, disponendo oggi di tecnologie microbiche più sofisticate e all'avanguardia, come quelle offerte dagli sviluppi delle tecniche di biologia molecolare (estrazione acidi nucleici, amplificazione, PCR, analisi profili elettroforetici, DGGE, clonaggio, ecc.), è più facile adottare di volta in volta, qualora richiesto, microrganismi più idonei alla risoluzione delle differenti problematiche anche nel campo dei beni culturali (Caneva *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Azione dei complessi enzimatici chitinolitici

Numerosi sono gli studi condotti sulla capacità dei microrganismi di degradare la chitina mediante attività chitinolitica soprattutto nel campo delle biotecnologie agro-alimentari. Infatti un potenziale meccanismo di controllo biologico dei parassiti e degli agenti patogeni delle piante contenenti chitina, quale componente strutturale essenziale nella parete cellulare (Gooday, 1990), può essere fornito proprio dall'attività chitinolitica espressa dai batteri.

La chitina, un omopolimero insolubile costituito da più unità di N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) legate tra loro con un legame di tipo  $\beta$ -1,4, rappresenta uno dei polisaccaridi più abbondanti in natura. Si tratta della principale componente strutturale di vari organismi tra cui funghi, insetti e crostacei (Gooday, 1990; Watanabe, 1990). La chitinasi, invece, è una idrolasi che degrada il polimero di chitina e, come la chitina stessa, è presente in una vasta gamma di organismi. In alcuni casi, la chitinasi gioca un ruolo nella morfogenesi e/o autolisi della chitina contenuta negli organismi. Numerosi batteri sono in grado di idrolizzare la chitina nonostante non sia presente come componente nativo. Quindi, è possibile che alcuni batteri siano in grado di utilizzare la chitina come fonte di carbonio attraverso l'attività degli enzimi chitinolitici. Nel suo studio Someya (Someya *et al.*, 2011) ha cercato di determinare la diversità filogenetica e l'eterogeneità spaziale dei batteri chitinolitici coltivabili nella rizosfera di numerose piante e di differenti aree geografiche. I risultati ottenuti evidenziano un'elevata presenza dei generi *Bacillus*, *Lysobacter*, *Mitsuaria*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*; mentre i generi *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* e *Microbacterium* erano presenti in minor quantità. Pertanto considerando la potenziale attività antagonista degli enzimi chitinolitici contro i funghi fitopatogeni, i batteri isolati ed identificati potrebbero essere potenzialmente utilizzati nel controllo biologico di parassiti fungini delle piante.

Un altro esempio è dato dal fungo *Trichoderma harzianum*, fortemente chitinolitico, che presenta una buona potenzialità per il controllo di una serie di patogeni terricoli delle piante (Lynch, 1987; Sivan *et al.*, 1989). Dackman (Dackman *et al.*, 1989) riporta che l'attività chitinasica è necessaria per i funghi del suolo per infettare uova di cisti nematoidi. Sneh (Sneh, 1981) si occupò dell'uso di batteri chitinolitici della rizosfera per il controllo biologico. Altri studi sono stati condotti da Barboza-Corona (Barboza-Corona *et al.*, 1999) che ha verificato la capacità chitinolitica di tre ceppi del batterio *Bacillus thuringiensis* mediante la loro reattività a specifici substrati fluorescenti. I risultati mostrano che i ceppi batterici sono in grado di produrre endochitinasi, chitobiosidasi e n-acetyl-b-glucosaminidasi importanti nel controllo contro funghi patogeni delle piante. Anche Liu (Liu *et al.*, 2002) ha investigato la produzione di chitinasi in *Bacillus thuringiensis* e gli effetti sinergici sull'attività insetticida. Lo studio dimostra che la chitinasi è ampiamente prodotta dal batterio e che in alcuni casi può aumentare la sua attività tossica e ciò potrebbe consentirne

l'impiego per la realizzazione di biopesticidi. Inoltre Sampson (Sampson, 1998) ha esaminato l'attività chitinolitica del *Bacillus thuringiensis* in grado di produrre una vasta gamma di proteine insetticide durante la sporulazione. I risultati evidenziano la potenzialità del batterio di essere impiegato come agente biologico in presenza dei principali insetti patogeni delle piante poiché secerne esochitinasi in presenza di chitina. Chernin (Chernin *et al.*, 1995) ha riscontrato la produzione di proteine con attività chitinolitica in tre ceppi di *Enterobacter agglomerans* prelevati dal suolo. L'attività degradativa è stata indotta mediante un terreno costituito da chitina colloidale quale fonte di carbonio ed è stata quantificata usando saggi cromogenici. I risultati ottenuti confermano la possibilità di utilizzare il batterio come antagonista di funghi patogeni delle piante. Ancora Frankowski (Frankowski *et al.*, 2001) ha condotto uno studio sulla *Serratia plymuthica* mettendo in evidenza la sua capacità di produrre enzimi chitinolitici consentendo il suo impiego nel campo delle biotecnologie agro-alimentari per la lotta agli agenti patogeni. I risultati mostrano un'attività inibitoria diretta sulla germinazione delle spore e sull'allungamento del tubo di germinazione di alcuni funghi patogeni delle piante. Kim (Kim *et al.*, 2003) ha verificato la capacità di inibire la crescita fungina da parte dello *Streptomyces* sp.. I risultati dello studio evidenziano la produzione di differenti enzimi da parte del batterio in grado di idrolizzare la chitina colloidale, il chitotrioso ed i chitooligosaccaridi. Lo studio condotto sullo *Pseudomonas fluorescences* da Nielsen (Nielsen *et al.*, 1999) ha evidenziato la possibilità di impiegare tale batterio come potenziale agente di biocontrollo nella rizosfera grazie alla sua attività chitinolitica. I test effettuati hanno rilevato attività endochitinasica messa in evidenza sia dalla comparsa di aloni su differenti terreni colturali in cui era stato inoculato il batterio sia dal saggio IEF (*isoelectric focusing gel electrophoresis*). Neves (Neves *et al.*, 2009) ha valutato l'effetto antifungino su *Penicillium* sp. e *Cladosporium corylophilum* mediante miscele di metil e propil parabene a differenti concentrazioni. I risultati dimostrano che una miscela di 0,5% metil parabene e 1,0% di propil parabene, in 85,0% di soluzione etanolica, rappresenta la più bassa concentrazione necessaria per un'efficace azione antifungina. Un agente deacidificante, 5,0% di propionato di calcio, è stato aggiunto a questa miscela per il trattamento di documenti cartacei contaminati da funghi. Prove effettuate sui campioni prima e dopo l'applicazione di questa miscela hanno mostrato solo un lieve aumento dell'ingiallimento ed una lieve diminuzione della resistenza alla trazione della carta, mentre è aumentato significativamente il pH quale riserva alcalina. Infine Pleban (Pleban *et al.*, 1997) ha dimostrato che il *Bacillus cereus* produce e secerne chitobiosidasi, un enzima chitinolitico in grado di contrastare l'attività patogena di alcuni funghi nei confronti delle piante di cotone. L'autore sottolinea il fatto che è stato il primo studio ad identificare e caratterizzare l'enzima chitobiosidasi quale unico enzima chitinolitico prodotto da un batterio endofitico.

Dagli studi finora condotti, è evidente la possibilità di trovare batteri chitinolitici in qualsiasi tipologia di habitat, come ad esempio l'ambiente marino, in grado di disporre di grandi quantità di chitina per la presenza essenzialmente di organismi che attuano un processo di muta. La maggior parte di questa chitina è prodotta vicino alla superficie, e gli studi hanno dimostrato che il suo riciclo si verifica sia in acqua che nei sedimenti (Gooday, 1990). La velocità di degradazione migliora a seguito di fenomeni di adesione della microflora chitinolitica e della digestione animale. L'importanza di questi processi è evidenziata dalla costante presenza di batteri chitinolitici, soprattutto dei generi *Vibrio* e *Photobacterium*, associata con lo zooplancton e il materiale particolato (Hood *et al.*, 1977). Le stime di densità di popolazione dei batteri chitinolitici, sia come conteggi totali che come percentuali di eterotrofi totali, hanno dimostrato notevoli differenze, ma conte consistentemente più elevate sono state riportate da sedimenti marini piuttosto che dall'acqua di mare sovrastante (Gooday, 1990). In particolare gli estuari sono particolarmente produttivi: Reichardt (Reichardt *et al.*, 1983) isolò 103 ceppi di batteri chitinolitici dall'estuario di Chesapeake Bay. Di questi, 44 appartenevano al genere *Cytophaga* e presentavano un pigmento di colore giallo-arancio; altri appartenevano ai generi *Pseudomonas* e *Chromobacterium*. Chan (Chan *et al.*, 1970) ha presentato degli studi condotti su batteri chitinolitici della regione di Puget Sound (Stato di Washington): i generi individuati, in ordine decrescente di abbondanza, sono *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Photobacterium*, *Bacillus* e *Chromobacterium*. Pel (Pel *et al.*, 1986, 1989 e 1990) ha studiato l'attività chitinolitica dei ceppi di *Clostridium* isolati da sedimenti dell'estuario di Eems-Dollard (Olanda). I risultati ottenuti hanno evidenziato che i ceppi batterici sono specializzati nell'utilizzare diacetilchitobiosi determinando, però, un accumulo N-acetilglucosamina, monomeri non utilizzabili che appaiono durante l'idrolisi casuale di oligomeri di chitina. La chitina degradata è stata notevolmente arricchita da co-coltura con altri batteri provenienti dai sedimenti affinché vengano rilasciati stimolatori di fattori di crescita come ad esempio la tioredossina, un composto che mantiene lo stato ridotto di essenziali gruppi sulfidrilici nel sistema chitinolitico. Batteri chitinolitici sono abbondanti anche in laghi e fiumi come ad esempio i generi *Serratia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Bacillus*; mentre nei sedimenti sono stati riscontrati gli attinomiceti e ceppi batterici appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Lysobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Cytophaga* (Gooday, 1990). Tutti gli studi riportati conducono ad un risultato comune: la produzione di chitinasi ad opera dei batteri ha dimostrato di essere indotta da oligomeri di chitina e bassi livelli di N-acetilglucosamina (Jeuniaux, 1963; Monreal *et al.*, 1969; Kole *et al.*, 1985).

## 2.5 Biodegradazione delle melanine

Finora gli studi condotti per verificare la capacità dei microrganismi di rimuovere le alterazioni cromatiche sono stati volti alla ricerca di un'eventuale azione degradativa operata dagli enzimi fungini ligninolitici nei confronti della melanina. Infatti le caratteristiche chimico-fisiche della melanina sono molto simili a quelle della lignina, un polimero tridimensionale molto complesso composto di alcoli aromatici legati da vari tipi di legami tra atomi di carbonio.

I funghi ligninolitici della carie bianca (*white rot fungi*) sono in grado di degradare sia la lignina che la cellulosa coinvolgendo l'intera struttura del legno. Il materiale ligneo che ha subito questo tipo di danno risulta sbiancato proprio a seguito della degradazione della lignina (bruna), leggero e fibroso (Caneva *et al.*, 2005).

I *white rot fungi* possono essere divisi in sottoclassi a seconda del complesso enzimatico che secernono al fine di degradare, solubilizzare ed assimilare la lignina. Tra i vari enzimi individuati, in quanto direttamente coinvolti in tali processi, i più importanti sono: lignina perossidasi (LiP), manganese perossidasi (MnP) e laccasi (Lac) (Hofrichter, 2002; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002; Eichlerová *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2011; Dhillon *et al.*, 2012; Plačková *et al.*, 2012; Hariharan *et al.*, 2013).

Le proprietà ossidative degli enzimi fungini offrono diversi vantaggi e sono di grande interesse per applicazioni industriali e biotecnologiche poiché sono catalizzatori specifici ed efficienti nonché ecologicamente sostenibili. Quindi gli enzimi fungini rappresentano un potenziale sostituto dei metodi classici comunemente impiegati nella decolorazione delle tinture; nella degradazione di coloranti azoici (*azo dyes*), composti policiclici aromatici (PAHs), xenobiotici, ecc.; nella biodegradazione e nel biorisanamento; nei trattamenti delle acque reflue; nella diagnostica e nella biosensoristica; nei processi di *biopulping*; nei sistemi di detossificazione e decontaminazione; nei metodi di conservazione e restauro dei beni culturali (Knapp *et al.*, 1995; Banat *et al.*, 1996; Kirk *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999; Martínez, 2002; Mayer *et al.*, 2002; Bumpus, 2004; Claus, 2004; Desai *et al.*, 2005; Baldrian, 2006; Barragán *et al.*, 2006; Puvaneswari *et al.*, 2006; Jiranuntipon *et al.*, 2008; Madhavi *et al.*, 2009; Syed *et al.*, 2009; Brijwani *et al.*, 2010; Erkurt *et al.*, 2010; Chacko *et al.*, 2011; Desai *et al.*, 2011; Le Roes-Hill *et al.*, 2011; Saratale *et al.*, 2011; Imran *et al.*, 2012).

Un lavoro pionieristico condotto da Butlet (Butler *et al.*, 1998) ha mostrato la capacità del fungo *Phanerochaete chrysosporium* di degradare la melanina mediante il sistema della manganese perossidasi (MnP). Molte indagini condotte sui sistemi enzimatici ligninolitici dei *white rot fungi* si sono concentrate su studi qualitativi dell'organizzazione genetica, sulla loro distribuzione in genomi

fungini, sui meccanismi di controllo trascrizionale e sulla loro espressione durante le infestazioni fungine del legno (Cullen, 1997; Kirk *et al.*, 1998. Martinez *et al.*, 2004). Inoltre sono state ampiamente studiate la struttura, la funzione e le potenziali applicazioni biotecnologiche degli enzimi ligninolitici finora isolati (Cameron *et al.*, 2000;. Mester, 2000). Gli enzimi ligninolitici extracellulari e/o i loro mediatori sono escreti nel legno da funghi durante l'infestazione a causa dell'ossidazione elettronica degli anelli di benzene durante la decomposizione di subunità della lignina. Si ottiene, così, la formazione di radicali liberi di carbonio che, alla fine, porta alla degradazione del polimero (Srebotnik *et al.*, 1997; Srebotnik *et al.*, 2000; Cantarella *et al.*, 2003). Mediatori sintetici della laccasi sono stati testati per uno sbiancamento enzimatico della polpa di cellulosa da cui risulta che il mediatore migliore è l'1-idrossibenzotriazolo (HBT) (Bourbonnais *et al.*, 1997).

Durante le operazioni di restauro, anche se l'infestazione fungina della carta viene completamente eliminata, la melanina potrebbe rimanere attaccata alle fibre interne del supporto ricoperto da micelio, essendo un polimero estremamente recalcitrante che non può essere rimosso per mezzo di tecniche di conservazione classiche. In studi precedenti sulla degradazione enzimatica di macchie fungine sulle carta, sono state testate le proteasi, le chitinasi, le lipasi e le glucanasi per la loro capacità di distruggere la parete cellulare fungina (Bloomfield *et al.*, 1967; Florian *et al.*, 1995). Nessuno di questi trattamenti, però, è riuscito a rimuovere le strutture fungine pigmentate dalla superficie del supporto cartaceo. Soltanto lo studio di Nieto-Fernandez (Koestler *et al.*, 2003) ha dato i primi risultati concreti sulla capacità della ligninasi di digerire la melanina presente nelle macchie di natura fungina (Tavzes *et al.*, 2009).

Tavzes (Tavzes *et al.*, 2009) ha condotto uno studio sui cambiamenti chimici indotti nella melanina e sullo sbiancamento del pigmento fungino presente nelle alterazioni cromatiche della carta ottenuto mediante il trattamento MnP e laccasi-1-idrossibenzotriazolo (laccasi-HBT). La melanina ha caratteristiche chimico-fisiche molto simili alla lignina, un componente importante di legno, e quindi gli enzimi ligninolitici dei funghi del marciume bianco sono stati testati per la loro selettiva capacità di degradazione della melanina. Il degrado della melanina è stato studiato sia in sospensioni liquide che su campioni di carta melaninizzati. I campioni in sospensione liquida sono stati testati per verificare eventuali cambiamenti nella loro composizione chimica (aspetto e relativa rappresentazione dei gruppi funzionali e dei legami chimici) con spettroscopia FTIR; mentre le variazioni di colore dei campioni di carta melaninizzati sono stati studiati con un colorimetro. L'efficacia del trattamento sbiancante è stato determinato come un cambiamento di luminosità ( $\Delta L$ ) nel sistema CIE Lab (L = luminosità, a = asse verde-rosso, b = asse giallo-blu). La melanina è stata ossidata nelle sospensioni liquide, e l'intensità della modifica varia a seconda del procedimento

impiegato. Le variazioni più marcate sono state osservate nel caso della melanina sottoposta a trattamento laccasi-HBT a pressione elevata. La decolorazione più importante dei campioni di carta melanizzati è stata osservata dopo il trattamento con laccasi-HBT, come nel caso delle sospensioni in liquido, evidenziando l'assenza di danni nell'integrità dei campioni di carta.

Lo studio condotto da Pohleven (Pohleven *et al.*, 2008) ha lo scopo di valutare la potenziale capacità di biorisanamento dei ceppi fungini selezionati in grado di decomporre il legno e di loro enzimi capaci di degradare la melanina. Le indagini sono state effettuate su campioni di carta sfruttando la capacità degradativa della laccasi. Il risultato più importante è stato osservato su campioni di carta infettati artificialmente e trattati con laccasi ad elevata pressione rispetto agli altri due trattamenti effettuati con manganese perossidasi e lignina perossidasi. I funghi utilizzati nell'esperimento sono quattro: *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Hypoxyylon fragiforme* responsabili della carie bianca, e *Gleophyllum trabeum* responsabile della carie bruna. I *white rot fungi* ed i loro enzimi ossidativi sono stati testati per verificare l'azione degradativa selettiva nei confronti della melanina presente su opere d'arte lignee. La lignina perossidasi catalizza l'ossidazione di strutture non-fenoliche simili alla lignina in radicali cationi acrilici, un processo che si verifica anche nel caso di ossidazione di diversi idrocarburi policiclici aromatici (PAHs). La manganese perossidasi promuove anche la perossidazione dei lipidi insaturi, ed in presenza di queste condizioni vengono ossidate le strutture non-fenoliche simili alla lignina. L'attività di laccasi è limitata a composti con basso potenziale di ionizzazione come i fenoli. Tuttavia, è stato dimostrato che la gamma dei substrati per l'attività della laccasi si estende anche alle strutture non-fenoliche simili alla lignina quando sono presenti i cosiddetti composti mediatori (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-solfonate)→ABTS; o hydroxyantranil acid→HAA). I radicali liberi, quali prodotti di queste reazioni, continuano l'ossidazione delle sostanze inquinanti organiche. Dopo la perossidasi che apre le strutture ad anello aromatico mediante l'introduzione di ossigeno, altre specie più comuni di funghi e batteri possono degradare i prodotti all'interno delle cellule in CO<sub>2</sub> ed in altri composti atossici.

I trattamenti hanno mostrato che il sistema laccasi-HBT ha causato i cambiamenti più importanti nella composizione della melanina rispetto alle altre procedure. Il procedimento è avvenuto ad una pressione elevata quindi ad una concentrazione di ossigeno superiore nella soluzione che ha comportato una maggiore efficienza della laccasi confermata anche da un aumento della luminosità rilevata mediante misure colorimetriche. Di conseguenza è stato dimostrato che una laccasi isolata (con mediatore HBT) è in grado di cambiare l'aspetto dei campioni di carta melanizzati nella direzione desiderata grazie alla degradazione ed all'ossidazione della melanina DHN, l'agente responsabile della pigmentazione bruno-nerastra. La concentrazione di ossigeno diluito nella

soluzione di reazione era tale che la laccasi è stata in grado di ossidare la maggior parte di HBT a disposizione e l'ossidazione della melanina ha avuto un successo maggiore rispetto alle altre combinazioni di reagenti. Un accurato controllo visivo dei campioni di carta melanizzati non ha evidenziato alcun danno significativo all'integrità del materiale a prescindere dai diversi trattamenti impiegati nella sperimentazione.

Anche Nieto-Fernandez (Koestler *et al.*, 2003) ha testato l'efficacia di enzimi ligninolitici prodotti dai *white rot fungi* del legno nella degradazione della melanina. Attualmente la capacità di alcuni enzimi di origine fungina di degradare la melanina viene studiata soprattutto per applicazioni in campo cosmetico poiché una forma di essa è presente anche nella pelle umana e ne determina la pigmentazione. Lo scopo dello studio è stato quello di selezionare ceppi fungini melanolitici capaci di produrre un appropriato enzima utile alla depigmentazione della pelle grazie allo sbiancamento dell'eumelanina. Lo *screening* ha rilevato attività melanolitica nel fungo *Sporotrichum pruinosum* che, coltivato in condizioni particolari, è in grado di produrre un enzima melanolitico extracellulare. L'enzima concentrato e purificato potrebbe depigmentare con successo campioni di pelle umana. I risultati hanno dimostrato che, contrariamente agli agenti sbiancanti noti, l'enzima non agisce come un inibitore della pigmentazione piuttosto come un vero e agente sbiancante della melanina già formata. Questo nuovo approccio dell'impiego degli enzimi nella decolorazione della melanina sembra essere molto promettente e risulta particolarmente importante perché ha un'origine biologica che rende più accettabile il suo uso nella cosmesi (Mohorčić *et al.*, 2007).

Un importante studio è stato condotto da Rättö (Rättö *et al.*, 2001) per sviluppare metodi biotecnologici capaci di rimuovere le alterazioni grigio-bluastré causate da funghi che crescono sia sulle piante che sul legname a spese, principalmente, dei tessuti parenchimali dell'alburno (Seifert *et al.*, 1988; Zink *et al.*, 1988 e 1989). I pigmenti di tali funghi sono classificati come melanine e sono presenti nelle pareti cellulari del micelio, ma talvolta possono anche essere secreti nel mezzo di crescita (Zink *et al.*, 1988 e 1989). Le melanine sono in grado di aumentare sia la capacità di sopravvivenza che la competitività dei funghi in condizioni ambientali avverse, e proteggono le pareti cellulari fungine dagli effetti deleteri degli enzimi idrolitici (Bell *et al.*, 1986).

Nel lavoro di Rättö (Rättö *et al.*, 2001) i potenziali microrganismi, 17 funghi e 4 batteri, sono stati sottoposti a *screening* per determinare la loro capacità di degradare la melanina. La selezione è avvenuta utilizzando melanina extracellulare isolata dall'*Aureobasidium pullulans* impiegato come substrato. Su agar, è stata osservata la decolorazione ad opera di quattro ceppi fungini: *Bjerkandera adusta*, *Galactomyces geotrichum*, *Trametes hirsuta* e *Trametes versicolor*. Tutti i funghi hanno dimostrato un'elevata efficienza sia su un terreno a basso contenuto di azoto sia su un terreno a basso contenuto di glucosio. Nel caso di *Bjerkandera adusta*, *Galactomyces geotrichum* e *Trametes*

*versicolor* è stato possibile evidenziare la capacità di degradare completamente la melanina utilizzando terreno costituito da agar e malto; mentre nel solo caso di *Galactomyces geotrichum* la decolorazione attuata dal fungo risultava meno evidente su un terreno ricco di nutrienti. Infine l'attività di degradativa della melanina messa in opera da *Galactomyces geotrichum* è apparsa localizzata essenzialmente nel micelio, ma potrebbe essere liberata nel mezzo di coltura mediante l'uso di enzimi. I batteri selezionati, invece, non sono in grado di decolorare la melanina presente nei funghi.

### 2.5.1 I coloranti ed i meccanismi di decolorazione

Lo stretto legame tra la melanina, sostanza fenolica derivata dagli idrocarburi aromatici per la sostituzione di uno o più atomi di idrogeno con gruppi ossidrilici ( $\text{OH}^-$ ), e la lignina, polimero tridimensionale molto complesso composto di alcoli aromatici, ha suggerito di effettuare una serie di ricerche sui coloranti e sui meccanismi di biodegradazione.

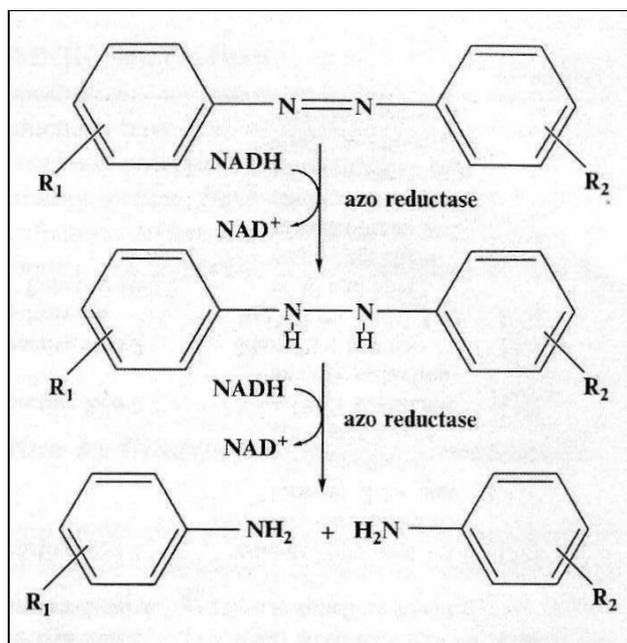
I metodi biologici sono basati su biotrasformazioni microbiche dei coloranti, realizzati per essere stabili, di lunga durata e, solitamente, non facilmente biodegradabili. Nondimeno molte ricerche hanno dimostrato una biodegradazione parziale o completa dei coloranti da colture pure e miste di batteri (Mazmanci, 2010). Infatti per una valutazione generale della biodegradabilità dei coloranti è necessario considerare le strutture chimiche e la loro classe di appartenenza. Finora le principali indagini sulle biotrasformazioni operate da batteri sono state effettuate maggiormente per la classe chimica di coloranti più abbondante, ossia quella degli azoici. La tipologia della natura elettronica dei legami in essi presenti ostacola la suscettibilità delle reazioni ossidative delle molecole presenti nei coloranti azoici. Pertanto tali coloranti resistono, generalmente, alla biodegradazione operata da batteri aerobi (Pagga *et al.*, 1986; Jimenez *et al.*, 1988; Shaul *et al.*, 1991; Ganesh *et al.*, 1994; Pagga *et al.*, 1994; Saratale *et al.*, 2011). Infatti solo batteri corredati di speciali enzimi riducenti sono stati riscontrati in fenomeni di biodegradazione dei coloranti azoici in complete condizioni aerobiche. Al contrario, la rottura dei legami azoici in condizioni anaerobiche è molto meno specifica.

Generalmente, il processo di biodegradazione batterica dei coloranti azoici consiste di due fasi. La prima fase prevede la scissione dei legami azoici con la conseguente formazione di ammine aromatiche, generalmente incolori, ma potenzialmente pericolose. Tali sostanze, generalmente, non possono essere ulteriormente degradate in condizioni anaerobiche pertanto il trattamento deve essere considerato semplicemente come la prima fase della degradazione completa di coloranti azoici. La seconda fase, quindi, prevede la conversione delle ammine aromatiche prodotte mediante

biodegradazione batterica in condizioni aerobiche (Walker, 1970; Levine, 1991; Chung *et al.*, 1992 e 1993; Bumpus, 1995; Banat *et al.*, 1996; Delee *et al.*, 1998; McMullan *et al.*, 2001; Stolz, 2001; Saratale *et al.*, 2011). La bioriduzione di coloranti azoici in condizioni anaerobiche è aspecifica e, presumibilmente, è un processo extracellulare costituito da tre diversi meccanismi: riduzione enzimatica diretta, riduzione indiretta mediata e riduzione chimica. Una reazione enzimatica diretta o una reazione indiretta mediata è catalizzata da cofattori enzimatici biologicamente rigenerati o da altri trasportatori di elettroni (Guo *et al.*, 2010; Saratale *et al.*, 2011).

In vitro, due tipi di azo-riduttasi citoplasmatiche NAD(P)H dipendenti sono stati descritti da Chen (Chen, 2006), ma una significativa attività riduttasi si osserva solo con estratti di cellule piuttosto che con cellule batteriche intere (Russ *et al.*, 2000; Blümel *et al.*, 2002). Poiché molti coloranti sono polari e/o sono molecole di grandi dimensioni per le quali non possono esserci proteine di trasporto, è improbabile che essi possono passare attraverso la membrana cellulare per entrare all'interno della cellula dove possono essere utilizzate da enzimi riduttasi non specifici. Pertanto, si ipotizza che la riduzione batterica dei coloranti sia, principalmente, un processo extracellulare (Keck *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2003). Questa ipotesi è supportata dai risultati che dimostrano come l'escreto microbico o i mediatori redox artificiali catalizzano i processi di decolorazione (Keck *et al.*, 1997; Kudlich *et al.*, 1997; Rau *et al.*, 2002). Recentemente, Brigé (Brigé *et al.*, 2008) ha dimostrato che la decolorazione dei coloranti è un processo di riduzione extracellulare che richiede un percorso di trasferimento di elettroni multicomponente che consiste di membrana citoplasmatica, periplasmatica e componenti di membrana esterna. Analogamente, è stata dimostrata la capacità dei batteri di rimuovere i coloranti azoici da un terreno solido costituito da agar. Ciò ha suggerito l'accumulo di enzimi redox attivi o sostanze biochimiche che vengono rilasciate nel mezzo durante la crescita delle cellule batteriche (Khalid *et al.*, 2008). Questi studi implicano che gli equivalenti riducenti vengono trasferiti da una catena di trasporto intracellulare degli elettroni ai mediatori che, conseguentemente, riducono il colorante extracellulare in modo non enzimatico. Un'altra ipotesi è che i batteri siano in grado di stabilire una relazione tra il loro sistema di trasporto intracellulare degli elettroni ed il colorante extracellulare *via* trasferimento elettronico delle proteine nella membrana esterna, riducendo in definitiva il colorante, direttamente o indirettamente, tramite mediatori redox (Pearce *et al.*, 2003; Brigé *et al.*, 2008; Khalid *et al.*, 2010). In condizioni anaerobiche o anossiche, il clivaggio del legame azoico (-N=N-), ossia la sua rottura, è condotto da enzimi specifici, catalizzando solo la riduzione dei coloranti azoici, o enzimi aspecifici, enzimi non specifici che catalizzano la riduzione di una vasta gamma di composti, tra cui i coloranti azoici. La scissione del legame azoico (-N=N-) procede attraverso due fasi che

comportano un trasferimento di quattro elettroni (equivalenti riducenti): in ogni stadio due elettroni vengono trasferiti al colorante azoico che agisce come un accettore finale di elettroni (Fig. 10).



**Figura 10.** Meccanismo di decolorazione dei coloranti azoici (Guo et al., 2010).

Il grado di decolorazione dipende dalla fonte di carbonio organico aggiunto, nonché dalla struttura chimica del colorante, dalla natura dei sostituenti e dalla loro relativa posizione (Pasti-Grigsby *et al.*, 1992; Paszczyński *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 2010). Inoltre la biodegradazione di alcuni coloranti azoici migliora in specifiche condizioni, in particolare quando la disponibilità di azoto è limitata (Loidl *et al.*, 1990; Spadaro *et al.*, 1992; Saratale *et al.*, 2011).

In realtà non vi è alcuna correlazione tra il grado di decolorazione ed il peso molecolare, indicando che la decolorazione non è un processo specifico e la permeabilità cellulare non è importante per il processo. Allo stesso tempo, questo meccanismo di riduzione anaerobica del colorante azoico intracellulare o extracellulare è una questione ancora aperta poiché non tutti i coloranti azoici possono essere ridotti con un processo intracellulare. Per esempio, l'elevato peso molecolare dei coloranti azoici polimerici e l'elevata polarità dei coloranti azoici solforati rendono difficile il passaggio delle molecole attraverso la membrana cellulare. È stato rilevato che il grado di decolorazione dei coloranti azoici solforati aumenta mediante l'impiego di estratto di cellule libere nonché per aggiunta di toluene - un composto che aumenta la lisi cellulare - mostrando quindi la limitata permeabilità della membrana a questo tipo di colorante (Stolz, 2001). Inoltre l'azo riduttasi è stata riscontrata in tutto il citoplasma batterico senza mostrare associazione alle membrane o ad altre strutture organizzate, ma è stata secreta inizialmente in qualità di un azo-riduttasi *in vivo* (Guo *et al.*, 2010).

Diversi studi hanno dimostrato una degradazione parziale o completa dei coloranti ad opera di colture pure e miste di batteri (Tab. 1) anche se, in diversi casi di applicazione di biotratamenti, le seconde hanno dimostrato di essere superiori alle prime. Infatti è stato dimostrato che si può ottenere un risultato migliore di biodegradazione mediante l'impiego di colture batteriche miste a seguito della complementarità delle *vie* cataboliche presenti all'interno di una comunità microbica non riscontrabile, invece, nei singoli ceppi puri (Nigam *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2004; Khehra *et al.*, 2005; Moosvi *et al.*, 2007; Saratale *et al.*, 2011). Recentemente, tuttavia, diversi ricercatori hanno identificato singoli ceppi batterici estremamente efficaci nella rimozione dei coloranti azoici (Pearce *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Khalid *et al.*, 2008 e 2009). Al contrario delle colture miste, l'uso di una coltura batterica pura presenta diversi vantaggi quali prestazioni prevedibili ed una conoscenza dettagliata sulle *vie* di degradazione che comporta una migliore garanzia sul fatto che il catabolismo dei coloranti porterà alla fine prodotti non tossici in determinate condizioni ambientali. Un altro vantaggio consiste nella possibilità di monitorare i ceppi batterici e le loro attività mediante metodi molecolari per quantificare la densità di popolazione nel tempo, dato importante per l'analisi quantitativa della cinetica di decolorazione e mineralizzazione dei coloranti azoici (Khalid *et al.*, 2010).

Una procedura di decolorazione molto interessante è rappresentata dall'impiego di cellule batteriche immobilizzate. A causa della immobilizzazione, i biocatalizzatori mostrano una maggiore stabilità operativa rispetto al sistema libero e ciò è dovuto al fatto che l'immobilizzazione migliora, generalmente, la stabilità degli enzimi che sono molto meno esposti agli inibitori, quali alogenuri e chelanti del rame, rispetto al sistema enzimatico libero (Rogalski *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2010).

Inoltre l'immobilizzazione non solo semplifica la separazione ed il recupero dei batteri, ma rende anche l'applicazione riutilizzabile riducendo i costi complessivi. Materiali immobilizzati, inoltre, hanno comparativamente maggiore durata operativa per la maggiore stabilità delle macromolecole o cellule e, di conseguenza, la protezione da eventuali condizioni avverse. Batteri immobilizzati sono stati impiegati con successo in diversi settori come la tutela ambientale (biocatalizzatori nei trattamenti delle acque reflue) oltre che in numerose industrie quali quella alimentare, chimica, farmaceutica, ecc. (Khan *et al.*, 2010).

I metodi di immobilizzazione delle cellule batteriche possono essere classificati in quattro principali categorie: matrice di intrappolamento, microincapsulamento, adsorbimento e legame covalente (AA.VV., 2010). Tra di essi, l'intrappolamento in perle di gel di alcool polivinilico (PVA) risulta essere il migliore a seguito della facilità d'uso, del basso costo, della ridotta tossicità ed elevata stabilità operativa. Fang (Fang *et al.*, 2004) ha evidenziato la necessità di seguire alcune precauzioni operative durante l'applicazione dei trattamenti di decolorazione per preservare la resistenza

meccanica delle perle di gel in cui sono immobilizzate le cellule batteriche al fine di aumentare la rimozione del colore (Khan *et al.*, 2010).

Sulla base sia delle caratteristiche e potenzialità dei microrganismi che dei vantaggi delle tecniche di immobilizzazione, tali metodi sono stati studiati da diversi ricercatori. Alcuni studi si sono concentrati sull'utilizzo di differenti tipi di pietre e vetri quali supporto di immobilizzazione per i batteri sia in condizione aerobica che anaerobica (Georgiou *et al.*, 2005; Senan *et al.*, 2003). I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità di decolorare e degradare i coloranti azoici ad opera di numerosi microrganismi, aerobi e anaerobi, preferibilmente impiegati in colture miste per sfruttare la loro stabilità e versatilità (Binkley *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2010).

La valutazione della capacità di attuare un processo di degradazione dei coloranti azoici mediante attività enzimatica ligninolitica ad opera dei ceppi batterici selezionati per la sperimentazione oggetto della presente tesi di Dottorato, è basata su studi condotti da diversi ricercatori. Banat (Banat *et al.*, 2006) propone una breve panoramica dei più importanti lavori realizzati a partire dagli anni '70, durante i quali iniziarono le prime ricerche finalizzate ad isolare colture batteriche in grado di degradare coloranti azoici. Lo studioso ricorda le relazioni di Horitsu (Horitsu *et al.*, 1977) in riferimento a studi effettuati sul *Bacillus subtilis*; poi di Idaka (Idaka *et al.*, 1978), sull'*Aeromonas hydrophila*; infine di Wuhrmann (Wuhrmann *et al.*, 1980) sul *Bacillus cereus*. Isolare tali microrganismi si è rivelato un compito difficile come nel caso dei ceppi di *Pseudomonas* (Kulla, 1981), il cui isolamento ed impiego nei processi di degradazione dei coloranti ha richiesto diverse indagini e tempi molto lunghi. Zimmermann (Zimmermann *et al.*, 1982) scoprì un enzima azo-riduttasi responsabile dell'inizio del degrado del colorante Orange II ad opera proprio dei ceppi di *Pseudomonas*. Successivamente a tali indagini vennero scoperte numerose altre specie di batteri appartenenti al ceppo di *Pseudomonas*, ma anche a quello di *Aeromonas* (Ogawa *et al.*, 1986; Yatome *et al.*, 1987.; Ogawa *et al.*, 1990; Yatome *et al.*, 1990). In una recensione, Groff (Groff *et al.*, 1989) ha descritto una serie di colture batteriche, quali *Rhodococcus sp.*, *Bacillus cereus*, *Plesiomonas sp.* e *Achromobacter sp.*, aventi capacità di attuare un processo di degradazione dei coloranti azoici. Gli studi hanno preso un nuovo slancio a partire dagli anni '90 grazie al lavoro di Cripps (Cripps *et al.*, 1990). Lo studioso, infatti, ha dimostrato la capacità del *white rot fungi Phanerochaete chrysosporium* di degradare diversi coloranti azoici, tematica poi ripresa da altri ricercatori (Paszczynski *et al.*, 1991; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992; Spadaro *et al.*, 1992; Banat *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1997; Swamy *et al.*, 1999; Chagas *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2001; Knapp *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2001; McMullan *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2001; Stolz, 2001). Infatti il *Phanerochaete chrysosporium* è servito da modello per lo studio della degradazione dei coloranti

azoici operata da molti altri *white rot fungi*. Mou (Mou *et al.*, 1991) ha dimostrato che diversi ceppi di *Myrothecium* e *Ganoderma* hanno la capacità di decolorare l'Orange II nonché altri due coloranti diazo solfonati denominati RS(WC) e IOB(H/C); Haug (Haug *et al.*, 1991), invece, ha descritto un consorzio batterico in grado di mineralizzare il colorante azoico solforato Mordant Yellow. La particolarità del processo consisteva in un'alternanza delle condizioni, da anaerobiche ad aerobiche, necessaria per raggiungere la completa degradazione. Questo era necessario in quanto diversi batteri del consorzio avevano bisogno di condizioni differenti per reagire in maniera ottimale: la principale scissione del legame azoico richiede enzimi riduttasi che operano, principalmente, in condizioni anaerobiche. Paszczyński (Paszczyński *et al.*, 1992) ha confrontato l'efficienza di una cultura di *Streptomyces chromofuscus* con quella del *white rot fungi Phanerochaete chrysosporium* ed ha concluso che il batterio potrebbe essere in grado di effettuare un processo di degradazione dei coloranti azoici, ma in misura minore rispetto al fungo della carie bianca. Le ricerche eseguite da Heiss (Heiss *et al.*, 1992), invece, si sono basate sull'utilizzo del batterio *Rhodococcus* sp., effettivamente in grado di degradare coloranti azoici solforati quali Orange II e Amido Nero, per clonare i frammenti di DNA codificanti azo-riduttasi in un mutante che aveva perso la capacità di degradazione, restituendogliela. Ancora vengono ricordati gli studi di Zhou (Zhou *et al.*, 1993) che hanno messo in evidenza la capacità di diversi actinomiceti di decolorare numerosi e differenti coloranti compresi antrachinoni, ftalocianine e coloranti azo, mediante adsorbimento e senza alcuna degradazione. È stato rilevato, inoltre, che coloranti azoici a base di rame (Cu) venivano completamente degradati attraverso l'utilizzo degli stessi actinomiceti. Un altro caso riportato da Banat (Banat *et al.*, 2006) riguarda il batterio *Pseudomonas luteola* studiato da Hu (Hu, 1994). I risultati ottenuti hanno stabilito che tale microrganismo è capace di rimuovere diversi coloranti azoici, come Red G, RBB, RP2B e V2RP, isolati dai fanghi delle acque reflue provenienti da industrie tessili. La degradazione completa è stata osservata per gli ultimi tre coloranti; mentre per il colorante Red G è stata osservata solo una scissione del legame azoico da parte del batterio. Wong (Wong *et al.*, 1996) ha studiato altri ceppi batterici quali *Klebsiella pneumoniae* RS-13 e *Acetobacter liquefaciens* S-1 capaci di decolorare il Methyl Red (MR). Lo studioso ha ritenuto che tali batteri possano essere usati in applicazioni future per un'efficiente rimozione di coloranti azoici contenuti in effluenti industriali.

Ancora lo studio condotto da Barragán (Barragán *et al.*, 2006) si è basato sull'utilizzo di tre ceppi batterici: *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Morganella* per verificare la loro capacità degradativa nei confronti del colorante azoico Acid Orange 7 aggiunto a particolari terreni quali caolino, bentonite e polvere di carbone attivo (PAC). I risultati ottenuti dimostrano che l'aggiunta di colture batteriche sulle superfici di terreni solidi contenenti il colorante scelto produce una loro degradazione, a

dimostrazione del fatto che la biodegradazione di alcuni composti recalcitranti, come i coloranti azoici, può essere facilitata dalla presenza di superfici che hanno caratteristiche tali da promuovere la formazione di nicchie microaerofili che facilitano la crescita microbica.

Young (Young *et al.*, 1997) ha condotto studi sul fungo *Trametes versicolor* in grado di decolorare una grande varietà di coloranti tra cui quattro di natura azoica, quali Acid Violet 7, Reactive Black 5, Acid Orange 74 e Acid Black 24; le ricerche effettuate da Shin (Shin *et al.*, 1998) e da Novotny (Novotny *et al.*, 2001), invece, hanno avuto per oggetto il *Phanerochaete chrysosporium* ed il *Pleurotus ostreatus* che, mediante perossidasi, è riuscito a decolorare diversi tipi di coloranti compresi quelli azoici come Congo Red, Methyl Orange, Reactive Orange 16, Reactive Black 5 e Naphthol Blue Black. Entrambi i ceppi fungini, sostanzialmente, sono in grado di degradare i più importanti coloranti azo- e diazoici quali antrachinonici, eterociclici, trifenilmetano, ftalocianina, ecc.. I lavori eseguiti da Swamy (Swamy *et al.*, 1999) hanno osservato le capacità di diversi funghi quali *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera sp.* BOS55, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes hirsuta* e *Trametes versicolor* nei processi di decolorazione di sei coloranti, di cui quattro coloranti azoici, nelle culture in piastra. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il *Pleurotus ostreatus* non era in grado di decolorare Amaranth, Remazol Black B, Tropaeolin O. e Remazol Brilliant Orange 3R (coloranti azoici), Reactive Blue 15 (fitocianina) e Remazol Brilliant Blue R (antrachinone). Mentre *Bjerkandera sp.* BOS55 e *Trametes versicolor* risultavano più efficaci essendo in grado di decolorare tutti i coloranti oggetto di studio. Infine è stato rilevato che *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes hirsuta* possiedono una capacità intermedia di decolorazione. Il primo non è riuscito a decolorare Remazol Brilliant Orange 3R e solo parzialmente il Tropaeolin O.; mentre ha causato notevoli decolorazione nel caso dell'Amaranth, Remazol Black B e Reactive Blue 15. Il secondo è risultato capace di decolorare l'Amaranth ed il Remazol Black B, ma non ha avuto nessun effetto sul Remazol Brilliant Orange 3R e ha decolorato solo parzialmente Reactive Blue 15 e Tropaeolin O. Le indagini condotte da Pointing (Pointing *et al.*, 2000) hanno avuto per oggetto il fungo *Pycnoporus sanguineus* impiegato per decolorare due coloranti trifenilmetano (blu di bromofenolo e verde malachite) e due coloranti azoici (Orange G e Amaranth). Lo studioso ha riscontrato una maggiore resistenza alla degradazione dei coloranti azoici rispetto agli altri.

Jarosz-Wilkolazka (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002) ha confrontato 115 funghi di diversi gruppi fisio-ecologici sulla base della loro capacità di decolorare due coloranti strutturalmente diversi in piastre di agar. È stato riscontrato che il colorante azoico Acid Red 183 risultava essere molto più resistente alla decolorazione rispetto al colorante antrachinonico Basic Blue 22. Infatti tra i funghi testati, 69 ceppi hanno mostrato decolorazione del colorante antrachinonico entro 5-14 giorni dall'inoculo fungino, mentre solo 16 ceppi sono stati in grado di decolorare il colorante azoico entro

21 giorni dall'inizio dello studio. Inoltre, è stato esaminato il potere di decolorazione dei coloranti dei tre ceppi fungini in riferimento ai loro fattori ossidativi extracellulari sia enzimatici che non enzimatici. In colture acquose statiche, i funghi *Bjerkandera fumosa*, *Kuehneromyces mutabilis* e *Stropharia rugosoannulata* hanno formato materiale fungino non in grado di decolorare i coloranti al di là di qualche assorbimento da parte del micelio. In confronto alle colture statiche, le colture poste in agitazione a 180 rpm hanno rimosso dal 75% al 100% del colore Basic Blue 22 e dal 20% al 100% del colore Acid Red 183.

Un altro importante lavoro è stato realizzato da Selvam (Selvam *et al.*, 2003) che ha utilizzato il *white rot* fungo *Thelephora sp.* per la decolorazione di tre coloranti azoici: Orange G, Congo Red e Amido Black 10B. I risultati ottenuti mostrano un'efficacia pari al 19% per l'Orange G rimosso mediante laccasi, mentre la percentuale scende al 13,5% nel caso della lignina perossidasi e al 10,8% per la manganese perossidasi a parità di concentrazione. Prendendo in considerazione l'effetto della laccasi nei confronti del Congo Red e dell'Amido Black le percentuali sono pari al 12,0% e al 15,0%, rispettivamente. Nel complesso i risultati mostrano un'elevata efficacia di rimozione dei coloranti Congo Red (97,1%) e Amido Black (98,8%), mentre l'Orange G (33,3%) è risultato essere il colorante più recalcitrante tra quelli utilizzati.

Lo scopo del lavoro di Kiiskinen (Kiiskinen *et al.*, 2004), invece, è stata la ricerca di nuovi potenziali laccasi per applicazioni industriali. I 26 funghi selezionati sono stati coltivati su terreni solidi contenenti dei coloranti di riferimento (Remazol Brilliant Blue R, Poly R-478, Guaiacolo e Acido Tannico) che hanno consentito l'individuazione dell'attività di laccasi a seguito di reazioni colorate. Il lavoro di *screening* ha portato all'isolamento *Peniophora*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Trichoderma* che rappresentano quattro nuovi generi fungini in grado di produrre laccasi efficienti per la decolorazione dei composti coloranti polimerici scelti mai studiati finora. È stato rilevato che le caratteristiche biochimiche delle quattro nuove laccasi erano tipiche delle laccasi fungine in termini di peso molecolare, pH e punto isoelettrico. Le laccasi hanno mostrato una buona stabilità termica a 60°C. I risultati indicano che il test eseguito rappresenta un metodo semplice ed efficiente per scoprire nuovi produttori di laccasi potenzialmente applicabili nel settore industriali. Inoltre lo *screening* ha confermato la produzione di laccasi in funghi già studiati in passato e noti per le loro attività enzimatiche quali *Pholiota* (Bollag *et al.*, 1984), *Phlebia* (Niku-Paavola *et al.*, 1990), *Bjerkandera* (Rohrmann *et al.*, 1992; Kaal *et al.*, 1993), *Sporotrichum* (Rohrmann *et al.*, 1992; Luterek *et al.*, 1997) e *Chrysosporium* (Buckley *et al.*, 1998).

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Riproduzione del danno biologico su provini cartacei**

##### *3.1.1 Caratterizzazione e preparazione dei campioni di carta*

I campioni di carta sono stati ricavati da tre tipologie di carta, diverse per caratteristiche e composizione, in modo da poter valutare sia la variabilità dell'attacco fungino in base al substrato di crescita sia le eventuali differenze nell'efficacia dei trattamenti di rimozione delle macchie. Le carte scelte per il progetto vengono di seguito elencate e descritte.

#### **Carta Whatman CHR 1 (Cat. No. 3001917) Whatman International Ltd. made in England:**

- ✓ 100% puro linter di cotone,
- ✓ pH 5,80.

#### **Carta Perugia:**

- ✓ 78% linter di cotone,
- ✓ 22% cotone,
- ✓ pH 6,50.

#### **Carta Mezzofino (Cat. No. 200953) prodotta dall'Istituto Poligrafico dello Stato:**

- ✓ 45% cellulosa di paglia bianchita,
- ✓ 25% di cellulosa di abete trattata con solfito,
- ✓ 20% di polpa di pioppo,
- ✓ 5% di solfato di allumina,
- ✓ 3% di collante,
- ✓ 2% di caolino,
- ✓ pH 5,45.

Le tre tipologie di carta sono state pesate mediante una bilancia di precisione (Mettler Toledo - Mod. AK 160) per determinarne la grammatura (Poles *et al.*, 1974) e caratterizzate attraverso sia l'analisi microscopica dell'impasto fibroso che l'analisi per la presenza di collanti.

L'analisi dell'impasto fibroso è stata eseguita sottoponendo i campioni di carta a bollitura in acqua distillata e poi sono stati lavorati con le mani per rompere i legami che tengono saldate le fibre stesse. Quindi i frammenti sono stati posti in un tubo da saggio contenente acqua distillata (~10ml) ed agitati, in modo da ottenere una sospensione di fibre. Successivamente con una canna di vetro è stata prelevata una piccola quantità di sospensione, si pone sul vetrino porta-oggetto e si lascia

asciugare. Il riconoscimento delle fibre è stato effettuato mediante l'utilizzo di particolari reattivi che colorano le strutture in modo diverso a seconda della loro natura. Il reattivo di Herzberg al cloroioduro di zinco evidenzia le fibre di cotone, lino e canapa che assumono un colore rosso vinoso; le paste chimiche a basso contenuto di lignina (abete, pioppo, pino, ecc.) assumono una colorazione variabile dal blu, blu-viola al blu-rossastro; le paste chimiche ad alto contenuto di lignina, le paste meccaniche di legno e le paste semichimiche assumono una colorazione variabile dal giallo-bluastro fino al giallo netto. Si preleva qualche goccia del reattivo, si pone sul vetrino e si lascia agire qualche istante quindi si elimina l'eccesso con della carta da filtro (Grandis, 1989). Le immagini ottenute dai campioni di cellulosa dei tre tipi di carta sono state comparate con immagini di riferimento ed in particolare con quanto riportato nel "*Color atlas for fiber identification*" di Graff (Graff, 1940).

L'identificazione dei collanti è stata eseguita sull'estratto acquoso ricavato dalla bollitura della carta, mediante opportuni saggi chimici. Il riconoscimento della gelatina è stato effettuato mediante l'impiego dei reattivi di Schmidt A [3g di  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} + 140\text{ml}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ ] e Schmidt B [10ml di  $\text{HNO}_3 + 130\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ ] in parti uguali: in presenza di questo collante si forma un precipitato bianco lattiginoso. (Grandis, 1989). Il riconoscimento dell'amido è stato effettuato mediante l'impiego di un reattivo allo iodio-ioduro di potassio che conferisce una colorazione blu alla soluzione (Grandis, 1989).

Successivamente i campioni cartacei sono stati esaminati al microscopio elettronico a scansione e, per mezzo della microanalisi EDS, è stata eseguita la caratterizzazione delle componenti inorganiche presenti sulla loro superficie (SEM-VP EVO 50 XVP Carl-Zeiss Electron Microscopy Group + EDS *Inca Energy 250* Oxford). Inoltre, per la misura di pH, sono state utilizzati due protocolli: il metodo distruttivo del "pH estratto", (<http://www.atichelca.it>) per caratterizzare le carte tal quali ed il metodo non distruttivo della "misura del pH superficiale" per i campioni trattati con i funghi (<http://www.atichelca.it>). Infine sono state condotte misure colorimetriche per la valutazione e la comparazione delle macchie fungine mediante un colorimetro portatile (Chroma Meter CR-200 Minolta Ver. 3.0) (Cfr. Par. 3.4.3 *Misure colorimetriche* pp. 76).

Infine sono stati realizzati dei campioni di carta larghi 2cm e lunghi 5cm per l'applicazione dei trattamenti enzimatici e della dimensione di 2x2cm per l'applicazione dei trattamenti batterici, per una questione di praticità rispetto alle dimensioni delle piastre Petri che utilizzate nella sperimentazione.

I campioni di carta così ottenuti sono stati sistemati in piastre di vetro e sterilizzati in autoclave a 121°C per 30 minuti per eliminare eventuali microrganismi contaminanti già presenti sul materiale cartaceo.

### 3.1.2 Coltura in vitro dei ceppi fungini

Al fine di riprodurre il danno biologico, i campioni di carta appartenenti alle tre diverse tipologie sono stati inoculati con tre diverse specie fungine (Tab. 4).

**Tabella 4. Specie fungine scelte per la sperimentazione e relativa banca di provenienza.**

Specie fungine	Provenienza
<i>Aureobasidium pullulans</i> [(De Bary) G. Arnaud]	MUT <sup>a</sup>
<i>Aspergillus terreus</i> (Thom)	ATCC <sup>b</sup>
<i>Eurotium chevalieri</i> (L. Mangin)	ICPL <sup>c</sup>

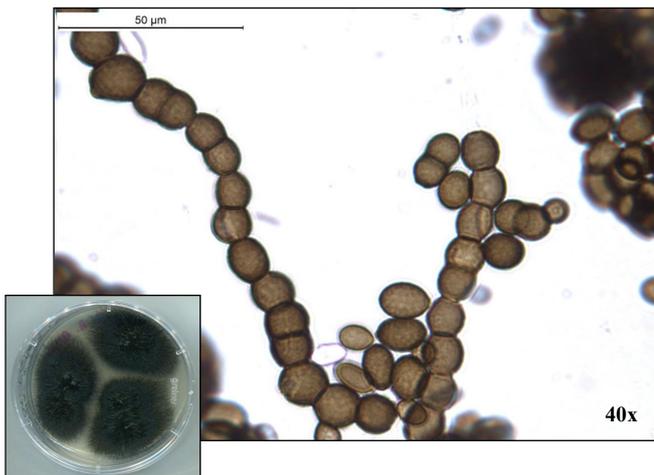
<sup>a</sup>MUT Micoteca Universitaria di Torino Dipartimento di Biologia Vegetale Università degli Studi di Torino, Viale Mattioli n. 25, 10125 Torino - Italia.

<sup>b</sup>ATCC: American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas (VA), 20110-2209 USA.

<sup>c</sup>ICPL (Istituto Centrale per la Patologia del Libro): Collezione di Colture di funghi filamentosi dell'Istituto Centrale per la Patologia del Libro (ora ICRCPAL), Laboratorio di Biologia, Via Milano n. 76, 00184 Roma - Italia.

#### *Aureobasidium pullulans*

Classificazione: Dothioraceae, Dothideales, Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi (*Annals d'École National d'Agriculture de Montpellier, Serie 2, Vol. 16, No. 39, pp. 1-4, 1918 [1917]*).



Le colonie si presentano lisce e spesso coperte da una massa viscosa di spore di colore giallo, crema, rosa, marrone o nero con ife settate (2-16µm di diametro) ialine e con pareti lisce e sottili. A volte si forma del micelio aereo, scarso e poco fioccoso. In colture più vecchie possono formarsi ife di colore bruno-nerastro con pareti spesse ed essudati neri entrambi costituiti da melanina, un pigmento insolubile in acqua, in soluzioni acide e nei comuni solventi organici (Domsch *et al.*, 2007).

### *Aspergillus terreus*

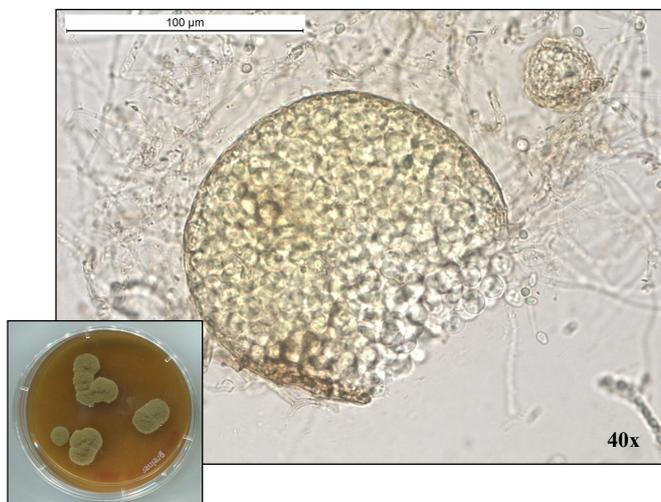
Classificazione: Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi (Thom & Church, *American Journal of Botany*, Vol. 5, pp. 85-86, 1918).



Le colonie raggiungono un diametro di 3,5-5,0 cm in 7 giorni e, generalmente, consistono in un denso strato di conidiofori giallo-marroni che diventano scuri con il passare del tempo. I conidiofori sono ialini e con pareti lisce. I conidi sono globosi, o ellissoidali, con un diametro di 1,5-2,5µm, da ialini a leggermente gialli, con pareti lisce (Samson *et al.*, 2000).

### *Eurotium chevalieri*

Classificazione: Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Ascomycota, Fungi (*Annales de Sciences Naturelles*, Botanique, Serie 9, Vol. 10, p. 361, 1910).



Le colonie si presentano piatte, a volte rugose al centro, con i margini irregolari. Le teste dei conidi di colore grigio-verde, generalmente, proiettano verso l'alto uno strato di abbondanti ascomi circondati da ife di color rosso-arancio. Gli ascomi si estendono abbondantemente su tutta la colonia, sono globosi o subglobosi con un diametro di 8-10µm. Le ascospore sono lenticolari, 4,5-5x3,5µm di dimensioni con una superficie piana o rugosa ed una cresta equatoriale (Samson *et al.*, 2000).

La coltura in vitro dei ceppi fungini ha previsto la preparazione di terreni costituiti da agar nutritivo che forniscono al fungo gli elementi necessari per lo sviluppo e la crescita, che avviene generalmente in 5 giorni alla temperatura di 25°C. In particolare i terreni utilizzati sono stati il PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid Cod. No. CM00139 – pH 5,6±0,2) ed il MEA 2% (Malt Extract, Oxoid Cod. No. LP0039 + Agar Bacteriological, Agar No. 1, Oxoid, Cod. No. LP0011 – pH 7,6±0,2).

L'inoculo dei funghi è stato effettuato operando sotto cappa a flusso laminare per evitare contaminazioni: con delle bacchette in plastica sterili sono stati prelevati dei frammenti delle

diverse colonie fungine (Tab. 4) e sono stati inoculati sui terreni di coltura solidi. Le piastre così realizzate sono state incubate in termostato a 25°C per favorire lo sviluppo dei funghi.

Le colonie cresciute su terreno solido sono state osservate sia allo stereomicroscopio che al microscopio ottico al fine di individuare le strutture microscopiche del fungo, permettendo il riconoscimento delle caratteristiche anatomiche specifiche.

### *3.1.3 Inoculo dei funghi sui campioni di carta*

A maturazione delle strutture conidiali dei ceppi fungini precedentemente selezionati sono state preparate delle sospensioni di spore a titolo noto (concentrazione microbica pari a  $2 \times 10^4$  CFU/ml), al fine di inoculare la medesima quantità di materiale fungino sui diversi campioni di carta. Le sospensioni sono state preparate in 10 ml di una soluzione di H<sub>2</sub>O distillata e Tween 40 allo 0,25%, un tensioattivo che consente di mantenere le spore fungine separate per facilitarne il conteggio con la Camera di Thoma.

Le sospensioni sono state diluite opportunamente con del brodo nutritivo (Czapek Dox Broth, Oxoid Cod. No. CM0097) sia per ottenere inoculi con lo stesso titolo in spore sia per fornire alle spore nutrimento minimale per favorirne la germinazione sulla carta.

L'inoculo delle carte è stato realizzato prelevando 100µl della sospensione con una pipettrici e distribuendoli in due punti sulle strisce di carta posizionate in piastre Petri. Per permettere lo sviluppo delle colonie le piastre Petri contenenti le carte sono state sistemate in una campana di vetro con doppio fondo contenente acqua distillata, che mantiene un'umidità relativa costante (100% circa) ed incubate nel termostato a 25°C per una settimana (Fig. 18).

Avvenuta la colonizzazione fungina, sono state ripetute le osservazioni qualitative e quantitative al SEM, le misure di pH e le misure colorimetriche.

## **3.2 Prove di pulitura mediante trattamenti enzimatici**

### *3.2.1 Trattamento enzimatico dei campioni di carta inoculati*

Tutti gli enzimi utilizzati nella sperimentazione sono prodotti dalla Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Products for Life Science Research 2008-2009) e le caratteristiche ed i relativi protocolli specifici sono di seguito riportati.

#### ✓ **Lipasi da *Candida rugosa***

Triacylglycerol acylhydrolase; Triacylglycerol lipasi.

E.C. 3.1.1.3.

Tipo VII, attività  $\geq 700$  unità/mg solido.

Contiene lattosio come diluente. Sostanzialmente privo di  $\alpha$ -amilasi e proteasi.

Un'unità può idrolizzare 1,0 microequivalente di acido grasso da trigliceridi in 1h a pH 7,7 alla temperatura di 37°C.

Proteina determinata con biureto. EC No. 232-619-9.

✓ **Proteasi da *Aspergillus saitoi***

[9025-49-4] E.C. 3.4.23.18.

Tipo XIII, attività  $\geq 0,6$  unità/mg solido.

Un'unità può idrolizzare emoglobina per produrre 1,0 $\mu$ mole (181 $\mu$ g) di tirosina per minuto a pH 2,8 alla temperatura di 37°C (colorato con il reagente Folin-Ciocalteu).

Sostanzialmente privo di proteasi alcalina. EC No. 232-796-2.

✓ **Chitinasi da *Streptomyces griseus***

[9001-06-3] E.C. 3.2.1.14.

Chitodextrinase; Poly (1,4- $\beta$ -[2-acetamido-2-deoxy-D-glucoside]) glycanohydrolase.

Polvere liofilizzata (essenzialmente senza sale), attività: 200-800 unità/g solido.

Un'unità può liberare 1,0mg di N-acetyl-D-glucosamina da chitina per ora a pH 6,0 alla temperatura di 25°C in un saggio di 2h.

E.C. No. 232-578-7.

Tutti gli enzimi sono stati impiegati in tampone fosfato a pH 7,0.

I campioni di carta utilizzati per questa prova sono stati: Mezzofino, Perugia e Whatman inoculati con *A. pullulans*, *A. terreus* ed *E. chevalieri*.

Come supporto per l'applicazione di enzimi sui campioni di carta è stato utilizzato il Gellano (Phytigel<sup>TM</sup>) a diverse concentrazioni. Per la preparazione di 300ml di gel si uniscono 300ml di acqua deionizzata e 0,04g di acetato di calcio che fornisce gli ioni  $Ca^{2+}$  necessari per la gelificazione. Quindi si aggiungono 2, 3 e 4g di Gellano per preparare il gel rispettivamente al 2, 3 e 4% e si scalda nel microonde a 360W per circa 5 minuti, o finché la soluzione non diventa trasparente e leggermente ambrata dal momento che il tempo varia a seconda della percentuale di Gellano presente. Successivamente il composto si versa in capsule Petri sterili e si lascia raffreddare sotto cappa sterile (Iannuccelli *et al.*, 2010).

I trattamenti sono stati eseguiti mediante l'applicazione degli enzimi da soli o in combinazione come riportato nella tabella 5.

**Tabella 5. Trattamenti enzimatici applicati ai campioni di carta inoculati con i ceppi fungini selezionati.**

Trattamento applicato	Specie fungina		
	<i>A. pullulans</i>	<i>A. terreus</i>	<i>E. chevalieri</i>
- Chitinasi a gocce	x	---	---
- Chitinasi, Lipasi e Proteasi a gocce	x	x	x
- Lipasi e Chitinasi a gocce	x	x	x
- Chitinasi su Gellano 2%	x	---	---
- Chitinasi, Lipasi e Proteasi su Gellano 2%	x	x	x
- Lipasi e Chitinasi su Gellano 2%	x	x	x
- Proteasi a gocce	---	x	x
- Proteasi su Gellano 2%	---	x	x

Le soluzioni enzimatiche utilizzate sono state così ottenute:

- \* Proteasi e Lipasi, 200mg in 100ml di tampone fosfato.
- \* Chitinasi, 10U (20mg) in 20ml di tampone fosfato.

I tempi di posa di ogni singolo trattamento sono stati due: 30 e 60 minuti.

Come controllo negativo è stato applicato sulle tre carte un cubetto di Gellano 2%, senza enzimi, e lasciato agire per 60 minuti a temperatura ambiente.

La verifica dell'efficacia del trattamento è stato verificato mediante misure colorimetriche su tutti i campioni e, in base ai risultati ottenuti, sono state eseguite analisi di pH (analisi realizzate nel laboratorio di Fisica dell'ICRCPAL con la collaborazione della Dott.ssa Lorena Botti e del Dott. Daniele Ruggiero) e microanalisi SEM-EDS sui trattamenti più efficaci.

### **3.3 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei ceppi batterici**

#### *3.3.1 Ceppi batterici*

Al fine di selezionare i microorganismi più adatti per i trattamenti di biopulitura del materiale cartaceo, sono stati testati 17 ceppi batterici ambientali (Tab. 6) appartenenti alla Collezione *ENEALilith* del Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biotecnologie Microbiche dell'Unità Tecnica di Caratterizzazione, Prevenzione e Risanamento Ambientale dell'ENEA Casaccia-Roma ed alla Collezione Ceppi dell'Università Friedrich Schiller di Jena (Germany). Tali ceppi erano stati isolati, in lavori precedenti, da siti inquinati, acque reflue industriali e siti archeologici, identificati (rDNA

16S) e caratterizzati per le loro potenzialità biotecnologiche. Le loro sequenze sono depositate nella GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Tabella 6. Ceppi batterici scelti per la sperimentazione ed appartenenti alla Collezione ENEA- Lilith del Laboratorio di Microbiologia Ambientale e biotecnologie microbiche dell'Unità Tecnica di Caratterizzazione, Prevenzione e Risanamento Ambientale dell'ENEA Casaccia (Roma).**

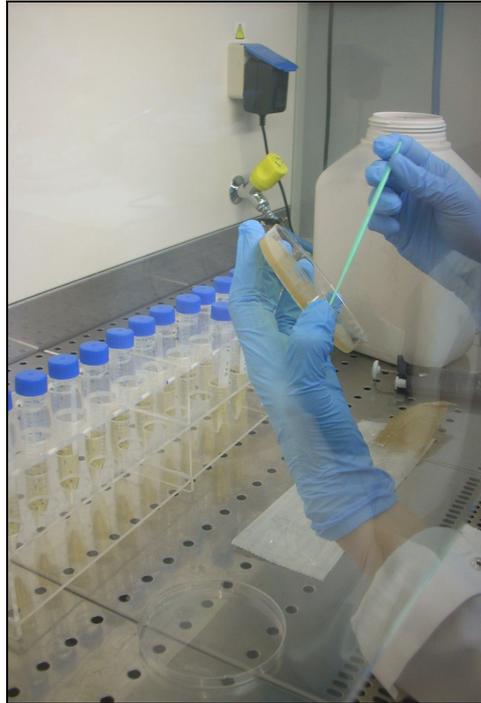
<b>Sigla del ceppo</b>	<b>Identificazione (% di similarità della sequenza dell'rDNA 16S) e numero di deposito</b>	<b>Provenienza</b>	<b>Bibliografia</b>
UI5	<i>Serratia ficaria</i> non depositato	Sito minerario abbandonato di Ingurtosu	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)
OSS25	<i>Bacillus circulans</i> EU124560	Sito contaminato abbandonato di Italsider - Bagnoli	(Sprocati <i>et al.</i> 2006)
UI28	<i>Bacillus cereus</i> JX133203	Sito minerario abbandonato di Ingurtosu	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)
DAN10	<i>Bacillus pumilus</i> EU249560	Tomba della Mercareccia di Tarquinia	(Sprocati <i>et al.</i> 2008)
OSS42	<i>Bacillus subtilis</i> EU124568	Sito contaminato abbandonato di Italsider - Bagnoli	(Sprocati <i>et al.</i> 2006)
MCC-Z	<i>Pedobacter sp.</i> JF279930	Campo abbandonato sito in Piana di Monte Verna (NA)	(Alisi <i>et al.</i> 2009)
TSNRS13	<i>Lysobacter sp.</i> EU263111	Tomba della Mercareccia di Tarquinia	(Sprocati <i>et al.</i> 2008)
CONC12	<i>Pseudomonas stutzeri</i> EU275358	Fanghi di sedimentazione di un impianto di trattamento delle acque reflue della conceria Ariston (NA)	(Tasso <i>et al.</i> 2008)
UT20	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> JX133184	Sito minerario abbandonato di Trezbionka (Polonia)	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)
UW28	<i>Arthrobacter sp.</i> non depositato	Sito minerario abbandonato di Ystwyth (Gran Bretagna)	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)
PZ7	<i>Pantoea agglomerans</i> EU275357	Notarile in pergamena biodeteriorato	Non pubblicato
CONC18	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> EU275351	Fanghi di sedimentazione di un impianto di trattamento delle acque reflue della conceria Ariston (NA)	(Tasso <i>et al.</i> 2008)
UW11	<i>Acinetobacter lwoffii</i> non depositato	Sito minerario abbandonato di Ystwyth (Gran Bretagna)	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)

Segue a pag. 65...

<b>Sigla del ceppo</b>	<b>Identificazione (% di similarità della sequenza dell'rDNA 16S) e numero di deposito</b>	<b>Provenienza</b>	<b>Bibliografia</b>
DAN5	<i>Mycobacterium esteraromaticum</i> EU249580	Tomba della Mercareccia di Tarquinia	(Sprocati <i>et al.</i> 2008)
MCC-K	<i>Mycobacterium sp.</i> JF279916	Campo abbandonato sito in Piana di Monte Verna (NA)	(Alisi <i>et al.</i> 2009)
H7	<i>Chitinophaga sp.</i> non depositato	Compost	Non pubblicato
UW43	<i>Streptomyces mauvecolor</i> JX133195	Sito minerario abbandonato di Ystwyth (Gran Bretagna)	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)
UT8	<i>Streptomyces spororaveus</i> non depositato	Sito minerario abbandonato di Trezbionka (Polonia)	(Sprocati <i>et al.</i> 2013)
OSS34	<i>Streptomyces heteromorphus</i> EU124566	Sito contaminato abbandonato di Italsider - Bagnoli	(Sprocati <i>et al.</i> 2006)
TPID5	<i>Nocardia alba</i> EU249584	Tomba della Mercareccia di Tarquinia	(Sprocati <i>et al.</i> 2008)
UR2	<i>Streptomyces coelicolor</i> non depositato	Collezione Ceppi dell'Università Friedrich Schiller di Jena (Germania).	Non pubblicato

### 3.3.2 Rivitalizzazione e coltura in vitro dei ceppi batterici

I ceppi batterici, conservati in stock in glicerolo a -80°C, sono stati rivitalizzati mediante pre-inoculo della sospensione batterica in 5 ml di TSB (Tryptic Soy Broth, Liofilchem s.r.l Cod. No. 610053) e incubazione a 30°C in agitazione per 24-48 ore. Avvenuta la crescita, è stato effettuato uno striscio su piastre contenenti i terreno solidi TSA (Tryptic Soy Agar, Liofilchem s.r.l Cod. No. 610052) e MM (Mineral Medium). Le piastre sono state incubate a 30°C fino allo sviluppo delle colonie (Fig. 15).



**Figura 15.** Rivitalizzazione e coltura in vitro dei ceppi batterici selezionati.

La preparazione del TSA è stata effettuata nel seguente modo: all'interno di una bottiglia in vetro sono stati aggiunti 500ml di acqua distillata, 15,00g di TSB e 7,50g di agar mescolando il composto su una piastra magnetica fino a completo scioglimento. Quindi il materiale è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti.

Successivamente sono stati aggiunti 8,30ml di glucosio (0,5% p/v) ed il terreno è stato versato all'interno di capsule Petri dove si è lasciato solidificare in condizioni di sterilità.

La preparazione dell'MM ha previsto l'uso di una bottiglia in vetro contenente 1 litro di acqua distillata a cui sono stati aggiunti:

- 6,000g di Tris (Hydroxymethyl Aminomethane),
- 4,680g di cloruro di sodio (NaCl),
- 1,490g di cloruro di potassio (KCl),
- 1,070g di cloruro di ammonio (NH<sub>4</sub>Cl),
- 0,430g di solfato di sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),
- 0,200g di cloruro di magnesio (MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O),
- 0,030g di cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O),
- 0,110g di fosfato di sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O),
- 0,005g di ammonio di ferro citrato (Fe(NH<sub>4</sub>)).

Successivamente sono stati aggiunti 4ml di acido cloridrico (HCl) per ottenere un pH 7,0 per una crescita ottimale dei batteri. Quindi il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti.

Successivamente sono stati aggiunti 8,30ml di glucosio (0,5% p/v) ed il terreno è stato versato all'interno di capsule Petri dove si è lasciato solidificare in condizioni di sterilità.

### 3.3.3 Screening dell'attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica

I ceppi batterici selezionati per la sperimentazione sono stati saggiati per verificare la loro attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica e la loro capacità di decolorare i pigmenti melanici.

L'attività cellulolitica viene ricercata al fine di escludere tutti quei batteri in grado di attuare un processo di degrado dei materiali cartacei. Il test per l'attività proteolitica permette, invece, di individuare quei ceppi batterici che, impiegati per la biopulitura, sarebbero in grado di rompere il legame tra il fungo ed il substrato cartaceo a cui il fungo si ancora attraverso sostanze proteiche. Il test per l'attività chitinolitica ha lo scopo di studiare la capacità dei microrganismi di degradare la chitina, la componente strutturale fondamentale della parete cellulare fungina, attraverso l'attività degli enzimi chitinolitici.

Infine, è stata analizzata la capacità dei batteri di decolorare i pigmenti melanici, ad opera di complessi enzimatici ligninolitici, attraverso la decolorazione di quattro diversi coloranti azoici: Orange G, Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico.

#### *Attività cellulolitica*

Il test è stato realizzato utilizzando un terreno solido contenente CarbossiMetilCellulosa (CMC), un derivato della cellulosa solubile in acqua, largamente impiegata per determinare la produzione di cellulasi poiché velocemente degradata dai microrganismi (Hankin *et al.*, 1977).

Per la preparazione delle piastre, all'interno di una bottiglia in vetro contenente 500ml di acqua distillata sono stati aggiunti 0,5g di estratto di lievito (Yeast Extra Granulated Merck), 2,5g di CMC (Sigma Aldrich s.r.l. Cod. No. C5013) molto lentamente scaldando il terreno sotto una leggera agitazione, 7,5g di agar e mantenendo un pH neutro per una crescita ottimale dei batteri. Quindi il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti e, successivamente, colato in piastre quadrate sotto cappa sterile.

I batteri sono stati inoculati nelle piastre contenenti CMC, eseguendo tre spot per ognuno di essi, ed incubati in termostato a 30°C per una settimana. A completo sviluppo, l'idrolisi della CMC è stata evidenziata seguendo la procedura descritta da Sirisena (Sirisena *et al.*, 1995): le piastre sono state ricoperte con una soluzione acquosa all'1% (p/v) di Congo Red per 15 minuti; dopo aver tolto il colorante, le piastre sono state inondate con 1M di NaCl per 15 minuti per stabilizzare la reazione. Le eventuali zone di idrolisi si manifestano sotto forma di aloni di chiarificazione.

### *Attività proteolitica*

Il test è stato realizzato utilizzando un terreno solido preparato utilizzando una bottiglia di vetro contenente 500ml di acqua distillata a cui sono stati aggiunti 15,0g di TSB (Tryptic Soy Broth, Liofilchem s.r.l. Cod. No. 610053), 7,5g di agar, 0,5g di gelatina in fogli (Pane degli Angeli). Il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti e, successivamente, sono stati aggiunti 4,2ml di glucosio (0,25% p/v). Infine il terreno così preparato è stato colato in piastre quadrate lasciate solidificare in condizioni di sterilità.

I batteri sono stati inoculati nelle piastre contenenti gelatina, eseguendo tre spot per ognuno di essi, ed incubati in termostato a 30°C per una settimana. A completo sviluppo, l'idrolisi della gelatina è stata evidenziata seguendo la procedura descritta da Vermelho (Vermelho *et al.*, 1996): le piastre sono state ricoperte con una soluzione allo 0,1% di amido black in metanolo-acido acetico-acqua nel rapporto 30:10:60 per 1 ora a 30°C e decolorando con una soluzione di metanolo-acido acetico-acqua, nel rapporto 30:10:60 per 15 minuti; dopo aver tolto il colorante, le piastre sono state inondate con il decolorante costituito da metanolo+acido acetico+acqua (30:10:60) per 15 minuti per stabilizzare la reazione. Le eventuali zone di idrolisi si manifestano sotto forma di aloni di chiarificazione.

### *Attività chitinolitica*

Il test per l'attività chitinolitica è stato realizzato modificando il protocollo descritto da Smith (Smith, 1977) che propone una semplice procedura per rivelare l'attività cellulolitica nei funghi, utilizzando come substrato il *cellulose azure*, una cellodestrina insolubile accoppiata ad un colorante idrosolubile. La produzione di cellulasi da parte dei funghi comporta il rilascio del colorante nel mezzo di coltura. Il test è stato modificato utilizzando il *chitin azure* al posto del *cellulose azure* per saggiare l'eventuale attività chitinolitica dei ceppi batterici selezionati.

E' stato preparato un primo terreno usando 0,75g di agar e 0,10g di estratto di lievito posti in un bottiglia di vetro contenente 100ml di acqua distillata. Il terreno è stato sterilizzato 121°C per 20 minuti e poi dispensato in provette di plastica con tappo (2ml per tubo) lasciate raffreddare sotto cappa sterile in posizione verticale.

Successivamente è stato preparato un secondo terreno costituito da due soluzioni:

A - 0,1125g di agar, 0,015g di estratto di lievito e 10ml di acqua distillata (2/3 del volume totale);

B - 0,0300g di *chitin azure* (Sigma-Aldrich s.r.l. - Cod. No. C3020) e 5ml di acqua distillata (1/3 del volume totale).

I terreni A e B sono stati sterilizzati separatamente a 121°C per 20 minuti, mescolati ancora caldi e versati nelle provette al di sopra dello strato del terreno di base già solido. Mediante una pipetta

sono stati versati 0,5ml di terreno per tubo lasciato poi solidificare in condizioni di sterilità. La polvere di *chitin azure*, però, si è rivelata insolubile nella miscela preparata pertanto è stato realizzato un foro all'interno del primo strato di terreno che ha consentito di effettuare l'inoculo dei batteri direttamente sullo strato di chitina sottostante.

I tubi così realizzati sono stati incubati in termostato a 30°C ed ispezionati periodicamente per verificare l'eventuale diffusione di colorante nello strato di terreno di base.

Nel caso dei funghi cellulolitici Smith (Smith, 1977) ha rilevato che la quantità di colorante rilasciato e la velocità di rilascio sono strettamente correlate al grado di attività chitinolitica delle singole culture. Inoltre le specie altamente attive producono il primo effetto rilevabile ad occhio nudo entro 2 giorni dall'inoculo, mentre la densità del colore dello strato del terreno di base aumenta rapidamente durante i giorni a seguire.

L'attività chitinolitica dei ceppi batterici è stata ulteriormente valutata con un secondo metodo impiegando chitina colloidale, preparata seguendo il protocollo descritto da Wen (Wen *et al.*, 2002) e Kuzu (Kuzu *et al.*, 2012): sono stati versati 60ml di HCl al 37% v/v in una bottiglia di vetro a cui sono stati aggiunti 2,5g di chitina da gusci di gambero (Sigma-Aldrich s.r.l. Cod. No. C7170). La soluzione è stata messa in cella frigorifera a 4°C in agitazione *overnight* e, successivamente, sono stati aggiunti 800ml di etanolo (EtOH) sotto cappa chimica mediante imbuto di vetro e carta da filtro (Whatman 41=20µm). Il contenuto della bottiglia di vetro, chiusa e lasciata a temperatura ambiente *overnight*, è stato suddiviso in 4 bottiglie da 200ml cadauna e centrifugate a 6000 rpm per 25 minuti a 4°C. Il precipitato è stato raccolto in un unico contenitore e lavato con acqua distillata sterile fino a raggiungere un pH neutro (12 lavaggi). Infine la chitina è stata sottoposta ad un processo di liofilizzazione che consente l'eliminazione dell'acqua con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della sostanza organica che viene ridotta in polvere.

Il saggio della degradazione della chitina colloidale su piastra è stato eseguito impiegando il terreno minerale minimo M9 (Davis *et al.*, 1986) a cui è stata aggiunta la chitina colloidale allo 0,5% (Jami al Ahmadi *et al.*, 2008).

Di seguito la composizione per litro:

- 0,650g di fosfato di sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),
- 1,500g di fosfato di potassico (KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),
- 0,250g di cloruro di sodio (NaCl),
- 0,500g di cloruro di ammonio (NH<sub>4</sub>Cl),
- 0,120g di solfato di magnesio (MgSO<sub>4</sub>),
- 0,005 di cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>),
- 15g di agar.

I ceppi batterici sono stati inoculati a spot sulle piastre con tamponi sterili. Quindi le piastre sono state incubate a 30°C per favorire lo sviluppo dei batteri. I microrganismi dotati di attività chitinolitica sono stati individuati mediante la comparsa di aloni di chiarificazione intorno alle colonie.

#### *Decolorazione degli azo dyes*

Al fine di determinare la produzione di enzimi ligninolitici da parte dei ceppi batterici scelti è stata analizzata la capacità di tali ceppi di decolorare quattro diversi coloranti azoici: Orange G, Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico (Selvam, 2003). Il test è stato realizzato utilizzando piastre Petri contenenti quattro diversi coloranti azoici: Orange G, Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico. Il controllo positivo è stato effettuato mediante l'impiego di tre *white rot fungi* inoculati su piastre contenenti gli stessi coloranti azoici utilizzati per i batteri:

- ✓ *Ganoderma lucidum* – (Curtis) P. Karst., *Revue mycologique*, Toulouse Vol. 3, No. 9, p. 17 (1881). Classificazione: Ganodermataceae, Polyporales, Incertae sedis, Agaricomycetes, Agaricomycotina, Basidiomycota, Fungi;
- ✓ *Lentinula edodes* – (Berk.) Pegler, *Kavaka*, Vol. 3, p 20, (1976) [1975]. Classificazione: Omphalotaceae, Agaricales, Agaricomycetidae, Agaricomycetes, Agaricomycotina, Basidiomycota, Fungi;
- ✓ *Trametes versicolor* – (L.) Lloyd, *Mycology Notes* (Cincinnati), Vol. 65, p. 1045 (1921) [1920]. Classificazione: Polyporaceae, Polyporales, Incertae sedis, Agaricomycetes, Agaricomycotina, Basidiomycota, Fungi.

I terreni utilizzati sono stati lo Standard Nutrient Medium n°1 (St.1, contenente: 15g/l di peptone, 3g/l di estratto di lievito, 6g/l di cloruro di sodio, 1g/l di glucosio, 15g/l di agar, pH 7,5±0,2) (Lapage *et al.*, 1970) ed il Sabouraud (Oxoid, Cod. No. CM0139 – pH 5,6±0,2) rispettivamente per batteri e funghi.

Ai terreni sono stati aggiunti separatamente i coloranti Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico alla concentrazione finale dello 0,05%. Infine ogni piastra è stata inoculata con i diversi microrganismi effettuando 3 spot per ognuno su ogni terreno contenente il colorante azoico. Le piastre sono state incubate in termostato a 30°C e 27°C rispettivamente per batteri e funghi fino a completo sviluppo. I microrganismi in grado di attuare un processo di decolorazione sono stati individuati mediante la comparsa di aloni di chiarificazione intorno alle colonie.

### 3.3.4 Prove di biopulitura

Sulla base dei risultati ottenuti dai test di caratterizzazione, sono stati impiegati nove ceppi batterici: UI28 *Bacillus cereus*, UI5 *Serratia ficaria*, CONC12 *Pseudomonas stutzeri*, UW28 *Arthrobacter sp.*, UW11 *Acinetobacter lwoffii*, H7 *Chitinophaga sp.*, MCC-Z *Flavobacterium sp.*, UI3 *Bacillus cereus* ed U2 *Streptomyces coelicolor*.

I ceppi batterici sono stati inoculati, dagli stock a -80°C, in falcon contenenti 5ml di TSB e incubati a 30°C in agitazione per 24-48 ore. Successivamente 400µl di pre-inoculo sono stati inoculati in 40ml di TSB in beute da 100 ml in termo-agitatore a 30°C. A completa crescita le sospensioni batteriche sono state trasferite in falcon e centrifugate a 5000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente al fine di ottenere il pellet. Il materiale ottenuto è stato risospeso in 35ml di sodio pirofosfato (0,1% p/v). Le sospensioni sono state poste in un termo-agitatore a 30°C *overnight* per l'affamamento dei batteri.

Le sospensioni batteriche sono state mescolate in rapporto 1:1 con agar al 2% (p/v) lasciato raffreddare a 40°C e colate in piastre Petri.

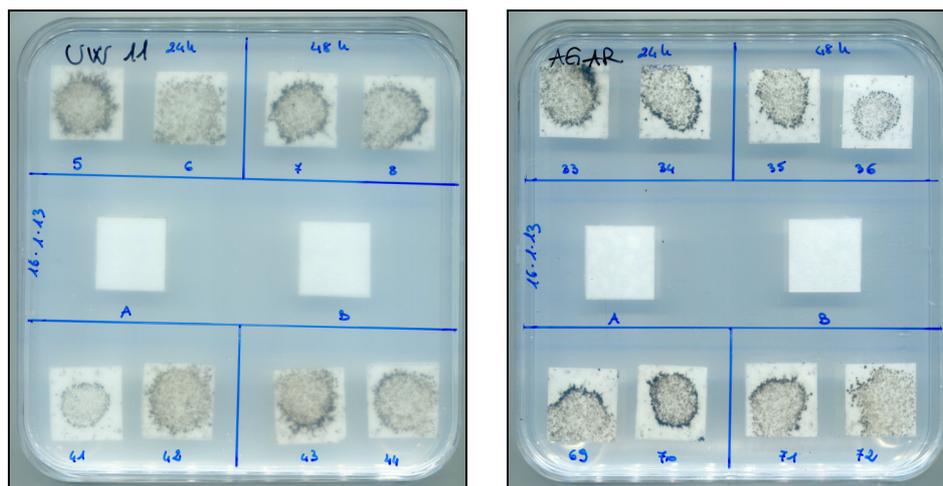
Le prove di biopulitura sono state effettuate su campioni di carta Whatman, più resistente rispetto alle carte Mezzofino e Perugia, inoculati con l'*A. pullulans*, in grado di produrre melanina.

Sono stati scelti tre tempi di posa per ogni singolo trattamento batterico: 24h, 48h e 7gg. I trattamenti sono stati eseguiti in duplicato.

Inoltre i campioni di carta sono stati divisi in due tipologie: “vivi”, campioni inoculati e sottoposti a trattamento con l'impacco batterico, e “morti”, campioni inoculati e sottoposti a sterilizzazione in autoclave a 121°C per 30 minuti, al fine di uccidere l'*A. pullulans*.

Nel caso dei campioni “morti” si è proceduto ad una prova di crescita per verificare l'effettiva inattività del fungo: sono state prelevate alcune colonie fungine dai campioni di carta inoculati poi trasferite su piastre contenenti diversi terreni di crescita (Potato Dextrose Agar, Oxoid Cod. No. CM00139; Malt Extract Agar, Oxoid Cod. No. CM0059 – pH 5,6±0,2) mediante l'impiego di uno swab. Gli inoculi sono stati incubati a 27°C e monitorati per 10 giorni al fine di rilevare l'eventuale attività fungina.

I campioni di carta sono stati posizionati sulle piastre contenenti i batteri inclusi nell'agar, a diretto contatto con il terreno, incubati a 27°C e controllati dopo 24h, 48h e 7gg. Il controllo negativo è stato effettuato utilizzando i campioni di carta inoculati con *A. pullulans* posizionati su piastre contenenti solo agar 2% (Agar Bacteriological, Agar No. 1, Oxoid Cod. No. LP0011) (Fig. 16).

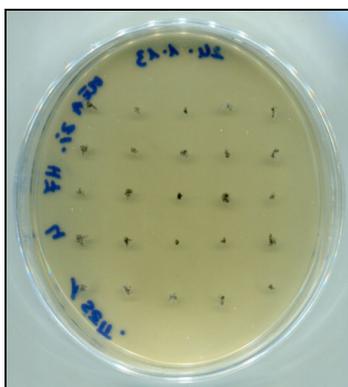


**Figura 16.** Campioni di carta Whatman inoculati con *A. pullulans*:

applicazione dell'impacco batterico di UW11 *Acinetobacter lwoffii* e piastra di controllo contenente solo agar al 2%.

Terminata l'incubazione, i campioni sono stati rimossi dalle piastre ed è stato effettuato un lavaggio per eliminare sia eventuali depositi fungini superficiali sia possibili tracce del terreno utilizzato nel trattamento. Inizialmente la pulitura è avvenuta mediante swab imbevuto di acqua sterile, ma ciò comportava la rottura delle fibre di carta quindi si è optato per un lavaggio ad immersione in acqua sterile + Tween 40 all'1% v/v (10ml+100µl) per circa 30 minuti ed un risciacquo finale in acqua sterile per rimuovere il tensioattivo. Si è ricorso all'utilizzo del tensioattivo poiché agente emulsionante in grado di facilitare la rimozione del materiale superficiale.

Al fine di verificare se i batteri avessero avuto un effetto biocida sui campioni inoculati con fungo vivo, alcuni campioni di carta sono stati utilizzati per effettuare degli inoculi diretti in agar con il "metodo dei 25 punti". La procedura ha previsto il trasferimento di 25 piccoli frammenti di carta (~1x1mm) su terreno solido MEA 2% (Cfr. Par. 3.1.2 *Coltura in vitro dei ceppi fungini* pp. 58) mediante delle bacchette in plastica sterili e incubazione in termostato a 27°C per una settimana allo scopo di favorire l'eventuale sviluppo del fungo (Fig. 17).



**Figura 17.** Inoculo a 25 punti dei campioni di carta Whatman inoculati con *A. pullulans* e sottoposti ai trattamenti batterici.

### **3.4 Gli strumenti di misura per la valutazione dell'efficacia e dell'innocuità dei trattamenti di biopulitura**

La valutazione dell'efficacia e dell'innocuità dei trattamenti di biopulitura eseguiti sui campioni di carta, è stata effettuata sulla base di differenti aspetti:

- ✓ l'osservazione dei caratteri diagnostici di funghi e batteri utilizzati nella sperimentazione è stata effettuata mediante l'impiego del Microscopio Ottico e dello Stereomicroscopio;
- ✓ l'osservazione degli elementi presenti sulla carta dopo la colonizzazione fungina e dopo i trattamenti di pulitura è stata effettuata mediante l'impiego del Microscopio Elettronico a Scansione + Spettroscopia in Dispersione di Energia;
- ✓ il cambiamento di colore delle macchie provocato dai trattamenti enzimatici è stato valutato attraverso le misurazioni colorimetriche;
- ✓ le variazioni di pH dei campioni di carta prodotte dalle colonizzazioni fungine e dai trattamenti applicati sono state rilevate mediante l'utilizzo del pHmetro.

*3.4.1 Osservazioni dei campioni di carta prima e dopo i trattamenti di biopulitura mediante Stereomicroscopio, Microscopio Ottico e Microscopio Elettronico a Scansione + Spettroscopia in Dispersione di Energia (SEM+EDS)*

#### *Stereomicroscopio e Microscopio Ottico*

Lo Stereomicroscopio è stato utilizzato per effettuare una prima caratterizzazione sia dei campioni di carta sia dei ceppi fungini utilizzati nella sperimentazione. Tale strumento, infatti, consente di ottenere una visione ingrandita e tridimensionale dell'oggetto in studio che non necessita di un trattamento particolare per l'osservazione.

Successivamente i campioni di carta sono stati sottoposti ad un'osservazione più dettagliata mediante il Microscopio Ottico, la cui funzione principale è di consentire all'operatore di distinguere i particolari di strutture estremamente piccole in maniera molto chiara.

L'analisi microscopica dell'impasto fibroso rappresenta un efficace strumento per l'identificazione della provenienza e la valutazione del grado di raffinazione e di integrità delle carte a seguito dell'osservazione di particolari elementi morfologici quali tracheidi, fibre sclerenchimatiche e liberiane, ecc.. I campioni di carta sono stati fatti bollire in acqua distillata e lavorati con le mani per rompere i legami che tengono saldate le fibre per favorire la loro separazione. Quindi i frammenti sono stati posti in tubi da saggio contenente acqua distillata e agitati in modo da ottenere una

sospensione di fibre, una procedura necessaria per una corretta preparazione ed osservazione dei campioni al Microscopio Ottico.

A maturazione delle strutture conidiali anche gli inoculi fungini sono stati sottoposti all'osservazione microscopica. Ciò ha permesso il riconoscimento delle caratteristiche anatomiche specifiche di ogni specie fungina poiché lo strumento consente di mantenere inalterate tutte le strutture microscopiche dei microrganismi.

Successivamente le colture fungine sono state utilizzate per ottenere delle sospensioni di spore a titolo noto al fine di produrre inoculi sui campioni di carta a densità standardizzata. La titolazione delle sospensioni è stata effettuata mediante di una camera conta globuli nota come camera di Thoma (Cfr. Par. 3.1.3 *Inoculo dei funghi sui campioni di carta* pp. 60) ed il conteggio delle spore è avvenuto per mezzo del Microscopio Ottico.

#### *Microscopio Elettronico a Scansione + Spettroscopia in Dispersione di Energia (SEM+EDS)*

La microscopia elettronica a scansione è stata utilizzata per caratterizzare le carte tal quali (Mezzofino, Perusia e Whatman), per analizzare gli effetti prodotti sui campioni cartacei a seguito dell'inoculo dei funghi (*A. pullulans*, *E. chevalieri* e *A. terreus*) e per osservare le eventuali modificazioni, a livello micro-morfologico, che le superfici dei frammenti di carta possono subire a seguito dell'azione dei diversi trattamenti di pulitura sperimentati.

A tale fine è stato impiegato il Microscopio Elettronico a Scansione che è in grado, sotto determinate condizioni, di fornire immagini con ingrandimenti pari a 1.000.000x, anche se per osservare le caratteristiche morfologiche della carta un ingrandimento pari a 1.000x è più che sufficiente.

Il confronto tra i campioni analizzati prima e dopo i trattamenti di biopulitura è stato eseguito sulla base di 3 diversi ingrandimenti: 500x, 1000x e 2000x. Alcuni campioni sono stati sottoposti a metallizzazione, mentre in altri casi è stato utilizzato il SEM in pressione variabile (~40 Pascal) così da poterli inserire nella camera da vuoto tali e quali. Questa condizione operativa è stata possibile grazie anche al detector per elettroni secondari (VPSE), che consente di visualizzare con elevata risoluzione le caratteristiche morfologiche della superficie del campione restituendo immagini con effetto di tridimensionalità.

Oltre all'osservazione con *detector* per elettroni secondari, la superficie dei campioni è stata caratterizzata con il rivelatore quadrupolare di elettroni retrodiffusi (QBSD), che permette di

ricostruire un'immagine del campione basata sul numero atomico degli elementi chimici in esso presenti. Ciò consente di ottenere informazioni di tipo compositivo o morfologico relative a zone volumetriche del campione profonde alcuni micron.

Tutti i campioni di carta sono stati montati su degli *stubs* in alluminio del diametro di 12,5mm (Agar Scientific, Essex, England, pin stubs, Cod. No. G301F) e fissati su un disco biadesivo in Carbonio (Agar Scientific, Essex, England, Cod. No. G3347). Al fine di evitare che sostanze estranee potessero interagire con i campioni, il prelievo e la manipolazione di questi, sono state fatte utilizzando un'attrezzatura adeguata, ossia pinzette in fibra di carbonio o plastica che non rilasciano ioni metallici (Fig. 18).



**Figura 18.** Campioni preparati per l'osservazione al SEM+EDS.

L'analisi SEM, qualora non sia necessario prelevare campioni da un manufatto, deve essere comunque considerata micro-invasiva a causa del tipo d'interazione tra fascio elettronico e materia e perché nella camera, in cui i campioni sono analizzati, sono utilizzati bassi valori di pressione. Ad esempio, la carta può deteriorarsi a seguito di perdita di contenuto d'acqua se l'irradiazione elettronica è troppo lunga o se il vuoto praticato è troppo spinto.

Le immagini SEM (risoluzione pari a  $\pm 4,5$  nm) sono state ottenute con valori di pressione pari a 40 Pa, mediante i rivelatori QBSD e VPSE e fascio elettronico accelerato a 20 kV con un filamento al tungsteno; mentre la *working distance* è stata fissata al valore di 13mm.

Accoppiata alla microscopia a scansione elettronica è stata utilizzata una microsonda per l'analisi dei raggi x, che consente di avere un sistema di analisi completo, ottenendo un'analisi puntuale qualitativa e quantitativa degli elementi presenti e la loro abbondanza. Dalla posizione dei picchi sullo spettro è stato possibile individuare in maniera univoca gli elementi presenti, e attraverso il confronto dell'analisi dei picchi con quella ottenuta da picchi standard è stato risalire alla loro concentrazione.

La microanalisi è stata eseguita mediante spettroscopia elettronica in dispersione di energia (EDS) per mezzo della sonda Oxford INCA Energy 250 dotata di rivelatore raffreddato con sistema Peltier (9 scansioni per ogni singolo campione analizzato). Agli spettri è stata applicata la convenzionale correzione ZAF, in cui Z indica un fattore di correzione che tiene conto del numero atomico, A tiene conto di una certa percentuale di raggi X prodotti che vengono assorbiti ed F tiene conto della fluorescenza (Goldstein *et al.*, 2003) (Fig. 19).



**Figura 19.** Microscopio elettronico a scansione corredato di microanalisi in dotazione all'Istituto Centrale per il Restauro e la Conservazione del Patrimonio Archivistico e Librario (SEM-VP EVO 50 XVP Carl-Zeiss Electron Microscopy Group + EDS *Inca Energy 250* Oxford).

### 3.4.2 Misure di pH

Il pH per i supporti cartacei rappresenta un fattore fondamentale per la loro stabilità chimica; da esso, infatti, dipendono i processi di idrolisi che comportano la rottura dei legami presenti nella cellulosa e quindi fragilità della carta. Il trattamento con acidi degrada la struttura polimerica della cellulosa e la reazione e la sua velocità dipendono fortemente dal pH. Anche un ambiente fortemente alcalino, in condizioni di temperatura elevata, può causare scissione idrolitica in qualsiasi punto della catena e degradazione polimerica (Bettolo, 2007).

Pertanto il pH dei campioni di carta è stato monitorato durante tutta la sperimentazione. Un qualsiasi trattamento di pulitura o di restauro può, infatti, essere efficace nell'eliminare la macchia fungina dalla carta, ma comportare un cambiamento nocivo del pH tale da renderne comunque sconsigliabile l'utilizzo, nonostante l'efficacia.

La misura del pH della carta è stata eseguita attraverso:

- ✓ un metodo distruttivo, misura dell'estratto acquoso non filtrato ottenuto spappolando la carta in acqua distillata;
- ✓ un metodo non distruttivo, detto pH per contatto o superficiale.

Nel primo caso si lascia macerare 1g di carta ridotto in frammenti in acqua distillata al fine di ottenere un estratto acquoso sul quale si effettua la misurazione.

Nel secondo caso si tratta di effettuare la misura per via potenziometrica attraverso l'utilizzo di un pHmetro, uno strumento costituito da due elettrodi, uno di riferimento, in genere a calomelano, e l'altro, l'indicatore, un elettrodo a vetro costituito da un elettrodo a calomelano pescante in una soluzione di acido cloridrico tamponata.

Le analisi di pH superficiale effettuate sui campioni hanno risentito della difficoltà di eseguire la misura in quanto la goccia d'acqua necessaria raramente è rimasta tale permettendone una corretta misurazione, mentre la maggior parte delle volte si è subito espansa su tutto il campione rendendone molto difficoltosa la valutazione.

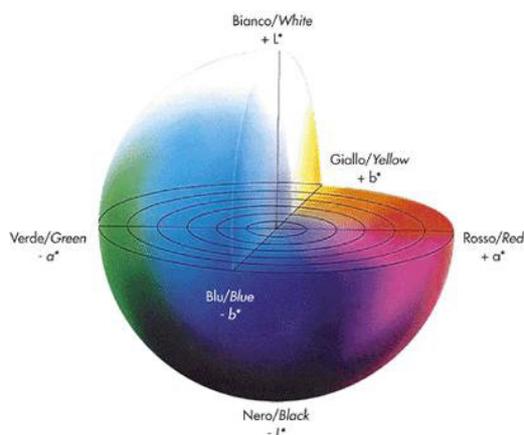
### *3.4.3 Misure colorimetriche*

Al fine di valutare in maniera oggettiva l'efficacia estetica dei metodi di biopulitura, sono stati confrontati i dati delle misure colorimetriche acquisite prima e dopo i trattamenti enzimatici e batterici. Infatti le analisi colorimetriche hanno consentito di esprimere, in termini quantitativi, i parametri che definiscono il colore di tutti i campioni utilizzati nella sperimentazione.

Il concetto della definizione del colore attraverso dei numeri si basa sull'introduzione di uno spazio cromatico tridimensionale le cui coordinate spaziali sono strettamente legate alla sensibilità dell'occhio umano, per il quale qualsiasi colore visibile è dato come una combinazione di tre colori principali prescelti.

Lo spazio più comunemente utilizzato è il CIELAB 1976, le cui coordinate sono  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . La forma che ne risulta è un cerchio, dove sui due diametri, che si intersecano perpendicolarmente in corrispondenza dell'asse  $L^*$  (luminanza), si trovano i valori positivi e negativi di  $a^*$  (linea rosso-verde) e  $b^*$  (linea giallo-blu).  $a^* > 0$  rappresenta la componente rossa e  $a^* < 0$  rappresenta la componente verde; analogamente  $b^* > 0$  rappresenta la componente gialla e  $b^* < 0$  rappresenta quella blu; mentre  $L^*$  è sempre non negativo ed assume il valore 100 per il diffusore perfetto e 0 per il nero perfetto, ossia il rapporto tra l'intensità della luce incidente e quella riflessa. Infine la retta

“bianco-nero” attraversa il centro del piano  $a^*b^*$ , perpendicolarmente al piano stesso, con il bianco in alto ed il nero in basso (Palazzi, 1995; Piacentini, 2009) (Fig. 20).



**Figura 20.** Diagramma rappresentativo dello spazio colorimetrico secondo il sistema CIELAB 1976.

Allo scopo di definire in maniera oggettiva le differenze di colore è stato introdotto il concetto di  $\Delta E$ , che rappresenta la variazione globale del colore. Nel caso di colori non troppo intensi né troppo slavati, si può definire  $\Delta E=1$  una differenza appena percettibile mettendo a confronto diretto le due superfici,  $\Delta E=2$  nettamente percettibile ma relativamente accettabile, mentre per  $\Delta E>5$  le differenze si possono facilmente percepire anche senza confronto diretto (Palazzi, 1995). Il colorimetro, una volta eseguite le due misure da confrontare, oltre a fornire la differenza di colore fornisce anche il  $\Delta L$ , che rappresenta la variazione di luminosità ed i  $\Delta a$  e  $\Delta b$ , permettendo di quantificare in maniera globale ed esaustiva le differenze tra i due colori presi in esame.

I parametri  $\Delta E$ ,  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  sono stati utilizzati per descrivere in maniera oggettiva le eventuali variazioni cromatiche che interessano i diversi campioni cartacei a seguito all'applicazione dei trattamenti di biopulitura.

Poiché lo spazio cromatico  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  è solo approssimativamente uniforme, la corrispondenza tra il valore numerico di  $\Delta E$  e la differenza di colore percepita dall'occhio umano, in molti casi è valida solo entro limiti abbastanza ampi.

Le misure di colore sono state realizzate mediante l'impiego del colorimetro tristimolo Minolta CR200. La testa di misura utilizza un'illuminazione diffusa fornita da una lampada ad arco allo xenon e solo la luce riflessa perpendicolarmente alla superficie è raccolta dal cavo a fibre ottiche per l'analisi del colore. L'area di misura presenta un diametro di 8mm.

### 3.5 Metodi di analisi statistica: elaborazione ed interpretazione dei dati

Il confronto tra i gruppi di dati acquisiti a seguito delle misurazioni delle diverse variabili considerate (coordinate colorimetriche, valori di pH, dati di microanalisi, ecc.) è stato eseguito mediante l'analisi della variabilità. In questo modo si è inteso verificare se due gruppi di dati siano significativamente diversi tra loro o se, viceversa, siano compatti. In altri termini, il raffronto tra le misure acquisite, ad esempio prima e dopo i trattamenti di biopulitura, avviene sulla base del confronto tra la variabilità interna a ogni gruppo di dati rispetto alla variabilità che c'è tra i due gruppi di dati; se la variabilità interna al gruppo di dati è maggiore rispetto a quella tra i due gruppi di dati, allora la variabilità interna di ogni gruppo di dati determina una differenza significativa tra i gruppi stessi. In questo modo è possibile stabilire in maniera oggettiva la differenza esistente tra le variabili misurate prima e dopo i diversi trattamenti applicati ai campioni cartacei. L'utilità di questo tipo di elaborazioni risiede nella possibilità di ottenere una visione complessiva riguardante la potenzialità dei trattamenti enzimatici e batterici di rimuovere sia i funghi che le alterazioni cromatiche da essi prodotte sui supporti cartacei.

#### 3.5.1 Analisi in Componenti Principali (PCA)

I dati relativi alle carte ed ai trattamenti cui sono state sottoposte, sono stati raggruppati in matrici e sottoposti ad analisi statistica multivariata PCA per mezzo di un apposito software (XLSTAT 2009, versione 2009.4.06). Nella PCA (Todeschini, 1998) le variabili che descrivono i dati sono trasformate in nuove variabili, chiamate componenti principali, che rappresentano delle combinazioni lineari delle variabili originali e la cui caratteristica più importante è quella di essere tra loro ortogonali. La PCA consiste in un processo di rotazione dei dati originali definiti da una matrice  $X$  di dimensioni  $n$  (oggetti, nel nostro caso i campioni di carta trattati o tal quali)  $\times p$  (variabili, nel nostro caso gli elementi chimici analizzati all'EDS, oppure le coordinate di colore od altri parametri quantitativi che descrivano i campioni), effettuato in modo tale che il primo nuovo asse sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati, il secondo sia perpendicolare al primo e sia nella direzione della successiva massima varianza dei dati e così di seguito per tutti i  $p$  nuovi assi. Quindi gli assi del nuovo spazio (componenti principali, detti anche fattori o autovettori) sono gli assi relativi alle nuove direzioni di massima varianza, in ordine via via decrescente (Camussi *et al.*, 1986). Si tratta pertanto di un metodo che permette di conservare la massima varianza insita in un *set* di dati, scartando le informazioni inutili e riducendo le "n" dimensioni iniziali ad un sistema di più facile leggibilità. Uno dei problemi fondamentali che la PCA comporta è la determinazione del numero  $M$  di componenti (fattori) significativi, con  $M < p$ . I descrittori che sono tra loro correlati sono descritti dalla medesima componente principale poiché apportano lo

stesso tipo di informazione. Le componenti principali sono vettori mutuamente ortogonali e differenti componenti descrivono variazioni indipendenti e non correlate dei descrittori, ciò significa che componenti differenti rappresentano variazioni nei dati dovute a differenti proprietà intrinseche. Queste proprietà intrinseche si manifestano quindi come le variazioni più significative dei descrittori sperimentali originali: esse rappresentano in qualche modo delle proprietà principali, ovvero macroproprietà del sistema non direttamente misurabili. Si passa infatti da una descrizione-conoscenza del sistema in termini di variabili macroscopiche originali, ciascuna normalmente nota nei suoi significati, ad una descrizione ad un livello semantico superiore – una *metadescrizione* – il cui ruolo può consentire di cogliere le proprietà emergenti del sistema, cioè proprietà nuove rispetto alle conoscenze originali, proprietà che emergono da una visione olistica del sistema o dagli effetti sinergici o antagonisti delle variabili originali che lo descrivono.

### 3.5.2 Analisi Fattoriale Discriminante (DFA)

Sempre utilizzando il software XLSTAT 2009 (versione 2009.4.06) è stata effettuata l'analisi fattoriale discriminante (DFA) che effettua la comparazione tra più gruppi (i campioni di carta con i diversi trattamenti di pulitura) sulla base di più variabili (le coordinate di colore o altri descrittori quantitativi), mettendo in luce quali di queste rivestano un ruolo primario nella separazione dei gruppi stessi. Per evitare che le variabili con i valori assoluti più elevati pesino maggiormente nell'analisi, si è proceduto ad una loro standardizzazione (viene valutato il contributo relativo di ciascuna variabile):

$$z_i = (x_i - x_m) / S$$

dove  $x_i$  è il valore originale della variabile relativamente all' $i$ -esimo caso,  $z_i$  è la sua deviazione standardizzata,  $x_m$  è la media della distribuzione originale ed  $s$  la sua deviazione standard.

L'analisi discriminante utilizza combinazioni lineari delle variabili per calcolare nuove funzioni (le funzioni discriminanti) in cui sia massimizzato il rapporto fra la varianza tra gruppi (fra le tesi) e la varianza entro gruppi (le repliche). Le funzioni discriminanti, numerate in ordine crescente in base all'ammontare di varianza tra gruppi che viene spiegata da ciascuna di loro, possono essere visualizzate in grafici a dispersione. In questi l'insieme degli oggetti appartenenti al medesimo gruppo forma una “nuvola” di punti. Misura sintetica della posizione della nuvola nello spazio definito dalle funzioni discriminanti è il centroide del gruppo. Per verificare se le posizioni dei centroidi dei gruppi studiati sono significativamente diverse, si usa il test “lambda di Wilks” (Camussi *et al.*, 1986).

### 3.5.3 Analisi della Varianza (ANOVA)

L'ANOVA è un modello utilizzato per cercare la relazione migliore tra un insieme di variabili, di tipo qualitativo, che descrivono gli oggetti studiati. Nell'ANOVA queste variabili vengono spesso chiamate fattori (o trattamenti). L'ANOVA permette di investigare l'effetto della variazione dei fattori sulla variabilità dei risultati sperimentali del sistema sotto osservazione, determinando quale variazione è imputabile ai fattori stessi e quale ad effetti casuali. Nel presente lavoro l'ANOVA è stata applicata nella valutazione della significatività delle differenze riscontrate fra i trattamenti di pulitura impiegati ed in tutti i confronti fra i descrittori quantitativi dei campioni (misure di colore, contenuto in microelementi, pH, ecc.) in cui fosse necessario valutare il peso dell'errore residuo rispetto alla varianza dovuta ai trattamenti.

Il metodo dell'ANOVA si propone di verificare l'ipotesi (ipotesi nulla) che non vi siano differenze tra le variabili prese in esame, e che le eventuali differenze siano dovute a fattori esterni.

Per effettuare l'analisi si testa l'ipotesi nulla, considerando che la varianza dei dati può essere distribuita in due parti:

- ✓ tra le medie dei trattamenti;
- ✓ nei trattamenti.

Si è proceduto quindi confrontando le varianze con un test di Fisher (F), per verificarne l'uguaglianza (Scossiroli *et al.*, 1971).

Il primo passo dell'analisi è consistito nello scorporare la somma degli scarti quadratici nelle due componenti indicate sopra. In questo modo è stata ottenuta la sorgente di varianza identificabile, dovuta alla differenza di trattamento ( $S_A$ ) e la componente di varianza non controllabile insita, invece, nei trattamenti stessi ( $S_R$ ).

Il programma XLSTAT 2009 riporta i risultati in una tabella come di seguito:

Differenza	d.f.	Somma degli scarti quadratici	Media degli scarti quadratici
Tra i trattamenti	k-1	$S_A$	$S_A/(k-1)$
Tra le repliche	N-k	$S_R$	$S_R/(N-k)$
Totale	N-1		

dove:

d.f. = gradi di libertà

k-1 = numero di variabili - 1

N-k = numero di repliche - k

N-1 = numero di repliche - 1

$S_A$  = somma degli scarti quadratici tra diversi trattamenti

$S_R$  = somma degli scarti quadratici tra le repliche dei trattamenti

A questo punto abbiamo due valori di varianza da confrontare: se la varianza dovuta ai trattamenti è molto superiore all'errore residuo, ci sono poche speranze che l'ipotesi nulla possa essere accettata. È altresì importante considerare che quando  $S_A/S_R$  ha un valore molto basso può essere probabile che qualche importante fattore non controllabile, non sia stato randomizzato bene durante gli esperimenti.

In generale, per confrontare tra loro le varianze si opera un test-F, facendo il rapporto tra la varianza *between-treatment* e quella dei residui.

$$F_e = S_A(N-k)/S_R(k-1)$$

Se  $F_e > F_{\text{tab}}$  si può asserire che vi è una significativa differenza tra i trattamenti (al livello di significatività scelto) (Camussi *et al.*, 1986).

#### 3.5.4 Test di confronto (*t-Student*)

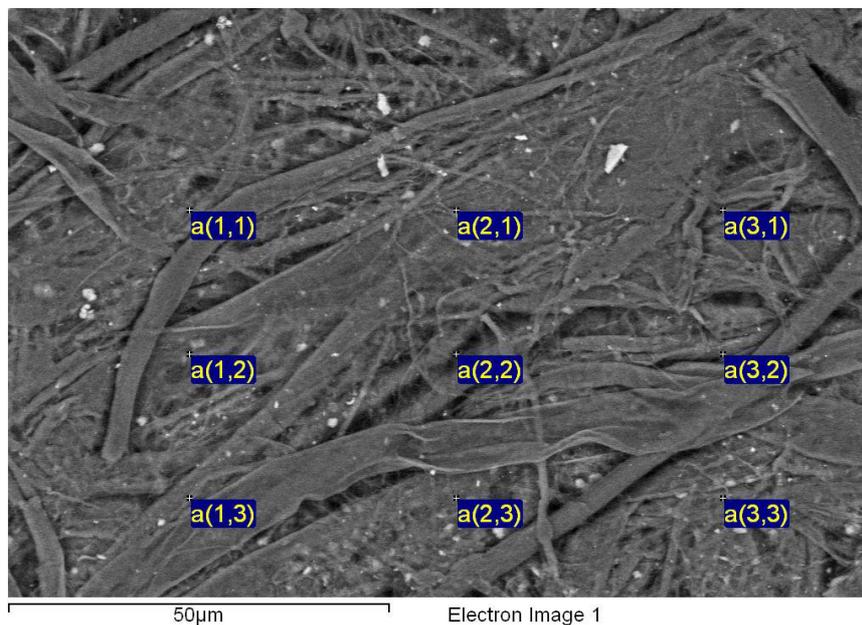
Nei confronti a coppie (trattato vs controllo; trattamento A vs trattamento B; ecc.) in cui non fosse applicabile il test ANOVA, è stato utilizzato il test t-Student. Si tratta di un metodo statistico (a due code) per la verifica della significatività della differenza dalla media, cioè per verificare se il valore osservato differisce significativamente dal valore medio ovvero se l'eventuale differenza sia attribuibile al caso (cioè al campionamento) o se sia effettivamente dovuto ad una differenza fra le coppie di dati. Il valore di riferimento per il test-t è espresso come intervallo, in funzione della dispersione dei valori attorno alla media aritmetica (deviazione standard). Il livello di significatività è stato fissato come  $p < 0,05$  (Camussi *et al.*, 1986). Infine il numero di gradi di libertà effettivi è stato calcolando utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite; mentre il valore critico  $t$  è stato calcolando utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox (Woolson *et al.*, 2002).

## 4. RISULTATI

### 4.1 Caratterizzazione dei campioni di carta

Le analisi effettuate sui campioni di carta, prima e dopo gli inoculi fungini ed i trattamenti di pulitura, hanno permesso di verificare alcune ipotesi sull'efficacia dei metodi di biopulitura nonché di comprendere se, ed in quale misura, l'utilizzo di enzimi e batteri possa essere approfondito per trattare problematiche di restauro e conservazione dei materiali cartacei deturpati da alterazioni cromatiche di origine fungina. Pertanto la caratterizzazione preliminare delle carte utilizzate per le prove è stata fondamentale per conoscerne le caratteristiche prima di effettuare i differenti interventi di rimozione delle alterazioni cromatiche presenti su di esse.

La microanalisi eseguita sulle carte scelte per la sperimentazione ha permesso di caratterizzarne il contenuto elementare e di metterne in evidenza alcune peculiarità composizionali. Data la relativa disomogeneità della superficie cartacea si è deciso di eseguire l'analisi su una griglia di punti 3x3, in modo da avere una misura della variabilità del dato (Fig. 21). I valori medi del contenuto dei singoli elementi chimici sono riportati in ppm nella tabella 7.



**Figura 21.** Immagine SEM della carta Perugia tal quale (1000x): esempio di griglia di punti 3x3 per microanalisi.

**Tabella 7. Composizione chimica elementale (ppm) dei campioni di carta tal quali.**

Valori medi di 9 repliche  $\pm$  Deviazione standard.

	Mezzofino		Perusia		Whatman	
	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
<b>C</b>	62168,0	2754,7	60841,4	2832,7	60114,7	4568,0
<b>O</b>	37719,6	2595,0	35022,5	4201,9	39885,3	4568,0
<b>Mg</b>	---	---	124,8	20,5	---	---
<b>Al</b>	---	---	199,1	27,4	---	---
<b>Si</b>	---	---	1573,0	181,4	---	---
<b>S</b>	---	---	54,1	11,2	---	---
<b>Cl</b>	---	---	55,7	11,1	---	---
<b>Ca</b>	---	---	1028,6	73,7	---	---
<b>Fe</b>	---	---	147,0	22,1	---	---

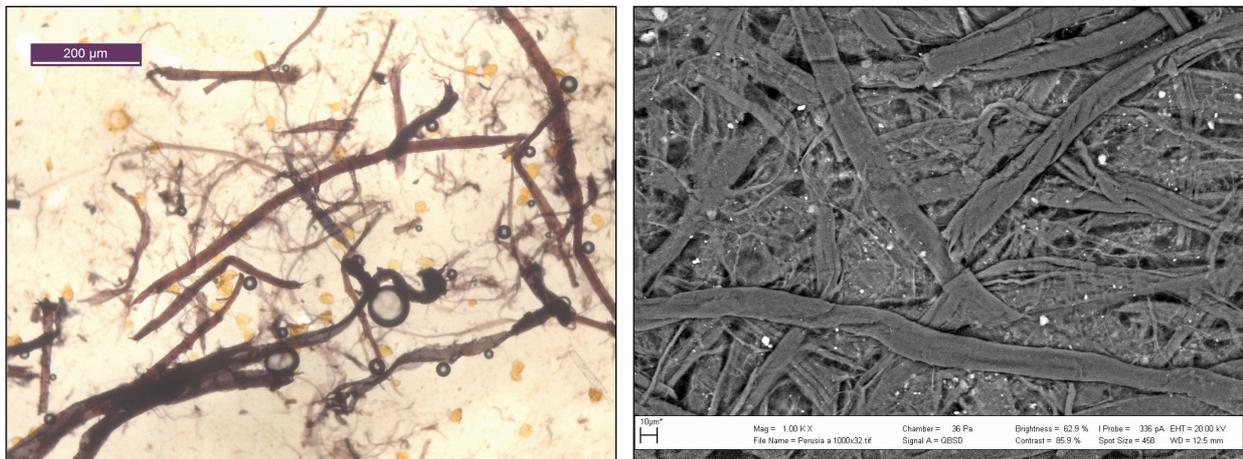
I dati ottenuti consentono di distinguere le carte Mezzofino e Whatman dalla carta Perusia che risulta l'unica a presentare cospicue concentrazioni di microelementi, inclusi quelli non desiderabili in una carta, come il ferro (Fe). Tali differenze composizionali sono riscontrabili anche dall'osservazione al microscopio ottico effettuata sull'impasto fibroso. L'analisi al microscopio dell'impasto fibroso rappresenta un utile strumento per l'identificazione della provenienza e la valutazione del grado di raffinazione e di integrità delle carte a seguito della valutazione delle caratteristiche morfologiche riscontrate.

La carta Mezzofino risulta costituita in gran parte da pasta meccanica di legno, fibre colorate in giallo; ma sono presenti anche alcune fibre di conifera (pasta semichimica), fibre colorate in blu, che nella pianta viva svolgono sia la funzione di sostegno che di conduzione e sono riconoscibili dalle punteggiature (Fig. 22). La carta Mezzofino presenta una grammatura pari a 50g/m<sup>2</sup>.



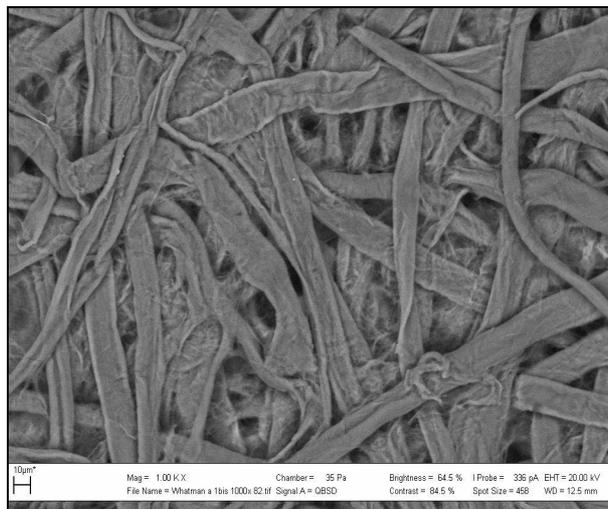
**Figura 22.** Immagine dell'impasto fibroso della carta Mezzofino al microscopio ottico (10x) ed al microscopio elettronico a scansione (1000x).

Invece le fibre della carta Perugia sono di colore rosso vinoso, caratteristica colorazione delle fibre tessili quali cotone, lino o canapa, ma in questo caso è possibile escludere il cotone poiché le fibre di tale pianta hanno una caratteristica forma nastriforme (Caneva *et al.*, 2005). Inoltre non si evidenzia la presenza di pasta meccanica di legno e si possono vedere alcune fibre scure, non bianchite, con possibile presenza di lignina o altre impurezze. La carta mostra un buon grado di raffinazione, definibile dalle numerose fibrille, e si nota la presenza di elementi tondeggianti colorati in giallo, probabilmente cariche minerali aggiunte alla carta (Fig. 23). La carta Perugia presenta una grammatura pari a  $88\text{g/m}^2$ .



**Figura 23.** Immagine dell'impasto fibroso della carta Perugia al microscopio ottico (10x) ed al microscopio elettronico a scansione (1000x).

Infine la carta Whatman è costituita esclusivamente da cellulosa pura e, quindi, non si è ritenuto necessario effettuare alcun test per la caratterizzazione delle fibre stesse (Fig. 24). La carta Whatman presenta una grammatura pari a  $87\text{g/m}^2$ .



**Figura 24.** Immagine al microscopio elettronico a scansione della carta Whatman (1000x).

Dai test effettuati con il reattivo allo iodio-ioduro di potassio per il riconoscimento dell'amido e con il reattivo di Schmidt per la gelatina non sono emersi risultati positivi. Il comportamento dell'acqua sulla carta, dove la goccia non si spande poiché l'angolo di contatto con il supporto è maggiore di 90°, lascia però pensare alla presenza di collanti probabilmente di natura sintetica e, quindi, non evidenziabili con i test effettuati.

Ulteriori differenze fra le carte scelte per produrre in vitro i campioni da sottoporre ai trattamenti di biopulitura sono state evidenziate grazie ai dati di colore e pH (Tab. 8).

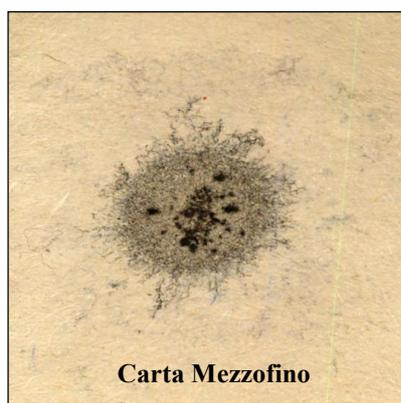
**Tabella 8. Dati di colore e di pH delle carte tal quali. Valori medi di 5 repliche.**

	Colore						pH
	Y	x	y	L	a	b	
<b>Mezzofino</b>	70,12	0,34	0,34	87,05	2,45	15,33	5,4±0,1
<b>Perusia</b>	72,50	0,34	0,35	88,20	2,07	18,50	6,5±0,1
<b>Whatman</b>	87,72	0,32	0,32	95,04	0,75	4,91	5,8±0,1

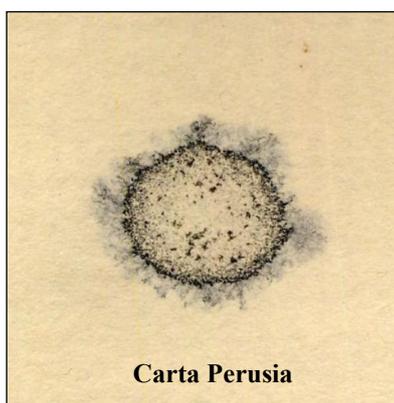
#### 4.2 Riproduzione del danno biologico

La formazione delle macchie fungine risente fortemente delle caratteristiche del substrato comportando una variabilità negli effetti dello sviluppo fungino su ciascuna delle carte utilizzate. Ogni singola specie fungina, infatti, ha prodotto “macchie-test” diverse, per aspetto e dimensione, sui differenti campioni di carta usati nella sperimentazione.

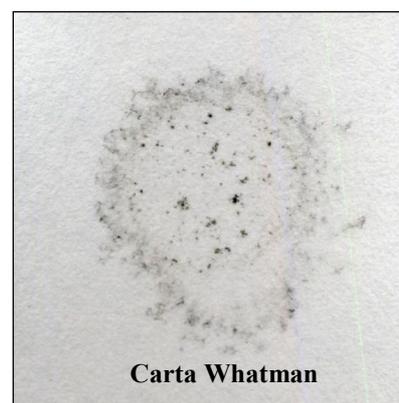
#### *Aureobasidium pullulans*



Il fungo produce una macchia scura, di colore nero, concentrata nella zona dell'inoculo. Il pigmento penetra nelle fibre ed è visibile anche sul recto del campione.

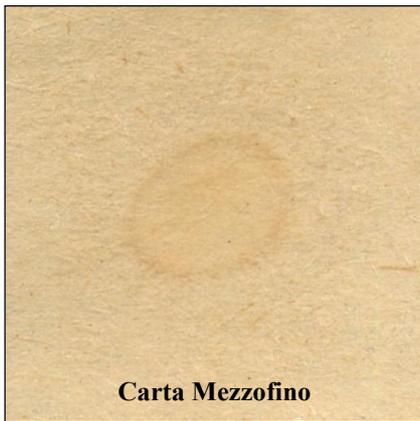


Il fungo produce una macchia con bordo più scuro, visibile anche sul recto del campione, con un leggero alone intorno, ed è concentrata nella zona dell'inoculo.

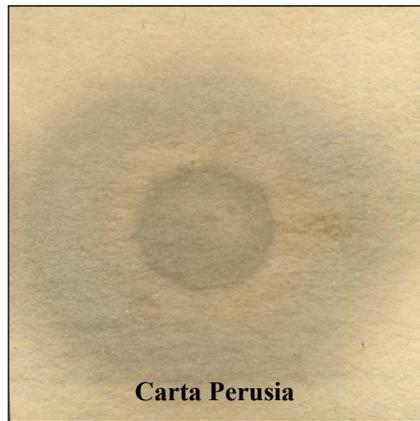


Il fungo produce una macchia scura, di colore nero, melanica, con bordo più scuro. Il pigmento penetra nelle fibre ed è visibile anche sul recto del campione.

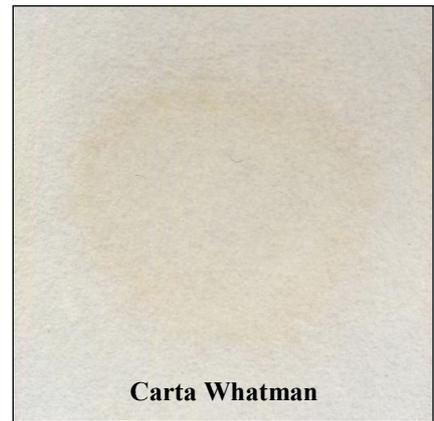
### *Aspergillus terreus*



Il fungo produce una piccola macchia di colore giallo-marrone nel punto di inoculo, poco più scura del colore della carta. La macchia non è visibile sul recto del campione.

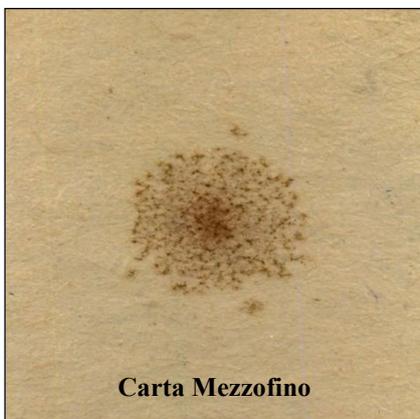


Il fungo produce una macchia notevolmente diversa dalle altre: il colore è grigio scuro e l'alone è molto pronunciato. Inoltre la macchia è leggermente visibile sul recto del campione.

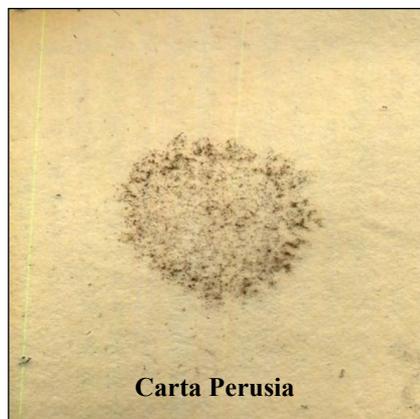


Il fungo produce un alone di colore giallo-marrone visibile anche sul recto del campione in quanto il pigmento penetra all'interno delle fibre della carta.

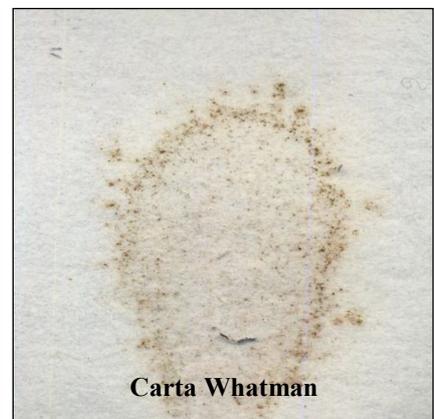
### *Eurotium chevalieri*



Il fungo produce una macchia concentrata nella zona dell'inoculo, di colore marrone e dovuta al micelio superficiale. Il pigmento rilasciato non penetra nelle fibre e, quindi, la macchia non è visibile sul recto del campione.



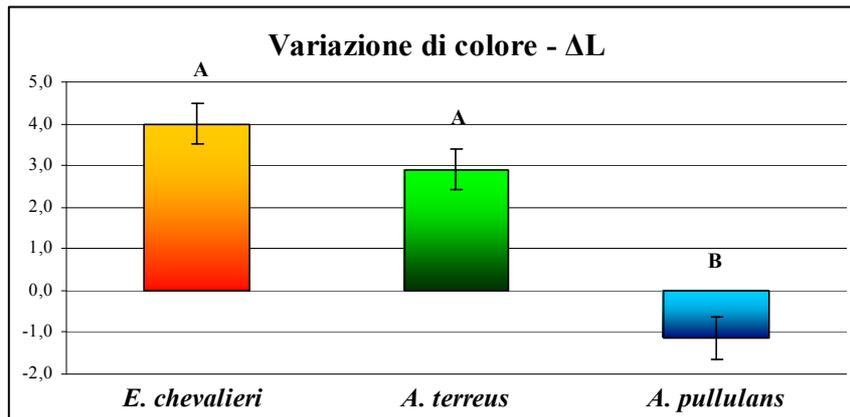
Il fungo produce una macchia di colore marrone concentrata nella zona dell'inoculo. Il fungo non penetra nelle fibre della carta e la macchia rimane superficiale, non visibile sul recto del campione.



Il fungo produce una macchia di colore marrone dovuta principalmente al micelio superficiale. La macchia è parzialmente visibile anche sul recto del campione a seguito del rilascio del pigmento.

Analizzando i risultati delle analisi colorimetriche eseguite sui funghi utilizzati nelle prove di biopulitura, l'ANOVA divide i tre funghi in due diversi raggruppamenti. In particolare

considerando il valore di  $\Delta L$ , ossia la variazione di luminosità tra la carta tal quale e la carta inoculata con il fungo, l'analisi permette di distinguere sempre fra l'*A. pullulans* e gli altri due funghi, indicando quindi che le macchie prodotte da questi ultimi hanno valori di luminosità molto diversi da quelle prodotte dal primo. Ciò a testimonianza del fatto che l'*A. pullulans* è l'unico dei tre funghi a produrre ife pigmentate e fortemente melaniche capaci di penetrare nelle fibre di cellulosa, colorandole con un meccanismo più invasivo di quanto non facciano l'*A. terreus* e l'*E. chevalieri* (Graf. 1).



**Grafico 1.** Analisi ANOVA dei valori della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) delle carte Mezzofino, Perusia e Whatman inoculate con i funghi *A. pullulans*, *A. terreus* ed *E. chevalieri*. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

Considerando contemporaneamente la variabile fungo e la variabile carta, invece, i raggruppamenti che si formano sono la dimostrazione di come la variabilità del *set* di dati dovuta alla specie fungina non sia definita solo dalle caratteristiche dei singoli organismi usati nella sperimentazione. Variando, infatti, il tipo di carta, anche all'interno del *set* di campioni ottenuti con la medesima specie fungina, è possibile avere una grande variabilità di risposta, come si evince dalla tabella 9 in cui vengono riportati sia i valori della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) che della variazione globale di colore ( $\Delta E$ ) di tutte le carte inoculate con i tre funghi selezionati.

**Tabella 9. Analisi ANOVA dei dati colorimetrici delle macchie considerando le variabili fungo e carta.**

Valori medi di 5 repliche. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
<i>A. pullulans</i> su Perusia	0,20	A
<i>A. pullulans</i> su Whatman	-1,06	A B
<i>A. pullulans</i> su Mezzofino	-2,56	B

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
<i>A. pullulans</i> su Mezzofino	3,75	A
<i>A. pullulans</i> su Perusia	1,72	B
<i>A. pullulans</i> su Whatman	1,34	B

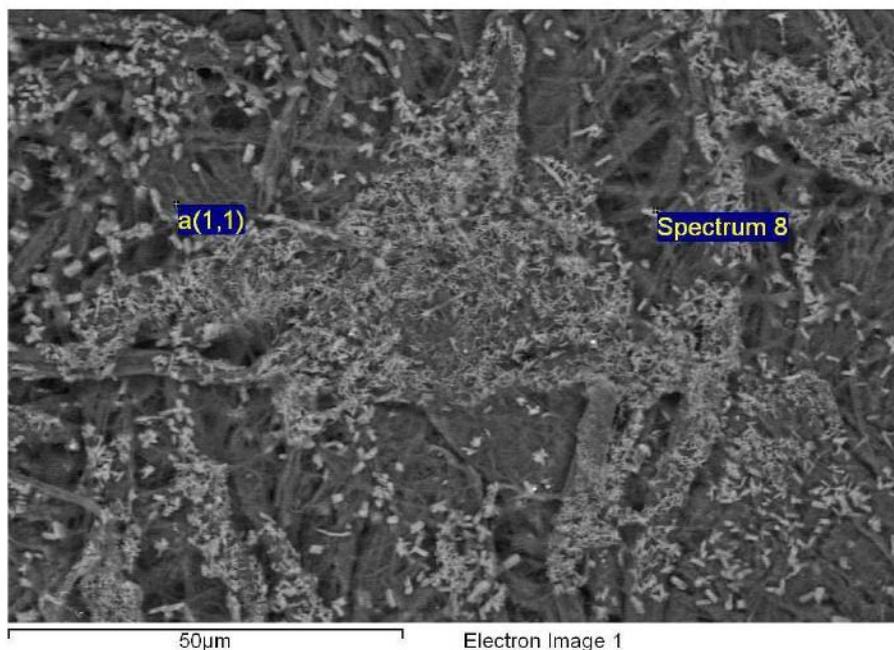
Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
<i>A. terreus</i> su Perusia	6,23	A
<i>A. terreus</i> su Mezzofino	1,89	B
<i>A. terreus</i> su Whatman	0,59	C

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
<i>A. terreus</i> su Perusia	6,76	A
<i>A. terreus</i> su Mezzofino	2,16	B
<i>A. terreus</i> su Whatman	2,15	B

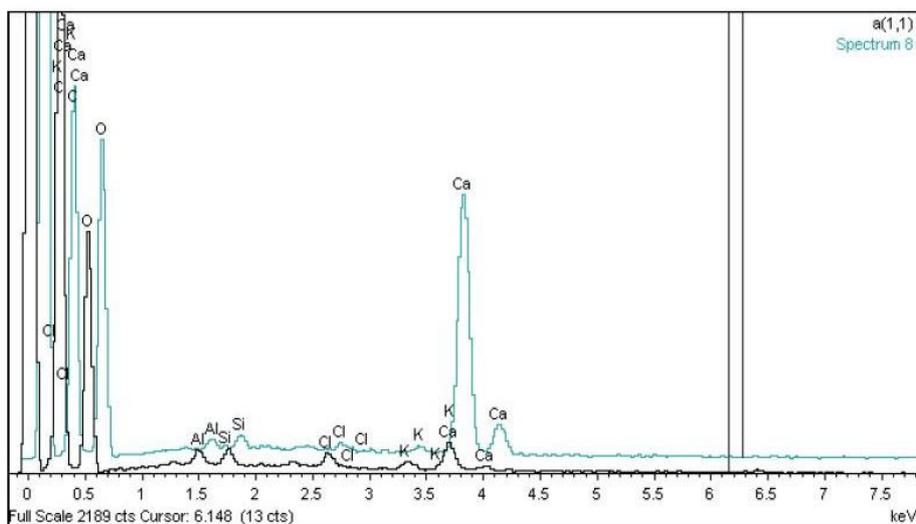
Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
<i>E. chevalieri</i> su Perusia	8,48	A
<i>E. chevalieri</i> su Whatman	2,12	B
<i>E. chevalieri</i> su Mezzofino	1,41	B

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
<i>E. chevalieri</i> su Perusia	8,71	A
<i>E. chevalieri</i> su Mezzofino	4,12	B
<i>E. chevalieri</i> su Whatman	2,56	C

La microanalisi effettuata sulle carte inoculate con i funghi ha permesso di rilevare come questi ultimi non siano determinanti per il contenuto in microelementi della carta, sebbene si possa notare una correlazione tra l'*A. terreus* e l'elemento calcio. Questo fungo, infatti, è in grado di produrre ossalati trasformando il calcio, già presente come carbonato nella carta, in ossalati di calcio. Tale caratteristica, riscontrabile solo sulla carta Perusia poichè l'unica ad avere calcio nella composizione di partenza, è emersa sia dalle osservazioni delle immagini ottenute al SEM, dove i cristalli di ossalato sono chiaramente visibili come strutture regolari bianche addossate alle fibre di cellulosa, sia nella microanalisi topografica effettuata sui singoli cristalli. Inoltre confrontando gli spettri effettuati su una zona pulita della carta (**nero**) e su un cristallo (**azzurro**) si può chiaramente notare la presenza di un picco del calcio nel secondo spettro non riscontrabile nel primo, a testimonianza della presenza di ossalati di calcio (Fig. 25-26). Il fatto che si tratti di ossalati è stato accertato in un precedente lavoro (Pinzari *et al.*, 2010).

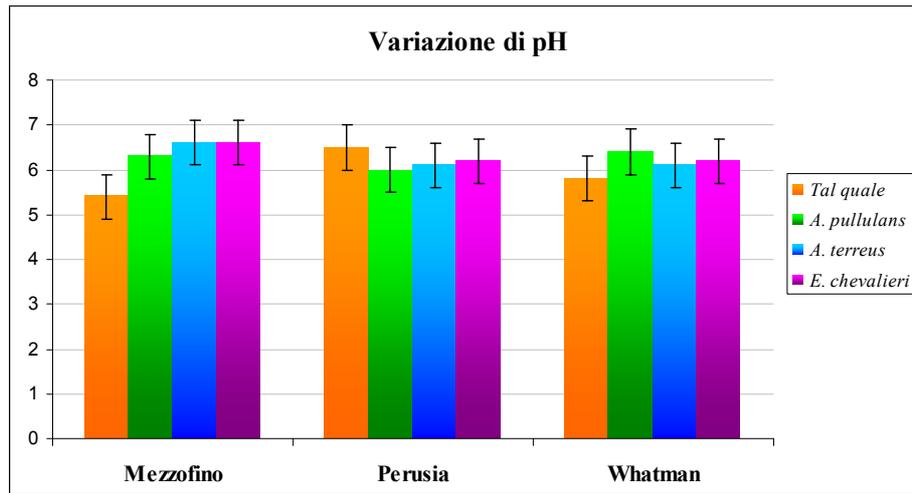


**Figura 25.** Carta Perugia inocolata con *A. terreus* osservata al microscopio elettronico a scansione (1000x).



**Figura 26.** Spettro relativo alla microanalisi eseguita su una zona pulita (nero) e su un cristallo (azzurro).

Le analisi di pH superficiale effettuate sui campioni hanno risentito della difficoltà di eseguire correttamente le misure in quanto la goccia d'acqua necessaria raramente è rimasta tale permettendone una corretta misurazione; mentre la maggior parte delle volte si è subito espansa su tutto il campione rendendone molto difficoltosa la procedura. Dalle analisi eseguite sui campioni di carta inoculati con i funghi, comunque, non emergono differenze statisticamente significative tra la carta tal quale e dopo gli inoculi fungini. Di seguito si riporta l'istogramma relativo ai valori medi di pH (Graf. 2).



**Grafico 2.** Analisi ANOVA dei valori di pH delle carte Mezzofino, Perusia e Whatman prima e dopo gli inoculi fungini (*A. pullulans*, *A. terreus* ed *E. chevalieri*). Valori medi di 5 repliche.

Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media.

#### 4.3 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei trattamenti enzimatici

Una prima valutazione degli effetti sulle carte dei trattamenti nel loro complesso ha riguardato le modifiche chimiche apportate rispetto alla composizione originaria. Si tratta di una questione delicata dal momento che qualsiasi microelemento aggiunto ad una carta potrebbe, nell'immediato o nel tempo, indurvi modificazioni indesiderate del colore o della resistenza meccanica.

La microanalisi ha messo in evidenza alcune modificazioni nella composizione elementare delle carte, come si evince dai valori medi del contenuto dei singoli elementi chimici riportati nella tabella 10. La significatività delle differenze fra i gruppi di campioni analizzati è stata valutata per mezzo dell'analisi ANOVA e dal successivo test di Tukey, relativo all'analisi delle differenze tra le categorie, con un intervallo di attendibilità del 95%.

**Tabella 10. Composizione chimica elementale (ppm) dei campioni.**

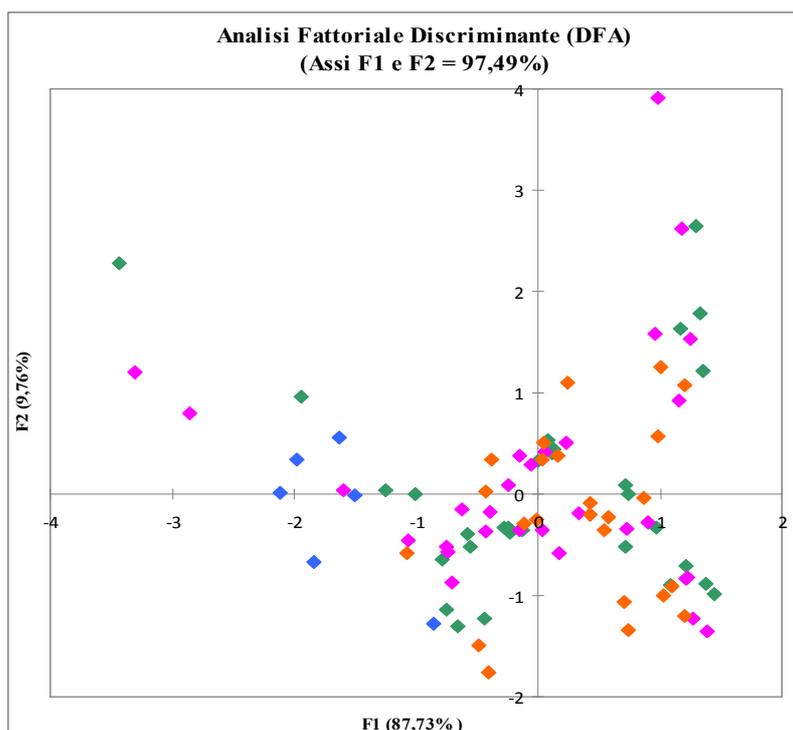
I dati sono relativi a tutte le carte e a tutte e tre le specie di funghi inoculati. nt - campioni di carta non trattati; nt\_F - campioni di carta inoculati con i funghi filamentosi e non trattati; t\_F - campioni inoculati e trattati con enzimi per la rimozione delle macchie fungine. Valori medi di 9 repliche  $\pm$  Deviazione standard.

	nt		nt_F		t_F	
	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
<b>Mg</b>	416,2	128,7	214,3	95,5	173,4	95,0
<b>Al</b>	66,4	17,9	946,3	178,3	1581,6	325,5
<b>Si</b>	524,3	125,8	1402,4	265,1	2607,5	488,7
<b>K</b>	---	---	965,3	214,0	1194,2	200,0
<b>P</b>	---	---	65,7	41,0	1985,3	364,0
<b>S</b>	18,0	6,7	153,0	58,4	136,8	82,3
<b>Cl</b>	18,6	6,7	814,8	150,1	94,5	68,7
<b>Ca</b>	380,3	63,5	8067,3	1622,7	11831,4	2703,3

In generale si può notare come la concentrazione di alluminio (Al), silice (Si), e calcio (Ca) aumenti sia dopo l'inoculo fungino che dopo il trattamento, mentre quella di magnesio (Mg) diminuisca. Inoltre è possibile riscontrare la comparsa di potassio (K) e fosforo (P), prima non presenti, e di zolfo (S) e cloro (Cl) presenti solo in traccia, nei campioni di carta sia a seguito dell'inoculo fungino che del successivo trattamento di pulitura.

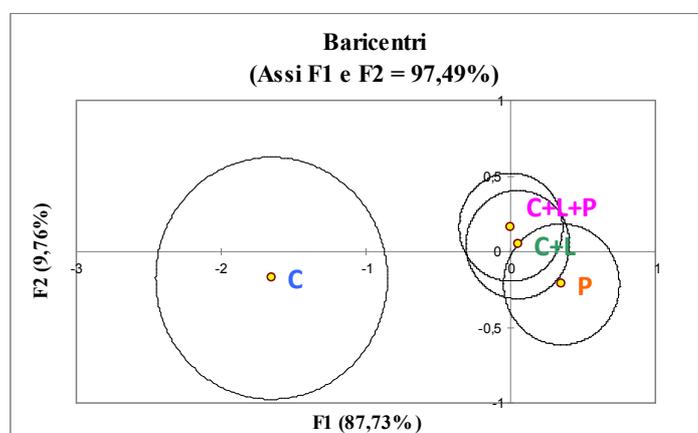
Successivamente sono stati analizzati i dati colorimetrici complessivi al fine di verificare in quale misura i trattamenti enzimatici abbiano influito sulla colorazione delle macchie.

Dall'analisi fattoriale discriminante, effettuata utilizzando come criterio di raggruppamento i differenti trattamenti enzimatici (diverse combinazioni dei tre enzimi, con e senza gel), emerge una bassa significatività della classificazione. Infatti quasi tutti i gruppi, ovvero i trattamenti, risultano mescolati, indicando una bassa "forza" delle categorie individuate a priori per l'analisi e, quindi, la creazione di un modello di classificazione debole, incapace di distinguere nella massa dei campioni quelli trattati in un modo piuttosto che in un altro. Fa eccezione il raggruppamento relativo al trattamento del solo enzima chitinasi come si evince dal grafico 3.



**Grafico 3.** Analisi fattoriale discriminante (DFA) effettuata utilizzando come criterio di raggruppamento i differenti trattamenti enzimatici effettuati su tutte le carte inoculate con i tre funghi scelti (F1=  $\Delta E$  e F2=  $\Delta L$ ).  $\blacklozenge$  P - proteasi;  $\blacklozenge$  C+L+P - chitinasi, lipasi e proteasi;  $\blacklozenge$  C - chitinasi;  $\blacklozenge$  C+L - chitinasi e lipasi. Valori medi di 5 repliche.

Questo dato si apprezza in maniera ancora più marcata se si considera il grafico 4 che riporta solo i baricentri dei gruppi senza tutte le osservazioni. Il gruppo dei campioni trattati con chitinasi è classificato dal modello al 50%, anche se poi nel complesso l'elevata variabilità, dovuta alla peculiarità delle macchie fungine ottenute sulle diverse carte, porta ad una scarsa separazione dei restanti gruppi.



**Grafico 4.** Analisi fattoriale discriminante: baricentri dei raggruppamenti eseguiti secondo i trattamenti enzimatici.

Dal test Tukey's HSD effettuato sui valori di variazione di colore ( $\Delta$ ), prima e dopo i trattamenti enzimatici su tutti i campioni di carta, emergono differenze statisticamente significative solo nel caso della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) a seconda dell'enzima utilizzato (Tab. 11).

**Tabella 11. Test Tukey's HSD eseguito sui valori della variazione di colore ( $\Delta$ ) dei campioni trattati con gli enzimi.**

Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi	Media - $\Delta b$	Gruppi	Media - $\Delta L$	Gruppi	Media - $\Delta E$	Gruppi
P	0,021	A	-1,038	A	3,791	A	4,601	A
C+L	0,117	A	-0,734	A	2,598	A B	3,999	A
C+L+P	0,108	A	-0,788	A	2,148	A B	3,875	A
C	-0,450	A	-0,162	A	-0,890	B	1,960	A

Inoltre il test t-Student eseguito sui valori di differenza di colore prima e dopo i trattamenti enzimatici applicati su tutti i campioni non evidenzia alcuna differenza statisticamente apprezzabile tra l'applicazione enzimatica a gocce o l'utilizzo del gel come supporto. Mentre dai risultati relativi ai tempi di posa, emerge una differenza statisticamente significativa nel caso della variazione della luminosità ( $\Delta L$ ) che risulta maggiore per i 30 minuti di posa rispetto ai 60 minuti (Tab. 12).

**Tabella 12. Test t-Student eseguito sulle variazioni di colore delle carte inoculate con i funghi e sottoposte a trattamento enzimatico sulla base dei tempi di posa.**

Valori medi di 5 repliche.

Categoria	Media - $\Delta a$	Media - $\Delta b$	Media - $\Delta L$	Media - $\Delta E$
30 min	0,16	-0,99	3,49	4,46
60 min	-0,02	-0,67	1,90	3,66

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta L$ ).

Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -3,077; -0,098 [.

Differenza	-1,588
t (Valore Osservato)	-2,152
t (Valore Critico)	2,020
GDL	79
p-value (bilaterale)	< 0,034
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Dopo questa prima serie di considerazioni eseguite sulla base dei risultati di colore relativi all'insieme dei campioni, sono stati scelti i trattamenti più efficaci, caso per caso, e su di essi sono

state eseguite ulteriori misure per avere un più ampio intervallo di valori da utilizzare nei confronti statistici dei singoli trattamenti (Tab. 13).

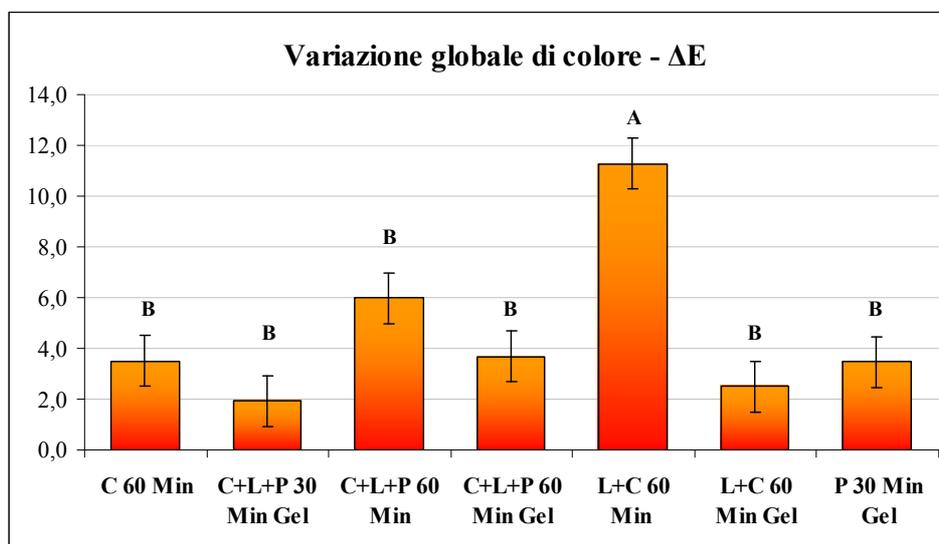
**Tabella 13. Elenco dei trattamenti scelti per eseguire le repliche.**

C - trattamento con chitinasi; L+C - trattamento con lipasi e chitinasi;

C+L+P - trattamento con chitinasi, lipasi e proteasi; P - trattamento con proteasi.

Fungo	Carta	Trattamento	Applicazione	Tempo di posa
<i>A. pullulans</i>	Mezzofino	C	gocce	60 min
	Perusia	L+C	gel	60 min
	Whatman	C+L+P	gel	60 min
<i>A. terreus</i>	Mezzofino	C+L+P	gocce	60 min
	Perusia	L+C	gocce	60 min
	Whatman	C+L+P	gocce	30 min
<i>E. chevalieri</i>	Mezzofino	P	gel	30 min
	Perusia	C+L+P	gocce	60 min
	Whatman	P	gel	30 min

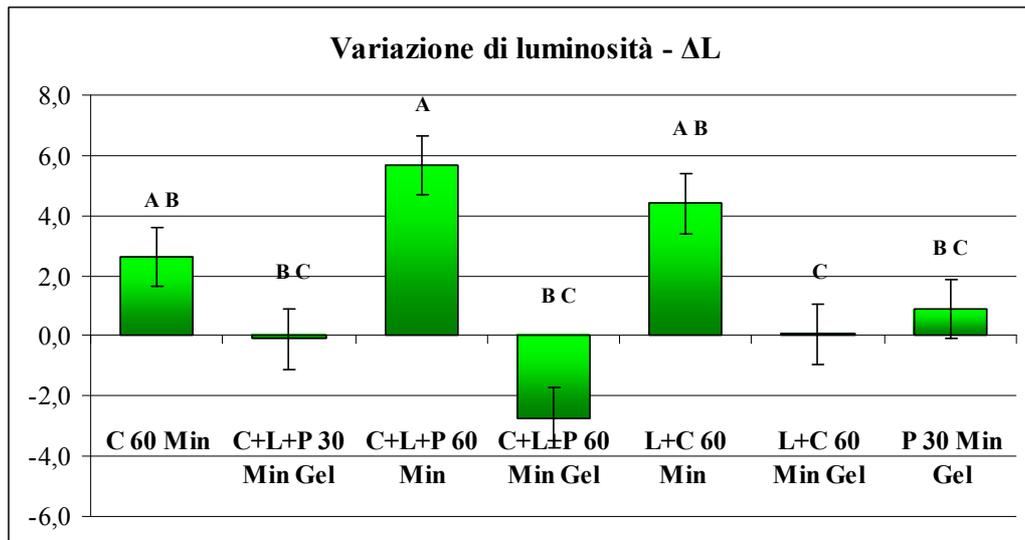
Un primo confronto è stato condotto fra i valori di variazione “globale” di colore ( $\Delta E$ ) apportati dai trattamenti selezionati, sui campioni di carta macchiati, perché capaci di modificare in qualche modo l'apparenza delle macchie. I valori medi del  $\Delta E$  dei trattamenti “vincenti” sono riportati nell'istogramma sottostante (Graf. 5).



**Grafico 5.** Analisi ANOVA dei valori della variazione “globale” di colore di tutti i funghi sulle tre carte a seguito dei trattamenti. L+C - trattamento con lipasi e chitinasi; C - trattamento con chitinasi; C+L+P - trattamento con chitinasi, lipasi e proteasi; P - trattamento con proteasi. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

L'analisi ANOVA restituisce delle differenze significative fra le intensità della variazione “globale” di colore ( $\Delta E$ ) indotta dai diversi trattamenti di biopulitura impiegati. Nel grafico, infatti, spicca l'efficacia della miscela lipasi e chitinasi applicata per 60 minuti in goccia (L+C 60Min).

Nel caso della variazione della luminosità ( $\Delta L$ ), invece, dall'ANOVA emerge che il trattamento migliore è quello costituito dalla miscela chitinasi, lipasi e proteasi applicata per 60 minuti in goccia (C+L+P 60Min) e, a seguire, la miscela lipasi e chitinasi applicata per 60 minuti in goccia (L+C 60Min) (Graf. 6).



**Grafico 6.** Analisi ANOVA dei valori della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) di tutti i funghi sulle tre carte dopo i vari trattamenti. C - trattamento con chitinasi; C+L+P - trattamento con chitinasi, lipasi e proteasi; L+C - trattamento con lipasi e chitinasi; P - trattamento con proteasi. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

Infine anche i cambiamenti sostanziali del grado sia di verde ( $\Delta a$ ) sia di giallo ( $\Delta b$ ) delle macchie si è avuto grazie all'utilizzo della miscela lipasi e chitinasi applicata per 60 minuti (L+C 60min), come è messo in evidenza nella tabella 14.

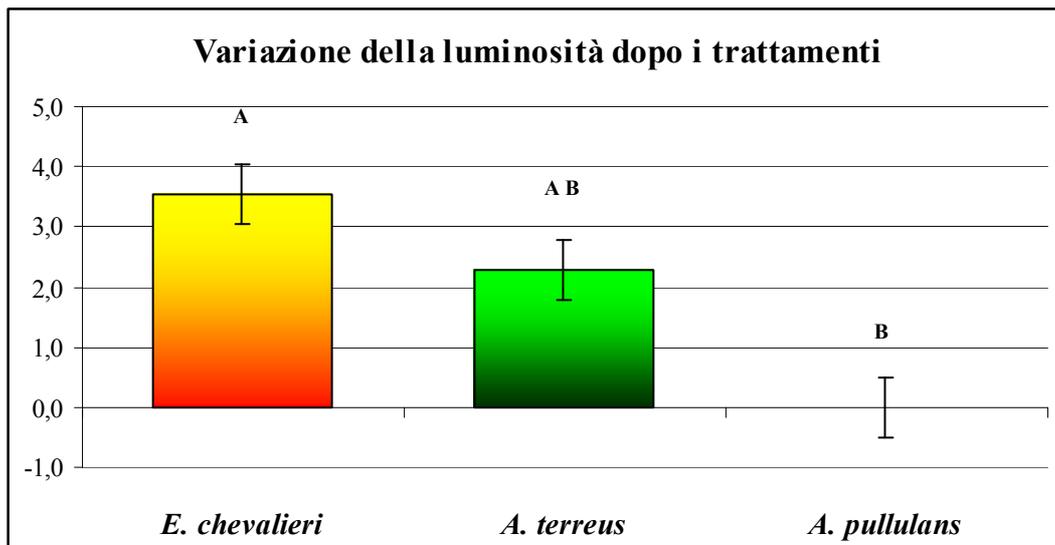
**Tabella 14. Confronto sulle coordinate di colore tra i diversi trattamenti enzimatici applicati ai campioni.**

Valori medi di 5 repliche. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi
L+C 60 Min	1,75	A
P 30 Min Gel	0,56	A B
C 60 Min	0,31	A B
L+C 60 Min Gel	0,17	B
C+L+P 30 Min Gel	0,07	B
C+L+P 60 Min Gel	-0,14	B
C+L+P 60 Min	-0,25	B

Categoria	Media- $\Delta b$	Gruppi
L+C 60 Min	8,85	A
C 60 Min	1,66	B
C+L+P 60 Min Gel	1,42	B
L+C 60 Min Gel	0,41	B
C+L+P 30 Min Gel	-0,71	B
C+L+P 60 Min	-1,42	B
P 30 Min Gel	-1,95	B

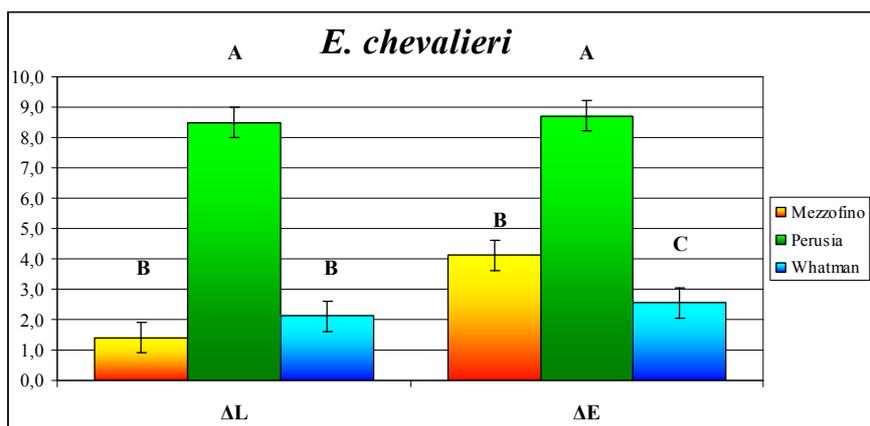
Come accennato, differenze molto marcate sono state riscontrate soprattutto fra le reazioni dei differenti funghi ai trattamenti applicati per rimuoverne gli effetti sulle carte. In generale può essere fatta qualche considerazione su quale fungo sia stato maggiormente rimosso od i cui effetti siano stati più efficacemente minimizzati a seguito dei trattamenti enzimatici. Nel grafico 6 sono riportati i valori medi della variazione della luminosità ( $\Delta L$ ) rispetto alle singole specie fungine. Dall'istogramma si nota come il valore più elevato del  $\Delta L$  sia quello corrispondente all'*E. chevalieri*.



**Grafico 7.** Analisi ANOVA dei valori della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) di tutti i funghi sulle tre carte a seguito di tutti i trattamenti. C - trattamento con chitinasi; C+L+P - trattamento con chitinasi, lipasi e proteasi; L+C - trattamento con lipasi e chitinasi; P - trattamento con proteasi. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

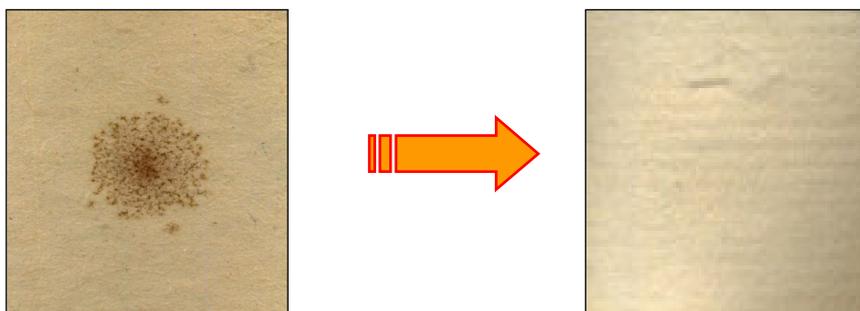
Dall'analisi ANOVA effettuata sui valori della variazione di colore ( $\Delta$ ) prima e dopo i trattamenti enzimatici delle macchie causate da *E. chevalieri* sulle tre differenti tipologie di carta, emergono differenze statisticamente significative fra tutte e tre le carte in termini di resa dei trattamenti. Risulta cioè diverso l'effetto del trattamento sulle macchie fungine causate sulle carte dai due funghi a seconda che si consideri una tipologia di carta piuttosto che un'altra.

La carta Perugia si differenzia dalle altre due per il valore della variazione globale di colore ( $\Delta E$ ) ed di luminosità ( $\Delta L$ ) dopo i trattamenti. Nel grafico 8 sono riportati come barre dell'istogramma i valori medi della variazione di colore ( $\Delta$ ) ottenuti dalle tre carte macchiate con *E. chevalieri* e trattate con enzimi. Si riportano anche i rispettivi risultati del test di Tukey (lettere in maiuscolo sulle barre degli istogrammi) ad indicare come tutti i confronti portino a differenze statisticamente significative almeno di una carta rispetto alle altre due sperimentate.



**Grafico 8.** Analisi ANOVA dei valori medi delle variazioni di colore ( $\Delta$ ) prima e dopo i trattamenti delle tre carte inoculate con *E. chevalieri*.  $\Delta L$ : variazione della luminosità;  $\Delta E$ : variazione globale di colore. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

In effetti la macchia prodotta dal fungo dopo il trattamento migliora sensibilmente così come può essere osservato nella figura 25.



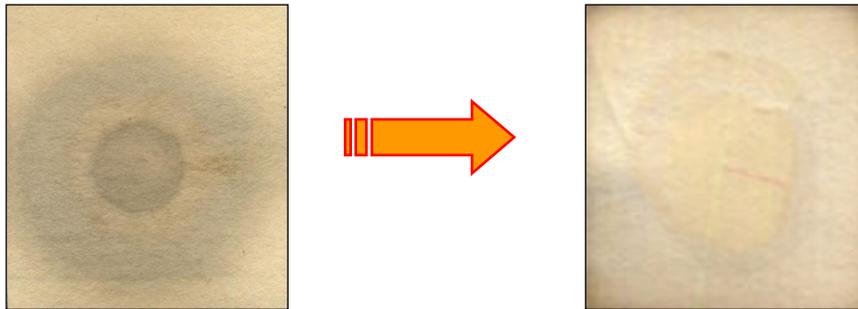
**Figura 25.** Esempio: carta Perusia inoculata con *E. chevalieri* prima e dopo il trattamento enzimatico con chitinasi, lipasi e proteasi per 60 minuti.

Analogo è il caso dell'*A. terreus*. Dall'analisi ANOVA e dal successivo test di Tukey's HSD, per il confronto dei valori medi delle variazioni di colore ( $\Delta$ ) ottenuti dalle tre carte macchiate con *A. terreus* e trattate con gli enzimi, emerge come alcuni confronti portino a differenze statisticamente significative (Tab. 15).

**Tabella 15.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori della variazione di colore ( $\Delta$ ) dei campioni trattati con gli enzimi. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

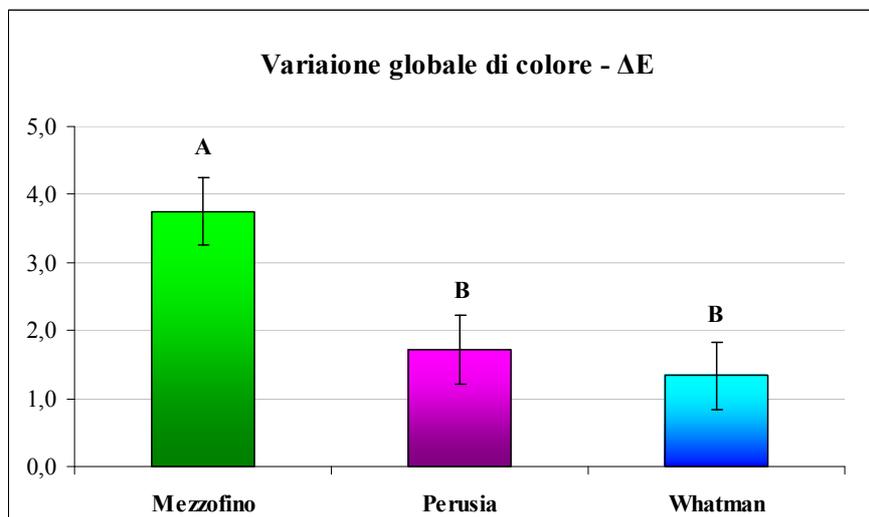
Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi	Media - $\Delta b$	Gruppi	Media - $\Delta L$	Gruppi	Media - $\Delta E$	Gruppi
<b>Mezzofino</b>	0,131	A	0,203	A	1,894	A	2,157	A
<b>Perusia</b>	0,637	B	2,436	B	6,229	B	6,763	B
<b>Whatman</b>	0,218	B	-2,051	C	0,593	C	2,151	B

La differenza più marcata riguarda la variazione di luminosità in base alla quale la carta Perugia presenta valori significativamente molto più elevati rispetto alle altre due carte. A ciò si affianca, sempre in Perugia, un valore significativamente maggiore che nelle altre due carte del  $\Delta b$ , ovvero la differenza fra trattato e non trattato nella coordinata del grado di “giallo”. La figura 26 conferma un sensibile miglioramento della macchia fungina dopo il trattamento.



**Figura 26.** Esempio: carta Perugia inocolata con *A. terreus* prima e dopo il trattamento con lipasi e chitinasi per 60 minuti.

Diverso è il caso relativo all’*A. pullulans*, dove l’analisi ANOVA eseguita sui valori di differenza di colore prima e dopo i trattamenti enzimatici delle macchie causate dall’*A. pullulans* sulle tre differenti tipologie di carta ha messo in evidenza che per tutte e tre le carte i trattamenti enzimatici determinano una variazione globale di colore ( $\Delta E$ ) positiva, più marcata per la carta Mezzofino (Graf. 9).



**Grafico 9.** Analisi ANOVA dei valori della variazione “globale” di colore ( $\Delta E$ ) delle carte Mezzofino, Perugia e Whatman inocolate con il fungo *A. pullulans*. Differenti lettere sulle barre dell’istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey’s HSD. Valori medi di 5 repliche.

Le barre d’errore indicano le deviazioni standard dalla media.

Nel caso delle macchie indotte da questo fungo su carta Whatman, invece, sono quelle che presentano un maggior cambiamento delle coordinate di colore verso valori negativi dopo i

trattamenti enzimatici rispetto alle altre carte impiegate nella sperimentazione. Il test t-Student, però, non evidenzia una differenza significativa per quanto riguarda le coordinate di colore, ma in questo caso particolare i campioni non trattati presentano un valore di luminosità più elevato rispetto a quelli trattati. I trattamenti hanno avuto cioè un effetto negativo sull'aspetto delle macchie prodotte dall'*A. pullulans*, rendendole più scure.

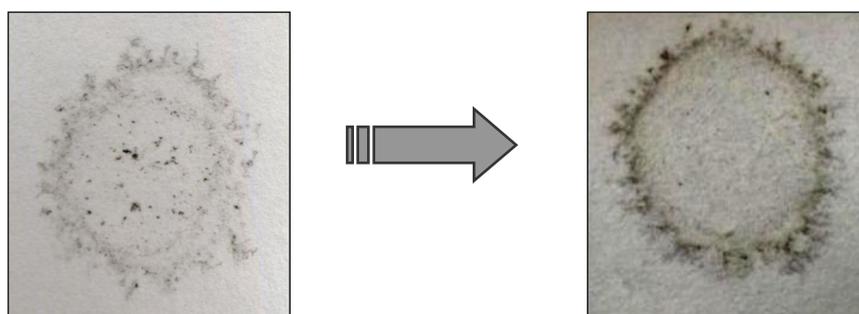
Infine possono essere fatte considerazioni più mirate possono essere condotte analizzando le variazioni di colore intese non come “delta” ( $\Delta$ ), ovvero differenze rispetto al non trattato, ma come spostamento delle tre coordinate di colore  $L^*a^*b^*$  dopo i singoli trattamenti enzimatici per le tre tipologie di carta messe assieme. Anche in questo caso l'ANOVA non restituisce differenze statisticamente significative, ma i valori medi delle misure delle tre coordinate dei campioni non trattati (nt) sono tendenzialmente più elevati sia per la coordinata b (misura dell'intensità nel giallo) che per la coordinata L (luminosità) rispetto ai campioni trattati (t) (Tab. 16).

**Tabella 16. Test Tukey's HSD eseguito sulle coordinate di colore  $L^*a^*b^*$  delle carte inoculate con *A. pullulans* e trattate con enzimi.**

Valori medi di 5 repliche. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - a	Gruppi	Media - b	Gruppi	Media - L	Gruppi
nt	1,44	A	10,14	A	78,86	A
C	1,35	A	9,83	A	77,80	A
C+L	1,01	A	9,61	A	77,52	A
C+L+P	0,97	A	9,39	A	77,30	A

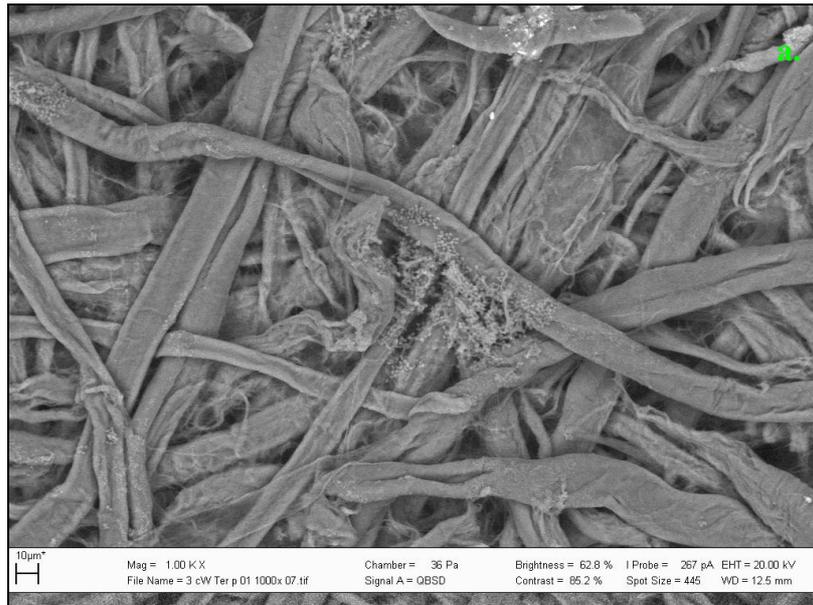
Sebbene la differenza tra i diversi trattamenti non sia significativa, complessivamente i campioni non trattati presentino valori di luminosità più elevati dei campioni trattati. Risultato visibile anche ad occhio nudo come mostra la figura 27.



**Figura 27.** Esempio: carta Whatman inoculata con *A. pullulans* prima e dopo il trattamento con chitinasi, lipasi e proteasi su gel per 60 minuti.

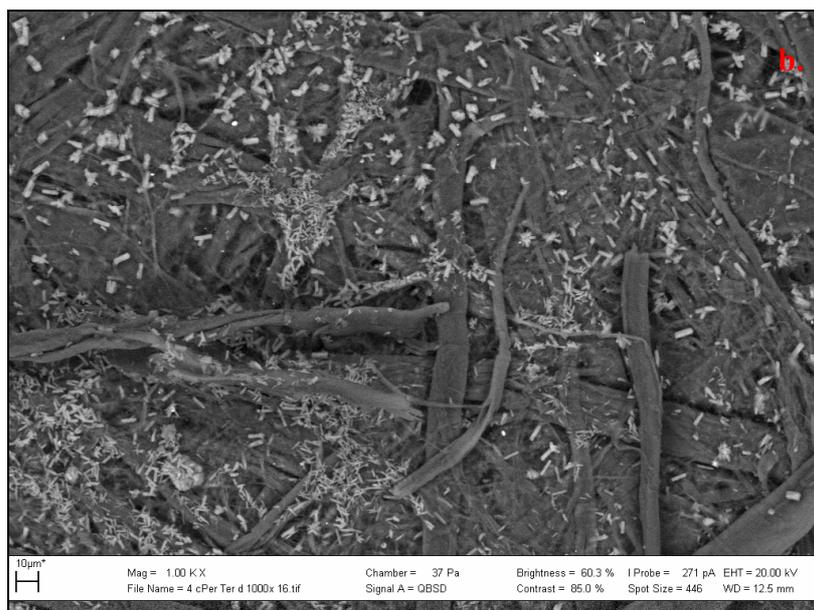
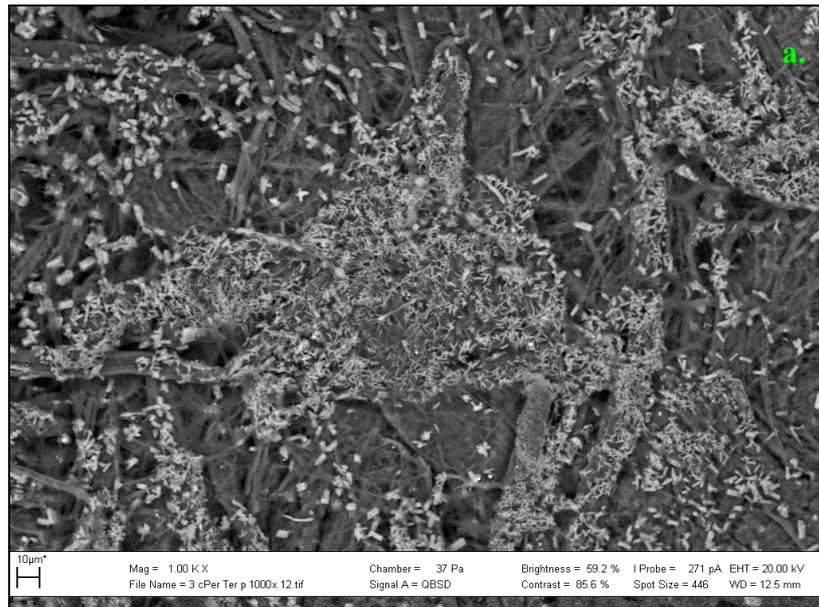
Un'osservazione interessante può essere fatta analizzando opportunamente l'aspetto microscopico del micelio fungino residuo sui campioni cartacei dopo i trattamenti. Dalle immagini ottenute al

SEM (Fig. 28÷30) si nota come a seguito dei trattamenti enzimatici la presenza del fungo sulla superficie dei campioni cartacei sia fortemente ridotta, se non del tutto eliminata, anche quando la macchia rimane, invece, presente sul campione, nella forma di un mutamento deturpante del colore. L'azione meccanica del pennello, necessaria per la rimozione delle soluzioni enzimatiche, ha sicuramente aiutato la rimozione delle spore e del micelio superficiali. Risulta evidente che, nella maggior parte dei casi analizzati, il fungo rilascia il pigmento nel substrato o cresce internamente alle fibre di cellulosa, che sono notoriamente cave. Pertanto non è sufficiente rimuovere il micelio superficiale per poter eliminare le macchie prodotte dai funghi.

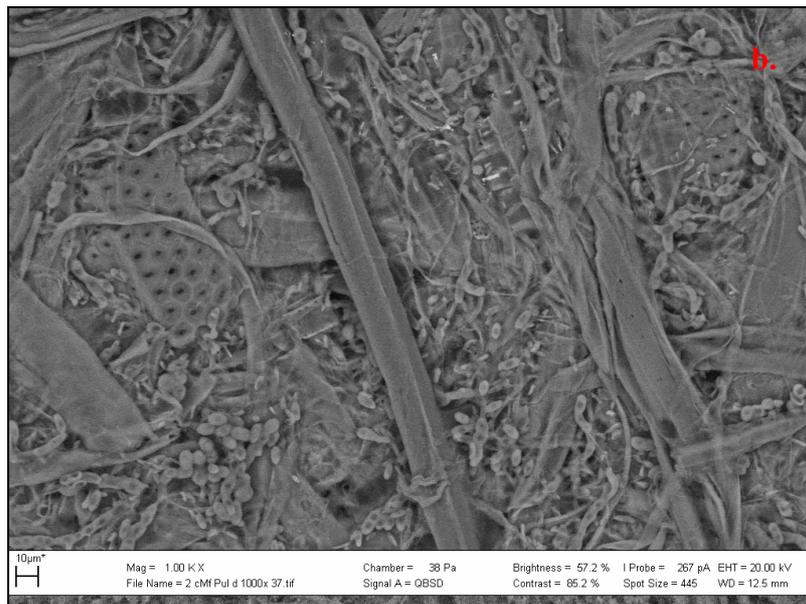
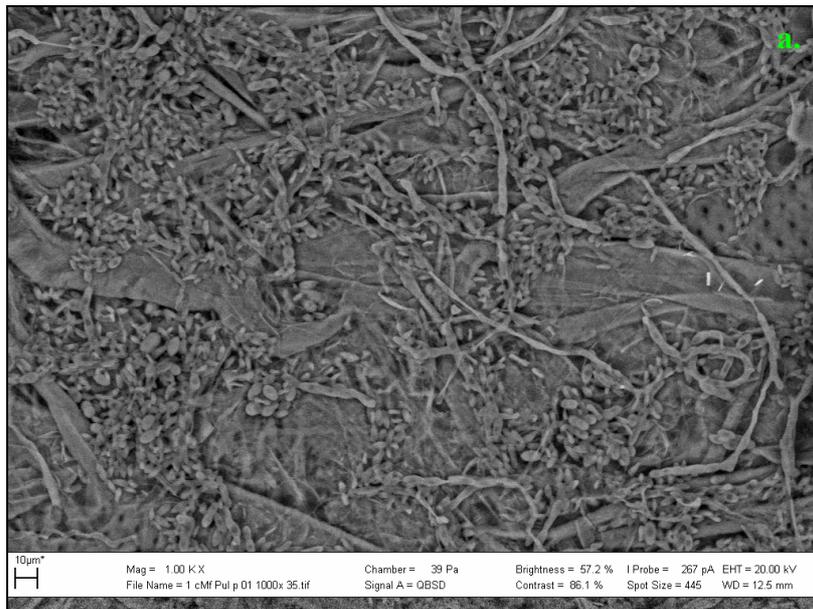


**Figura 28.** *E. chevalieri* su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento (1000x).

Il fungo *E. chevalieri* si sviluppa all'interno della carta producendo conidiofori pigmentati di colore marrone che si proiettano perpendicolari al substrato. Dopo i trattamenti enzimatici il fungo non è più presente, ma è evidente la degradazione di alcune fibre dovuta all'attività cellulolitica dell' *E. chevalieri*.



**Figura 29.** *A. terreus* su carta Perugia prima (a.) e dopo (b.) il trattamento (1000x). Il fungo produce ossalati di calcio, visibili nella foto come cristalli bianchi di forma rafidica. Nell'immagine relativa al campione trattato si nota solo in parte la rimozione dei cristalli, ad indicare come questi siano saldamenti ancorati alle fibre della carta.



**Figura 30.** *A. pullulans* su carta Mezzofino prima (a.) e dopo (b.) il trattamento (1000x).

In queste immagini si può notare la massiccia presenza di conidi e di ife fungine che restano fra le fibre di carta anche dopo i trattamenti enzimatici: ciò a testimonianza che il fungo è estremamente ancorato al substrato e, quindi, difficile da eliminare.

I risultati delle analisi confermano quello che visivamente è stato il risultato ottenuto sui campioni. *L'A. pullulans* è il fungo che meno di tutti viene intaccato dal trattamento. Del resto è l'unico dei tre utilizzati nella sperimentazione a produrre una macchia melanica e quindi senza dubbio di più

difficile eliminazione. I risultati delle misurazioni colorimetriche, eseguite dopo i trattamenti con enzima chitinasi, mostrano una diminuzione nei valori della luminosità, ma lasciano comunque pensare ad un'effettiva azione dell'enzima.

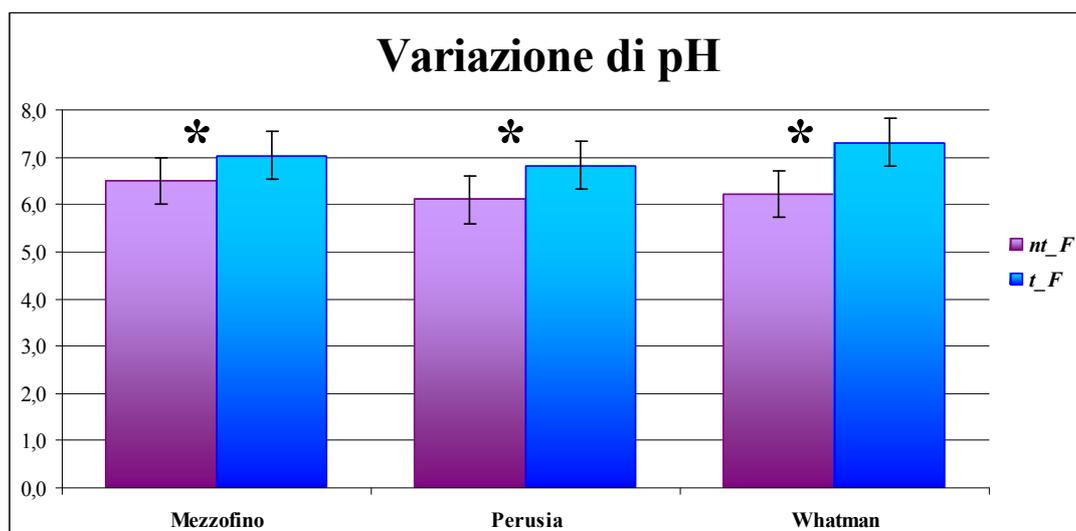
Il pH delle carte è stato monitorato durante tutta la sperimentazione. Un qualsiasi trattamento di pulitura o di restauro può, infatti, essere efficace nell'eliminare la macchia fungina dalla carta, ma comportare un cambiamento nocivo del pH tale da renderne sconsigliabile l'utilizzo nonostante l'efficacia.

Il pH per i supporti cartacei rappresenta un fattore fondamentale per la loro stabilità chimica poiché da esso dipendono i processi di idrolisi, che comportano la rottura dei legami presenti nella cellulosa e quindi fragilità della carta. Il trattamento con acidi degrada la struttura polimerica della cellulosa e la reazione e la sua velocità dipendono fortemente dal pH. Anche un ambiente fortemente alcalino, in condizioni di temperatura elevata, può causare scissione idrolitica in qualsiasi punto della catena e, quindi, degradazione polimerica (Bettolo, 2007).

I valori di pH delle carte trattate e non trattate sono stati analizzati con l'ANOVA. Dagli istogrammi che riportano i valori medi di un minimo di 5 misure per macchia, si evince che, rispetto alle carte inoculate con i funghi e non ancora trattate, tutte le macchie che hanno subito i trattamenti enzimatici hanno presentato un aumento del valore di pH. Ciò va ricondotto anche alla presenza del tampone utilizzato per veicolare l'enzima sulle carte. In questa sede, infatti, ci si è preoccupati in via del tutto preliminare a saggiare l'attività sulle carte delle diverse miscele enzimatiche. In prospettiva sarà necessario valutare quale veicolo acquoso possa essere più idoneo per i trattamenti enzimatici su carta, in modo da minimizzare le eventuali interazioni negative con le fibre vegetali da un lato, ma ottimizzarne l'efficacia di pulitura dall'altra.

Gli istogrammi relativi ai valori medi di pH dei campioni di tutte e tre le tipologie di carta ed ai dati dei tre differenti funghi utilizzati per la realizzazione in vitro delle macchie, presi separatamente, hanno un andamento molto simile. Tutti i trattamenti permettono alle carte di mantenere un pH compreso tra 6,0 e 7,5, grazie anche al tampone fosfato con pH intorno a 7,0, utilizzato per veicolare le miscele enzimatiche sulle carte.

Nel caso delle carte Mezzofino e Whatman, facendo dei confronti tra prima e dopo il trattamento, è possibile mettere in evidenza delle differenze statisticamente significative attraverso il test t-Student (Graf. 10).



**Grafico 10.** Analisi ANOVA dei valori di pH delle carte Mezzofino, Perugia e Whatman inoculate con i funghi *A. pullulans*, *A. terreus* ed *E. chevalieri*, non trattate (nt) e trattate (t). Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Gli asterischi sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

Nel grafico 10 si può notare come il valore di pH delle tre carte si alzi in modo statisticamente significativo di circa un punto fra non trattato e trattato, sempre tenendo conto della variabilità del dato, in corrispondenza dell'intera area interessata dalle macchie fungine. Rispetto a prima del trattamento il valore di pH rimane entro valori neutrali, in teoria comunque ben tollerati dalla carta. Pertanto i trattamenti enzimatici testati nella sperimentazione non sembrano comportare, a livello del pH di superficie, effetti secondari nocivi per il substrato cartaceo.

#### 4.4 Prove di pulitura mediante l'applicazione dei trattamenti batterici

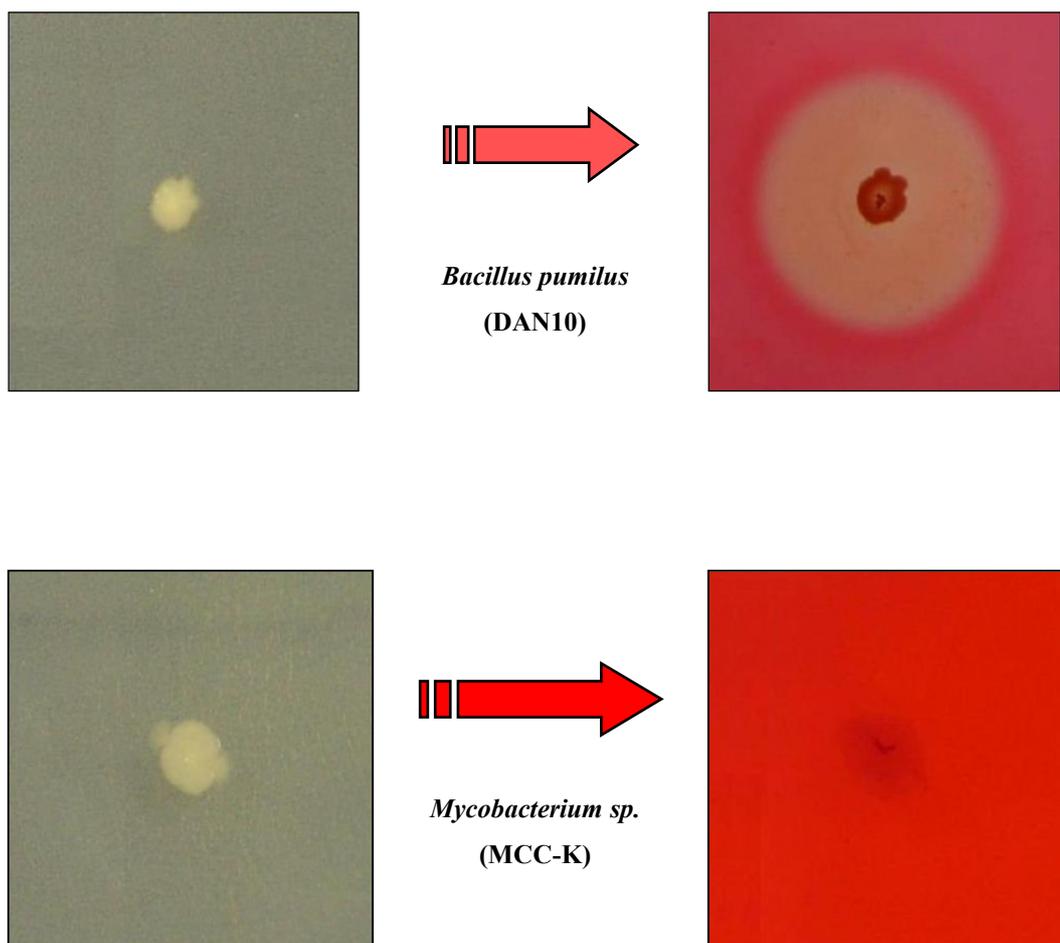
La selezione dei ceppi batterici, appartenenti alla Collezione *ENEA-Lilith*, è stata effettuata sulla base delle loro potenzialità metaboliche: in particolare i batteri sono stati selezionati per la capacità di degradare il micelio e le spore fungine che colonizzano la carta e/o per la capacità di degradare il pigmento melanico dell'*A. pullulans*. Nel primo caso l'attenzione è stata rivolta verso batteri chitinolitici (Tab. 9) (Park *et al.*, 2000; Folders *et al.*, 2001; Frankowski *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Gohel *et al.*, 2005; Someya *et al.*, 2011). Nel secondo caso, invece, lo studio delle fonti bibliografiche (Diamantidis *et al.*, 2000; Ramachandran *et al.* 2000; Suzuki *et al.*, 2003; Kiiskinen *et al.*, 2004; Machczynski *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2006; Niladevi, 2008; Madhavi *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2011; Le Roes-Hill *et al.*, 2011; Imran *et al.*, 2012) ha consentito di individuare alcuni ceppi batterici aventi caratteristiche e potenzialità simili a quelle riscontrate nei *white rot fungi*, ovvero complessi enzimatici ligninolitici in grado di attuare un processo di

degradazione nei confronti delle melanine: *Streptomyces mauvecolor* (UW43), *Streptomyces spororaveus* (UT8), *Streptomyces heteromorphus* (OSS34), *Nocardia alba* (TPID5) ed un ceppo della specie *Streptomyces coelicolor* (UR2) appartenente alla collezione ceppi dell'Università Friedrich Schiller di Jena (Germania).

Chiaramente dalla selezione sono stati esclusi microrganismi patogeni o, in qualche modo, nocivi sia per gli operatori sia per i materiali che si vogliono pulire, ed i ceppi sporigeni, cioè capaci di sopravvivere in forma di spora quiescente anche dopo lunghi intervalli di tempo.

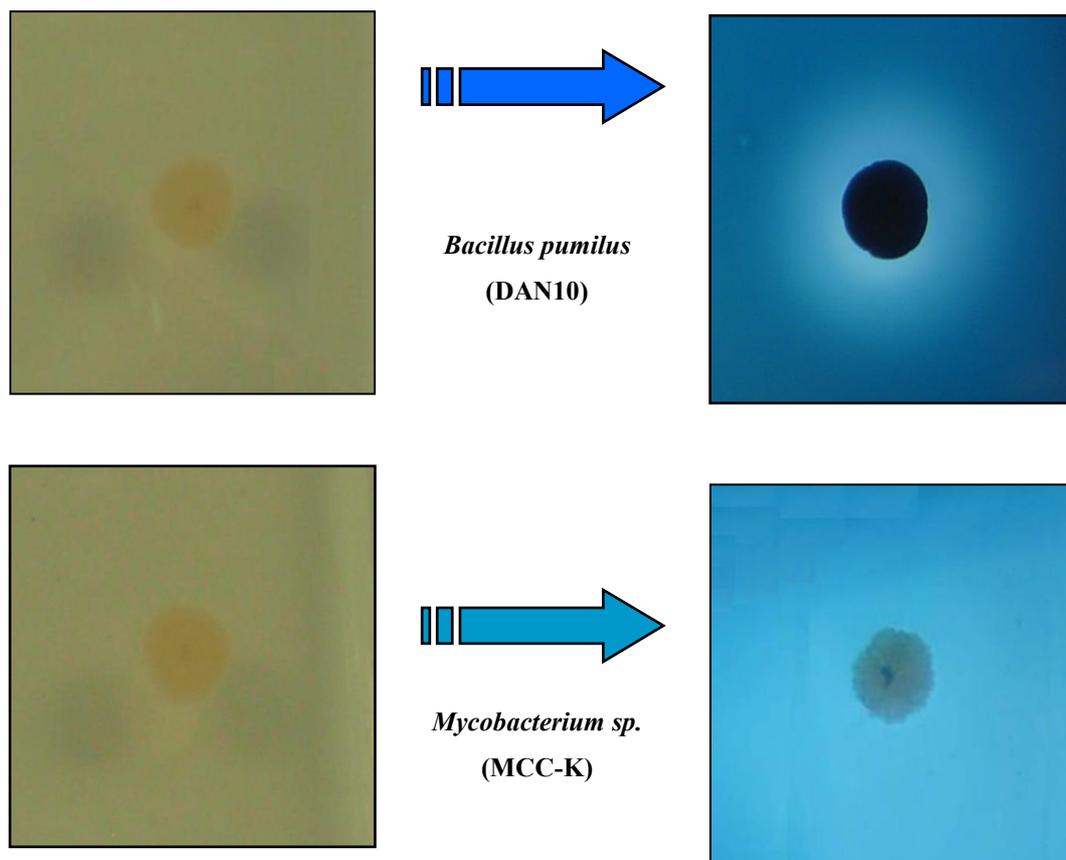
#### *Screening dell'attività cellulosolitica, proteolitica e chitinolitica*

L'idrolisi della cellulosa e della gelatina si sono manifestate sotto forma di aloni di chiarificazione resi visibili grazie all'utilizzo di soluzioni acquose colorate: Congo Red per le piastre contenenti Carbossi Metil Cellulosa (CMC) (Fig. 31) ed Amido Black per le piastre contenenti gelatina (Fig. 32).



**Figura 31.** Test per l'attività cellulosolitica. Nel caso del *Bacillus pumilus* (DAN10) sono ben visibili le zone di idrolisi della CMC manifestatesi sotto forma di aloni di chiarificazione grazie al colorante Congo Red.

Nel caso del *Mycobacterium sp.* (MCC-K) non è avvenuto nessun processo di idrolisi.



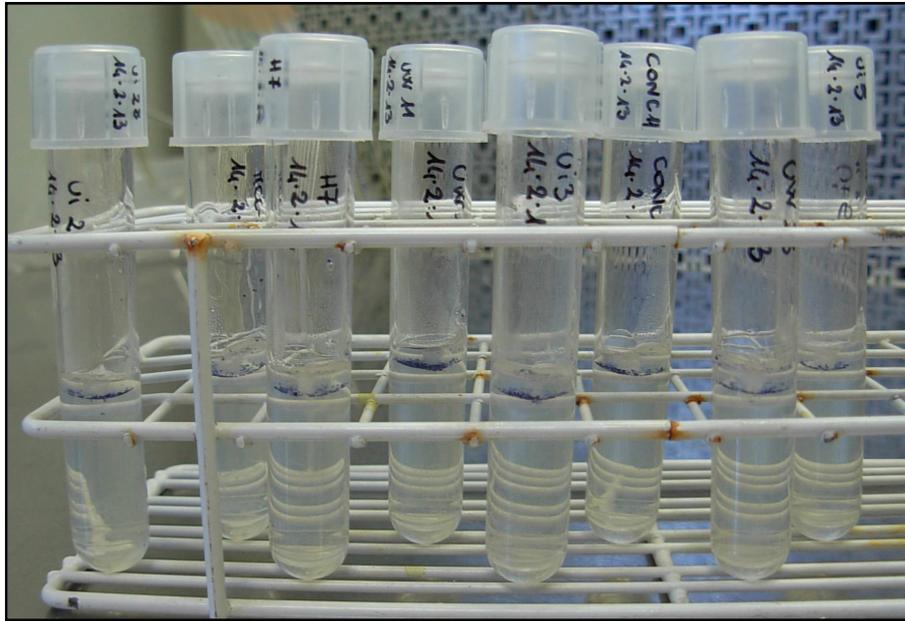
**Figura 32.** Test per l'attività proteolitica. Nel caso del *Bacillus pumilus* (DAN10) sono ben visibili le zone di idrolisi della gelatina manifestatesi sotto forma di aloni di chiarificazione grazie al colorante Amido Black. Nel caso del *Mycobacterium sp.* (MCC-K) non è avvenuto nessun processo di idrolisi.

Infine è stato eseguito il test per l'attività chitinolitica impiegando *chitin azure* a seguito di una modifica al protocollo messo a punto da Smith (Smith, 1977) per la degradazione della cellulosa (Cfr. Par. 3.3.3 *Screening dell'attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica* pp.).

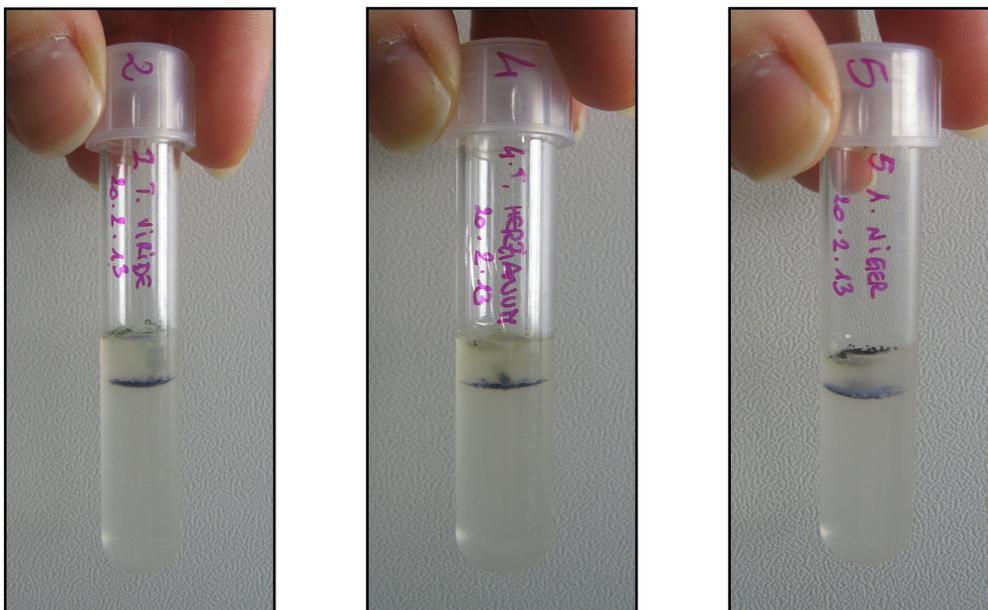
Il test è stato applicato a tutti i batteri selezionati e a tre funghi chitinolitici, quali controllo positivo:

- ✓ *Trichoderma viride* - Pers., *Neues Mag. Bot.*, Vol. 1, p. 92 (1794). Classificazione: Hypocreaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi;
- ✓ *Trichoderma harzianum* - Rifai, *Mycol. Pap.*, Vol. 116, p. 38 (1969). Classificazione: Hypocreaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi;
- ✓ *Aspergillus niger* - Tiegh., *Annl. Sci. Nat., Bot.*, Sér. 5, No. 8, p. 240 (1867). Classificazione: Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi;

A sviluppo completo dei batteri (Fig. 33) e dei funghi (Fig. 34), nessun tubo ha mostrato alcuna evidenza di rilascio del *chitin azure*, come risultato dell'attività chitinolitica, quindi non è stata rilevata nessuna diffusione del colorante nel terreno di base.



**Figura 33.** Test per l'attività chitinolitica secondo il protocollo di Smith (Smith, 1977) opportunamente modificato. Nei tubi in cui sono stati inoculati i batteri selezionati non è possibile rilevare nessuna diffusione del *chitin azure* nel terreno.



**Figura 34.** Test per l'attività chitinolitica secondo il protocollo di Smith (Smith, 1977) opportunamente modificato. Nei tubi in cui sono stati inoculati i funghi chitinolitici non è possibile rilevare nessuna diffusione del *chitin azure* nel terreno.

Quindi il protocollo attuato non è adatto per determinare l'attività chitinolitica così come è stato applicato da Smith per l'attività cellulolitica, ma ha bisogno di opportune modifiche nonché di ulteriori prove sperimentali per un suo migliore impiego. Pertanto è stato deciso di saggiare l'attività chitinolitica dei ceppi batterici impiegando chitina colloidale (Cfr. Par. 3.3.3 *Screening dell'attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica* pp.).

A seguito dei risultati ottenuti dai tre test di caratterizzazione (Tab. 17) sono stati scelti i seguenti batteri per effettuare le successive prove di biopulitura: UI5 *Serratia ficaria*, MCC-Z *Flavobacterium sp.*, CONC12 *Pseudomonas stutzeri*, UI28 *Bacillus cereus*, UW28 *Arthrobacter sp.*, UW11 *Acinetobacter lwoffii* e UI3 *Bacillus cereus*. Nonostante la presenza di ampie zone di idrolisi della CMC, è stato scelto di utilizzare anche il batterio H7 *Chitinophaga sp.* poichè ha mostrato una spiccata attività proteolitica e, soprattutto, chitinolitica.

**Tabella 17. Attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica dei ceppi batterici selezionati.**

(+ formazione di alone; - assenza di alone)

Specie	Codice Identificativo	CMC	Gelatina	Chitina Colloidale
<i>Serratia ficaria</i>	UI5	-	+/-	+
<i>Bacillus circulans</i>	OSS25	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	DAN10	++	++	-
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	DAN5	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	OSS42	-	-	-
<i>Flavobacterium sp.</i>	MCC-Z	-	+	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CONC12	-	+/-	+
<i>Lysobacter sp.</i>	TSNRS13	-	-	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	CONC18	-	-	-
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	UT20	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	UI28	-	++	+
<i>Arthrobacter sp.</i>	UW28	-	+/-	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	PZ7	++	++	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	UW11	-	+/-	+
<i>Mycobacterium sp.</i>	MCC-K	-	-	-
<i>Chitinophaga sp.</i>	H7	++	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	UI3	-	+	+

Al fine di individuare dei ceppi in grado di agire sulle alterazioni cromatiche di natura melanica prodotte dal fungo *A. pullulans*, la selezione è proseguita andando a studiare specie batteriche,

appartenenti agli Attinomiceti, descritte in letteratura per la produzione di enzimi ligninolitici (Mercer *et al.*, 1996; Diamantidis *et al.*, 2000; Ramachandran *et al.* 2000; Suzuki *et al.*, 2003; Kiiskinen *et al.*, 2004; Machczynski *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2006; Niladevi, 2008; Madhavi *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2011; Le Roes-Hill *et al.*, 2011; Imran *et al.*, 2012). Sono stati scelti i ceppi: UR2 *Streptomyces coelicolor*, UW43 *Streptomyces mauvecolor*, UT8 *Streptomyces spororaveus*, OSS34 *Streptomyces heteromorphus* e TPID5 *Nocardia alba*. L'attività ligninolitica è stata valutata attraverso lo studio della capacità di decolorare quattro diversi coloranti azoici: Orange G, Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico (Cfr. Par. 3.3.4 *Prove di biopulitura* pp. 70). Il test è stato eseguito anche per i seguenti *white rot fungi*: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* e *Trametes versicolor*, quale controllo positivo.

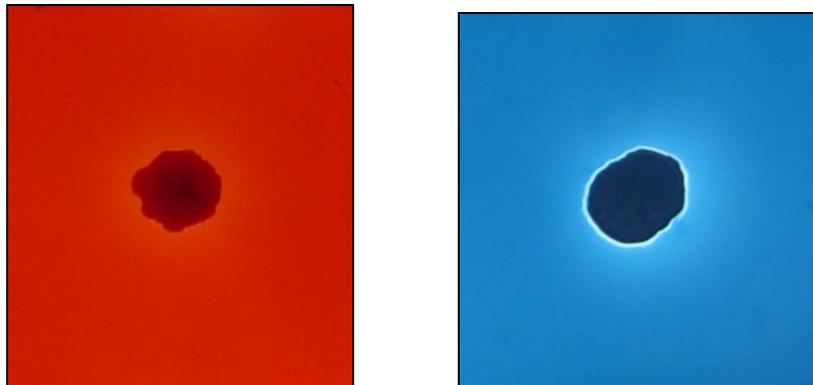
Tutti i ceppi selezionati sono stati anche sottoposti ai test dell'attività cellulolitica, proteolitica e chitinolitica (Tab. 18).

**Tabella 18. Attività ligninolitica, cellulolitica, proteolitica e chitinolitica dei ceppi batterici selezionati**

(+ formazione di alone; - assenza di alone).

<b>Specie</b>	<b>Codice Identificativo</b>	<b>CMC</b>	<b>Gelatina</b>	<b>Chitina Colloidale</b>	<b>Orange G</b>	<b>Congo Red</b>	<b>Amido Black</b>	<b>Acido Tannico</b>
<i>Streptomyces coelicolor</i>	UR2	-	+	+	+	+	+	+
<i>Streptomyces mauvecolor</i>	UW43	-	-	-	-	+	+	-
<i>Streptomyces spororaveus</i>	UT8	-	-	-	-	+	+	-
<i>Streptomyces heteromorphus</i>	OSS34	-	-	-	-	+	+	-
<i>Nocardia alba</i>	TPID5	-	-	-	-	+	+	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>white rot fungi</i>	No test			+	+	-	+
<i>Lentinula edodes</i>	<i>white rot fungi</i>	No test			+	+	-	+
<i>Trametes versicolor</i>	<i>white rot fungi</i>	No test			+	-	+	-

Combinando i risultati di tutte le prove effettuate, è stato deciso di impiegare solo il ceppo UR2 *Streptomyces coelicolor* per trattamenti di biopulitura. Infatti questo batterio non presenta attività cellulolitica, mentre mostra attività proteolitica e chitinolitica (Fig. 35-36).

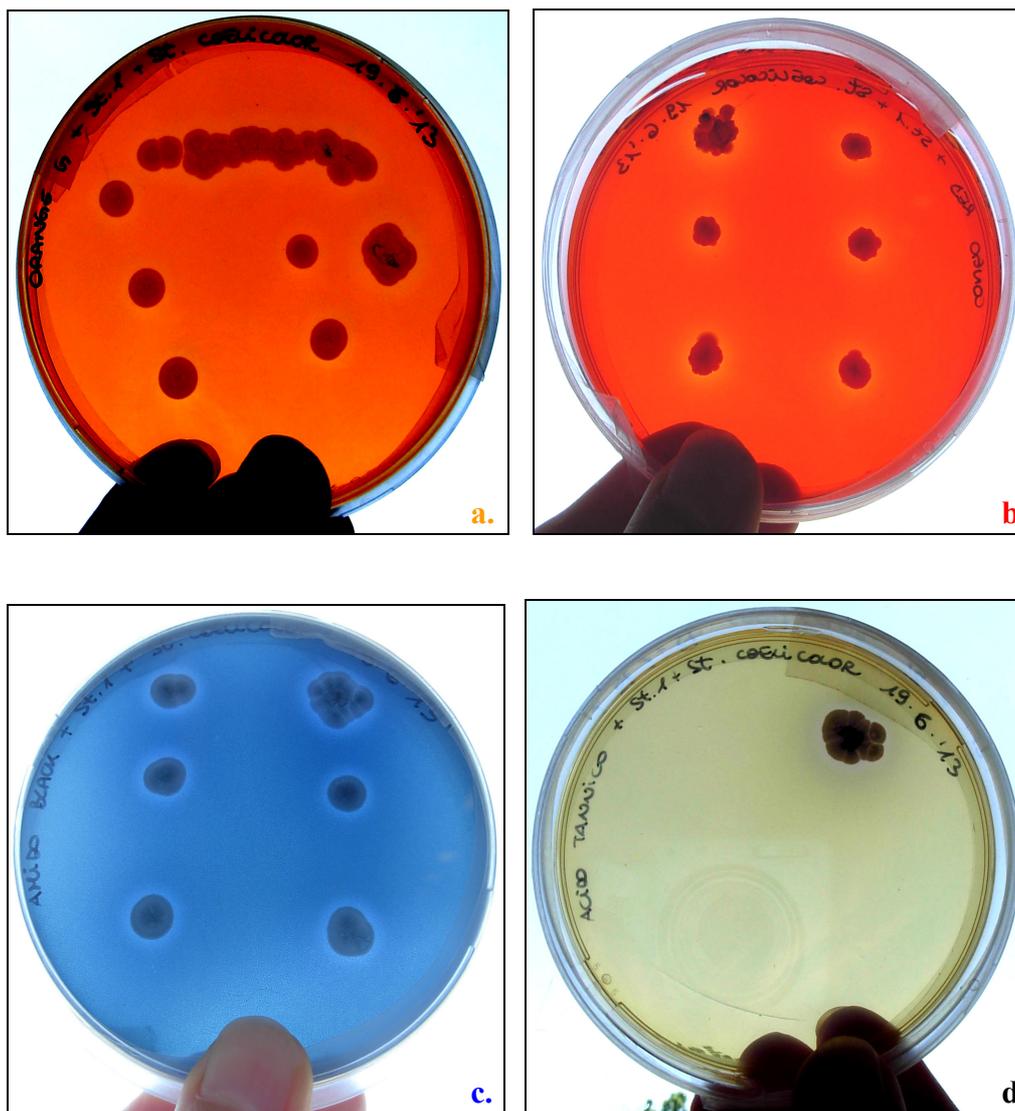


**Figura 35.** Test per l'attività cellulolitica e proteolitica dello *Streptomyces coelicolor* (UR2). Il colorante Congo Red non evidenzia nessun alone di chiarificazione ad indicare che non sono avvenuti processi di idrolisi della CMC. Nel caso della gelatina, invece, sono ben visibili le zone di idrolisi manifestatesi sotto forma di aloni di chiarificazione grazie al colorante Amido Black.



**Figura 36.** Test per l'attività chitinolitica: controllo dopo 7gg. Nel caso dello UR2 *S. coelicolor* sono ben visibili le zone di idrolisi della chitina colloidale manifestatesi sotto forma di aloni di chiarificazione.

Inoltre i risultati ottenuti con i coloranti azoici mostrano che il batterio UR2 *Streptomyces coelicolor* è in grado di attuare una moderata azione degradativa nei confronti dei coloranti impiegati per la sperimentazione (Fig. 37).



**Figura 37.** Test per l'attività ligninolitica.

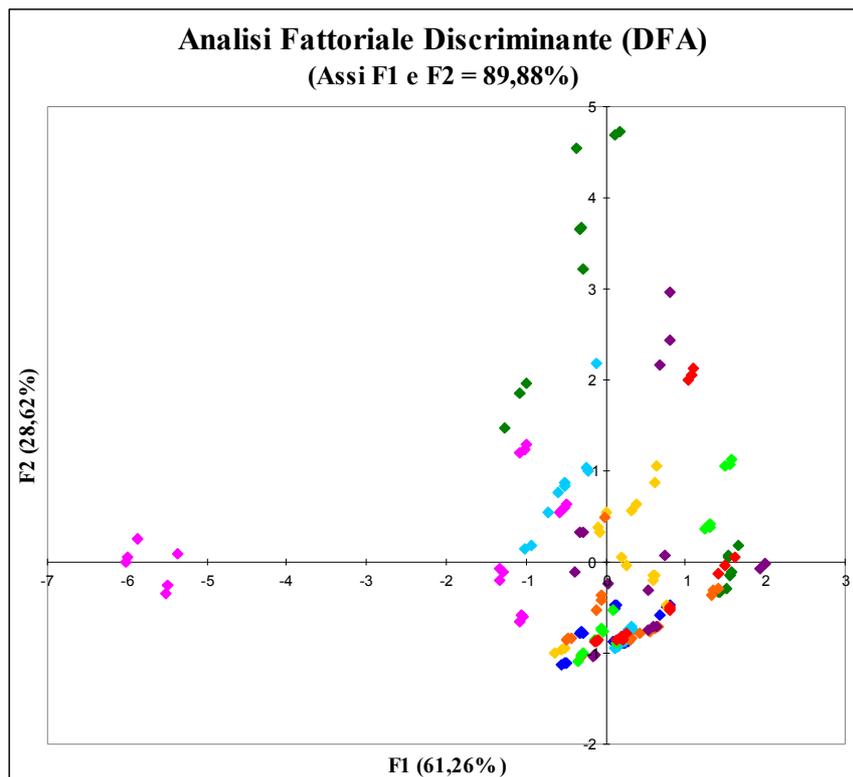
UR 2 *Streptomyces coelicolor* su piastre contenenti i coloranti azoici, dopo 7 giorni di incubazione: Orange G (a.), Congo Red (b.), Amido Black (c.) ed Acido Tannico (d.). La comparsa di aloni di decolorazione conferma la presenza di attività ligninolitica.

### ***Prove di biopulitura***

I batteri selezionati sono stati impiegati su campioni di carta Whatman, poiché più resistente rispetto alle carte Mezzofino e Perugia, inoculate con l'*A. pullulans*, in grado di produrre le macchie melaniche.

I dati colorimetrici complessivi, ovvero i valori di differenza di colore prima e dopo i trattamenti con batteri di tutti i campioni di carta, sono stati utilizzati per effettuare un'analisi discriminante allo scopo di verificare in quale misura ogni ceppo batterico abbia influito sul risultato finale. Applicando l'Analisi Fattoriale Discriminante ai parametri colorimetrici  $\Delta L$  e  $\Delta a$  ed utilizzando come criterio di raggruppamento i ceppi batterici impiegati, emerge una bassa significatività della

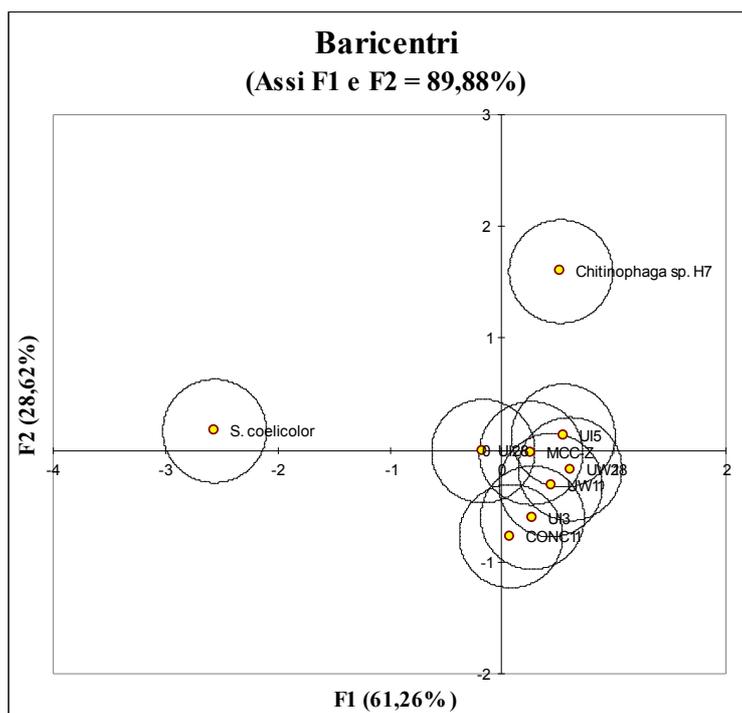
classificazione, ovvero i gruppi risultano sovrapposti nella maggior parte dei trattamenti impiegati indicando una bassa “forza” delle categorie individuate a priori per l’analisi e, quindi, la creazione di un modello di classificazione debole, incapace di distinguere nella massa dei campioni quelli trattati in un modo piuttosto che in un altro. Infatti i dati raggruppati in base ai ceppi batterici sono più o meno tutti sovrapposti anche se fanno eccezione, però, i raggruppamenti relativi ai trattamenti con H7 *Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor* (Graf. 11).



**Grafico 11.** Analisi fattoriale discriminante (DFA) effettuata utilizzando come criterio di raggruppamento i differenti ceppi batterici (F1=  $\Delta L$  e F2=  $\Delta a$ ). Valori medi di 5 repliche.

- ◆ CONC12 *Pseudomonas stutzeri*; ◆ H7 *Chitinophaga sp.*; ◆ MCC-Z *Flavobacterium sp.*;
- ◆ UR2 *Streptomyces coelicolor*; ◆ UI28 *Bacillus cereus*; ◆ UI3 *Bacillus cereus*;
- ◆ UI5 *Serratia ficaria*; ◆ UW11 *Acinetobacter lwoffii*; ◆ UW28 *Arthrobacter sp.*.

Questo dato si apprezza in maniera ancora più marcata se si considera il grafico che riporta solo i baricentri dei gruppi (Graf. 12). I raggruppamenti dei campioni trattati con *Chitinophaga sp.* (H7) e *S. coelicolor* (UR2) sono classificati a posteriori dal modello dell’analisi discriminante rispettivamente al 50,00% e al 33,33% e ciò porta ad una separazione dei gruppi.



**Grafico 12.** Analisi fattoriale discriminante (DFA):  
baricentri dei raggruppamenti eseguiti secondo i trattamenti con batteri.

Dall'ANOVA effettuata sui valori di variazione “globale” di colore ( $\Delta E$ ) prima e dopo i trattamenti batterici su tutti i campioni di carta emergono differenze statisticamente significative fra l'impiego di H7 *Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor* e l'impiego di tutti gli altri batteri utilizzati (Tab. 19-20).

**Tabella 19.** Analisi ANOVA eseguita sui valori della variazione “globale” di colore ( $\Delta E$ )  
dei campioni non trattati e trattati con i batteri.

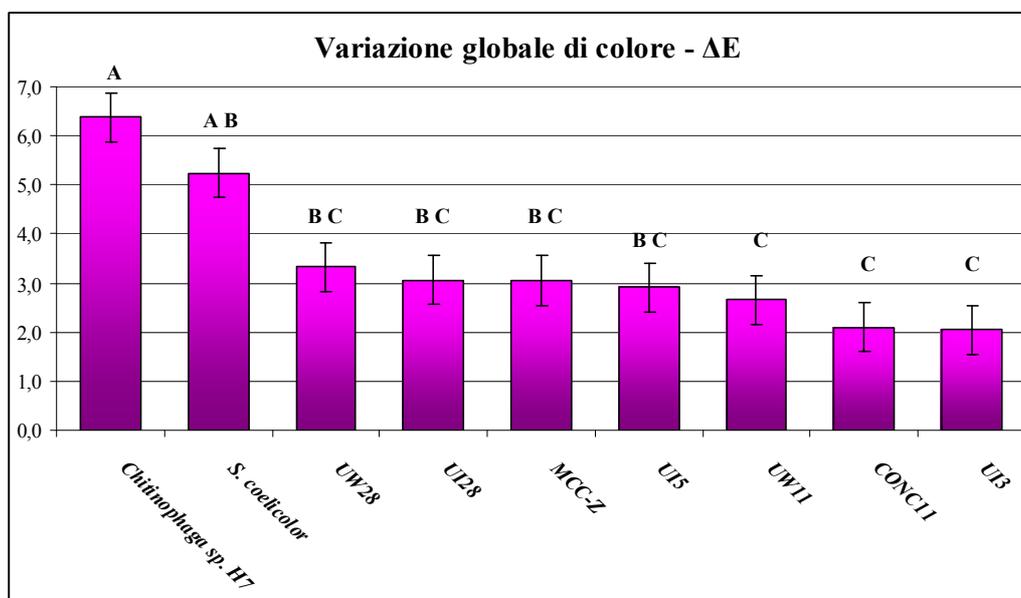
Fonte	GDL	Somma dei Quadrati	Media dei Quadrati	F	Pr > F
Modello	8	303,005	37,876	6,598	< 0,0001
Errore	153	878,349	5,741		
Totale Corretto	161	1181,353			

**Tabella 20.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori della variazione "globale" di colore ( $\Delta E$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri.

Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
<i>H7 Chitinophaga sp.</i>	6,38	A
<i>UR2 S. coelicolor</i>	5,24	A B
<i>UW28</i>	3,33	B C
<i>UI28</i>	3,06	B C
<i>MCC-Z</i>	3,05	B C
<i>UI5</i>	2,92	B C
<i>UW11</i>	2,66	C
<i>CONC12</i>	2,09	C
<i>UI3</i>	2,05	C

Il valore più elevato di variazione globale del colore  $\Delta E$  è stato ottenuto con *H7 Chitinophaga sp.* seguito da *UR2 S. coelicolor* rispetto all'applicazione degli altri batteri (Graf.13).

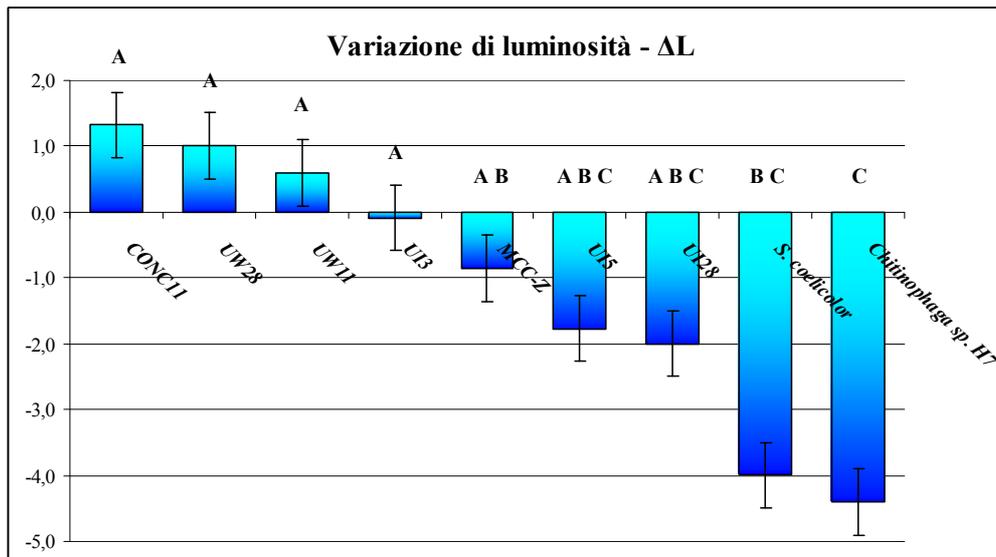


**Grafico 13.** Analisi ANOVA della variazione "globale" di colore ( $\Delta E$ ) tra i campioni non trattati e trattati con i batteri.

I valori rappresentano la media di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media.

Le differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

L'analisi ANOVA mette in evidenza che le variazioni di  $\Delta L$  relative sempre ad *H7 Chitinophaga sp.* ed *UR2 S. coelicolor* sono negative (Graf. 14), mentre i risultati ottenuti dal test Tukey's HSD confermano che tutte le differenze sono statisticamente significative (Tab. 21-22).



**Grafico 14.** Analisi ANOVA della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri. I valori rappresentano la media di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

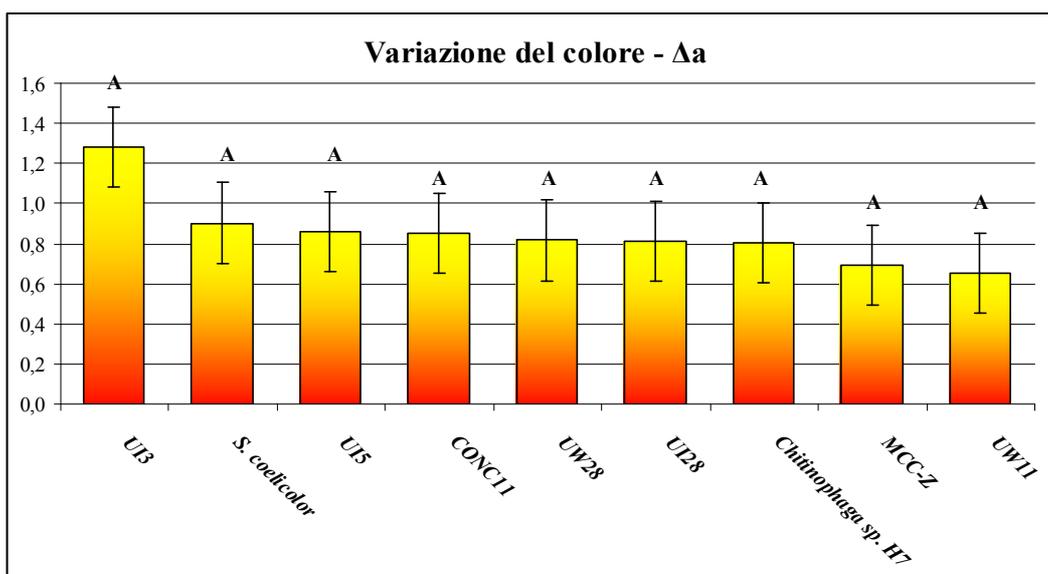
**Tabella 21.** Analisi ANOVA eseguita sui valori di luminosità ( $\Delta L$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri.

Fonte	GDL	Somma dei Quadrati	Media dei Quadrati	F	Pr > F
Modello	8	626,694	78,337	7,061	< 0,0001
Errore	153	1697,475	11,095		
Totale Corretto	161	2324,169			

**Tabella 22.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori di luminosità ( $\Delta L$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - ΔL	Gruppi
CONC12	1,33	A
UW28	1,01	A
UW11	0,60	A
UI3	-0,09	A
MCC-Z	-0,86	A B
UI5	-1,77	A B C
UI28	-2,00	A B C
UR2 <i>S. coelicolor</i>	-4,00	B C
H7 <i>Chitinophaga sp.</i>	-4,40	C

Nessun cambiamento sostanziale, invece, è stato riscontrato per il grado di verde ( $\Delta a$ ), come confermato anche dall'analisi ANOVA e dal test Tukey's HSD eseguiti sui campioni non trattati e trattati con i batteri che non restituisce differenze staticamente significative sulla base dei dati di colore ottenuti dalle misurazioni (Graf. 15) (Tab. 23-24).



**Grafico 15.** Analisi ANOVA della variazione del parametro a – passaggio verde/magenta- ( $\Delta a$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

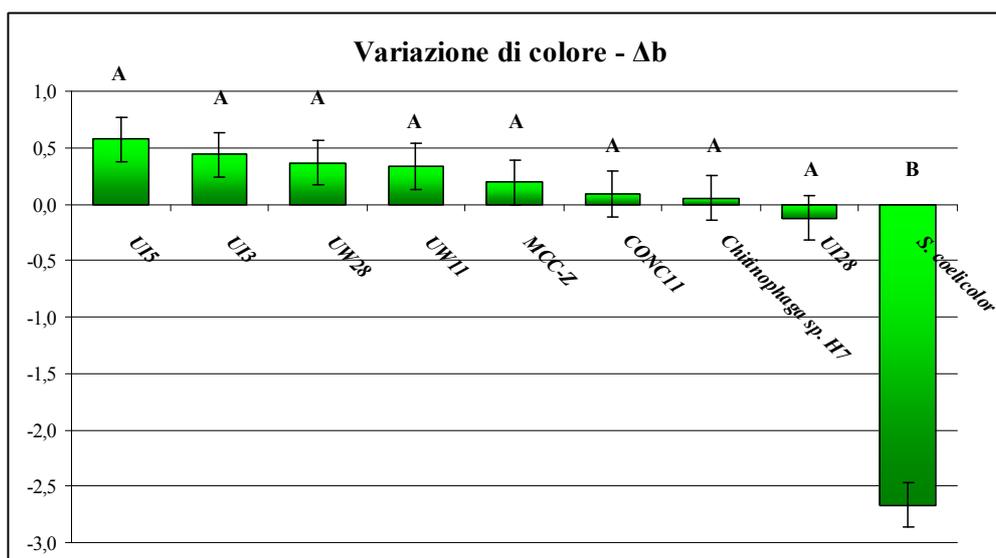
**Tabella 23.** Analisi ANOVA eseguita sui valori di a – passaggio verde/magenta ( $\Delta a$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri.

Fonte	GDL	Somma dei Quadrati	Media dei Quadrati	F	Pr > F
Modello	8	4,659	0,582	0,824	< 0,583
Errore	153	108,129	0,707		
Totale Corretto	161	112,788			

**Tabella 24.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori della variazione di a – passaggio verde/magenta ( $\Delta a$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media – Δa	Gruppi
UI3	1,28	A
UR2 <i>S. coelicolor</i>	0,90	A
UI5	0,86	A
CONC12	0,85	A
UW28	0,82	A
UI28	0,81	A
H7 <i>Chitinophaga sp.</i>	0,80	A
MCC-Z	0,69	A
UW11	0,65	A

Infine, osservando il grafico 16 che riporta le medie dei valori della variazione del grado di giallo ( $\Delta b$ ), è possibile notare un cambiamento importante a seguito dell'applicazione di UR2 *S. coelicolor* poiché i valori di b si spostano verso il colore blu e ciò è messo in evidenza anche dall'ANOVA e dal test Tukey's HSD (Tab. 25-26).



**Grafico 16.** Analisi ANOVA della variazione del parametro b - passaggio giallo/blu - ( $\Delta b$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

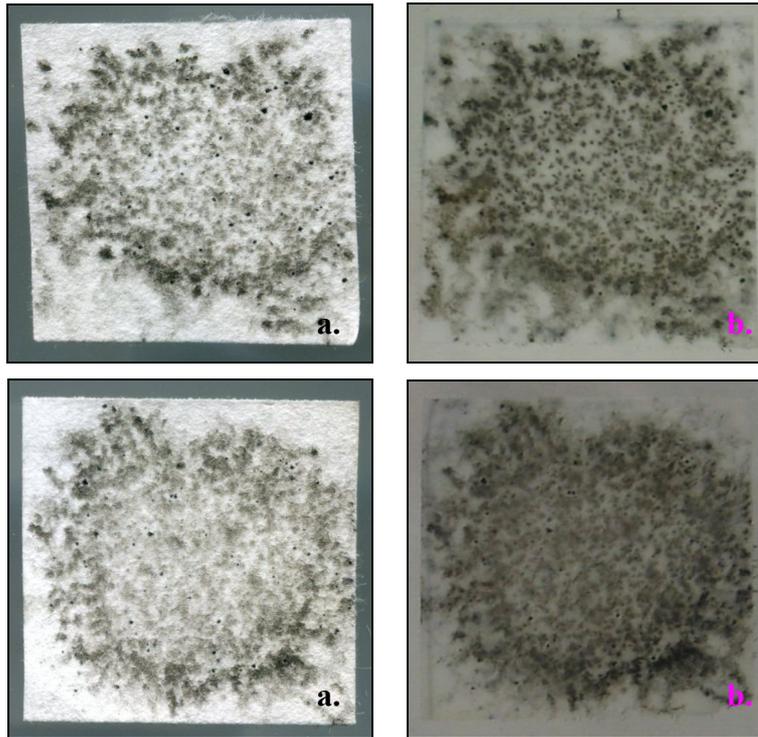
**Tabella 25.** Analisi ANOVA eseguita sui valori di b – passaggio giallo/blu ( $\Delta b$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri.

Fonte	GDL	Somma dei Quadrati	Media dei Quadrati	F	Pr > F
Modello	8	141,932	17,741	15,822	< 0,0001
Errore	153	171,557	1,121		
Totale Corretto	161	313,489			

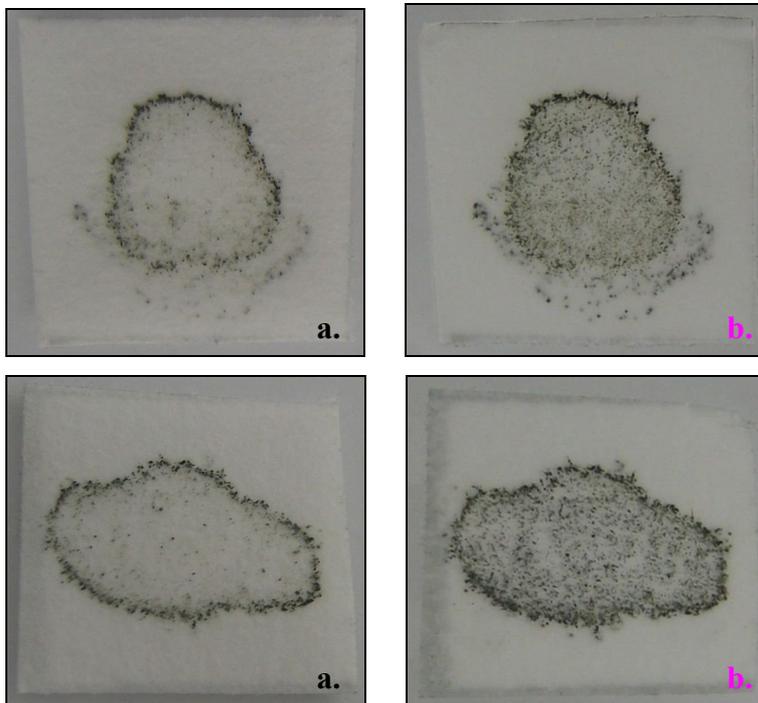
**Tabella 26.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori della variazione di b – passaggio giallo/blu ( $\Delta b$ ) dei campioni non trattati e trattati con i batteri. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media – Δb	Gruppi
UI5	0,57	A
UI3	0,44	A
UW28	0,37	A
UW11	0,33	A
MCC-Z	0,19	A
CONC12	0,09	A
H7 Chitinophaga sp.	0,05	A
UI28	-0,13	A
UR2 S. coelicolor	-2,67	B

Alla luce dei risultati ottenuti i campioni di carta sono stati osservati ad occhio nudo e ciò ha consentito di rilevare cambiamenti importanti delle macchie indotte dall'applicazione dei trattamenti batterici maggiormente efficaci: *Chitinophaga sp.* (H7) e *S. coelicolor* (UR2) (Fig. 38-39).



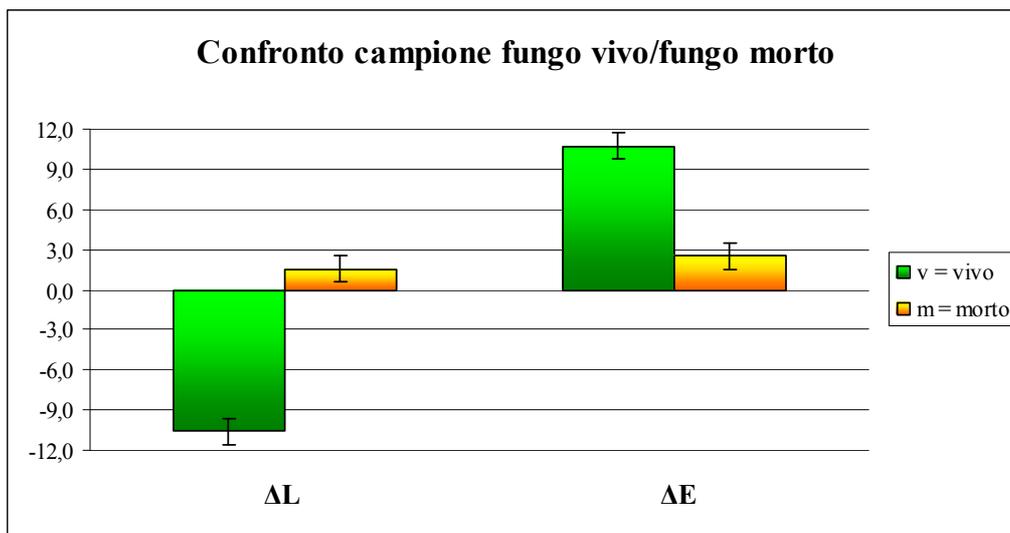
**Figura 38.** *A. pullulans* su Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio H7 *Chitinophaga sp.* per 48h e 7gg.



**Figura 60.** *A. pullulans* su Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio UR2 *S. coelicolor* per 24h e 48h.

Successivamente sono stati eseguiti il test t-Student e l'analisi ANOVA sui dati colorimetrici complessivi relativi ai ceppi *Chitinophaga sp.* (H7) e *S. coelicolor* (UR2) al fine di verificare in quale misura la vitalità dell'*A. pullulans*, il lavaggio effettuato dopo l'applicazione dei batteri ed i tempi di posa abbiano influito sul risultato finale.

Nel caso di H7 *Chitinophaga sp.* il test t-Student evidenzia una differenza statisticamente significativa tra l'applicazione del trattamento sui campioni con fungo vivo (v) e morto (m). La differenza di luminosità ( $\Delta L$ ) risulta maggiore per i campioni con fungo vitale così come la variazione globale di colore ( $\Delta E$ ) (Graf. 17) (Tab. 27).



**Grafico 17.** Test t-student eseguito sulle variazioni di colore in base alla tipologia del campione di carta: fungo vivo (v) e fungo morto (m). Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media.

**Tabella 27.** Test t-Student dei valori di  $\Delta L$  e  $\Delta E$  dei campioni di carta con fungo vivo (v) e fungo morto (m). Il test indica una differenza statisticamente significativa per  $\Delta L$  e  $\Delta E$ .

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta L$ ).

Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -13,877; -10,378 [.

Differenza	-12,128
t (Valore Osservato)	-14,088
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	< 0,0001
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta E$ ).

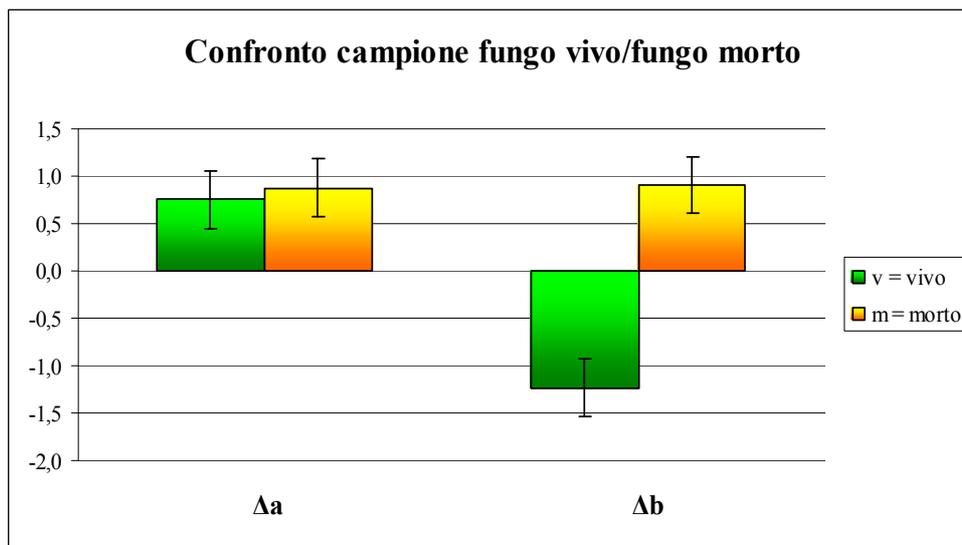
Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] 6,643; 9,799 [.

Differenza	8,221
t (Valore Osservato)	10,589
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	< 0,0001
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Il test Tukey's HSD effettuato sui valori della variazione del grado di verde ( $\Delta a$ ) e giallo ( $\Delta b$ ), invece, ha restituito una differenza statisticamente significativa solo nel secondo caso. In effetti il cambiamento di colore avvenuto lungo l'asse giallo/blu risulta maggiore per i campioni con fungo vitale (Graf. 18) (Tab. 28).



**Grafico 18.** Test t-student eseguito sulle variazioni di colore in base alla tipologia del campione di carta: fungo vivo (v) e fungo morto (m). Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media.

**Tabella 28.** Test t-Student dei valori di  $\Delta a$  e  $\Delta b$  dei campioni di carta con fungo vivo (v) e fungo morto (m).

Il test indica una differenza statisticamente significativa solo per  $\Delta b$ .

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta a$ ).

Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -0,338; 0,087 [.

Differenza	-0,126
t (Valore Osservato)	-1,201
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	0,238
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta b$ ).

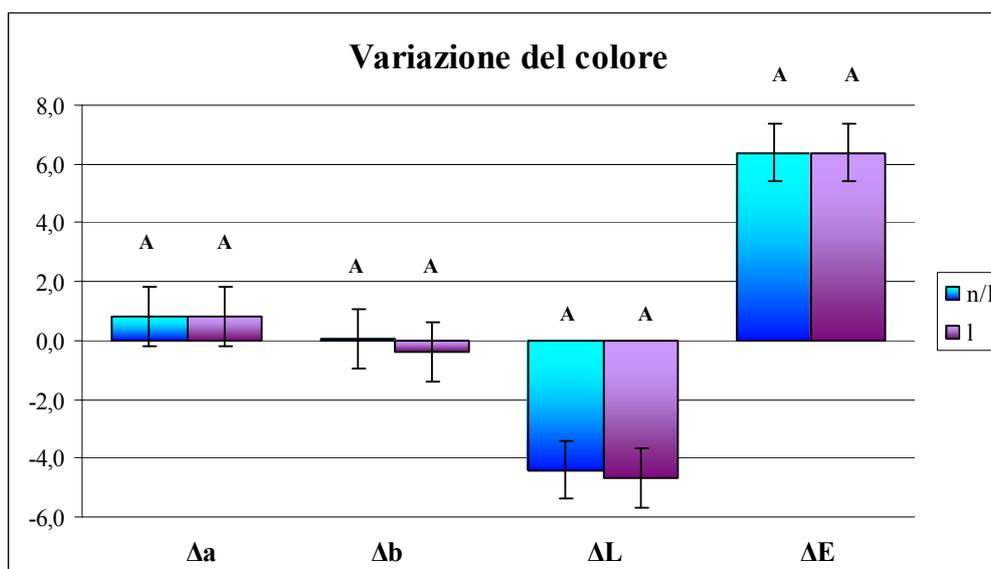
Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -2,439; -1,839 [.

Differenza	-2,139
t (Valore Osservato)	-14,475
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	< 0,0001
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Non vi è, invece, nessuna differenza apprezzabile tra i campioni di carta sottoposti a lavaggio ( $H_2O$ +Tween 40 per 30 minuti + risciacquo in acqua sterile) e quelli che non hanno subito il lavaggio (Graf. 19) (Tab. 29).



**Grafico 19.** Test t-student eseguito sulle variazioni di colore in base alla tipologia del campione di carta: campioni di carta non sottoposti a lavaggio (nl) e campioni di carta sottoposti a lavaggio (l).

Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

**Tabella 29.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori di  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta L$  e  $\Delta E$  dei campioni di carta non sottoposti a lavaggio (nl) e campioni di carta sottoposti a lavaggio (l). Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

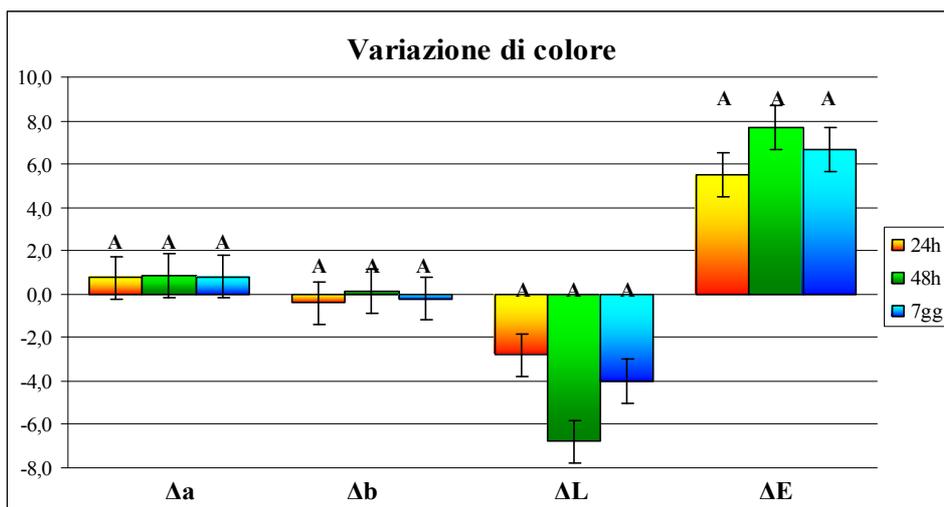
Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi
nl	0,80	A
l	0,82	A

Categoria	Media - $\Delta b$	Gruppi
nl	0,05	A
l	-0,38	A

Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
nl	-4,40	A
l	-4,66	A

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
nl	6,38	A
l	6,38	A

La stessa scarsa differenza emerge anche dai risultati relativi ai diversi tempi di posa a cui sono stati sottoposti i campioni di carta trattati con il batterio *H7 Chitinophaga sp.*. Il confronto effettuato sui dati ottenuti dal trattamento dopo 24h, 48h e 7gg non mostra differenze statisticamente significative come dimostrano il test di t-Student e l'analisi ANOVA (Graf. 20) (Tab. 30).



**Grafico 20.** Analisi ANOVA della Variazione di colore in base al tempo di posa: 24h, 48h e 7gg. Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media.

Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

**Tabella 30.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori di  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta L$  e  $\Delta E$  in base ai tempi di posa - 24h, 48h e 7gg. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi
24h	0,75	A
48h	0,87	A
7gg	0,82	A

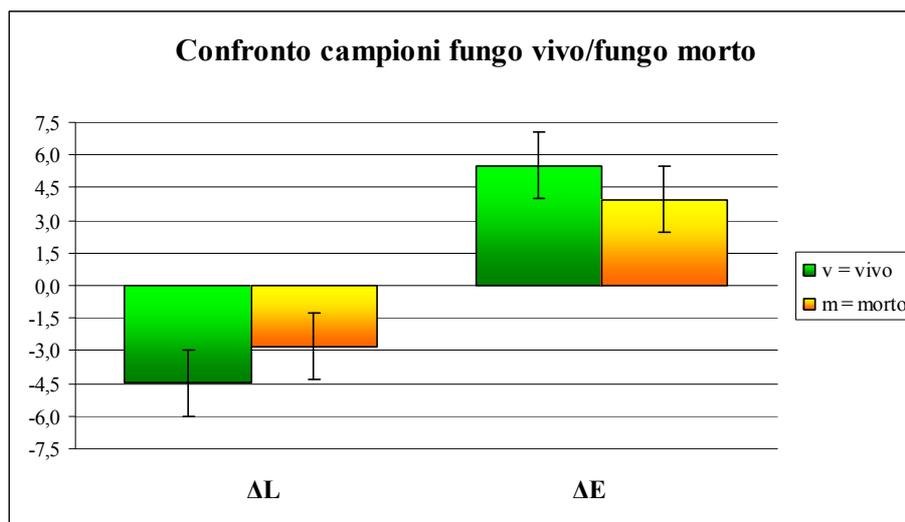
Categoria	Media - $\Delta b$	Gruppi
24h	-0,41	A
48h	0,13	A
7gg	-0,20	A

Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
24h	-2,808	A
48h	-6,798	A
7gg	-3,990	A

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
24h	5,484	A
48h	7,679	A
7gg	6,670	A

Si può però osservare come la differenza di luminosità ( $\Delta L$ ), sempre negativa, risulta maggiore per il tempo di posa 48h rispetto a 24h e 7gg.

Analogo è il caso relativo all'applicazione del batterio UR2 *S. coelicolor*, dove il test t-Student ha evidenziato delle differenze statisticamente significative in riferimento ai dati ottenuti per i campioni con fungo vivo (v) e morto (m). I risultati ottenuti evidenziano una differenza di luminosità ( $\Delta L$ ) e di variazione globale di colore ( $\Delta E$ ) maggiore per i campioni con fungo vitale (Graf. 21) (Tab. 31).



**Grafico 21.** Test t-student eseguito sulle variazioni di colore in base alla tipologia del campione di carta: fungo vivo (v) e fungo morto (m). Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media.

**Tabella 31.** Test t-Student dei valori di  $\Delta L$  e  $\Delta E$  dei campioni di carta con fungo vivo (v) e fungo morto (m). Il test indica una differenza statisticamente significativa per  $\Delta L$  e  $\Delta E$ .

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta L$ ).

Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -2,412; -0,971 [.

Differenza	-1,692
t (Valore Osservato)	-4,774
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	< 0,0001
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta E$ ).

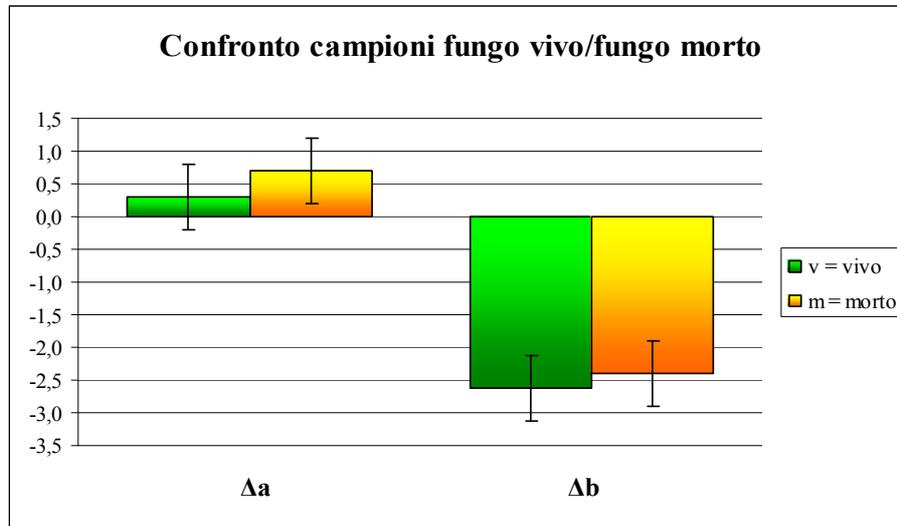
Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] 0,171; 2,971 [.

Differenza	1,571
t (Valore Osservato)	2,280
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

I trattamenti eseguiti con il batterio UR2 *S. coelicolor* sui campioni con fungo vitale e non, invece, non hanno determinato nessun cambiamento sostanziale del grado di verde ( $\Delta a$ ) e di giallo ( $\Delta b$ ) delle macchie di *A. pullulans* (Graf. 22) (Tab. 32).



**Grafico 22.** Test t-student eseguito sulle variazioni di colore in base alla tipologia del campione di carta: fungo vivo (v) e fungo morto (m). Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media.

**Tabella 32.** Test t-Student dei valori di  $\Delta a$  e  $\Delta b$  dei campioni di carta con fungo vivo (v) e fungo morto (m). Il test non indica una differenza statisticamente significativa né per  $\Delta a$  né per  $\Delta b$ .

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta a$ ).

Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -0,851; 0,009 [.

Differenza	-0,421
t (Valore Osservato)	-1,989
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	0,055
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Test t per due campioni indipendenti ( $\Delta b$ ).

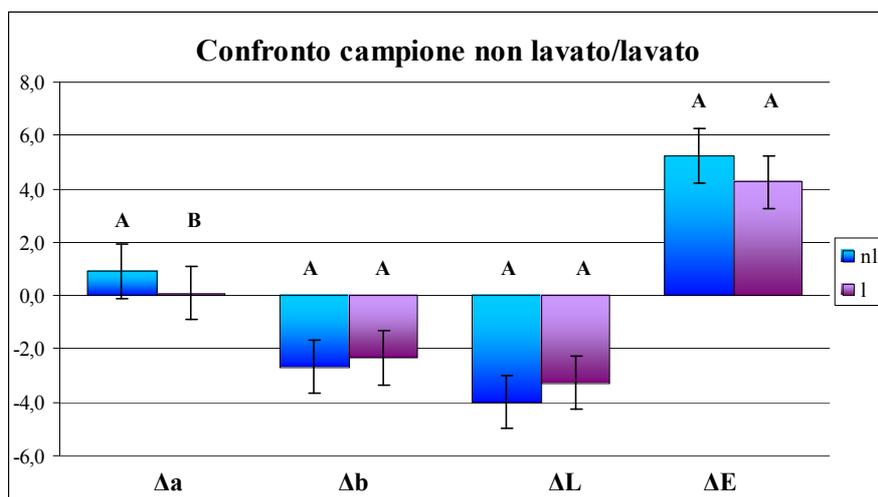
Intervallo di confidenza per la differenza tra medie al 95%: ] -1,820; 1,369 [.

Differenza	-0,226
t (Valore Osservato)	-0,288
t (Valore Critico)	2,032
GDL	34
p-value (bilaterale)	0,775
alfa	0,05

Il numero di gradi di libertà è calcolato utilizzando la formula di Welch-Satterthwaite.

Il valore t critico è calcolato utilizzando l'approssimazione di Cochran-Cox.

Analizzando i risultati relativi alle variazioni di colore tra i campioni di carta non sottoposti (nl) e sottoposti (l) a lavaggio (Graf. 23) (Tab. 33) si evince che solo nel caso della variazione del grado di verde ( $\Delta a$ ) c'è una differenza statisticamente significativa.



**Grafico 23.** Test t-student eseguito sulle variazioni di colore in base alla tipologia del campione di carta: campioni di carta non sottoposti a lavaggio (nl) e campioni di carta sottoposti a lavaggio (l). Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media.

Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

**Tabella 33.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori di  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta L$  e  $\Delta E$

dei campioni di carta non sottoposti a lavaggio (nl) e campioni di carta sottoposti a lavaggio (l).

Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

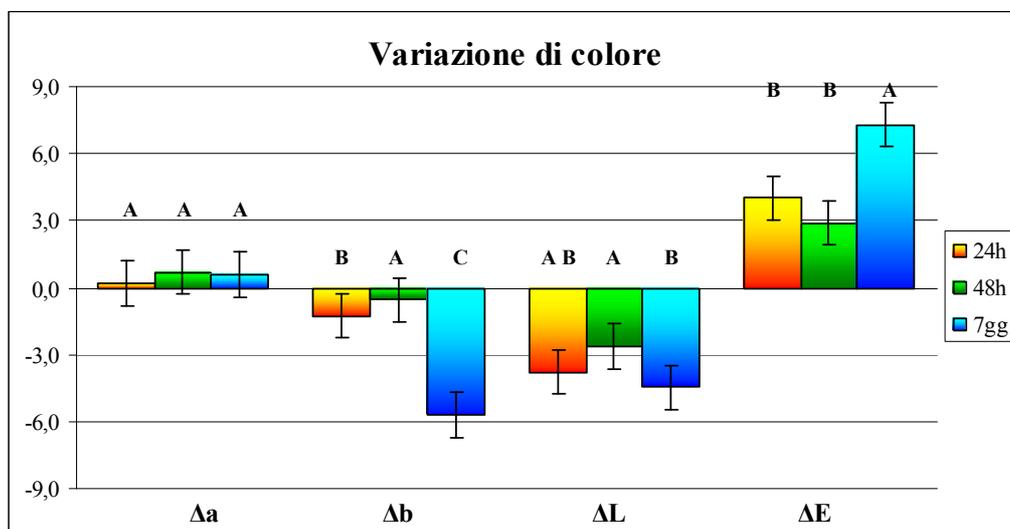
Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi
nl	0,90	A
l	0,09	B

Categoria	Media - $\Delta b$	Gruppi
nl	-2,67	A
l	-2,34	A

Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
nl	-4,00	A
l	-3,27	A

Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
nl	5,23	A
l	4,25	A

Infine il test t-Student, così come l'analisi ANOVA, effettuato sui dati colorimetrici confrontando i diversi tempi di posa, restituisce differenze statisticamente significative. Il confronto effettuato sui dati ottenuti dal trattamento a 24h, 48h e 7gg è di seguito riportato (Graf. 24) (Tab. 34).



**Grafico 24.** Analisi ANOVA della variazione di colore in base ai tempi di posa: 24h, 48h e 7gg. Valori medi di 5 repliche. Le barre di errore indicano la deviazione standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

**Tabella 34.** Test Tukey's HSD eseguito sui valori di  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta L$  e  $\Delta E$  in base ai tempi di posa - 24h, 48h e 7gg. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - $\Delta a$	Gruppi
24h	0,21	A
48h	0,69	A
7gg	0,59	A

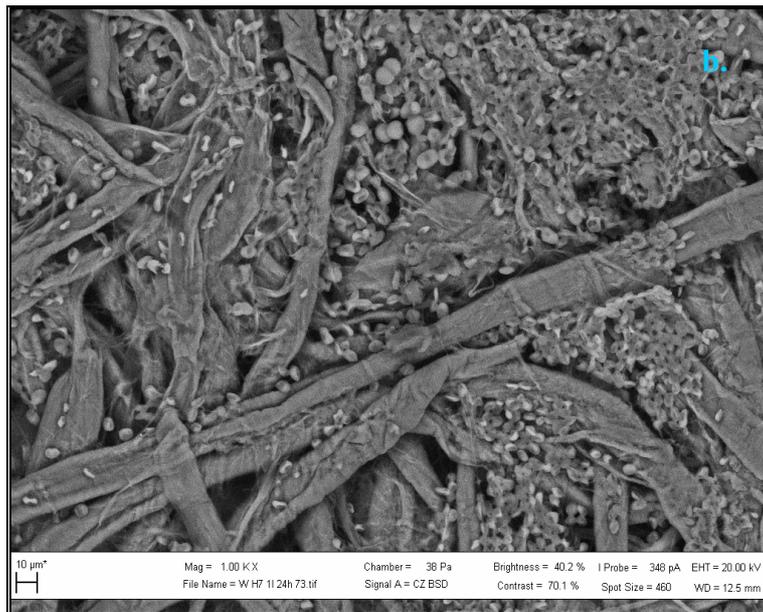
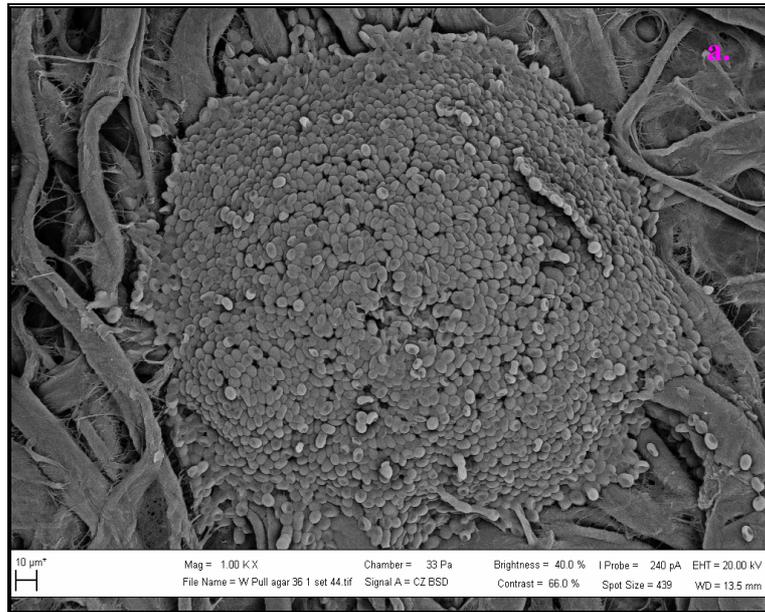
Categoria	Media - $\Delta b$	Gruppi
24h	-1,27	B
48h	-0,55	A
7gg	-5,69	C

Categoria	Media - $\Delta L$	Gruppi
24h	-3,78	A B
48h	-2,64	A
7gg	-4,48	B

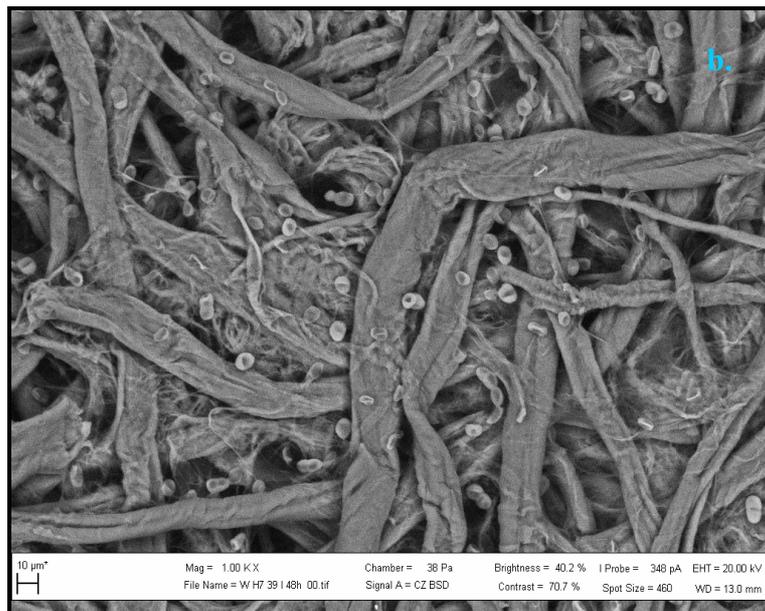
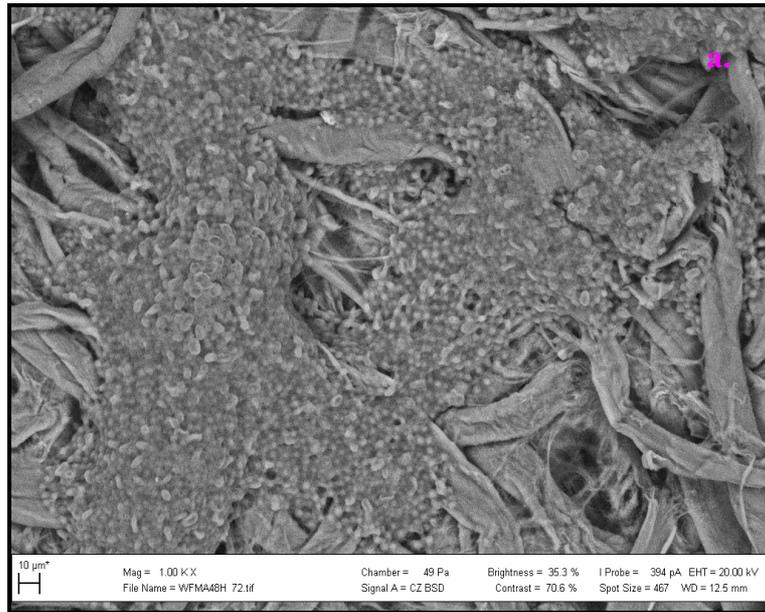
Categoria	Media - $\Delta E$	Gruppi
24h	4,02	B
48h	2,91	B
7gg	7,31	A

La differenza di luminosità definita dal  $\Delta L$  risulta minore per il tempo di posa 48h rispetto a 24h e 7gg.

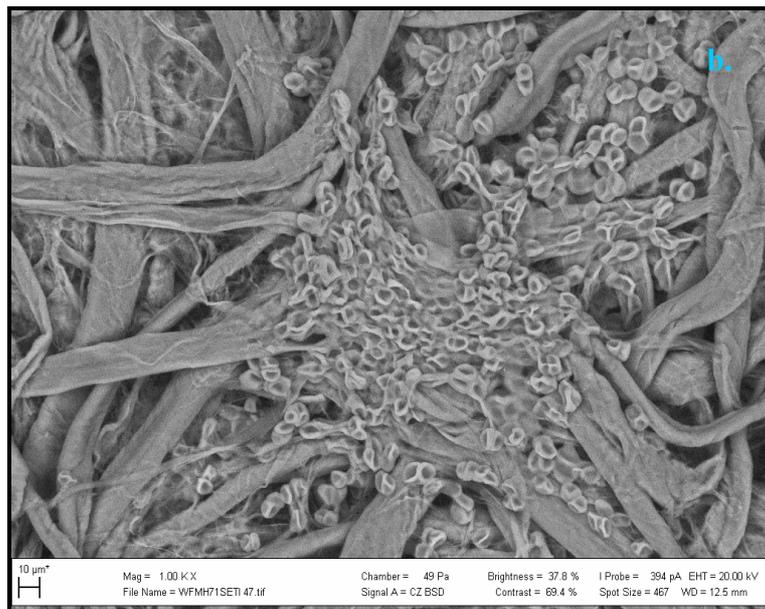
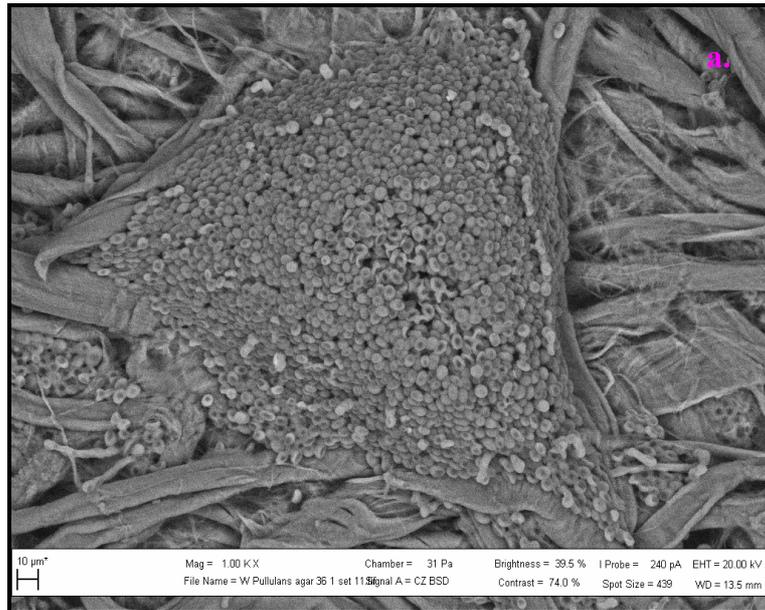
I campioni di carta trattati con H7 *Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor* sono stati osservati al SEM per valutare eventuali cambiamenti micromorfologici del micelio fungino a seguito dell'applicazione dei batteri. Dalle immagini ottenute si nota come, a seguito dei trattamenti con i due batteri, la densità del micelio fungino sulla superficie dei campioni cartacei sia diminuita nonostante sia ancora ben visibile la presenza di conidi che restano fra le fibre di carta anche dopo i trattamenti (Fig. 39÷44).



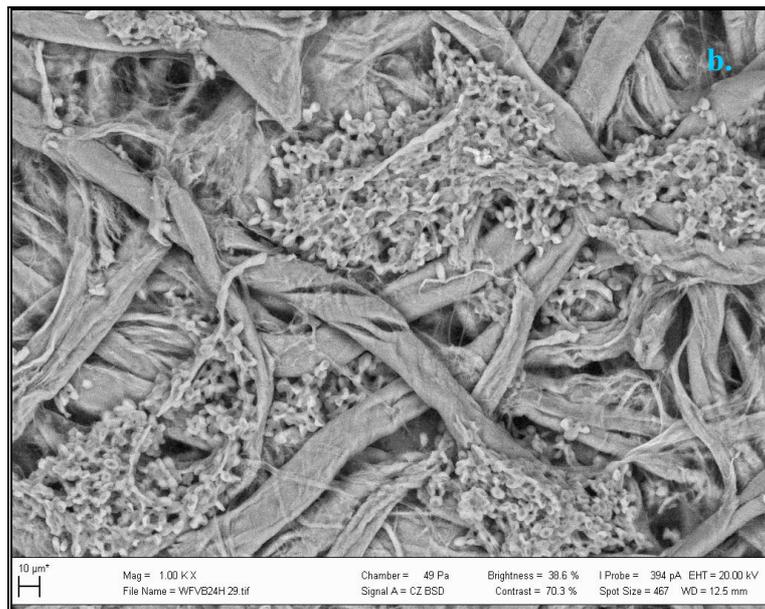
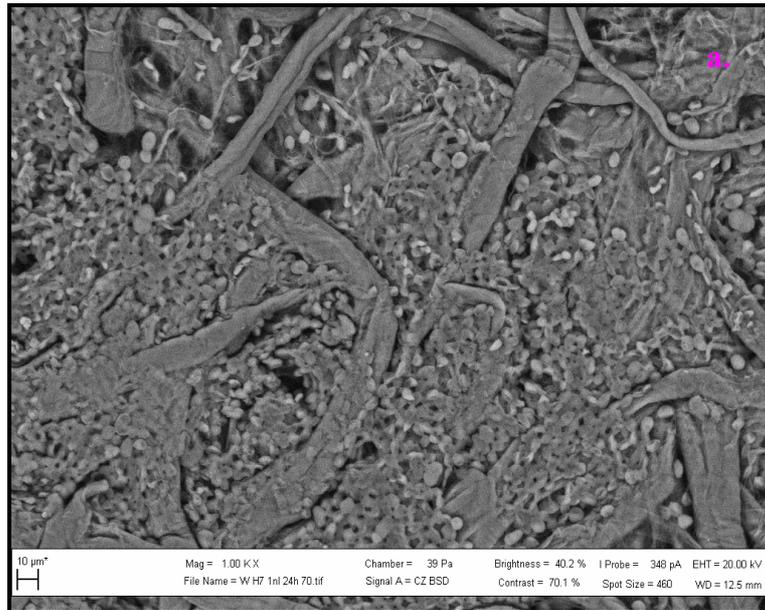
**Figura 39.** *A. pullulans* inoculato su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio *H7 Chitinophaga sp.* applicato per 24h (1000x).



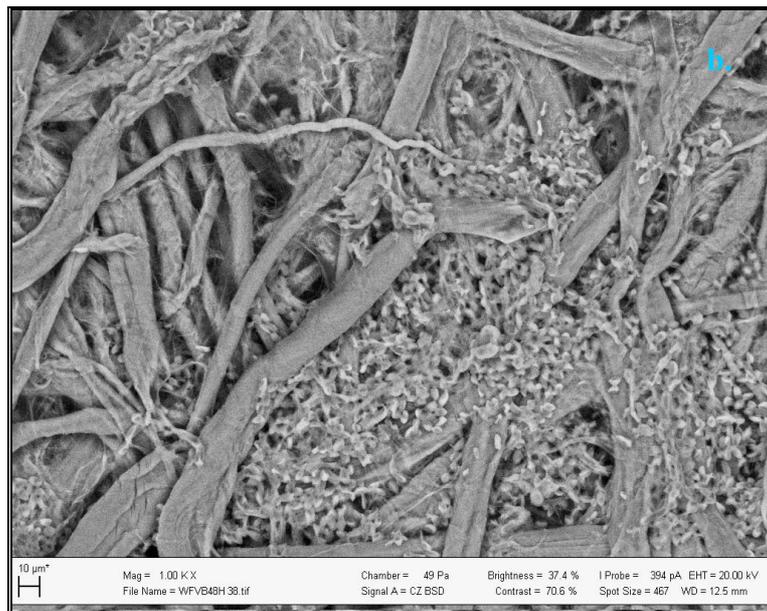
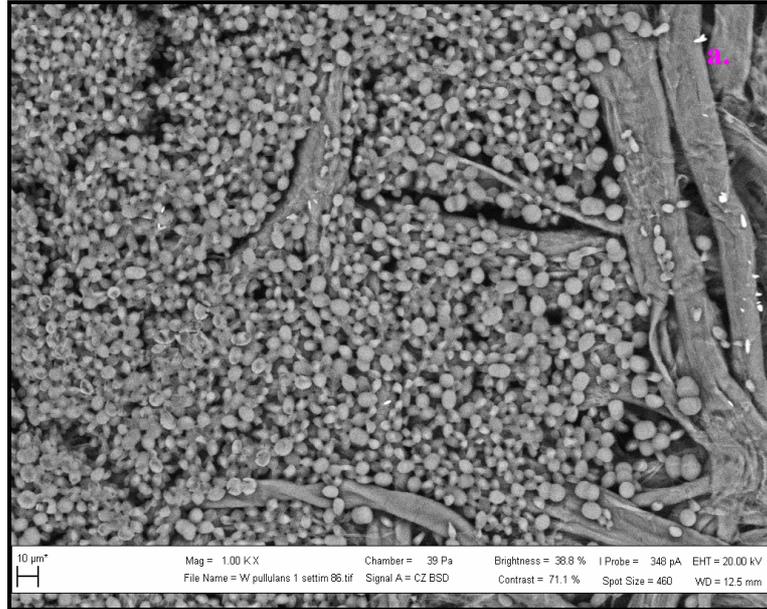
**Figura 40.** *A. pullulans* inoculato su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio *H7 Chitinophaga sp.* applicato per 48h (1000x).



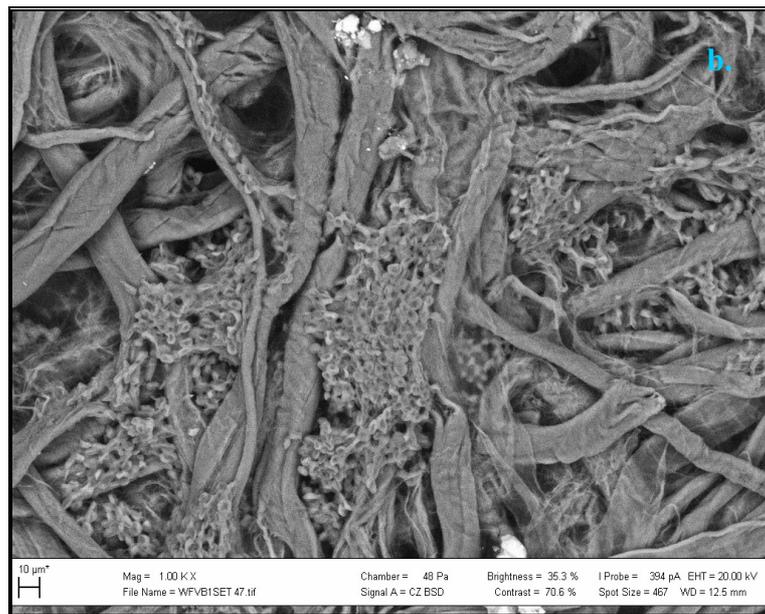
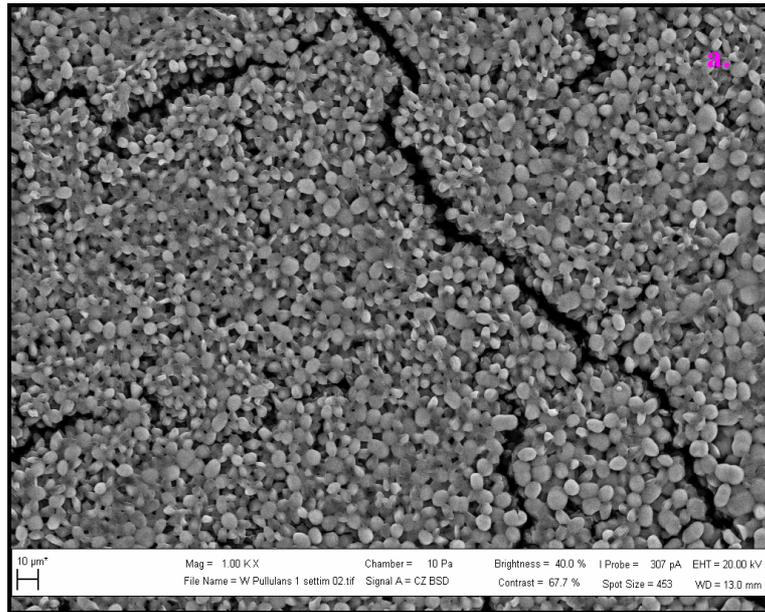
**Figura 41.** *A. pullulans* inoculato su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio *H7 Chitinophaga sp.* applicato per 7gg (1000x).



**Figura 42** *A. pullulans* inoculato su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio UR2 *Streptomyces coelicolor* applicato per 24h (1000x).



**Figura 43.** *A. pullulans* inoculato su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio UR2 *Streptomyces coelicolor* applicato per 48h (1000x).



**Figura 44.** *A. pullulans* inoculato su carta Whatman prima (a.) e dopo (b.) il trattamento con il batterio UR2 *Streptomyces coelicolor* applicato per 7gg (1000x).

La microanalisi, effettuata sui campioni di carta dopo i trattamenti con batteri, ha messo in evidenza alcune modificazioni nella loro composizione elementale (Tab. 35).

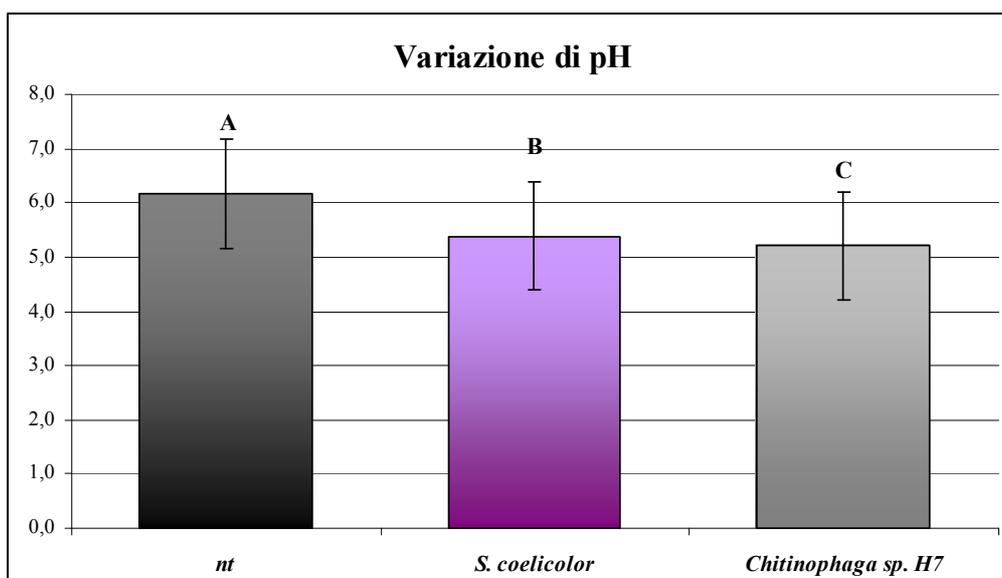
**Tabella 35. Composizione chimica elementale (ppm) dei campioni.**

I valori sono relativi a tutti i campioni di carta inoculati con *A. pullulans* non trattati (nt\_F) e trattati con H7 *Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor*. Valori medi di 9 repliche  $\pm$  deviazione standard.

	<i>nt_F</i>		<i>H7 Chitinophaga sp.</i>		<i>UR2 S. coelicolor</i>	
	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
<b>Mg</b>	---	---	1285,8	176,0	640,8	108,3
<b>K</b>	---	---	471,7	92,4	2054,7	296,2
<b>P</b>	2288,7	143,2	1854,3	237,9	4372,2	363,5
<b>S</b>	3856,5	126,9	1731,5	174,5	4176,1	249,4
<b>Ca</b>	5366,0	178,7	3108,7	442,2	7800,4	666,0
<b>Na</b>	---	---	254,2	86,7	156,5	52,6
<b>Cl</b>	---	---	---	---	31,6	18,9

A seguito del trattamento con H7 *Chitinophaga sp.*, si può notare una sensibile riduzione di fosforo (P) e zolfo (S), legata alla presenza di sostanza organica; mentre nel caso dell'applicazione di UR2 *S. coelicolor* si verifica un andamento inverso poiché il trattamento fa aumentare i valori originari di entrambi i microelementi. E' possibile notare, inoltre, la comparsa di elementi chimici non presenti nei campioni di carta inoculati con l'*A. pullulans*, quali magnesio (Mg), potassio (K) e sodio (Na) per entrambi i trattamenti batterici. Dopo l'applicazione di UR2 *S. coelicolor* è stato riscontrata anche la comparsa del cloro (Cl).

Durante la sperimentazione, inoltre, è stato monitorato il pH dei campioni di carta. Dall'istogramma realizzato mediante l'elaborazione dei valori medi di pH delle carte trattate e non trattate si evince che, rispetto alle carte inoculate con l'*A. pullulans* e non sottoposte a trattamenti con batteri, tutte le carte trattate con H7 *Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor* hanno presentato una diminuzione del valore di pH (Graf. 25).



**Grafico 25.** Analisi ANOVA della variazione dei valori di pH dei campioni di carta non trattati (nt\_F), trattati con *H7 Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor*. Valori medi di 5 repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard dalla media. Differenti lettere sulle barre dell'istogramma indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$  sulla base del post-hoc test Tukey's HSD.

Nell'istogramma si può notare come il valore medio del pH si abbassi in modo statisticamente significativo passando dal campione non trattato ai campioni trattati con i due batteri. I risultati sono stati confermati dall'analisi ANOVA e dal test Tukey's HSD che ha evidenziato raggruppamenti statisticamente significativi (Tab. 36-37).

**Tabella 36.** Analisi ANOVA eseguita sui valori di pH dei campioni non trattati e trattati con i batteri.

Fonte	GDL	Somma dei Quadrati	Media dei Quadrati	F	Pr > F
Modello	2	2,726	1,363	24,362	< 0,0001
Errore	72	4,028	0,056		
Totale Corretto	74	6,753			

**Tabella 37.** Valori medi di 5 repliche. Test Tukey's HSD eseguito sui valori di pH: campioni inoculati con *A. pullulans* non trattati (nt\_F) e trattati con *H7 Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor*. Differenti lettere indicano una differenza statisticamente significativa per  $p < 0,05$ .

Categoria	Media - pH	Gruppi
nt F	6,2	A
UR2 <i>S. coelicolor</i>	5,4	B
<i>H7 Chitinophaga sp.</i>	5,2	C

poi al fine di verificare in quale misura la vitalità dell'*A. pullulans*, il lavaggio effettuato dopo l'applicazione dei batteri ed i tempi di posa abbiamo influito sulla variazione del valore iniziale .

Dai test t-Student e le analisi ANOVA eseguiti sui dati di pH relativi ai batteri *H7 Chitinophaga sp.* ed UR2 *S. coelicolor*, è stato osservato che tutti i valori medi di pH dei campioni di carta inoculati con l'*A. pullulans* e sottoposti a biopulitura presentano un andamento molto simile poiché comportano un abbassamento del valore di pH delle carte di circa un punto, a seconda del trattamento applicato (Tab. 38).

**Tabella 38. Valori medi di pH (5 repliche) dopo il trattamento con *H7 Chitinophaga sp.* ed UR2 *S. coelicolor*.**

I dati di pH sono suddivisi in base alle diverse categorie dei campioni di carta: *nt\_F* = campione inoculato con *A. pullulans* e non trattato; *vivo* = campione inoculato con *A. pullulans* e trattato; *morto* = campione inoculato con *A. pullulans*, sterilizzato e trattato; *nl* = campione inoculato con *A. pullulans*, trattato e non sottoposto a lavaggio; *l* = campione inoculato con *A. pullulans*, trattato e sottoposto a lavaggio; *24h* = campione inoculato con *A. pullulans* e trattato per 24h; *48h* = campione inoculato con *A. pullulans* e trattato per 48h; *7gg* = campione inoculato con *A. pullulans* e trattato per 7gg.

<i>H7 Chitinophaga sp.</i>	Categorie							
	<i>nt_F</i>	<i>vivo</i>	<i>morto</i>	<i>nl</i>	<i>l</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>7gg</i>
<b>pH</b>	6,2	5,3	5,1	5,3	5,1	5,3	5,3	5,1

UR2 <i>S. coelicolor</i>	Categorie							
	<i>nt_F</i>	<i>vivo</i>	<i>morto</i>	<i>nl</i>	<i>l</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>7gg</i>
<b>pH</b>	6,2	5,4	5,3	5,6	5,2	5,3	5,5	5,3

Partendo da un valore medio di pH 6,2 dei campioni cartacei inoculati con il fungo melanico, si passa ad un *range* di valori medi di pH pari a 5,1÷5,3 nel caso dell'applicazione del batterio *H7 Chitinophaga sp.* ed a 5,2÷5,6 nel caso dell'applicazione del batterio UR2 *S. coelicolor*. Entrambi i trattamenti batterici, quindi, comportano un lieve aumento del pH che diventa leggermente acido, minando così la stabilità chimica della carta a seguito dell'instaurarsi dei processi di idrolisi.

## 5. DISCUSSIONE

Nel presente Progetto di Dottorato è stato sviluppato un metodo non invasivo di pulitura dei materiali archivistici e librari affetti da alterazioni cromatiche deturpanti provocate dai pigmenti fungini o dalle strutture pigmentate degli stessi microrganismi che rimangono adesi ai materiali. Lo studio si è articolato nell'applicazione su carte macchiate da funghi di trattamenti localizzati, basati sull'attività di miscele enzimatiche e di batteri con specifiche attività degradative.

Le tecniche attualmente adottate nel restauro per smacchiare e pulire i documenti dagli attacchi dei funghi sono di tipo chimico o meccanico, spesso aggressive o poco efficaci. Pertanto mettere a punto un sistema innovativo, rispettoso dei materiali ed economico, che risolva questo problema, rappresenta un obiettivo importante, che gli stessi restauratori chiedono al mondo della ricerca. La rimozione delle macchie fungine e del micelio stesso dalla carta rappresenta, quindi, un passaggio importante nelle operazioni di restauro e di conservazione poiché consente una migliore fruizione dell'opera d'arte e garantisce le condizioni igieniche idonee alla conservazione.

Il primo aspetto importante della ricerca è consistito nel mettere a punto una tecnica che permettesse di riprodurre una serie di macchie fungine sui supporti cartacei con le caratteristiche desiderate e, soprattutto, riproducibili per forma ed effetto. Disporre, infatti, di un numero sufficiente di campioni standardizzati e con caratteri il più possibile vicini a quelli che si presentano naturalmente sui materiali è stata la prima condizione da soddisfare sperimentalmente.

I funghi filamentosi sono responsabili di varie tipologie di danno alla carta, sia strutturale, ma più spesso cromatico, dovuto cioè alla produzione di macchie che possono presentare caratteristiche varie sia per forma che per colore. I pigmenti rilasciati nella carta dai funghi possono essere associati strutturalmente al micelio fungino (come ad esempio alcune melanine) od essere secreti e rilasciati nel substrato, che risulterà pertanto macchiato da sostanze chimiche più o meno solubili (flavonoidi, chinoni, carotenoidi, ecc.) (Florian, 2000). Nel corso dello studio si è cercato di considerare e, soprattutto, di controllare sperimentalmente tutte le principali variabili chimiche, fisiche e biologiche capaci di incidere sulle caratteristiche del sistema carta-fungo oggetto dello studio. Sono state utilizzate tre carte: Mezzofino, Perusia e Whatman, aventi caratteristiche chimico-fisiche diverse, al fine di valutare la variabilità dell'attacco fungino in base al substrato da colonizzare e le eventuali differenze nell'efficacia dei trattamenti di rimozione delle macchie. La carta Mezzofino è costituita in gran parte da pasta meccanica di legno, ma sono presenti anche alcune fibre di conifera (pasta semichimica); la carta Perusia è costituita da lino o canapa con aggiunta di cariche minerali, allo scopo di impartire e/o migliorare particolari caratteristiche del supporto, e mostra un buon grado di raffinazione; la carta Whatman è costituita esclusivamente da cellulosa pura e risulta essere la più resistente tra quelle selezionate grazie anche ad uno spessore

maggiore. Le carte sono state inoculate con tre specie fungine: *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus terreus* ed *Eurotium chevalieri*, differenti per tipo di micelio e pigmentazione, in modo tale da riprodurre delle “macchie-test” sulle quali sono stati applicati i trattamenti di biopulitura.

La caratterizzazione preliminare delle carte e la successiva valutazione dell'efficacia delle prove di pulitura è stata effettuata mediante un approccio integrato che ha previsto l'impegno delle seguenti metodologie: la microscopia elettronica a scansione, per l'analisi della superficie dei campioni corredata dalla microanalisi, per la determinazione della composizione elementare della carta; l'analisi colorimetrica, che ha consentito di valutare in maniera oggettiva l'efficacia estetica dei metodi di biopulitura; le misurazioni del pH, che hanno permesso di monitorare costantemente le condizioni chimiche di lavoro in modo tale da determinare la nocività o meno dei trattamenti batterici nei confronti del materiale cartaceo.

Grazie all'impiego della microscopia elettronica a scansione corredata da microanalisi, è stato possibile caratterizzare sia le carte tal quali (Mezzofino, Perusia e Whatman) sia gli effetti prodotti sui campioni cartacei a seguito dell'inoculo dei funghi (*A. pullulans*, *A. terreus* ed *E. chevalieri*) che ha prodotto effetti diversi a seconda delle caratteristiche della carta. E' stato infatti osservato che lo stesso fungo è in grado sia di produrre macchie diverse (colore, forma e dimensione) che di riuscire o meno ad aderire e penetrare all'interno delle fibre in base alla tipologia di carta su cui è stato inoculato. L'*A. pullulans* è il fungo più invasivo poiché è in grado di penetrare all'interno delle fibre di carta producendo macchie melaniche che si concentrano nella zona dell'inoculo, su carta Mezzofino, o con bordo più scuro, su carta Perusia e Whatman, ben visibili anche sul recto dei diversi campioni cartacei a seguito della penetrazione delle ife. Considerando, invece, i funghi *A. terreus* ed *E. chevalieri*, le macchie prodotte generalmente presentano una colorazione giallo-marrone e le ife fungine non sempre riescono a penetrare all'interno delle fibre.

La capacità del micelio fungino di penetrare ed aderire al substrato non è ancora pienamente nota, ma alcuni studi hanno dimostrato il ruolo fondamentale giocato da alcune componenti della parete cellulare (Gareth Jones, 1994). Secondo Howard (Howard *et al.*, 1989) la melanina non giocherebbe un ruolo fondamentale nell'adesione, ma, mantenendo un'alta concentrazione interna dei soluti e un'alta pressione idrostatica, assicurerebbe un'efficace penetrazione nel substrato stesso. I dati disponibili sugli adesivi fungini non sono molti nonostante tali informazioni siano fondamentali nel campo del restauro poiché, se si riuscisse a comprendere il modo in cui i funghi aderiscono al supporto, risulterebbe più semplice effettuare interventi atti alla loro rimozione.

L'analisi elementare, condotta per mezzo dell'EDS, ha permesso di rilevare come la specie fungina che ha più influito da un punto di vista della distribuzione dei microelementi sulla struttura della carta sia stata l'*A. terreus* che ha anche avuto la capacità di traslocare l'elemento calcio. Questo

fungo, infatti, è stato in grado di produrre acidi organici trasformando il calcio, già presente come carbonato nella carta, in ossalati di calcio (Pinzari *et al.*, 2010). Tale effetto è stato riscontrato solo sulla carta Perugia essendo l'unica ad avere calcio nella composizione di partenza.

Le analisi di pH eseguite sui campioni di carta hanno, invece, evidenziato che le specie fungine utilizzate non sono in grado di apportare cambiamenti importanti dal momento che i valori rimangono in un *range* di neutralità.

Le analisi colorimetriche hanno consentito di esprimere, in termini quantitativi, i parametri che definiscono il colore di tutte le “macchie test” al fine di valutare in maniera oggettiva le caratteristiche delle macchie. La diversità di partenza delle carte e le diverse specie fungine impiegate per l'inoculo hanno comportato un'elevata variabilità negli effetti su ciascuna di esse dello sviluppo fungino. Analizzando i risultati delle misure colorimetriche e, in particolare, considerando il valore di  $\Delta L$ , ossia la variazione di luminosità tra la carta tal quale e la carta inoculata con il fungo, l'analisi ANOVA ha permesso di distinguere, per tutti i tipi di carta, le macchie prodotte dall'*A. pullulans* da quelle prodotte dagli altri due funghi l'*A. terreus* e l'*E. chevalieri*. Ciò è dovuto al fatto che l'*A. pullulans* è l'unico dei tre funghi a produrre ife pigmentate e fortemente melaniche capaci di penetrare nelle fibre di cellulosa, colorandole con un meccanismo più invasivo.

Il passo successivo ha previsto l'applicazione sulle “macchie-test” di diversi trattamenti enzimatici. La scelta è stata indirizzata verso tre classi di enzimi da impiegare singolarmente o in combinazione: lipasi e proteasi, per agire sia sulle ife fungine atte all'ancoraggio al supporto cartaceo provocandone il distacco (Florian, 2002; Caneva *et al.*, 2005; De Mico *et al.*, 2009; Tavzes *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2009); chitinasi per agire sulla parete cellulare del fungo, costituita principalmente da chitina, liberando il pigmento ivi contenuto (Florian, 1995 e 2002; Caneva *et al.*, 2005).

Da una prima osservazione ad occhio nudo è stato possibile notare che la macchia prodotta dai funghi *A. terreus* ed *E. chevalieri* dopo i trattamenti enzimatici migliora sensibilmente. Diverso è il caso relativo all'*A. pullulans* poiché la macchia melanica peggiora dopo i trattamenti enzimatici diventando più scura e spandendosi sul supporto cartaceo. La pulitura ha molto probabilmente indotto l'apertura delle ife ed il conseguente rilascio fra le fibre di cellulosa del pigmento scuro, provocando un peggioramento dell'aspetto delle macchie originali.

Le immagini ottenute al SEM mostrano nel caso dell'*A. terreus* e dell'*E. chevalieri* una forte riduzione della presenza di spore e micelio fungino sulla superficie dei campioni cartacei a seguito dei trattamenti enzimatici. Osservando le immagini dell'*A. pullulans*, invece, è stato possibile notare

la massiccia presenza di conidi e di ife fungine fra le fibre di carta anche dopo i trattamenti enzimatici: ciò a testimonianza che il fungo è saldamente ancorato al substrato e, quindi, difficile da eliminare.

La microanalisi eseguita sui campioni di carta dopo i trattamenti enzimatici, ha messo in evidenza alcune modificazioni nella loro composizione elementale. In generale si può notare l'aumento del fosforo (P), probabilmente dovuto al tampone fosfato utilizzato per sciogliere gli enzimi, tampone che è risultato rimanere sui campioni dopo il trattamento e che pertanto dovrà essere sostituito da una soluzione veicolante più facilmente eliminabile dopo i trattamenti. Inoltre è possibile riscontrare come la concentrazione di alluminio (Al), silice (Si), e calcio (Ca) aumenti sia dopo l'inoculo fungino che dopo il trattamento, mentre quella di magnesio (Mg) diminuisca. Importante è il valore relativo all'elemento potassio (K), assente nella composizione originaria delle carte, che aumenta sensibilmente sia prima che dopo i trattamenti enzimatici ad indicare che la biomassa fungina è ancora presente sulle carte. Anche lo zolfo (S), presente solo in traccia, aumenta a seguito dell'inoculo fungino, ma il valore rimane pressoché invariato dopo i trattamenti enzimatici. Infine, è stato riscontrato un forte aumento del cloro (Cl), inizialmente presente solo in traccia, nei campioni di carta a seguito dell'inoculo fungino, mentre il successivo trattamento di pulitura ha abbassato notevolmente la sua concentrazione.

Esaminando i dati colorimetrici relativamente all'*A. terreus* ed all'*E. chevalieri*, si è misurato un incremento della variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) e della variazione globale di colore ( $\Delta E$ ). In effetti sono i funghi la cui macchia presenta i miglioramenti estetici più apprezzabili, anche ad occhio nudo, dopo i trattamenti enzimatici. In entrambi i casi la differenza più marcata riguarda la variazione di luminosità ( $\Delta L$ ) in base alla quale la carta Perusia presenta valori significativamente molto più elevati rispetto alle altre due carte. A ciò si affianca, sempre in Perusia, un valore significativamente maggiore che nelle altre due carte del  $\Delta E$ , ovvero la variazione globale di colore fra trattato e non trattato. Considerando che, prima del trattamento, la macchia prodotta dall'*A. terreus* e dall'*E. chevalieri* sulla carta Perusia presenta valori molto inferiori rispetto a quelli misurati nelle macchie prodotte dagli stessi funghi sulle altre due tipologie di carta, è possibile affermare che il risultato di pulitura migliore sia stato ottenuto sulla Perusia.

I risultati ottenuti dal trattamento enzimatico delle macchie prodotte dall'*A. pullulans* si discostano molto dai precedenti. Dopo i trattamenti enzimatici è stato misurato un cambiamento delle coordinate di colore verso valori negativi che indica uno scurimento delle macchie melaniche. La diminuzione nei valori della luminosità dopo il trattamento con enzima chitinasi lascia pensare ad un'effettiva azione dell'enzima che sarebbe in grado di rompere le strutture la parete cellulare

fungina determinando il rilascio del pigmento melanico e provocando un peggioramento dell'aspetto delle macchie bruno-nerastre.

Una differenza è emersa dai risultati relativi ai tempi di posa delle soluzioni enzimatiche sulle macchie dell' *A. pullulans*: una variazione statisticamente significativa è stata riscontrata nella differenza di luminosità ( $\Delta L$ ) che è risultata maggiore per i 30 minuti di posa rispetto ai 60 minuti. Aumentando il tempo di posa, infatti, è aumentato il tempo di azione dell'enzima che ha materialmente sciolto la parete cellulare fungina determinando nell'*A. pullulans* il rilascio, fra le fibre di cellulosa, del pigmento scuro, provocando paradossalmente un peggioramento dell'aspetto delle macchie.

Il pH delle carte è stato monitorato durante tutta la sperimentazione. Un qualsiasi trattamento di pulitura o di restauro può, infatti, essere efficace nell'eliminare la macchia fungina dalla carta ma comportare un cambiamento del pH verso valori acidi che determinano un indebolimento delle fibre di cellulosa e ne rendono comunque sconsigliabile l'utilizzo, nonostante l'efficacia. Dopo i trattamenti, il valore di pH rimane entro valori neutrali, ben tollerati dalla carta. Infatti i trattamenti permettono alle carte di mantenere un pH compreso tra 6,0 e 7,5 grazie anche alla presenza del tampone con pH 7,0, utilizzato per veicolare le miscele enzimatiche sulle carte. Pertanto i trattamenti enzimatici testati nella sperimentazione non sembrano comportare a livello del pH di superficie effetti secondari nocivi per il substrato cartaceo.

Nella seconda fase della sperimentazione è stata valutata la percorribilità di un diverso approccio per la rimozione delle macchie melaniche prodotte dall' *A. pullulans*, che si basa sull'impiego di ceppi batterici vitali e sullo sfruttamento delle loro capacità degradative.

Oggetto della selezione sono stati ceppi batterici appartenenti alla collezione *ENEA-Lilith*, ceppi ambientali isolati da siti archeologici o aree contaminate e caratterizzati, in precedenti lavori, per le loro proprietà biotecnologiche (Tasso *et al.* 2008; Sprocati *et al.* 2006, 2008, 2009 e 2013). In generale, l'impiego di batteri vitali per la pulitura di opere d'arte prevede che tali microrganismi rispondano a dei prerequisiti necessari a garantire la non nocività per l'opera e l'operatore stesso che li impiegherà. A tale scopo sono stati esclusi dalla selezione ceppi patogeni e ceppi sporigeni. Un ulteriore requisito da soddisfare, nel caso dell'impiego dei microrganismi sul supporto cartaceo, è l'assenza di attività cellulolitica, per escludere tutti quei batteri in grado di utilizzare i materiali cartacei come substrato. Soddisfatte queste condizioni, è stata operata una selezione di ceppi batterici che fossero capaci di rimuovere il materiale fungino o di degradare i pigmenti prodotti dai microfunghi nel corso del biodeterioramento della carta.

La selezione dei candidati ideali per l'applicazione di biopulitura si è focalizzata sulla ricerca di due

caratteristiche: l'attività proteolitica, per individuare i batteri in grado di dissolvere le strutture che legano le ife fungine alle fibre di cellulosa, strutture che hanno perlopiù una composizione di natura proteica; l'attività chitinolitica, per verificare la capacità dei ceppi batterici di degradare la chitina, la componente strutturale essenziale della parete cellulare fungina, attraverso l'attività degli enzimi chitinolitici.

A seguito dei risultati ottenuti sono stati scelti i seguenti batteri: UW11 *Acinetobacter lwoffii*, UW28 *Arthrobacter sp.*, UI3 *Bacillus cereus*, UI28 *Bacillus cereus*, MCC-Z *Flavobacterium sp.*, CONC12 *Pseudomonas stutzeri*, UI5 *Serratia ficaria* e H7 *Chitinophaga sp.*

Considerati i risultati ottenuti a seguito del trattamento enzimatico delle macchie melaniche, ovvero l'espansione della macchia probabilmente dovuta alla liberazione della melanina dalle ife fungine, l'attenzione è stata rivolta verso la ricerca di ceppi batterici capaci di degradare la melanina. Lo studio delle fonti bibliografiche (Diamantidis *et al.*, 2000; Ramachandran *et al.* 2000; Suzuki *et al.*, 2003; Kiiskinen *et al.*, 2004; Machczynski *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2006; Niladevi, 2008; Madhavi *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2011; Le Roes-Hill *et al.*, 2011; Imran *et al.*, 2012) ha consentito di individuare alcuni ceppi batterici aventi caratteristiche e potenzialità simili a quelle riscontrate nei *white rot fungi*, ovvero complessi enzimatici in grado di attuare un processo di degradazione nei confronti delle melanine: *Streptomyces mauvecolor* (UW43), *Streptomyces spororaveus* (UT8), *Streptomyces heteromorphus* (OSS34), *Nocardia alba* (TPID5) e *Streptomyces coelicolor* (UR2). I ceppi batterici selezionati per la sperimentazione sono stati saggiati sia per verificare la loro attività cellulosolitica, proteolitica e chitinolitica sia per determinare la produzione di enzimi ligninolitici analizzando la capacità dei batteri di decolorare quattro diversi coloranti azoici: Orange G, Congo Red, Amido Black ed Acido Tannico (Selvam, 2003). Combinando i risultati ottenuti dai test effettuati, è stato possibile selezionare il ceppo UR2 *Streptomyces coelicolor*, che esprime una forte attività chitinolitica ed una buona capacità di decolorazione.

La sperimentazione è proseguita utilizzando come provini dei campioni di carta Whatman per la maggiore resistenza di questo supporto rispetto alla carta Mezzofino e Perugia ed applicando singolarmente i nove ceppi batterici inglobati in una matrice di agar.

Come nel caso dei trattamenti enzimatici, da una prima osservazione ad occhio nudo è stato possibile notare che la macchia prodotta dal fungo melanico *A. pullulans* sulla carta Whatman peggiora sensibilmente dopo i trattamenti con i batteri. Il risultato dell'applicazione è una macchia più scura di quella originale probabilmente a causa del rilascio, fra le fibre di cellulosa, del pigmento scuro che porta ad un sensibile peggioramento del danno cromatico iniziale.

I dati colorimetrici sono stati utilizzati per verificare in quale misura ogni ceppo batterico abbia influito sul risultato finale. Applicando la DFA, ed utilizzando come criterio di raggruppamento i

differenti trattamenti con batteri, sono emerse indicazioni importanti sulle specie batteriche che hanno maggiormente influito sui cambiamenti di colore delle macchie. Una riduzione significativa della luminosità ( $\Delta L$ ) è stata ottenuta dopo il trattamento delle macchie con *H7 Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor*.

Allo scopo di riprodurre in laboratorio le condizioni in cui vengono a trovarsi i materiali cartacei sottoposti a deterioramento ad opera dei microrganismi le prove di pulitura sono state effettuate su campioni di carta “vivi”, cioè inoculati con il fungo, e “morti”, ovvero campioni inoculati e sottoposti a sterilizzazione in autoclave, al fine di uccidere l'*A. pullulans*. In questo modo è stato simulato sia il caso di una infestazione fungina in atto che di una contaminazione pregressa e non più attiva. Dall'analisi ANOVA e dal test t-Student eseguiti sui trattamenti batterici con *H7 Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor*, sono emerse complessivamente differenze significative considerando le categorie dei campioni “vivi” e “morti”. I risultati ottenuti evidenziano una differenza di luminosità ( $\Delta L$ ) e di variazione globale di colore ( $\Delta E$ ) più elevata per i campioni con fungo vitale ad indicare la capacità di continuare a produrre il pigmento melanico, nonostante l'applicazione dei trattamenti batterici.

Metà dei campioni, sia “vivi” che “morti”, sono stati sottoposti a delle prove di lavaggio con un tensioattivo (Tween 40 all'1%) per eliminare sia eventuali depositi fungini superficiali sia possibili tracce del terreno utilizzato nel trattamento. Si è ricorso all'utilizzo del tensioattivo poiché agente emulsionante in grado di facilitare la rimozione del materiale superficiale. Non è stata riscontrata nessuna differenza apprezzabile tra i campioni di carta sottoposti e non a lavaggio dopo i trattamenti batterici. I risultati ottenuti fanno pensare che il tensioattivo utilizzato non sia stato in grado di rimuovere il materiale rilasciato a seguito dell'azione dei trattamenti di pulitura.

Sono stati inoltre saggiati tre tempi di posa differenti: 24h, 48 h e 7gg. Il test t-Student, così come l'analisi ANOVA, effettuati sui dati colorimetrici confrontando i diversi tempi di posa, restituiscono differenze statisticamente significative solo nel caso dell'applicazione di UR2 *S. coelicolor*. L'aumento della luminosità verso valori negativi dopo 7gg di trattamento, potrebbe risiedere nell'effettiva azione dei UR2 *S. coelicolor*: aumentando il tempo di contatto tra il batterio ed il fungo, infatti, aumenta il tempo di azione dei complessi enzimatici del batterio che potrebbero materialmente rompere la parete cellulare fungina e determinare la liberazione del pigmento melanico del fungo *A. pullulans* provocando, così, una dispersione del colorante.

I campioni di carta trattati con *H7 Chitinophaga sp.* e UR2 *S. coelicolor* sono stati osservati al SEM per valutare eventuali cambiamenti micro-morfologici del micelio fungino a seguito dell'applicazione dei batteri. Dalle immagini ottenute al microscopio elettronico a scansione si è notato come nonostante sia ancora visibile la presenza di conidi e micelio fra le fibre di carta, a

seguito dei trattamenti la densità del fungo sulla superficie dei campioni cartacei si è ridotta. L'eliminazione della pigmentazione dovuta al fungo non è stata di fatto ottenuta e, ad una osservazione ad occhio nudo dei campioni trattati, la macchia nera è ancora ben visibile.

La microanalisi, effettuata sui campioni di carta dopo i trattamenti con batteri, ha messo in evidenza alcune modificazioni nella loro composizione elementale. A seguito del trattamento con H7 *Chitinophaga sp.*, è stata notata una sensibile riduzione di fosforo (P) e zolfo (S), legata alla presenza di sostanza organica ad indicare una diminuzione della biomassa fungina sui campioni di carta. Nel caso dell'applicazione di UR2 *S. coelicolor* si è verificato un andamento inverso poiché il trattamento ha fatto aumentare i valori originari di entrambi i microelementi. E' stato possibile notare, inoltre, la comparsa di elementi chimici non presenti nei campioni di carta inoculati con l'*A. pullulans*, quali magnesio (Mg), potassio (K) e sodio (Na) per entrambi i trattamenti batterici. Dopo l'applicazione di UR2 *S. coelicolor* è stata riscontrata anche la comparsa del cloro (Cl). E' possibile ipotizzare che le modificazioni della composizione elementale dei campioni di carta tal quali e sottoposti ai trattamenti di biopulitura siano dovute sia all'*A. pullulans* che ai batteri impiegati per la rimozione del materiale fungino e delle alterazioni cromatiche.

Infine è stato monitorato il pH dei campioni di carta prima e dopo i trattamenti di pulitura. In entrambi i casi il valore di pH diventa leggermente acido minando così la stabilità chimica della carta a seguito dell'instaurarsi dei processi di idrolisi. Infatti l'acidità attacca e rompe sia i legami tra le molecole di glucosio che costituiscono le catene di cellulosa che i legami peptidici tra gli amminoacidi delle collature a base di gelatina comportando un accorciamento ed un indebolimento delle catene polimeriche e, conseguentemente, un infragilimento del materiale cartaceo.

## 6. CONCLUSIONI

La sperimentazione svolta si pone in un contesto di ricerca innovativo, quello del Biorestauro, e rappresenta un primo passo nel campo della biopulitura dei materiali cartacei, passaggio essenziale nelle operazioni di restauro e di conservazione sia per permettere una migliore fruizione dell'opera sia per garantire le condizioni igieniche idonee alla conservazione.

La prima parte dello studio, ovvero l'applicazione dei trattamenti enzimatici per la rimozione delle macchie fungine dalla carta, si pone come un approfondimento di una metodica di restauro attualmente impiegata sui supporti cartacei parallelamente alle tradizionali tecniche di restauro chimico-fisiche. La seconda parte della ricerca, che ha previsto l'impiego dei batteri come agenti di restauro, rappresenta invece il primo tentativo di pulitura dei materiali archivistici e librari affetti da alterazioni cromatiche fungine attraverso un approccio completamente biologico.

Nel campo del restauro l'utilizzo degli enzimi è applicato già a partire dagli anni '70, principalmente per operazioni di pulitura e consolidamento delle opere d'arte. Una delle principali caratteristiche degli enzimi è quella di essere altamente specifici, cioè sono in grado di catalizzare una o al massimo pochi tipi di reazione con un substrato simile, rendendone sicuro l'utilizzo anche su materiali costituiti da più componenti. Quasi inesistenti, invece, risultano essere le fonti bibliografiche inerenti la capacità dei batteri di rimuovere sostanze organiche ed inorganiche dai beni archivistici e librari. Gli studi condotti finora hanno dimostrato che i processi di pulitura basati sull'impiego di microrganismi non presentano rischi se condotti in modo appropriato. Ciò prevede l'esclusione di microrganismi patogeni per l'uomo e l'ambiente e l'adozione di ceppi batterici non sporigeni, cioè incapaci di sopravvivere in forma di spora quiescente anche dopo lunghi intervalli di tempo. Inoltre l'impiego dei microrganismi, in alcuni casi, presenta dei vantaggi rispetto agli enzimi in particolare quando la sostanza organica da rimuovere è particolarmente complessa proprio come nel caso delle macchie melaniche di natura fungina. Infatti accade che gli enzimi, essendo programmati per attaccare determinati legami chimici, si trovano in difficoltà di fronte a molecole complesse che richiedono un *pool* di enzimi differenti, non necessariamente disponibili in commercio. In tale contesto i batteri sono in grado, per effetto di meccanismi d'induzione genica, di sintetizzare gli enzimi adatti alla degradazione del materiale con il quale si trovano a contatto, reagendo in modo "intelligente" alle condizioni ambientale circostanti. Quindi i batteri sono in grado di indurre processi più specifici degli enzimi e molto selettivi e, conseguentemente, non invasivi, agendo solo su composti bersaglio senza interagire con molecole diverse da quelle per cui sono impiegati. Oltre a ciò l'utilizzo dei batteri non richiede condizioni sperimentali restrittive, quali temperatura e pH, e risulta essere più economico rispetto sia agli enzimi che alle classiche metodologie poiché è possibile utilizzare microrganismi ambientali isolati da diverse matrici, come

siti archeologici e terreni contaminati. Queste matrici rappresentano nicchie ecologiche dove i batteri, sottoposti a particolari pressioni ambientali, hanno sviluppato diverse *vie* metaboliche come risposte adattative. Tutti i batteri utilizzati in questa ricerca sono stati testati per la prima volta in trattamenti di biopulitura e sono stati specificamente selezionati tra numerosi ceppi ambientali della collezione *ENEA-Lilith*, isolati e caratterizzati per applicazioni biotecnologiche.

Fondamentale per la diagnostica degli effetti dell'attività degli organismi sia deteriogeni che pulitori sul materiale cartaceo è stato l'approccio analitico integrato, basato sull'impiego di differenti tecniche fisiche, chimiche e biologiche, in grado di fornire informazioni diverse e spesso complementari.

Nonostante la complessità del problema non abbia permesso di definire una nuova procedura, sono stati ottenuti dei risultati che rappresentano certamente un buon punto di partenza per lo sviluppo di un protocollo di biopulitura:

- i trattamenti enzimatici basati sull'impiego di lipasi e proteasi hanno determinato una forte riduzione della presenza fungina con un sensibile miglioramento estetico dei campioni di carta inoculati con *A. terreus* ed *E. chevalieri*, visibile sia ad occhio nudo che mediante analisi colorimetriche;

- l'azione dell'enzima chitinasi nei confronti del fungo *A. pullulans* ha determinato il rilascio, fra le fibre di cellulosa, del pigmento melanico causando probabilmente la rottura della parete cellulare fungina;

- la selezione dei ceppi batterici ha permesso di individuare otto microorganismi (UI5 *Serratia ficaria*, MCC-Z *Flavobacterium sp.*, CONC12 *Pseudomonas stutzeri*, UI28 *Bacillus cereus*, UW28 *Arthrobacter sp.*, UW11 *Acinetobacter lwoffii*, UI3 *Bacillus cereus* e H7 *Chitinophaga sp.*) che possiedono sia attività proteolitica, utile per rompere il legame tra il fungo ed il substrato cartaceo, sia attività chitinolitica, sfruttabile per degradare la chitina, componente strutturale fondamentale della parete cellulare fungina; ed il ceppo *Streptomyces coelicolor* (UR2), con capacità di decolorazione di diversi coloranti azoici, potenzialmente utile per la degradazione del pigmento melanico liberato a seguito della rottura delle cellule fungine;

- i trattamenti batterici con i ceppi H7 *Chitinophaga sp.* e UR2 *Streptomyces coelicolor* hanno determinato un'importante diminuzione della presenza del fungo *A. pullulans* sulla superficie dei campioni cartacei ma, contestualmente, hanno causato uno scurimento delle macchie melaniche.

Quest'ultimo risultato può essere considerato il punto di partenza per le future prove sperimentali.

La melanina liberata nel supporto cartaceo e non più inclusa nelle ife fungine potrebbe risultare, infatti, più facilmente aggredibile da parte sia di altri ceppi microbici opportunamente selezionati che di ulteriori trattamenti enzimatici.

Un altro aspetto importante da sviluppare in futuro riguarda lo studio di microrganismi in grado di agire sui meccanismi di ancoraggio delle strutture fungine al supporto cartaceo in modo tale da rimuovere il fungo senza causare ulteriori danni all'opera d'arte a seguito del rilascio di melanina fra le fibre di cellulosa dovuto alla rottura della parete cellulare fungina a seguito dell'applicazione dei trattamenti batterici.

Inoltre sarà fondamentale valutare un'adeguata tecnica di lavaggio del materiale cartaceo da effettuare al termine delle procedure di biopulitura. Queste operazioni sono di grande importanza in quanto dovranno garantire sia valori di pH neutrali, o comunque ben tollerati dalla carta, sia un'idonea ed efficace rimozione di residui organici, di enzimi e di cellule vive e morte dei microrganismi dai supporti a seguito dei trattamenti effettuati.

Infine sarà opportuno stimare i possibili effetti nel tempo che i processi di biopulitura potranno avere sui campioni di carta mediante prove di invecchiamento accelerato.

## 7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio relatore, il Professor Corrado Fanelli per la disponibilità mostrata in questi anni di lavoro.

Ringrazio l'Istituto Centrale per il Restauro e la Conservazione del Patrimonio Archivistico e Librario e la Direttrice Maria Cristina Misiti per avermi dato l'opportunità di svolgere la tesi. In particolare, ringrazio la Dott.ssa Flavia Pinzari e la Dott.ssa Maria Carla Sclocchi per aver messo a mia disposizione il Laboratorio di Biologia; Piero Coalizzi per le analisi al SEM-EDS; il Dott. Daniele Ruggiero e la Dott.ssa Lorena Botti per le analisi di pH e colorimetria, ma soprattutto per la disponibilità e l'entusiasmo di lavorare insieme.

Ringrazio il Laboratorio di Microbiologia Ambientale e Biotecnologie Microbiche dell'Unità di Caratterizzazione, Prevenzione e Risanamento Ambientale dell'Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie, l'Energia e lo Sviluppo Economico Sostenibile (ENEA – Casaccia). In particolare, i miei più sentiti ringraziamenti vanno alla Dott.ssa Anna Rosa Sprocati per avermi accolto nel suo laboratorio e per aver curato questo lavoro sperimentale con cura ed entusiasmo.

Vorrei esprimere la mia gratitudine soprattutto per la Dott.ssa. Flavia Tasso senza la quale questa ricerca non sarebbe stata possibile. Inoltre, ringrazio la Dott.ssa Chiara Alisi, Dott.ssa Paola Marconi, Dott.ssa Tiziana Beltrani, Dott.ssa Giada Migliore, Dott.ssa Alessia Fiore e Dott.ssa Luisa Pirone per avermi aiutato e sostenuto durante questi ultimi tre anni di lavoro.

Un ringraziamento speciale alla Dott.ssa Michela Grimaldi ed al Dott. Matteo Mazzoni miei splendidi compagni di viaggio con cui ho condiviso gioie e dolori nel corso degli ultimi tre anni.

Ultima, ma prima per importanza, la mia famiglia che desidero ringraziare con tutto il cuore per il loro immenso amore, l'immane sostegno, la pazienza e specialmente per aver creduto in me.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. AA.VV. (2002), *Chimica e biologia applicate alla conservazione degli archivi*. Ministero per i Beni e le Attività Culturali, Centro di Fotoriproduzione Legatoria e Restauro degli Archivi di Stato, Pubblicazione degli Archivi di Stato, Saggi 74.
2. AA.VV. (2010), *Biodegradation of azo dyes*. The Handbook of Environmental Chemistry. Springer-Verlag.
3. Abo Ellil A.H.A. (2005), *Melanin inhibitors and dicarboximide interconversion in some phytopathogenic fungi*. Egypt. J. Phytopathol., Vol. 33, No.1, pp. 21-32.
4. Adelantado C., Bello C., Borrell C., Calvo M.A. (2005), *Evaluation of the Antifungal Activity of Products Used for Disinfecting Documents on Paper in Archives*. Restaurator - International Journal for the Preservation of Library and Archival Material, Vol. 26, pp. 235–238.
5. Alfano G., Lustrato G., Belli C., Zanardini E., Cappitelli F., Mello E., Sorlini C., Ranalli G. (2011), *The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: the case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 65, pp. 1004-1011.
6. C. Alisi, R. Musella, F. Tasso, C. Ubaldi, S. Manzo, C. Creminisi, A.R. Sprocati (2009), *Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistanc*. Science of the Total Environment, Vol. 407, No. 8, pp. 3024-3032.
7. Allsopp D., Seal K.J., Gaylarde C.C. (2004), *Introduction to Biodeterioration*. Cambridge University Press.
8. Ando H., Kondoh H., Ichihashi M., Hearing V.J. (2007), *Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase*. Journal of Investigative Dermatology (2007), Volume 127, pp. 751-761.
9. 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, Vol. 5, No. 9, pp. 2453-2459.
10. Anzani M., Berzioli M., Cagna M., Campani E., Casoli A., Cremonesi P., Fratelli M., Rabbolini A., Riggiardi D. (2008), *Gel rigidi di Agar per il trattamento di pulitura di manufatti in gesso*. Quaderno No. 6, CESMAR7, Il Prato.
11. Arai H. (2000), *Foxing caused by fungi: twenty-five years of study*. Int. Biodeter. Biodegrad., Vol. 46, pp. 181-188.
12. Ariño X., Saiz-Jimenez C. (1996), *Biological diversity and cultural heritage*. Aerobiologia, Vol. 12, pp. 279-282.
13. Arroyo M., Aldred D., Magan N. (2008), *Environmental factors and preservatives affect carbon utilization patterns and niche overlap of food spoilage fungi*. Fungal Ecology I, Elsevier, pp. 24-32.
14. Aticelca MC 22-72: *Determinazione del pH superficiale della carta e del cartone*. Aticelca MC 23-73: *Determinazione del pH di un estratto acquoso della carta e del cartone. Metodo per estrazione a freddo*. <http://www.aticelca.it>.
15. Atlas R.M., Chowdury A.N., Gaury K.L. (1988), *Microbial calcification of gypsum-rock and sulphated marble*. Studies in Conservation, Vol. 33, pp. 149-153.
16. Babu A.M., Kumar V., Datta R.K. (1999), *Development of special hyphal branches of Phyllactinia corylea on host and non-host surfaces*. Mycopathologia N° 145, pp. 29-33. Kuwer Academic Publishers.
17. Bacosa H.P., Suto K., Inoue C. (2012), *Bacterial community dynamics durino the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 74, pp. 109–115.

18. Bajaj I.B., Survase S.A., Saudagar P.S., Singhal R.S. (2007), *Gellan Gum: Fermentative Production, Downstream Processing and Application*. Food Technol. Biotechnol., 45: 341-354.
19. Baldrian P. (2006), *Fungal laccases - occurrence and properties*. FEMS - Microbiology Reviews, Vol. 30, No. 2, pp. 215–242.
20. Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R. (1996), *Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review*. Biores. Technol., Vol. 58, pp. 217-227.
21. Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R. (2006), *Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review*. Bioresource Technology, Vol. 58, pp. 217-227.
22. Banerjee A., Supakar S., Banerjee R. (2014), *Melanin from the nitrogen-fixing bacterium Azotobacter chroococcum: a spectroscopic characterization*. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0084574>.
23. Barboza-Corona J.E., Contreras J.C., Velázquez-Robledo R., Bautista-Justo M., Gómez-Ramírez M., Cruz-Camarillo R., Ibarra J.E. (1999), *Selection of chitinolytic strains of Bacillus thuringiensis*. Biotechnology Letters, N° 21, pp. 1125-1129. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
24. Barragán B.E., Costa C., Márquez M.C. (2006), *Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media*. Dyes and Pigments, Vol. 75, pp. 73-81, Elsevier.
25. Bartnicki-Garcia S., Reyes E. (1964), *Chemistry of spore wall differentiation in Mucor rouxii*. Arch. Biochem. Biophys, Vol. 108, pp. 125-133.
26. Bassler B.L., Charles Y., Lee Y.C., Roseman S. (1991), *Chitin Utilization by Marine Bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by Vibrio furnissii*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, N° 36, pp. 24276-24286. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc - Printed in U.S.A.
27. Bell A.A., Wheeler M.H (1986), *Biosynthesis and functions of fungal melanins*. Annu. Rev. Phytopathol, Vol. 24, pp. 411-451.
28. Bellucci R., Buzzegoli E., Matteini M., Moles A. (1982), *Impiego di emulsionanti quali supportanti di solventi in operazioni di pulitura dei dipinti*. Metodo e Scienza, pp. 261-262.
29. Bellucci R., Cremonesi P. (1994), *L'uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti*. Kermes, arte e tecnica del restauro, Vol. 21, pp. 45-64.
30. Bellucci R., Cremonesi P., Pignagnoli G. (1999), *A Preliminary Note on the Use of Enzymes in Conservation: The Removal of Aged Acrylic Resin Coatings with Lipase*. Studies in Conservation, Vol. 44, No. 4, pp. 278-281. Published by: International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works.
31. Benfey O.T. (1958), *August Kekule and the birth of the structural theory of organic chemistry in 1858*. Journal of Chemistry Education, Vol. 35, pp. 21–23.
32. Berthelin J. (1983). *Microbial weathering processes*. In Microbial Geochemistry a cura di Krumbein W.E. Blackwell Scientific Publications, London, pp. 223-262.
33. Bettolo R.M., Migneco M.L., Plossi Zappalà M. (2007), *I materiali cellulosici e le loro materie prime* in Campanella L., Casoli A., Colombini M.P., Marini Bettolo R., Matteini M., Migneco M.L., Montenero A., Nodari L., Piccioli C., Plossi Zappalà M., Portalone G., Russo U., Sammartino M.P., “Chimica per l’arte”. Zanichelli editore, Bologna.
34. Bicchieri M., Pappalardo G., Romano F.P., Sementilli F.M., De Acutis R. (2001), *Characterisation of foxing stains by chemical and spectrometric methods*. Restaurator, Vol. 22, pp. 1-19.
35. Bicchieri M. (2002), *Il Laboratorio di Chimica dell’Istituto Centrale per la Patologia del Libro*. Analysis, No. 1+2, pp. 1-11.
36. Bicchieri M., Monti M., Piantanida G., Sodo A. (2007), *Diagnostica? No, ricerca. La riduzione... 10 anni dopo*. MiBAC. Il restauro in Italia e oltre i confini. Testaura – III Salone del Restauro dei Beni Culturali. XI Salone dei Beni e delle Attività Culturali. Venezia 29 Novembre – 1 Dicembre.

37. Bicchieri M., Monti M., Piantanida G., Sodo A., Fleres P. (2007), *L'abito non fa il ferrogallotannico*. MiBAC. Il restauro in Italia e oltre i confini. Testaura – III Salone del Restauro dei Beni Culturali. XI Salone dei Beni e delle Attività Culturali. Venezia 29 Novembre – 1 Dicembre.
38. Bilińska B. (1996), *Progress of infrared investigations of melanin structures*. Spectrochimica Acta Part A, Vol. 52, pp. 1157-1162, Elsevier.
39. Binkley J., Kandelbauer A. (2003), *Effluent treatment-enzymes in activated sludge*. In: Cavaco-Paulo A., Guebitz G.M. (eds) - Textile processing with enzymes. Woodhead, Cambridge (UK), pp. 199–221.
40. Blank Z., Reimschuessel A.C. (1974), *Structural studies of organic gels by SEM*. Journal of Materials Science, Vol. 9, No. 11, pp. 1815-1822.
41. Blois M.S. (1978), *The melanins: their synthesis and structure*. Photochemistry and Photobiology Reviews, Vol. 3, pp. 115-134.
42. Bloomsfield B.J., Alexander M. (1967), *Melanins and Resistance of Fungi to Lysis*. Journal of Bacteriology, Vol. 93, No. 4, pp. 1276-1280. American Society for Microbiology Printed in U.S.A.
43. Blüher A., Grube A., Bornscheuer U., Banik G. (1997), *A reappraisal of the enzyme lipase for removing drying oil stains on paper*. The Paper Conservator – The Journal of the Institute of Paper Conservator, Vol. 21. Edited by Nancy Bell.
44. Blümel S., Knackmuss H.J., Stolz A. (2002), *Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from Xenophilus azovorans KF46F*. Appl. Env. Microbiol., Vol 68, pp. 3948–3955.
45. Bochner B. (1989), *“Breathprints” at the microbial level*. ASM News, Vol. 55, pp. 536-539.
46. Bollag J.M., Leonowicz A. (1984), *Comparative studies of extracellular fungal laccases*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 48, pp. 849–854.
47. Botti L., Corazza A., Placido M., Residori L., Ruggiero D. (2010), *Misure di colore prima e dopo il trattamento di pulitura con gel rigido di Gellano sull'opera d'arte grafica “Généalogie de la Royale Maison de Savoye, sec. XVII*. Restauro: sinergie tra pubblico e privato. XVII Salone dell'Arte del Restauro e della Conservazione dei Beni Culturali e Ambientali di Ferrara – 24/27 Marzo 2010.
48. Botti L., Casetti Brach C., Corazza A., Cremonesi P., Iannuccelli S., Placido M., Residori L., Ruggiero D., Sotgiu S., Tireni L. (2011), *A new methodology for wet conservation treatments of graphic art on paper with a rigid polysaccharide gel of gellan gum*. In: Proceedings of the ICOM-CC 16<sup>th</sup> Triennial Conference, Lisbon, 19-23 Sept. 2011.
49. Boubonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. (1997), *Reactivities of various mediators and laccase with kraft pulp and lignin model compounds*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 12, pp. 4627-4632.
50. Brigé A., Motte B., Borloo J., Buyschaert G., Devreese B., Jozef J., Beeumen V. (2008), *Bacterial decolorization of textile dyes is an extracellular process requiring a multicomponent electron transfer pathway*. Microbial. Biotechnol., Vol 1, pp. 40–52.
51. Brijwani K., Rigdon A., Vadlani P.V. (2010), *Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing*. Enzyme Research, Vol. 2010, pp. 1-10.
52. Buckley K.F., Dobson A.D.W. (1998), *Extracellular ligninolytic enzyme production and polymeric dye decolourization in immobilized cultures of Chrysosporium lignorum CLI*. Biotechnology Letters, Vol. 20, pp. 301–306.
53. Bumpus J.A. (1995), *Microbial degradation of azo dyes*. Prog. Ind. Microbiol., Vol. 32, pp. 157-176.
54. Bumpus J.A. (2004), *Biodegradation of Azo Dyes by Fungi*. Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications, pp. 457-469.

55. Burnes T.A., Blanchette R.A., Farrell R.L. (2000), *Bacterial Biodegradation of Extractives and Patterns of Bordered Pit Membrane Attack in Pine Wood*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 12, pp. 5201–5205. American Society for Microbiology.
56. Butler M.J., Day A.W. (1998), *Destruction of Fungal Melanins by Ligninases of Phanerochaete chrysosporium and Other White Rot Fungi*. International Journal of Plant Sciences, Vol. 159, No. 6 pp. 989-995. Published by The University of Chicago Press.
57. Butler M.J., Day A.W. (1998), *Fungal Melanins: a review*. Canadian Journal of Microbiology, Vol. 44, No.12, pp. 1115-1136.
58. Butler M.J., Gardiner R.B., Day A.W. (2005), *Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi?* Biological Control, Vol. 32, pp. 326–336, Elsevier.
59. Bystrykh L.V, Fernández-Moreno M.A., Herrema J.K., Malpartida F., Hopwood D.A., Dijkhuizen L (1996), *Production of Actinorhodin-Related “Blue Pigments” by Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Bacteriology, Vol. 178, No. 8, pp. 2238–2244.
60. Cameron M.D., Timofeevski S., Aust S.D. (2000), *Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics*. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 54, pp. 751-758.
61. Campani E., Casoli A., Cremonesi P., Saccani I., Signorini E. (2007), *L’uso di Agarosio e Agar per la preparazione di Gel Rigidi*. Quaderno No. 4, CESMAR7, il Prato (ed.).
62. Camussi A., Möller F., Ottaviano E., Sari Gorla M. (1986), *Metodi statistici per la sperimentazione biologica*. Zanichelli Editore, Bologna.
63. Caneva G., Nugari M.P., Salvadori O. (2005), *La biologia vegetale per i beni culturali. Vol. I. Biodeterioramento e Conservazione*. Nardini Editore. Firenze.
64. Caneva G. (2005), *La biologia vegetale per i beni culturali. Vol. II. Conoscenza e Valorizzazione*. Nardini Editore. Firenze.
65. Cantarella G., Galli C., Gentili P. (2003), *Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 22, No. 3-4, pp. 135-144.
66. Cappitelli F., Principi P., Sorlini C. (2006), *Biodeterioration of modern materials in contemporary collections: can biotechnology help?* TRENDS in Biotechnology, Vol.24, No.8, pp. 350-354.
67. Cappitelli F., 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*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 17, pp. 5671-5675.
68. Carlile M.J., Watkinson S.C. (1994), *The Fungi*. Academic Press, New York, pp. 153-201.
69. Casetti Brach C., Iannuccelli S., Sotgiu S., Tirenì L. (2010), *L’uso del gel rigido di Gellano nella conservazione dei beni culturali: l’intervento di restauro sull’opera d’arte grafica “Généalogie de la Royale Maison de Savoye, sec. XVII*. Restauro: sinergie tra pubblico e privato. XVII Salone dell’Arte del Restauro e della Conservazione dei Beni Culturali e Ambientali di Ferrara – 24/27 Marzo 2010.
70. Chacko J.T., Subramaniam K. (2011), *Enzymatic Degradation of Azo Dyes – A Review*. International Journal of Environmental Sciences, Vol. 1, No 6, pp. 1250-1260.
71. Chagas E.P., Durrant L.R. (2001), *Decolorization of azo dyes by Phanerochaete chrysosporium and Pleurotus sajorcaju*. Enzyme Microb. Technol., Vol. 29, pp. 473–477.
72. Chan J.G. (1970), *The Occurrence, Taxonomy and Activity of Chitinolytic Bacteria from Sediment, Water and Fauna of Puget Sound*. Ph.D. thesis, University of Washington, Seattle.

73. Chandrasekaran R., Radha A., Thailambal V.G. (1992), *Roles of potassium ions, acetyl and L-glycerol groups in native gellan double helix: an x-ray study*. *Carbohydrate Res.*, No. 224, pp. 1.
74. Chandrasekaran R., Radha A. (1995), *Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides*. *Trends in Food Science & Technology - Elsevier*, Vol. 6, pp. 143-148.
75. Chang A.J., Fan J., Wen X. (2012), *Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 72, pp. 26-30.
76. Chang J.S., Lin Y.C. (2001), *Decolorization kinetics of recombinant E. coli strain harboring azo dye decolorization determinants for Rhodococcus sp.* *Biotechnol. Lett.*, Vol. 23, pp. 631-636.
77. Chang J.S., Chen B.Y., Lin Y.C. (2004), *Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from Escherichia coli strain NO3*. *Bioresour. Technol.*, Vol. 91, pp. 243-248.
78. Chang W.T., Chen C.S., Wang S.L. (2003), *An Antifungal Chitinase Produced by Bacillus cereus with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source*. *Current Microbiology*, Vol. 47, pp. 102-108.
79. Chapuis M., Lydon A., Brandt-Grau A. (2009), *Preserving our heritage, improving our environment Volume II Cultural heritage research: FP5, FP6 and related projects*. European Communities. Printed in Belgium.
80. Chaube P., Indurkar H., Moghe S. (2010), *Biodegradation and decolorisation of dye by mix consortia of bacteria and study of toxicity on Phaseolus mungo and Triticum aestivum*. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, Vol. 1, pp. 45-56.
81. Chen H. (2006), *Recent advances in azo dye degrading enzyme research*. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, Vol 7, pp. 101-111.
82. Chen L.C., Blank E.S., Casadevall A. (1996), *Extracellular Proteinase Activity of Cryptococcus neoformans*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol. 3, N° 5, pp. 570-574. American Society for Microbiology.
83. Chernin L., Ismailov Z., Haran S., Chet I. (1995), *Chitinolytic Enterobacter agglomerans Antagonistic to Fungal Plant Pathogens*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, N° 5, pp. 1720-1726. American Society for Microbiology.
84. Chesterman W., Leach E.H. (1958), *A Bleaching Method for Melanin and two Staining Methods*. *Journal of Cell Science*, Vol. 3, No. 99, pp. 65-66. Company of Biologists Ltd.
85. Chet I., Henis Y. (1969), *Effect of catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of Sclerotium rolfsii Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to b (1-3)- glucanase*. *Soil Biol. And Biochem.*, Vol. 1, pp. 131-138.
86. Chung K.T., Cerniglia C.E. (1992), *Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationship*. *Mutat. Res.*, Vol. 277, pp. 201-220.
87. Chung K.T., Stevens S.E.J., Cerniglia C.E. (1992), *The reduction of azo dyes by the intestinal microflora*. *Crit. Rev. Microbiol.*, Vol. 18, pp. 175-197.
88. Chung K.T., Stevens S.E.J. (1993), *Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths*. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 12, pp. 2121-2132.
89. Claus H. (2004), *Laccases: structure, reactions, distribution*. *Micron*, Vol. 35, pp. 93-96, Elsevier.
90. Cooper D., King C., Segal J. (1980), *The use of enzymes in partially non-aqueous media in "Conservation of library and archive materials and the graphic arts"*. Butterworths, London, pp. 25-30.
91. Copedé M. (1991), *La carta e il suo degrado*. Arte e Restauro, Cardini Editore.

92. Cotta M.A., Hespell R.B. (1986), *Proteolytic Activity of the Ruminal Bacterium Butyrivibrio fibrisolvens*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 52, N° 1, pp. 51-58. American Society for Microbiology
93. Cottrell M.T., Moore J.A., Kirchman D.L. (1999), *Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, N° 6, pp. 2553–2557. American Society for Microbiology.
94. Cowling E.B. (1958), *A review of literature on the enzymatic degradation of cellulose and wood*. Forest Products Laboratory, United States Department of Agriculture Forest Service, U.S.A..
95. Cremonesi P. (1999), *L'uso degli enzimi nella pulitura di opera policrome*. Il Prato, Arti Grafiche Padovane, Padova.
96. Cremonesi P. (2001), *L'uso dei tensioattivi e chelanti nella pulitura di opera policrome*. Il Prato, Collana I Talenti.
97. Cremonesi P. (2006), *Applicazioni di metodologie di intervento più recenti per la pulitura del materiale cartaceo*. Atti delle giornate di studio. “Problemi di restauro – Giornate di studio per gli storici dell’arte, ispettori di soprintendenza, conservatori e operatori mussali. Milano.
98. Cripps C., Bumpus J.A., Aust S.D. (1990), *Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, pp. 1114–1118.
99. Cullen D. (1997), *Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi*. J. Biotechnol., Vol. 53, pp. 273-289.
100. Dackman C., Chet I., Nordbring-Hertz B. (1989), *Fungal parasitism of the cyst nematode Heterodera schachtii: infection and enzymatic activity*. FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 62, pp. 201–208.
101. Dakal T.C., Arora P.K. (2012), *Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., Vol. 11, pp. 71–104.
102. Das S.N., Dutta S., Kondreddy A., Chilukoti N., Pullabhotla S.V.S.R.N., Vadlamudi S., Podile A.R. (2010), *Plant Growth-Promoting Chitinolytic Paenibacillus elgii Responds Positively to Tobacco Root Exudates*. J. Plant Growth Regul., N° 29, pp. 409–418. Springer Science+Business Media.
103. Dashtban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. (2010), *Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin*. Int. J. Biochem. Mol. Biol., Vol. 1, pp. 36-50.
104. Da Silva M., Moraes A.M.L., Nishikawa M.M., Gatti M.J.A., Vallim de Alencar A., Brandão L.E., Nóbrega A. (2006), *Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 57, pp. 163–167.
105. Davis L.G., Dibner M.D., Battey J.F. (1986), *Basic methods in molecular biology*. Elsevier, New York.
106. Deacon J.W. (1997). *Modern Mycology*. Calderoli Edagricole, Bologna.
107. De Belie N., De Graef B., De Muynck W., Dick J., De Windt W., Verstraete W. (2005), *Biocatalytic Processes on Concrete: Bacterial Cleaning and Repair*. 10DBMC International Conférence On Durability of Building Materials and components Lyon – France, 17-20 April 2005.
108. De Boer W., Gunnerwiek P.J.A.K., Lafeber P., Janse J.D., Spit B.E., Woldendorp J.W. (1998), *Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria*. Soil Biol. Biochem., Vol. 30, No. 2, pp. 193-203, Published by Elsevier Science Ltd..
109. De Boer W., Gunnerwiek P.J.A.K., Kowalchuk G.A., Van Veen J.A. (2001), *Growth of Chitinolytic Dune Soil  $\beta$ -Subclass Proteobacteria in Response to Invading Fungal Hyphae*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, N° 8, pp. 3358–3362. American Society for Microbiology.
110. Dehestani A., Kazemitabar K., Ahmadian G., Jelodar N.B., Salmanian A.H., Seyedi M., Rahimian H., Ghasemi S. (2010), *Chitinolytic and antifungal activity of a Bacillus pumilus*

- chitinase expressed in Arabidopsis*. Biotechnol. Lett., N° 32, pp. 539–546. Springer Science+Business Media, B.V. 2009.
111. De La Chapelle A., Choisy P., Gallo F., Legoy M.D. (2003), *L'uso di amilasi e protease per il restauro delle arti grafiche*. In: Nuove metodologie nel restauro del material cartaceo, Il Prato, Collana I Talenti, pp. 37-67.
  112. Delee W., O'Neill C., Hawkes F.R., Pinheiro H.M. (1998), *Anaerobic treatment of textile effluents: a review*. J. Chem. Technol. Biotechnol., Vol. 73, pp. 323-335.
  113. Del Pilar Ponce-Jiménez M., López-Dellamary Toral F.A., Delgado Fornué E. (2002), *Antifungal Protection and Sizing of Paper with Chitosan Salts and Cellulose Ethers. Part 1, Physical Effects*. Journal of the American Institute for Conservation, Vol. 41, No. 3, pp. 243-254. The American Institute for Conservation of Historic & Artistic Works.
  114. Del Pilar Ponce-Jiménez M., López-dellamary toral F.A, Gutierrez-Pulido H., (2002), *Antifungal protection and sizing of paper with chitosan salts and cellulose ethers. Part 2, Antifungal effects*. Journal of the American Institute for Conservation, Vol. 41, No. 3, pp. 255-268.
  115. De Mico A. & Pinzari F. (2009), *Application of enzymatic solutions on paper to remove fungal stains. SEM-EDS evaluation of the effects*. Proceedings, 4th International Congress of "Science and technology for the safeguard of cultural heritage in the Mediterranean basin", Vol.II Session B. Angelo Ferrari, Italy.
  116. Desai S.S., Nytianand C. (2011), *Microbial laccases and their applications: a review*. Asian Journal of Biotechnology, Vol. 3, No. 2, pp. 98-124.
  117. DeSantis P.C., (1983), *Some observations on the use of enzymes in paper conservation*. Journal of the American Institute of Conservation, Vol. 23, No. 1, Article 2, pp. 7-27.
  118. Dhillon G.S., Kaur S., Brar S.K. (2012), *In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase Trametes versicolor grown on brewer's spent grain*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 72, pp. 67-75.
  119. Diamatidis G., Effosse A., Potier P., Bally R. (2000), *Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium Azospirillum lipoferum*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 32, pp. 919-927, Elsevier.
  120. Di Majo A., Mita L. (1984-85), *L'uso degli enzimi nella conservazione dei materiali librari. Alcune osservazioni sperimentali*. Bollettino Ist. Centr. Patol. Libro, Vol. 39, pp. 41-46.
  121. Dufossé L., (2006) *Microbial production of food grade pigments*. Food Technol. Biotechnol., Vol. 44, No. 3, pp. 313-321.
  122. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. (2007), *Compendium of soil fungi*. Second edition, taxonomically revised by Walter Gams. IHW-Verlag, Eching.
  123. Duo-Chuan L. (2006), *Review of fungal chitinases*. Mycopathologia, Vol. 161, pp. 345–360.
  124. Durrell L.W., (1964), *The composition and structure of walls of dark fungus spores*. Mycopathology Mycology Applied, Vol. 23, pp. 339-345.
  125. Eckhardt F.E.W. (1985), *Mechanisms of microbial degradations of minerals in sandstone monuments, mediaeval frescoes and plasters*. In Proceedings of V<sup>th</sup> International Congress of Deterioration and Conservation of Stone, Lausanne, Vol 2, pp. 643-652.
  126. Edmonds P., Horton D.J. (1991), *Enzymatic breackdown and decolourisation of black fungus embedded in acrylic paint: a progress report*. AICCM Bulletin, Vol. 17, No. 3, pp. 53-61.
  127. Egli T.W. (1992), *General strategies in the biodegradation of pollutants*. In Metal ions in biological systems. H. Sigel and A. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York (NY), pp. 1-41.
  128. Eichlerová I., Homolka L., Benada O. (2007), *Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus Dichomitus squalens: Toxicological evaluation and morphological study*. Chemosphere, Vol. 69, pp. 795–802.
  129. Ekenler M., Tabatabai M.A. (2002), *Effects of trace elements on  $\beta$ -glucosaminidasi activity in soils*. Soil Biology and Biochemistry, Vol. 34, pp. 1829-1832.

130. Ellis D.H., Griffiths D.A. (1974), *The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi*. *Canad. J. Microbiol.*, Vol. 20, pp. 1379-1386.
131. Erkurt E.A., Erkurt H.A., Unyayar A. (2010), *Decolorization of azo dyes by white rot fungi*. *Biodegradation of azo dyes, The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag, pp. 157-167.
132. Fang H., Wenrong H., Yuezhong L. (2004), *Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS*. *Water Res.*, Vol. 38, pp. 3596–3604.
133. Fang Z., Li T., Wang Q., Zhang X., Peng H., Fang W., Hong Y., Ge H., Xiao Y. (2011), *A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 89, pp. 1103–1110, Springer-Verlag.
134. Feller G., Thiry M., Gerday C. (1990), *Sequence of a lipase gene from the Antarctic psychrotroph *Moraxella TA144**. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, N° 21, p. 641. Oxford University Press.
135. Felse P.A., Panda T. (1999), *Regulation and cloning of microbial chitinase genes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 51, pp. 141-151, Springer-Verlag.
136. Fernandes P. (2006), *Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 73, pp. 291–296.
137. Fiacconi M. (2011), *Nuovi Metodi per il trattamento di alterazioni microbiche e fungine nei Beni Culturali, Librari ed Archivistici*. Tesi di Laurea Triennale. Università degli Studi di Roma “La Sapienza”.
138. Flood P, Wendelbo Ø. (1975), *The enzymatic freeing of papyri from cartonnage: A controlled study by light- and scanning microscopy*. *Restaurator*, Vol. 2, No. 2, pp. 53-60.
139. Florian M.L.E., Purinton N. (1995), *Determination of location of stains in fungal spots and enzymatic removal of pigmented hyphae in paper*. *Biodeterioration of cultural property 3: proceedings of the 3rd international conference on biodeterioration of cultural property, 4-7 July, Bangkok, Thailand*, pp. 414-425.
140. Florian M.L.E. (1997), *Heritage eaters. Insects & fungi in heritage collections*. James & James, London.
141. Florian M.L.E. (2000), *Aseptic technique: a goal to strive for in collection recovery of mouldy archival materials and artefacts*. *Journal of the American Institute of Conservation*, Vol. 39, pp. 107-15.
142. Florian M.L.E. (2002), *Fungal Facts. Solving fungal problems in heritage collections*. Archetype Publications Ltd., London.
143. Fogarty R.V., Tobin J.M. (1996), *Fungal melanins and their interactions with metals*. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 19, pp. 311-317.
144. Folders J., Algra J., Roelofs M.S., Van Loon L.C., Tommassen J., Bitter W. (2001), *Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a Gradually Secreted Protein*. *Journal of Bacteriology* Vol. 183, N° 84, pp. 7044–7052. American Society for Microbiology.
145. Fournier B., Hooper D.C. (2000), *A New Two-Component Regulatory System Involved in Adhesion, Autolysis, and Extracellular Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus**. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, No. 14, pp. 3955–3964. American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
146. Frankowski J., Lorito M., Scala F., Schmid R., Berg G., Bahl H. (2001), *Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48*. *Arch. Microbiol.*, No. 176, pp. 421-426. Springer-Verlag 2001.
147. Frisvad J.C., Andersen B., Thrane U. (2008), *The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi*. *Mycological Research*, Vol. 112, pp. 231-240.
148. Fu Y., Viraraghavan T. (2001), *Fungal decolorization of dye wastewaters: a review*. *Bioresour. Technol.*, Vol. 79, pp. 251–262.

149. Gahlout M., Gupte S., Gupte A. (2013), *Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye reactive violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by Ganoderma cupreum AG-1*. Biotech., Vol. 3, pp. 143–152.
150. Gallo F., Pasquariello G. (1989), *Foxing: ipotesi sull'origine biologica*. «Bollettino ICPL», Vol. 48, pp. 139-176.
151. Gallo F. (1992), *Il Biodeterioramento di Libri e Documenti*. Centro di Studi per la Conservazione della Carta, ICCROM, Roma.
152. Gallo F., De La Chapelle A., Choisy P., Legoy M.D. (1994), *Employ d'amylases et de protéases pour restauration d'arts graphiques* in "Environnement et conservation de l'écrit, de l'image et du son. Actes des journées internationales d'études de l'Arsag". Paris, pp.217-229.
153. Ganesh R., Boardman G.D., Michelsen D. (1994), *Fate of azo dyes in sludges*. Water Res., Vol. 28, pp. 1367-1376.
154. Gareth Jones E.B. (1994), *Fungal adhesion*. Mycological Research, Vol. 98, pp. 961-981.
155. Gauri K.I., Chowdhury A.N. (1988), *Experimental studies on conversion of gypsum to calcite by microbes*. In Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress of Deterioration and Conservation of Stone, Torun - Poland, 12-14 September, Nicolaus Copernicus University.
156. Georgiou D., Hatiras J., Aivasidis A. (2005), *Microbial immobilization in a two stage fixed bed reactor pilot plant for onsite anaerobic decolorization of textile wastewater*. Enzyme Microb. Technol., Vol. 37, pp. 597–605.
157. Ghasemi S., Ahmadiana G., Sadeghia M., Zeigler D.R., Rahimianc H., Ghandilia S., Naghibzadeha N., Dehestania A. (2011), *First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by Bacillus pumilus SG2*. Enzyme and Microbial Technology, No. 48, pp. 225–231. Elsevier Inc.
158. Gibson S.A.W., MacFarlane G.T. (1988), *Studies on the Proteolytic Activity of Bacteroides fragilis*. Journal of General Microbiology, Vol. 134, pp. 19-27. Printed in Great Britain.
159. Gohel V., Vyas P., Chhatpar H.S. (2005), *Activity staining method of chitinase on chitin agar plate through polyacrylamide gel electrophoresis*. African Journal of Biotechnology, Vol. 4, No. 1, pp. 87-90. Academic Journals.
160. Goldstein J., Newbury D., Joy D., Lyman C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J. (2003), *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York.
161. Gonçalves R. C. R., Lisboa H.C.F., Pombeiro-Sponchiado S.R. (2012), *Characterization of melanin pigment produced by Aspergillus nidulans*. World J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 28, pp. 1467–1474, Springer Science+Business Media.
162. Gooday G.W. (1990), *Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan*. Biodegradation, Vol. 1, pp. 177-190. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
163. Graff J.H. (1940), *A color atlas for fiber identification*. The institute of paper chemistry. Wisconsin.
164. Grandis E. (1989), *Prove sulle materie fibrose sulla carta e sul cartone*. Associazione Tecnica Italiana per la Cellulosa e la Carta - Torino.
165. Groff K.A., Kim B.R. (1989), *Textile wastes*. J. Water Pollut. Control Fed., Vol. 63, pp. 872-876.
166. Guo J., Kang L., Wang X., Yang J. (2010), *Decolorization and degradation of azo dyes by redox mediator system with bacteria*. Biodegradation of azo dyes, The Handbook of Environmental Chemistry, Springer-Verlag, pp. 85-100.
167. Han M.J., Choi H.T., Song O.G. (2005), *Purification and Characterization of Laccase from the White Rot Fungus Trametes versicolor*. The Journal of Microbiology, Vol. 43, No. 6, pp.555-560. The Microbiological Society of Korea.

168. Hankin L., Anagnostakis S.L. (1977), *Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect C, Cellulase Activity of Micro-organisms*. Journal of General Microbiology, Vol. 98, pp. 109-115.
169. Hao O.J., Kim H., Chiang P. (2000), *Decolorization of wastewater*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Vol. 30, pp. 449-505.
170. Hariharan S., Nambisan P. (2013), *Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and lac production from Ganoderma lucidum under solid state fermentation of pineapple leaf*. BioResources, Vol. 8, No. 1, pp. 250-271.
171. Harman (1992), *Chitinolytic enzymes produced by Trichoderma harzianum: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase*. Phytopathology, Vol. 83, pp. 302-307.
172. Hatton M. (1977), *Enzymes in a viscous medium*. Paper Conservator, Vol. 2, No. 9.
173. Haug W., Schmidt A., Nortemann B., Hempel D.C., Stolz A., Knackmuss H.J. (1991), *Mineralization of the sulphonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthathene-2-sulphonate-degrading bacterium consortium*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 57, pp. 3144-3149.
174. Heiss G. S., Gowan B., Dabbs E.R. (1992), *Cloning of DNA from a Rhodococcus strain conferring the ability to decolorize sulfonated azo dyes*. FEMS Microbiol.Lett., Vol. 99, pp. 221-226.
175. Henne A. Schmitz R.A., Bömeke M., Gottschalk G., Daniel R. (2000), *Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, N° 7, pp. 3113–3116. American Society for Microbiology.
176. Henson J.M., Butler M.J., Day A.W. (1999), *The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi*. Annu. Rev. Phytopathol., Vol. 37, pp. 447–471.
177. Hobbs G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Flett F., Oliver S.G. (1990), *Pigmented antibiotic production by Streptomyces coelicolor A3(2): kinetics and the influence of nutrients*. Journal of General Microbiology, Vol. 136, pp. 2291-2296. Printed in Great Britain.
178. Hofmann C., Van der Reyden D., Baker M. (1991), *Comparison and Evaluation of Bleaching Procedures: The Effect of Five Bleaching Methods on the Optical and Mechanical Properties of New and Aged Cotton Linter Paper Before and After Accelerated Aging*. Annual of The Book and Paper Group, Vol. 10. The American Institute for Conservation.
179. Hofrichter M. (2002), *Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)*. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 30, pp. 454–466.
180. Hong Y., Xu M., Guo J., Xu Z., Chen X., Sun G. (2007), *Respiration and growth of Shewanella decolorations S12 with an azo compound as the sole electron acceptor*. Appl. Env. Microbiol., Vol. 73, pp. 64–72.
181. Hood M.A., Meyers S.P. (1977), *Microbial and chitinoclastic activities associated with Panaeus setiferus*. J. Oceanograph. Soc. Japan, Vol. 33, pp. 235–241.
182. Horinaka J., Honda S., Takigawa T. (2009), *Rheological properties of concentrated solutions of gella in an ionic liquid*. Carbohydrate Polymers, Vol. 78, pp. 576-580.
183. Horitsu H., Takada M., Idaka E., Tomoyeda M., Ogawa T. (1977), *Degradation of p-aminoazobenzene by Bacillus subtilis*. Eur. J. Appl. Microbiol., Vol. 4, pp. 217-224.
184. Howard R.J., Ferrari M.A. (1989), *Role of melanin in appressorium function*. Experimental Mycology, Vol. 13, pp. 403-418.
185. Howard M.B., Ekborg N.A., Weiner R.M., Hutcheson S.W., (2003), *Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, Vol. 30, pp. 627-635.
186. Hu T.L. (1994), *Decolorization of reactive azo dyes by transformation with Pseudomonas luteola*. Biores. Technol., Vol. 49, pp. 47-51.

187. Huang C.J., Wang T.K., Chung S.C., Chen C.Y. (2005), *Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, Bacillus cereus 28-9*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38, No. 1, pp. 82-88.
188. Huang Y., Singh P.P., Tang J., Swanson B.G. (2004), *Gelling temperatures of high acyl gellan as affected by monovalent and divalent cations with dynamic rheological analysis*. *Carbohydrates Polymers*, No. 56, pp. 27-33.
189. Iannuccelli S., Sotgiu S. (2009), *L'impiego di gel rigidi polisaccaridici per il trattamento di pulitura di opera grafiche a stampa*. In: *Lo stato dell'Arte VII, Atti del VII Congresso Nazionale IGIIC, Napoli 8-10 Ottobre 2009, Torino 2009*.
190. Iannuccelli S., Sotgiu S. (2009), *La pulitura superficiale di opera grafiche a stampa con gel rigidi*. In: *Progetto Restauro, Il Prato (ed.)*, Padova, pp. 15-24.
191. Iannuccelli S., Sotgiu S. (2010), *A new methodology for wet conservation treatments of graphic art on paper with a rigid polysaccharide gel of gellan gum*. In: *preprints of the ICOM-CC Graphic Documents Working Group Interim Meeting 6-8 Oct., Royal Library Denmark*, pp. 46-51.
192. Iannuccelli S., Sotgiu S. (2010), *La pulitura superficiale di opera grafiche a stampa con gel rigidi polisaccaridici*. *Materiali e prodotti per il restauro librario, Nuove Ricerche, Quaderni 2*, Gangemi Editore, pp. 73-94.
193. Idaka E., Ogawa T., Horitsu H., Tomoyeda M. (1978), *Degradation of azo compounds by Aeromonas hydrophila var. 24B*. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, Vol. 94, No. 3, pp. 91-94.
194. Imran M., Asad M.J., Hadri S.H., Mehmood S. (2012), *Production and industrial applications of laccase enzyme*. *Journal of Cell and Molecular Biology*, Vol. 10, No. 1, pp. 1-11.
195. Jacobson E.S., Tinnell S.B. (1993), *Antioxidant function of fungal melanin*. *J. Bacteriol.*, Vol. 175, No. 21, pp. 7102-7104. American Society for Microbiology.
196. Jacobson E.S. (1995), Hove E., Emery H.S. (1993), *Antioxidant function of melanin in black fungi*. *Infection and Immunity*, Vol. 63, No. 12, pp. 4944-4945. American Society for Microbiology.
197. Jacobson E.S. (2000), *Pathogenic Roles for Fungal Melanins*. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 13, N° 4, pp. 708-717.
198. Jami al Ahmadi K., Tabatabaei Yazdi M., Fathi Najafi M., Shahverdi A.R., Faramarzi M.A., Zarrini G., Behravan J. (2008), *Isolation and characterization of a chitinolytic enzyme producing microorganism, Paecibacillus chitinolyticus JK2 from Iran*. *Research Journal of Microbiology*, Vol. 3, No. 6, pp. 395-404.
199. Jarosz-Wilkolażka A., Kochmańska-Rdest J., Malarczyk E., Wardas W., Leonowicz A. (2002), *Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes*. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30, pp. 566-572.
200. Jayatilake J.A.M.S. (2011), *A review of the ultrastructural features of superficial Candidiasis*. *Mycopathologia*, Vol. 171, pp. 235-250.
201. Jennings D.H., Lysec G. C. (1999), *Fungal Biology: understanding the fungal lifestyle*. BiosScientific Publishers, Springer.
202. Jerusik R.J. (2010), *Fungi and paper manufacture*. *Fungal Biology Reviews*, Vol. 24, pp. 68-72, Elsevier.
203. Jeuniaux C. (1963), *Chitine et Chitinolyse*. Masson et C<sup>ie</sup>, Éditeurs – Paris.
204. Jimenez B., Noyola A., Capdeville B. (1988), *Selected dyes for residence time distribution evaluation in bioreactors*. *Biotechnol. Techniques*, Vol. 2, pp. 77-82.
205. Jimenez-Lopez C., Jroundi F., Pascolini C., Rodriguez-Navarro C. (2008), *Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 62, pp.352-363.

206. Jinbo Y., Saito S., Watanabe H., Niwa H., Izumi Y. (1999), *Higher order structures of gellan gum gels and the gelation mechanism*. Graduate School of Science and Engineering. Yamagata University, Yonezawa, Yamagata, Japan. <http://pfwww.kek.jp/acr2000/b/y00p139.pdf>.
207. Jiranuntipon S., Chareonpornwattana S., Damronglerd S., Albasi C., Delia M.L. (2008), Decolorization of synthetic melanoidins-containing wastewater by a bacterial consortium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 35, pp. 1313–1321. Society for Industrial Microbiology.
208. Johannes C., Majcherczyk A. (2000), *Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system*. *Appl. Environ. Microbiol. Rev.*, Vol. 66, pp. 524-528.
209. Jroundi F., Fernández-Vivas A., Rodríguez-Navarro C., Bedmar E.J., González-Muñoz M.T. (2010), *Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity*. *Microbial Ecology*, Vol. 60, pp. 39-54.
210. Kaal E.E.J., de Jong E., Field J.A. (1993), *Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus Bjerkandera sp. strain BOS55*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, pp. 4031–4036.
211. Kaim W., Schewederski B. (1994), *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. Wiley, Chichester, England, pp. 187-214.
212. Kamil Z., Rizk M., Saleh M., Moustafa S. (2007), *Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol*. *Global Journal of Molecular Sciences*, Vol. 2, No. 2, pp. 57-66.
213. Kani K., Horinaka J., Maeda S. (2005), *Effects of monovalent cation and anion species on the conformation of gella chains in aqueous systems*. *Carbohydrate Polymers*, No. 61, pp. 168-173.
214. Keck A., Klein J., Kudlich M., Stolz A., Knackmuss H.J., Mattes R. (1997), *Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of Sphingomonas sp. Strain BN6*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp. 3684–3690.
215. Khalid A., Arshad M., Crowley D.E. (2008), *Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 78, pp. 361–369.
216. Khalid A., Arshad M., Crowley D.E. (2008), *Decolorization of azo dyes by Shewanella sp. under saline conditions*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 79, pp. 1053–1059.
217. Khalid A., Arshad M., Crowley D.E. (2009), *Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater*. *Wat. Res.*, Vol. 43, pp. 1110–1116.
218. Khalid A., Arshad M., Crowley D. (2010), *Bioaugmentation of azo dyes*. *Biodegradation of azo dyes*, *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag, pp. 1-37.
219. Khan J.A. (2011), *Biodegradation of Azo Dye by Moderately Halotolerant Bacillus megaterium and Study of Enzyme Azoreductase Involved in Degradation*. *Advanced Biotech.*, Vol. 10, No. 7, pp. 21-27.
220. Khan R., Banerjee U.C. (2010), *Decolorization of azo dyes by immobilized bacteria*. *Biodegradation of azo dyes*, *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag, pp. 73-84.
221. Khehra M.S., Saini H.S., Sharma D.K., Chadha B.S., Chimni S.S. (2005), *Decolorization of various azo dyes by bacterial consortia*. *Dyes Pigment.*, Vol. 67, pp. 55–61.
222. Khehra M.S., Saini H.S., Sharma D.K., Chadha B.S., Chimni S.S. (2005), *Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes*. *Wat. Res.*, Vol. 39, pp. 5135–5141.
223. Kiiskinen L.L., Rättö M., Kruus K. (2004), *Screening for novel laccase-producing microbes*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 97, pp. 640–646.

224. Kim K.-J., Yang Y.-J., Kim J.-G., (2003), *Purification and characterization of chitinase from Streptomyces sp. M-20*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 36, No. 2, pp. 185-189. KSBMB & Springer-Verlag 2003.
225. Kirk K., Cullen D. (1998), *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi*. In: Young R.A., Akhtar M. (eds) Environmental friendly technologies for pulp and paper industry. Wiley, New York, pp. 273–307.
226. Knapp J.S., Newby P.S., Reece L.P. (1995), *Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi*. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 17, pp. 664–668, Elsevier Science Ltd..
227. Knapp J.S., Vantoch-Wood E.J., Zhang F.M. (2001), *Use of wood-rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents*. In: Gadd G.M. (ed.) - Fungi in Bioremediation. Cambridge (U.K.), Cambridge University Press., p. 481.
228. Koestler R.J., Koestler V.R., Charola A.E., Nieto-Fernandez F.E. (2003), *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of works of art*. The Metropolitan Museum of Art, New York.
229. Kole M.M., Altosaar I. (1985), *Increased chitinase production by a non-pigmented mutant of Serratia marcescens*. FEMS Microbial. Lett., Vol. 26, pp. 265–269.
230. Kollias N., Sayre R.M., Zeise L., Chedekel M.R. (1991), *Photoprotection by melanin*. J. Photochem. Photobiol. B., Vol. 9, pp. 135–160.
231. Konkol N.R., McNamara C.J., Blanchette R.A., May E., Mitchell R., *Microbes Can Damage but Also Help Restore Artifacts*. <http://forms.asm.org/>.
232. Konkol N., McNamara C.J., Mitchell R. (2010), *Fluorometric detection and estimation of fungal biomass on cultural heritage materials*. Journal of Microbiological Methods, 80: 178–182.
233. Korytowski W., Sarna T. (1990), *Bleaching of melanin pigments*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 21, pp. 12410-12416. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
234. Kouker G., Jaeger K.E. (1987), *Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, N° 1, pp. 211-213. American Society for Microbiology.
235. Kreuzer M., Schmutzler K., Waage I., Thomm M., Hausner W. (2013), *Genetic engineering of Pyrococcus furiosus to use chitin as a carbon source*. BMC Biotechnology, Vol. 13, No. 9, pp. 1-10.
236. Kudlich M., Keck A., Klein J., Stolz A. (1997), *Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by Sphingomonas sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction*. Appl. Env. Microbiol., Vol 63, pp. 3691–3694.
237. Kulla H. G. (1981), *Aerobic bacterial degradation of azo dyes*. In Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds, FEMS Symposium 12 (ed.), Leisinger T., Cook A.W., Hutter R., Nuesch J. Academic Press, London, pp. 387-399.
238. Kulla H. G., Klausener F., Meyer U., Liideke B., Leisinger T. (1983), *Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I and Orange II*. Arch. Microbiol., Vol. 135, pp. 1-7.
239. Kumaran N.S., Dharani G. (2010), *Decolorization of textile dyes by white rot fungi Phanerocheate chrysosporium and Pleurotus sajor-caju*. Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation, Vol. 1, No. 4, pp. 361-370.
240. Kuo M.J., Alexander M. (1967), *Inhibition of the Lysis of Fungi by Melanins*. Journal of Bacteriology, Vol. 94, No. 3, pp. 624-629. American Society for Microbiology.
241. Kuzu S.B., Güvenmez H.K., Denizci A. (2012), *Production of a thermostable and alkaline chitinase by Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki STRAIN HBK-51*. Biotechnology Research International, pp. 2090-3146.

242. Lackner R., Srebotnik E., Messner K. (1991), *Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 178, pp.1092-1098.
243. Lai T.E., Pullammanappallil P.C., Clarke W.P. (2006), *Quantification of cellulase activity using cellulose-azure*. Talanta, Vol. 69, pp. 68–72.
244. Lapage S., Shelton J., Mitchell J. (1970), *Methods in Microbiology*. Ed. Norris J. e Ribbons D., Vol. 3A, Academic Press, London.
245. Larminie P. (1992), *The use of enzymes for the removal of oil stains from paper* in “Conference papers, Manchester”. The institute of paper conservation, London, pp.119-122.
246. Leaback D.H., Walker P.G. (1961), *Studies on Glucosaminidasi*. Biochemistry. J., Vol. 78, pp. 151-156.
247. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. (1994), *Principi di biochimica*. Seconda edizione. Zanichelli Editore, Bologna.
248. Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wjtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. (2001), *Fungi laccase: properties and activity on lignin*. J. Basic. Microbiol., Vol. 41, No. 3-4, pp. 185-227.
249. Le Roes-Hill M., Khan N., Burton S. (2011), *Actinobacterial Peroxidases: an Unexplored Resource for Biocatalysis*. Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 164, pp. 681–713.
250. Le Roes-Hill M., Rohland J., Burton S. (2011), *Actinobacteria isolated from termite guts as a source of novel oxidative enzymes*. Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 100, pp. 589–605.
251. Levine W.G. (1991), *Metabolism of azo dyes: implication for detoxification and activation*. Drug Metabol. Rev., Vol. 23, pp. 253-309.
252. Limón M.C., Chacón M.R., Mejías R., Delgado-Jarana J., Rincón A.M., Codón A.C., Benítez T. (2004), *Increased antifungal and chitinase specific activities of Trichoderma harzianum CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain*. Appl. Microbiol. Biotechnol., No. 64, pp. 675–685. Springer-Verlag 2004.
253. Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä M. E. (2005), *Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi*. Microbiology Reviews, 29: 877-896.
254. Littrell K.C., Gallas J.M., Zajac G.W., Thiagarajan P. (2003), *Structural Studies of Bleached Melanin by Synchrotron Small-angle X-ray Scattering*. Photochemistry and Photobiology, Vol. 77, No. 2, pp. 115–120.
255. Liu Y.T., Lee S.H., Liao Y.Y. (1995), *Isolation of a fungus and its hydrolytic activity on melanin*. Mycologia, Vol. 87, pp. 651-654.
256. Liu M., Cai Q.X., Liu H.Z., Zhang B.H., Yan J.P., Yuan Z.M. (2002), *Chitinolytic activities in Bacillus thuringiensis and their synergistic effects on larvicidal activity*. Journal of Applied Microbiology, Vol. 93, pp. 374–379. The Society for Applied Microbiology.
257. Lockwood J.L. (1960), *Lysis of mycelia of plant pathogenic fungi by natural soil*. Phytopathology, Vol. 50, pp. 787–789.
258. Loidl M., Hinteregger C., Ditzelmüller G., Ferschl A., Streichsbier F. (1990), *Degradation of aniline and mono chlorinated anilines by soil born Pseudomonas acidovorans strains*. Arch. Microbiol., Vol. 155, pp. 56-61.
259. Lustrato G., Alfano G., Andreotti A., Colombini M.P., Ranalli G. (2012), *Fast biocleaning of mediaeval frescoes using viable bacterial cells*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 69, pp. 51-61.
260. Luther J.P., Lipke H. (1980), *Degradation of Melanin by Aspergillus fumigatus*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 40, No. 1, pp. 145-155.
261. Luterek J., Gianfreda L., Wojtas-Wasilewska M., Rogalski J., Jaszek M., Malarczyk E., Dawidowicz A., Finks-Boots M., Ginalska G., Leonowicz A. (1997), *Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: induction by ferulic acid, partial purification, and immobilization of laccase from the high laccase-producing strain, Cerrena unicolor*. Acta Microbiologica Polonica, Vol. 46, pp. 297–311.

262. Lynch J. (1987), In vitro identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. *Curr. Microbiol.*, Vol. 16, pp. 49–53.
263. Machczynski M.C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G.W. (2004), *Characterization of SLAC: A small laccase from Streptomyces coelicolor with unprecedented activity*. *Protein Sci.*, Vol. 13, pp. 2388-2397.
264. Madhavi V., Lele S.S. (2009), *Laccase: properties and applications*. *BioResources*, Vol. 4, No. 4, pp. 1694-1717.
265. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2003), *Brock biology of microorganisms*. 10<sup>th</sup> edn., Prentice-Hall, Upper Saddle River.
266. Mahbub K.R., Mohammad A., Ahmed M.M., Begum S. (2012), *Decolorization of synthetic dyes using bacteria isolated from textile industry effluent*. *Asian Journal of Biotechnology*, Vol. 4, No. 3, pp. 129-136.
267. Makes F. (1979), *Enzymatic consolidation of paintings*. University of Goteborg, Sweden.
268. Makes F. (1982), *Enzymatic consolidation of a painting: seventeenth century landscape from Skokloster Palace*. In Contribution of the Washington Congress, IIC, London 25-30 Ottobre.
269. Makes F. (1988), *Enzymatic consolidation of the portrait of Rudolf II with a multi-enzyme preparation isolated from Antarctic krill*. *Acta Universitatis Gothoburgensis - Goteborg Studies on Conservation*, Vol. 1, Goteborg, Sweden.
270. Mapari S.A.S., Nielsen K.F., Larsen T.O., Frisvad J.C., Meyer A.S., Thrane U. (2005), *Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants*. *Biotechnology - Published by Elsevier Ltd*.
271. Mapari S.A.S., Meyer A.S., Thrane U., Frisvad J.C. (2009), *Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale*. *Microbial. Cell. Factories*, Vol. , 8, No. 24, pp. 1-15.
272. Mao R., Tang J., Swanson B.G. (2000), Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. *Carbohydrates Polymers*, No. 41, pp. 331-338.
273. Martínez A.T. (2002), *Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases*. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30, pp. 425–444.
274. Martinez D., Larrondo L.F., Putnam N., Gelpke M.D.S., Huang K. (2004), *Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78*. *Nature Biotechnol.*, Vol. 22, pp. 695–700.
275. Martins M.A.M., Ferreira I.C., Santos I.M., Queiroz M.J., Lima N. (2001), *Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.*, Vol. 89, pp. 91–98.
276. Martorell M.M., Pajot H.F., De Figueroa L.I.C. (2012), *Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used a selection criteria*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 66, pp. 25-32.
277. Mashimo S., Shinyashiki N., Matsumura Y. (1996), *Water structure in gellan gum-water system*. *Carbohydrate Polymers* , Vol. 30, pp. 141-144. Elsevier.
278. Matsubara M., Lynch J.M., De Leij F.A.A.M. (2005), *A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land*. *Enzyme & Microbial Technology*, Vol. 39, pp. 1365-1372.
279. Mayer A.M., Staples R.C. (2002), *Laccase: new functions for an old enzyme*. *Phytochemistry*, Vol. 60, pp. 551–565.
280. Mazmanci M.A. (2010), *Decolorization of azo dyes by immobilized fungi*. *Biodegradation of azo dyes*, *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag, pp. 169-181.
281. McMullan G., Meehan C., Conneely A., Nirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I.M., Marchant R., Smyth W.F. (2001), *Microbial decolourisation and degradation of textile dyes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 56, pp. 81–87.

282. Mercer D.K., Iqbal M., Miller G.G., McCarthy A.J. (1996), *Screening Actinomycetes for Extracellular Peroxidase Activity*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, No. 6, pp. 2186–2190. American Society for Microbiology.
283. Mester T. (2000), *Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants*. Int. Biodeterior. Biodegr., Vol. 46, pp. 51-59.
284. Michaelsen A., Piñar G., Montanari M., Pinzari F. (2009), *Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: a case study*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 63, pp. 161–168.
285. Michaelsen A., Pinzari F., Barbabietola N., Piñar G. (2012), *Monitoring the effects of different conservation treatments on paper-infecting fungi*. International Biodeterioration & Biodegradation. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.08.005>.
286. Miller M., Palojarvi A., Rangger A., Reeslev M., Kjoller A. (1998), *The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 64, pp. 613–617.
287. Mohanasrinivasan V., SriramKalyan P., Ipsita Nandi, Subathradevi C., Selvarajan E., Suganthi V., Jemimah Naine S. (2013), *Fermentative production of extracellular pigment from Streptomyces coelicolor MSIS1*. Research Journal of Biotechnology, Vol. 8, No. 4, pp. 31-41.
288. Mohorčič M., Friedrich J., Renimel I., André P., Mandin D., Chaumont J.P. (2007), *Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12: 200-206.
289. Momose M., Ota H., Hayama M. (2011), *Re-evaluation of melanin bleaching using warm diluted hydrogen peroxide for histopathological analysis*. Pathology International, Vol. 61, pp. 345–350.
290. Moncrieff A., K. Hempel (1970), *Work on the degeneration of sculptured stone*. Conservation of stone and wooden objects, New York Conference, 2<sup>nd</sup> Edition, ICC Ed., London, Vol. 1, pp. 103–114.
291. Monreal J., Reese E.T. (1969), *The chitinase of Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol., Vol. 15, pp. 689–696.
292. Monsan P. (1982), *Les methodes immobilisation enzymes*. In: Durand G, Monsan P (eds) *Les enzymes, productions utilisations industrielles*. Gauthier-Villards, Paris, pp. 81–118.
293. Montalbano L., Susini A. (2003), *Sperimentazione dei Gel enzimatici su opera cartacee*. In: *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Il Prato, Collana I Talenti, pp. 125-135.
294. Montemartini Corte A., Ferroni A., Salvo V.S., (2003), *Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 51, pp. 167–173.
295. Moosvi S., Kher X., Madamwar D. (2007), *Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2*. Dyes Pigm., Vol. 74, pp. 723–729.
296. Moreno-Espindola I.P., Rivera-Becerril F., Ferrara-Guerrero M., De León-González F., (2007), *Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles*. Soil Biology & Biochemistry 39, pp. 2520-2526, Published by Elsevier Ltd.
297. Mou D.G., Lim K.K., Shen H.P. (1991), *Microbial agents for decolorization of dye wastewater*. Biotechnol. Adv., Vol. 9, pp. 613–622.
298. Moutaouakkil A., Zeroual Y., Dzairi F.Z., Talbi M., Lee K., Blaghen M. (2003), *Purification and partial chareterization of azoreductase from Enterobacter agglomerans*. Arch. Biochem. Biophys., Vol. 413, pp. 139–146.
299. Miyoshi E., Takaya T., Nishinari K. (1995), *Effects of salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology*. Thermochimica Acta, No. 267, pp. 269-287.

300. Nagasaki K., Kumazawa M., Murakami S. (2008), *Purification, Characterization, and Gene Cloning of Ceriporiopsis sp. Strain MD-1 Peroxidases That Decolorize Human Hair Melanin*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 74, No. 16, pp. 5106–5112. American Society for Microbiology.
301. Nandakumar R., Babu S., Raguchander T., Samiyappan R. (2007), *Chitinolytic Activity of Native Pseudomonas fluorescens Strains*. J. Agric. Sci. Technol., Vol. 9, pp. 61-68.
302. Neeraja C., Anil K., Purushotham P., Suma K., Sarma P., Moerschbacher B.M., Podile A.r. (2010), *Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants*. Crit. Rev. Biotechnol., Vol. 30, No. 3, pp. 231-241.
303. Neves E.R., Schäfer S., Phillips A., Canejo J., Macedo M.F., (2009), *Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration*. International Biodeterioration & Biodegradation 63 – Published by Elsevier Ltd.
304. Nickerson M.T., Paulson A.T., Speers R.A. (2003), *Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation*. Food Hydrocolloids, No. 17, pp. 577-583.
305. Nicolaus R.A., Piatelli M., Fattorusso E. (1964), *The structure of melanins and melanogenesis-IV. On some natural melanins*. Tetrahedron, Vol. 20, pp. 1163-1172.
306. Nicolaus R.A. (1968), *Melanins*. Hermann, Paris.
307. Nielsen M.N., Sørensen J. (1999), *Chitinolytic activity of Pseudomonas fuorescens isolates from barley and sugar beet rhizosphere*. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 30, pp. 217-227. Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V.
308. Nigam P., Banat I.M., Singh D., Marchant R. (1996), *Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes*. Process. Biochem., Vol. 31, pp. 435–442.
309. Niku-Paavola M.L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundell T., Hatakka A. (1990), *The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus Phlebia radiata*. Journal of Biotechnology, Vol. 13, pp. 211–221.
310. Niladevi K.N. (2008), *Characterization of laccase from Streptomyces psammoticus: an enzyme for eco-friendly treatment of environmental pollutants*. PhD thesis in Biotechnology presso National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (CSIR), Trivandrum – INDIA.
311. Norberg P., Hofsten B.V. (1969), *Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria*. Journal of General Microbiology, Vol. 55, pp. 251-256. Printed in Great Britain.
312. Nosanchuk J.D., Casadevall A. (2003), *The contribution of melanin to microbial pathogenesis*. Cellular Microbiology, Vol. 5, No. 4, pp. 203–223.
313. Novotny C., Rawal M., Bhatt M., Patel M., Sasek V., Molitoris H.P. (2001), *Capacity of Irpex lacteus and Pleurotus ostreatus for decolorization of chemically different dyes*. J. Biotechnol., Vol. 89, pp. 113–122.
314. Nyuksha J.P. (1993), *Biodeterioration of Paper and Books*. Library of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg.
315. Nyuksha J.P. (1994), *The biodeterioration of paper and books* in Garg K.L., Garg N., Mukerji K.G., Recent advances in biodeterioration and biodegradation, Vol.1. Naya Prokash, Calcutta, India, pp.1-88.
316. O'Brien M., Colwell R.R. (1986), *A Rapid Test for Chitinase Activity That Uses 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-D-Glucosaminide*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, N° 7. pp. 1718-1720. American Society for Microbiology.
317. Ogawa T., Yatome C., Idaka E., Kamiya H. (1986), *Biodegradation of azo acid dyes by continuous cultivation of Pseudomonas cepacia 13 NA*. J. Soc. Dyers and Colourists, Vol. 2, pp. 12-14.

318. Ogawa T., Yatome C. (1990), *Biodegradation of azo dyes in multistage rotating biological contactor immobilized by assimilating bacteria*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 44, pp. 561-566.
319. Ogawa E.R., Takahashi H., Yajima H., Nishinari K. (2005), *Thermally induced coil-to-helix transition of sodium gellan gum with different molar masses in aqueous salt solutions*. Biopolymers, No. 79, pp. 207-217.
320. Ogino H., Miyamoto K., Ishikawa H. (1994), *Organic-Solvent-Tolerant Bacterium Which Secretes Organic-Solvent-Stable Lipolytic Enzyme*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, N° 10, pp. 3884-3886. American Society for Microbiology.
321. O'Hoski B.A. (1976), *An investigation into the composition and properties of saliva in relation to the surface-cleaning of oil painting*, Paper presented at the Ottawa Regional Group Meeting, National Gallery of Canada, Ottawa.
322. Okoroma E.A., Garelick H., Aiola O.O., Purchase D. (2012), *Identification and characterisation of a Bacillus licheniformis strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 74, pp. 54-60.
323. Padmavathy S., Sandhya S., Swaminathan K., Subrahmanyam Y.V., Chakrabarti T., Kaul S.N. (2003), *Aerobic Decolorization of Reactive Azo Dyes in Presence of Various Cosubstrates*. Chem. Biochem. Eng. Q., Vol. 17, No. 2, pp. 147-151.
324. Pagga U., Brown D. (1986), *The degradation of dyestuffs: Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests*. Chemosphere, Vol. 15, pp. 479-491.
325. Pagga U., Taeger K. (1994), *Development of a method for adsorption of dyestuffs on activated sludge*. Water Res., Vol. 28, pp. 1051-1057.
326. Palazzi S. (1995), *Colorimetria. La scienza del colore nell'arte e nella tecnica*. Nardini Editore, Firenze.
327. Palla F. (2006), *Biotechnologie per i Beni Culturali. Innovazioni scientifiche Bio-cleaning, Bio-reinforcing*. CRPR/InForma - Rivista semestrale del Centro Regionale Progettazione e Restauro, No. 1, Anno 2006, pp. 22-26.
328. Park S.H., Lee J.H., Lee H.K. (2000), *Purification and Characterization of Chitinase from a Marine Bacterium, Vibrio sp. 98CJ11027*. The Journal of Microbiology, Vol. 38, N° 4, pp. 224-229. The Microbiological Society of Korea.
329. Pasquinelli F. (1975), *Manuale per tecnici di laboratorio*. Edizioni Rosini. Firenze.
330. Pasti-Grigsby M.B., Paszczynski A., Goszczynski S., Crawford D.L., Crawford R.L. (1992), *Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by Streptomyces spp. and Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, pp. 3605-3613.
331. Paszczynski A., Crawford R.L. (1991), *Degradation of azo compounds by ligninase from Phanerochaete chrysosporium: involvement of veratryl alcohol*. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 178, pp. 1056-1063.
332. Paszczynski A., Pasti M.B., Goszczynski S., Crawford D.L., Crawford R.L. (1991), *New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by Streptomyces spp. and Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microbiol. Technol., Vol. 13, pp. 378-384.
333. Paszczynski A., Pasti-Grigsby M.B., Goszczynski S., Crawford R.L., Crawford D.L. (1992), *Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by Phanerochaete chrysosporium and Streptomyces chromofuscus*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, pp. 3598-3604.
334. Pearce C.I., Lloyd J.R., Guthrie J.T. (2003), *The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review*. Dyes Pigment., Vol. 58, pp. 179-196.
335. Pearce C.I., Christie R., Boothman C., von Canstein H., Guthrie J.T., Lloyd J.R. (2006), *Reactive azo dye reduction by Shewanella strain J18 143*. Biotechnol. Bioengin., Vol. 95, pp. 692-703.

336. Pel R., Gottschal J.C. (1986), *Chitinolytic communities from an anaerobic estuarine environment*. In Muzzarelli, RAA, Jeuniaux, C & Gooday, GW (Eds): Chitin in Nature and Technology, pp. 539–546. Plenum, New York.
337. Pel R., Gottschal J.C. (1986), *Stimulation of anaerobic chitin degradation in mixed cultures*. Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 52, pp. 359–360.
338. Pel R., Gottschal J.C. (1989), *Interspecies interaction based on transfer of a thioredoxin-like compound in anaerobic chitin-degrading mixed cultures*. FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 62, pp. 349–358.
339. Pel R., Wessels G., Aalfs H., Gottschal J.C. (1989), *Chitin degradation by Clostridium sp. strain 9.1 in mixed cultures with saccharolytic and sulphate-reducing bacteria*. FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 62, pp. 191–200.
340. Pel R., Wijngaard A., Epping E., Gottschal J.C. (1990), *Comparison of the chitinolytic properties of Clostridium sp. strain 9.1 and a chitin degrading bacterium from the intestinal tract of the plaice Pleuronectes platessa (L.)*. J. Gen. Microbiol., Vol. 136, pp. 695–704.
341. Piacentini M. (2009), *Appunti del corso di Metodologie fisiche per i beni culturali. Archeometria*. Dipartimento di Scienze di Base ed Applicate per l'Ingegneria, Laboratorio di Analisi non Distruttive ed Archeometria, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma.
342. Pinzari F., Pasquariello G., De Mico A. (2006), *Biodeterioration of Paper: A SEM Study of Fungal Spoilage Reproduced Under Controlled Conditions*. Macromol. Symp., Vol. 238, pp. 57–66.
343. Pinzari F. (2008), *Scienza e ricerca per i beni culturali. Microscopia elettronica a scansione e microanalisi*. "Quaderni ICPL 2". Gangemi, Roma.
344. Pinzari F., Coalizzi P., Troiano F. (2010), *Rilievi microbiologici sull'opera d'arte grafica "Généalogie de la Royale Maison de Savoye, sec. XVII. Restauro: sinergie tra pubblico e privato*. XVII Salone dell'Arte del Restauro e della Conservazione dei Beni Culturali e Ambientali di Ferrara – 24/27 Marzo 2010.
345. Pinzari F., Zotti M., De Mico A., Calvini P. (2010), *Biodegradation of inorganic components in paper documents: Formation of calcium oxalate crystals as a consequence of Aspergillus terreus Thom growth*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 64, No. 6, pp. 499-505.
346. Pitt J.I., Hocking A.D. (2009), *Fungi and Food Spoilage, third edition*. Springer Science, New York.
347. Plačková M., Svobodová K., Cajthaml T. (2012), *Laccase activity profiling and gene expression in PC-degrading cultures of Trametes versicolor*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 71, pp. 22-28.
348. Pleban S., Chernin L., Chet I. (1997), *Chitinolytic activity of an endophytic strain of Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 25, pp. 284-288. The Society for Applied Bacteriology.
349. Plonka P.M., Grabacka M. (2006), *Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects*. Acta Biochimica Polonica, Vol. 53, No. 3, pp. 429–443.
350. Plou F.J., Ferrer M., Nuero O.M., Calvo M.V., Alcalde M., Reyes F., Ballesteros A. (1998), *Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay*. Biotechnology Techniques, Vol. 12, N° 3, pp. 183–186. Chapman & Hall.
351. Pohleven F., Vidic I., Tavzes C. (2008), *Degradation of melanin and biocides y ligninolytic fungi*. Wood science for conservation of cultural heritage – Braga 2008: proceedings of the international conference held by Cost action IE0601 in Braga (portugal) 5-7 November 2008.
352. Pointing S.B., Vrijmoed L.L.P. (2000), *Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by Pycnoporus sanguineus producing laccase as the sole phenoloxidase*. World J. Microbiol., Vol. 16, pp. 317–318.

353. Pointing S.B., Bucher V.V.C., Vrijmoed L.L.P. (2000), *Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability*. World J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 16, pp. 199–205.
354. Poles G., Della Giovanna A. (1974), *Analisi microscopica delle fibre naturali nella carta*. Associazione Tecnica Italiana per la Cellulosa e la Carta - Torino.
355. Potgieter H.J., Alexander M. (1966), *Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis*. J. Bacteriol., Vol. 91, pp. 1526-1532.
356. Preston-Mafham J., Boddy L., Randerson P.F. (2002), *Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique*. FEMS - Microbiology Ecology, Vol. 42, pp. 1-14.
357. Price L.O., Lee M.W., Bertalan S. (1994), *Mold/Fungi* in “Book and Paper conservation Catalogue 12”, 9<sup>th</sup> Edition. AIC Book and paper group.
358. Prota G. (1992), *Melanins and Melanogenesis*. Academic Press, San Diego, CA.
359. Punitha V., Kannan P., Saravanabhavan S., Thanikaivelan P., Raghava Rao J., Balachandran Unni Nair, Ramasami T. (2008), *Enzymatic Removal of Melanin in Enzyme Based Dehairing and Fibre Opening*. The Journal of the American Leather Chemists Association, Vol. 103, No. 7, pp. 203-208.
360. Purves W.K., Sadava D., Orians G.H., Heller H.C. (2001), *Biologia. L'evoluzione della diversità*. Zanichelli Editore, pp. 660-666.
361. Puvaneswari N., Muthukrishnan J., Gunasekaran P. (2006), *Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes*. Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 44, pp. 618-626.
362. Rajamohanam P.R., Ganapathy S., Vyas P.R., Ravikumar A., Deshpande M.V. (1996), *Solid-state CP/MASS <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: a sensitive method to monitor enzymatic hydrolysis of chitin*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Volume 31, Issues 3-4, 5<sup>th</sup> February 1996, Pages 151-163.
363. Ramachandran S., Magnuson T.S., Crawford D.L. (2000), *Isolation and analysis of three peroxide sensor regulatory gene homologs *ahpC*, *ahpX* and *oxyR* in *Streptomyces viridosporus* T7A--a lignocellulose degrading actinomycete*. DNA Seq., Vol. 11, No. 1-2, pp. 51-60.
364. Ramírez J.L., Santana M.A., Galindo-Castro I., Gonzalez A. (2005), *The role of biotechnology in art preservation*. TRENDS in biotechnology, Vol. 23, No. 12, pp. 584-588.
365. Ranalli G., Chiavarini M., Guidetti V., Marsala F., Mattini M., Zanardini E., Sorlini C. (1997), *The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 40, pp. 255-261.
366. Ranalli G., Sorlini C., (2003), *Application of microorganism for the deteriorated surfaces recovery*. Coalition N. 6 (2), Edited by Saiz-Jimenez C.
367. 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: bio restoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes*. Journal of Applied Microbiology 98, 73-83.
368. Rani C., Jana A.K., Bansal A. (2011), *Studies on the Biodegradation of Azo Dyes by White rot Fungi *Daedalea Flavida* in the Absence of External Carbon Source*. 2<sup>nd</sup> International Conference on Environmental Science and Technology – IPCBEE, Vol.6, pp. 147-150.
369. Rättö M., Chatani M., Ritschkoff A.C., Viikari L. (2001), *Screening of micro-organisms for decolorization of melanins produced by bluestain fungi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:210–213.
370. Rau J., Knackmuss H.J., Stolz A. (2002), *Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria*. Env. Sci. Technol., Vol. 36, pp. 1497–1504.

371. Rebrikova N.L., Manturovskaya N.V. (2000), *Foxing – A new approach to an old problem*. Restaurator , Vol. 21, pp. 85-100.
372. Rechetilova T.A. (2004), *Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development*. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 40, No. 3, pp. 319–324.
373. Reeslev M., Miller M., Nielson K.F. (2003), *Quantifying mold biomass on gypsum board: comparison of ergosterol and Beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 69, pp. 3996–3998.
374. Rego J.V., Billen G., Fontigny A., Somville M. (1985), *Free and attached proteolytic activity in water environments*. Marine Ecology - Progress Series, Vol. 21, pp. 245-249. Inter-Research, Printed in F. R. Germany.
375. Reichardt W., Gunn B., Colwell R.R. (1983), *Ecology and taxonomy of chitinoclastic Cytophaga and related chitin-degrading bacteria isolated from an estuary*. Microb. Ecol., Vol. 9, pp. 273–294.
376. Riley P.A. (1997), *Melanin*. Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol. 26, No. 11, pp. 1235-1239.
377. Robbins P.W., Albright C., Benfield B. (1988), *Cloning and Expression of a Streptomyces plicatus Chitinase (Chitinase-63) in Escherichia coli\**. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 263, No. 1, pp. 443-447.
378. Roberts W.K., Selitrennikoff C. (1988), *Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity*. Journal of General Microbiology, Vol. 134, pp. 169-176. Printed in Great Britain.
379. Robinson J.M., Keating M.S., Sloan G.L. (1980), *The Characteristics of Extracellular Protein Secretion by Staphylococcus staphylolyticus*. Journal of General Microbiology, Vol.118, pp. 529-533. Printed in Great Britain.
380. Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. (2001), *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative*. Biresour. Technol., Vol. 77, pp. 247–255.
381. Rodriguez E., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R. (1999), *Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi*. Curr. Microbiol., Vol. 38, pp. 27-32.
382. Rodriguez-Kabana R., Godoy G., Morgan-Jones G., Shelby R.A. (1983), *The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies*. Plant and Soil, N° 75, pp. 95-106. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague. Printed in the Netherlands.
383. Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Chekroun B.K., González-Muñoz M.T. (2003), *Conservation of ornamental stone by Myxococcus xanthus induced carbonate biomineralization*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, pp. 2182-2193.
384. Rogalski J., Jozwik E., Hatakka A., Leonowicz A. (1995) *Immobilization of laccase from Phlebia radiata on controlled porosity glass*. J. Mol. Catal. A. Enzym., Vol. 95, pp. 99–108.
385. Rohrmann S., Molitoris H.P. (1992), *Screening for wooddegrading enzymes in marine fungi*. Canadian Journal of Botany, Vol. 70, pp. 2116–2123.
386. Rojas J.A., Cruz C., Mikán J.F., Villalba L.S., Cepero de Garcia M.C., Restrepo S. (2009), *Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper*. International Biodeterioration & Biodegradation – Published by Elsevier Ltd.
387. Russ R., Rau J., Stolz A. (2000), *The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria*. Appl. Env. Microbiol., Vol. 66, pp. 1429–1434.
388. Saitou N., Nei M. (1987), *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol. Biol. Evol., Vol. 4, No. 4, pp. 406-425.
389. Saiz-Jimenez C. (2009), *Biodeterioration: An Overview of the State-of-the-Art and Assessment of Future Directions*. [http://www.europarl.eu.int/stoa/publi/pdf/00-13-04\\_en.pdf](http://www.europarl.eu.int/stoa/publi/pdf/00-13-04_en.pdf).
390. Saiz-Jimenez C. (1997), *Biodeterioration vs Biodegradation: the Role of Microorganisms in the Removal of Pollutants Deposit on Historic Buildings*. International Biodeterioration &

- Biodegradation, Vol. 40, N° 2-4, pp. 225-232. Elsevier Science Limited. Printed in Great Britain.
391. Salem S.R., Shabeb M.S.A., Amara A.A. (2009), *Optimization of thermophilic protease production in Bacillus mixed cultures under mesophilic conditions*. World Journal of Agricultural Sciences, vol. 5, No. 3, pp. 375-383.
  392. Sampson M.N., Gooday W.G. (1998), *Involvement of chitinases of Bacillus thuringiensis during pathogenesis in insects*. Microbiology, N° 144, pp. 2189-2194. Printed in Great Britain.
  393. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (2000), *Introduction to a food and airborne fungi*. Sixth Revised Edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
  394. Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A. (2003), *Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes*. Journal of Applied Microbiology, N° 94, pp. 295-300. The Society for Applied Microbiology.
  395. Santucci L., Grosso V. (1984-85), *Aspetti chimici dello sbiancamento della carta. Effetti secondari di ipoclorito e clorito di sodio, e ossidanti coesistenti e derivati*. Bollettino dell'Istituto Centrale per la Patologia del Libro "Alfonso Gallo", 39, Numero Unico, pp. 165-186.
  396. Saratale R.G., Saratale G.D., Chang J.S., Govindwar S.P. (2011), *Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Vol. 42, pp. 138–157, Elsevier.
  397. Schmalzer-Ripcke J., Sugareva V., Gebhardt P., Winkler R., Kniemeyer O., Heinekamp T., Brakhage A.A. (2009), *Production of pyomelanin, a second type of melanin via the tyrosine degradation pathway in Aspergillus fumigatus*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 75, No. 2, pp. 493-503. American Society for Microbiology.
  398. Scossiroli R.E. & Palenzona D.L. (1971), *Manuale di biometria*. Zanichelli Editore, Bologna.
  399. Segal J. & Cooper D. (1977), *The use of enzymes to release adhesives*. Paper conservator, 2: 47-50.
  400. Seifert K., Breuil C., Rossignol L., Best M., Saddler J. (1988), *Screening for microorganisms with potential for biological control of sapstain on unseasoned lumber*. Mater. Org., Vol. 23, pp. 81-95.
  401. Selvam K., Swaminathan K., Chae K.S. (2003), *Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus Thelephora sp.*. BioResources Technology, Vol. 88, pp. 115–119.
  402. Senan R.C., Shaffiqu T.S., Roy J.J., Abraham T.E. (2003), *Aerobic degradation of a mixture of azo dyes in a packed bed reactor having bacteria coated laterite pebbles*. Biotechnol. Prog., Vol. 19, No. 2, pp. 647–651.
  403. Shah D.P., Jani G.K. (2009), *Modification and characterization of Gellan Gum*. Pharmaceutical technology, Vol. 33, No. 7, pp. 48-58.
  404. Sharma D., Sharma B., Shukla A.K. (2011), *Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review*. Biotechnology, Vol. 10, N° 1, pp. 23-40. Asian Network for Scientific Information.
  405. Sharma D.K., Saini H.S., Singh M., Chimni S.S., Chadha B.S. (2004), *Biodegradation of acid blue-15 a textile dye by an upflow immobilized cell bioreactor*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., Vol. 31, pp. 109–114.
  406. Sharma G., Pandey R.R. (2010), *Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes*. Journal of Yeast and Fungal Research, Vol. 1, No. 8, pp. 157-164.
  407. Sharma P. , Goel R., Capalash N. (2006), *Bacterial laccases*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 23, No. 6, pp. 823-832.

408. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001), *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology Advances, Vol. 19, pp. 627–662.
409. Shaul G.M., Holdsworth T.J., Dempsey C.R., Dostal K.A. (1991), *Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process*. Chemosphere, Vol. 22, pp. 107-119.
410. Shen C.R., Chen Y.S., Yang C.J., Chen J.K., Liu C.L. (2009), *Colloid Chitin Azure Is a Dispersible, Low-Cost Substrate for Chitinase Measurements in a Sensitive, Fast, Reproducible Assay*. Journal of Biomolecular Screening - <http://jbx.sagepub.com/>.
411. Shin K.S., Kim C.J. (1998), *Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white rot fungus, Pleurotus ostreatus*. Biotechnol. Lett., Vol. 20, pp. 569–572.
412. Siehr D.J. (1981), *Melanin biosynthesis in Aureobasidium pullulans*. Journal of Coatings Technology, Vol. 53, pp. 23-25.
413. Sierra G. (1956), *A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates*. Laboratory of Microbiology, Municipal University of Amsterdam, Holland.
414. Sigma-Aldrich Products for Life Science Research (2008-2009), <http://www.sigmaaldrich.com>.
415. Sirisena D.M., Manamendra T.P. (1995), *Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from decomposing rice straw*. J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka, Vol. 23, No. 1, pp. 25-30.
416. Sivan A., Chet I. (1989), *Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology, Vol. 135, pp. 675-682.
417. Sivasakthivelan P. (2013), *Decolorization Of Textile Dyes And Their Effluents Using White Rot Fungi*. International Journal of ChemTech Research, Vol. 5, No. 3, pp. 1309-1312.
418. Smith R.E. (1977), *Rapid Tube Test for Detecting Fungal Cellulase Production*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 33, No. 4, pp. 980-981. American Society for Microbiology.
419. Sneh B. (1981), *The use of rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control*. Phytopath. Zeitschrift., Vol. 100, pp. 251–256.
420. Somers P.J.B., Yao R.C., Doolin L.E., McGowan M.J., Fukuda D.S., Mynderse J.S. (1987), *Method for the detection and quantification of chitinase inhibitors in fermentation broths, isolation and insect life cycle effect of A82516*. The Journal of Antibiotics, Vol. 40, No. 12, pp. 1751-1756.
421. Someya N., Ikeda S., Morohoshi T., Tsujimoto M.N., Yoshida T., Sawada H., Ikeda T., Tsuchiya K. (2011), *Diversity of Culturable Chitinolytic Bacteria from Rhizospheres of Agronomic Plants in Japan*. Microbes Environ., Vol. 26, N° 1. <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsme2/>.
422. Sorlini C., Cappitelli F., (2008), *The application of viable bacteria for the biocleaning of cultural heritage surfaces*. Coalition N. 15 (2), Edited by Saiz-Jimenez C.
423. Spadaro J.T., Gold M.H., Renganathan V. (1992), *Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, pp. 2397–2401.
424. A.R. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, L. Segre, C. Cremisini (2006), *Comparison of microbial communities native to three differently polluted ecological niches in the industrial site of Bagnoli (Naples, Italy)*. In: Recent Research Developments in Multidisciplinary Applied Microbiology. Understanding and Exploiting Microbes and Their Interactions. Biological, Physical, Chemical and Engineering Aspects, Wiley-VCH. ISBN 0-470-85084-1.
425. A.R. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, E. Vedovato, N. Barbabietola, C. Cremisini (2008), *A microbiological survey of the Etruscan Mercareccia tomb (Italy): contribution of microorganisms to deterioration and restoration*. In: Art 2008 - Non-destructive investigations and microanalysis for the diagnostics and conservation of cultural and environmental heritage, Jerusalem, Israel, May 25-30.

426. A.R. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, A. Fiore, P. Marconi, F. Langella, G. Haferburg, A. Nicoara, A. Neagoe, E. Kothe (2013), *Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils*. Environ. Sci. Pollut. Res.. DOI 10.1007/s11356-013-1907-3.
427. Srebotnik E., Kenneth A., Jensen J.R., Shingo K., Kenneth E. (1997), *Evidence That Ceriporiopsis subvermispora Degrades Nonphenolic Lignin Structures by a One-Electron-Oxidation Mechanism*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 11, pp. 4435–4440.
428. Srebotnik E., Kenneth E. (2000), *Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system*. Journal of Biotechnology, Vol. 81, pp. 179-188.
429. Sterflinger K., Pinzari F. (2012), *The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment*. Environmental Microbiology, Vol. 14, No. 3, pp. 559–566.
430. Sterlini F. (1995), *Surface cleaning products and their effects on paper*. Paper conservation news, 76: 3-7.
431. Stolz A. (2001), *Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes*. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 56, pp. 69–80.
432. Sul'man E.M., Sul'man M.G., Doluda V.Y. (2010), *Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development. Fifth International Congress (March 2009, Moscow)*. Catalysis in Industry, Vol. 2, No. 2, pp. 194–195.
433. Surgalla M.J., Beesley E.D. (1969), *Congo Red-Agar Plating Medium for Detecting Pigmentation in Pasteurella pestis*. Applied Microbiology, Vol. 18, No. 5, pp. 834-837. American Society for Microbiology.
434. Suryanarayanan T.S., Ravishankar J.P., Venkatesan G., Murali T.S. (2004), *Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte*. Mycol. Res., Vol. 108, No. 8, pp. 974–978. The British Mycological Society.
435. Susini A. (2005), *Metodi enzimatici nel restauro delle opera su carta*. Kermes, No. 58, pp. 61-64.
436. Suwannawong P., Khammuang S., Sarntima R. (2010), *Decolorization of rhodamine B and congo red by partial purified laccase from Lentinus polychrous Lév*. J. Biochem. Tech., Vol. 3, No. 2, pp. 182-186.
437. Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y. (2003), *A thermostable laccase from Streptomyces lavendulae REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression*. Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 67, pp. 2167-2175.
438. Svitil A.L., Chadhain S.M.N., Moore J.A., Kirchman D.L. (1997), *Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium Vibrio harveyi Growing on Different Forms of Chitin*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, N° 2, pp. 408–413. American Society for Microbiology.
439. Swamy J., Ramsay J.A. (1999), *The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes*. Enzyme Microbiol. Technol., Vol. 24, pp. 130–137.
440. Swamy J., Ramsay J.A. (1999), *Effects of glucose and NH<sup>4+</sup> concentrations on sequential decolorization by Trametes versicolor*. Enzyme Microbiol. Technol., Vol. 25, pp. 278–284.
441. Swan G.A. (1963), *Chemical structure of melanins*. Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol.100, pp. 1005-1019.
442. Swan G.A. (1974), *Structure, Chemistry and Biosynthesis of the Melanins*. In Herz W., Grisebach H., Kirby G.W. (Eds.), Progress in the Chemistry of Organic Nature Products, Vol. 31, p. 521. Springer, New York.
443. Sworm G., Sanderson G.R., Gibson W. (1995), *Gellan gum fluid gels*. Food Hydrocolloids, Vol. 9, No. 4, pp. 265-271.
444. Sworm G. (2000), *Gellan gum*. Handbook of hydrocolloids, pp. 204-227. Second Edition by Phillips G.O., Williams P.A.. Woodhead Publishing Limited e CRC Press Cambridge.

445. Syed M.A., Sim H.K., Khalid A., Shukor M.Y. (2009), *A simple method to screen for azo-dye-degrading bacteria*. J. Environ. Biol., Vol. 30, No. 1, pp. 89-92.
446. Szczepanowska H.M. & Lovett C.M. Jr. (1992), *A study of removal and prevention of fungal stains on paper*. JAIC, 31: 147-160.
447. Szczepanowska H.M. & Moomaw W.R. (1994), *Laser stain removal of fungus-induced stains from paper*. JAIC, 33: 25-32.
448. Szczepanowska H., Cavaliere A.R. (2000), *Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collections, Wye House, Easton, Maryland*. International Biodeterioration and Biodegradation, Vol. 46, No. 3, pp. 245-249.
449. Takano Y., Kubo Y., Kawamura C., Tsuge T., Furusawa L. (1997), *The Alternaria alternata melanin biosynthetic gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutants of Colletotrichum lagenarium*. Fungal Genetics and Biology, Vol. 21, pp. 131-140.
450. Talarico F., Caldi C., Valanzuela M., Zaccheo C., Zampa A., Nugari M.P. (2001), *Applicazione dei gel come supportanti nel restauro*. Bollettino ICR, No. 3, pp.101-118.
451. Tasso F., Barbabietola N., Grimaldi M., Alisi C., Marconi P., Sprocati A.R., Pasquariello G. (2011), *Il Biorestauro: microrganismi al servizio dell'arte*. <http://patrimonioculturale.enea.it/pubblicazioni/2011/f.-tasso-il-biorestauro-microrganismi-al-servizio-dellarte/view>.
452. Tavzes Č., Šilc F., Kladnik A., Fackler K., Messner K., Pohleven F., Koestler R.J. (2009), *Enzymatic degradation of mould stains on paper analysed by colorimetry and DRIFT-IR spectroscopy*. International biodeterioration & biodegradation, 63: 873-879.
453. Tavzes Č., Palčič J., Fackler K., Pohleven F., Koestler R.J. (2013), *Biomimetic system for removal of fungal melanin staining on paper*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 84, pp. 307-313.
454. Techkarnjanaruk S., Goodman A.E. (1999), *Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium Pseudoalteromonas sp. strain S91*. Microbiology, N° 145, pp. 925-934. Printed in Great Britain.
455. Teng W.L., Khor E., Tan T.K., Lim L.Y., Tana S.C. (2001), *Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi*. Carbohydrate Research, N° 332, pp. 305–316, Elsevier.
456. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M. (2013), *Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms*. Biotechnol. J., Vol. 8, pp. 97–109.
457. Thiagarajan V., Revathi R., Aparanjini K., Sivamani P., Girilal M., Priya C.S., Kalaichelvan P.T. (2011), *Extra cellular chitinase production by Streptomyces sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on Fusarium oxysporum PTK2 cell wall*. Int. J. Curr. Sci., Vol.1, pp. 30-44.
458. Thompson S.E., Smith M., Wilkinson M.C., Peek K. (2001), *Identification and Characterization of a Chitinase Antigen from Pseudomonas aeruginosa Strain 385*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, N° 9, pp. 4001–4008. American Society for Microbiology.
459. Tiano P. (2002), *Biodegradation of Cultural heritage: Decay Mechanisms and Control Methods*. [http://www.arcchip.cz/w09/w09\\_tiano.pdf](http://www.arcchip.cz/w09/w09_tiano.pdf).
460. Tiquia S.M. (2002), *Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting*. Journal of Applied Microbiology, N° 92, pp. 764-775. The Society for Applied Microbiology.
461. Todeschini R. (1998), *Introduzione alla chemiometria*. EdiSES, Napoli, pp. 121-122.
462. Tokousbalides M.C., Sisler H.D. (1979), *Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of Verticillium dahliae*. Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol. 11, pp. 64.

463. Troiano F. (2008), *Sviluppo di un nuovo metodo enzimatico (il 4-MUF-NAG) per la diagnosi di alterazioni fungine sui beni culturali*. Tesi di Laurea Specialistica. Università degli Studi di Roma "La Sapienza".
464. Tsujibo H., Miyamoto K., Kuda T., Minami K. (1992), *Purification, Properties, and Partial Amino Acid Sequences of Thermostable Xylanases from Streptomyces thermoviolaceus OPC-520*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58, No. 1, pp. 371-375. American Society for Microbiology.
465. Tsujibo H., Orikoshi H., Shiotani K., Hayashi M., Umeda J., Miyamoto K., Imada C., Okami Y., Inamori Y. (1998), *Characterization of Chitinase C from a Marine Bacterium, Alteromonas sp. Strain O-7, and Its Corresponding Gene and Domain Structure*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, N° 2, pp. 472–478. American Society for Microbiology.
466. Upstill C., Atkins E.D.T., Atwool P.T. (1986), *Helical conformations of gellan gum*. International Journal of Biological Macromolecules, No. 8, pp. 275.
467. Urzi C., Krumbein W.E., Warscheid T. (1992), *On the question of biogenic colour changes of marbles of Mediterranean monuments*. (Coating - Crust - Microstomatolite - Patina - Scialbatura - Skin - Rock varnish). The Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium. Geneve, Ed. D. Decrouez, J. Chamay, F. Zezza, Musee d'Art et Histoire de Geneve, Geneve, 19-21 Nov., pp. 397 - 420.
468. Urzi C., Garcia-Valles M., Vendrell M., Pernie A. (1999), *Biomining processes on rock and monument surfaces observed in field and in laboratory conditions*. Geomicrobiology Journal, Vol. 16, No. 1, pp. 39-54.
469. Urzi C., De Leo F. (2000), *Biodeterioration of Cultural Heritage in Italy: State of Art*. [http://www.arcchip.cz/w08/w08\\_de\\_leo.pdf](http://www.arcchip.cz/w08/w08_de_leo.pdf).
470. Vafei F., Khataee A.R., Movafeghi A., Lisar S.Y.S., Zarei M. (2012) *Bioremoval of an azo dye by Azolla filiculoides: study of growth, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes status*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 75, pp. 194-200.
471. Vaidya R.J., Macmil S.L.A., Vyas P.R., Chhatpar H.S. (2003), *The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of Alcaligenes xylosoxydans*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 36, pp. 129–134.
472. Valdez S., González-Cerón G., Kieser H.M., Servín-González L. (1999), *The Streptomyces coelicolor A3(2) lipAR operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator*. Microbiology, N° 145, pp. 2365–2374. Printed in Great Britain.
473. Valentini F., Diamanti A., Palleschi G. (2010), *New bio-cleaning strategies on porous building materials affected by biodeterioration event*. Applied Surface Science, N° 256, pp. 6550–6563. Elsevier B.V.
474. Van Der Reyden D., (1992), *Recent scientific research in paper conservation*. JAIC, Vol. 31, No. 1, Article 14, pp. 117-138.
475. Vandevivere P.C., Bianchi R., Verstraete W. (1998), *Review: treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies*. J. Chem. Technol. Biotechnol., Vol. 72, pp. 289–302.
476. Venturelli F., Virli L. (1995), *Invito alla Botanica. Con esercitazioni di laboratorio*. Zanichelli Editore.
477. Vermelho A.B., Meirelles M.N.L., Lopes A., Gonçalves Petinate S.D., Chaia A.A., Branquinha M.H. (1996), *Detection of Extracellular Proteases from Microorganisms on Agar Plates*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 91, No. 6, pp. 755-760.
478. Viral S., Kunjal P. (2012), *Degradation of Azo dye Acid blue 158 by soil microbes*. Research Journal of Biotechnology, Vol. 7, No. 2, pp. 50-57.
479. Walker R. (1970), *The metabolism of azo compounds: a review of the literature*. Food Cosmet. Toxicol., Vol. 8, pp. 659-676.

480. Wang S.L., Chang W.T. (1997), *Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by Pseudomonas aeruginosa K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 2, pp. 380–386. American Society for Microbiology.
481. Wang X., Xu P., Yuan Y., Liu C., Zhang D., Yang Z., Yang C., Ma C. (2006), *Modeling for gellan gum production by Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461 in a simplified medium*. Appl. Environ. Microbiol., No. 72, pp. 3367-3374.
482. Watanabe T., Oyanagi W., Suzuki K., Tanaka H. (1990), *Chitinase System of Bacillus circulans WL-12 and Importance of Chitinase A1 in Chitin Degradation*. Journal of Bacteriology, Vol. 172, N° 7, pp. 4017-4022. American Society for Microbiology.
483. Watanabe T., Kimura K., Sumiya T., Nikaidou N., Suzuki K., Suzuki M., Taiyoji M., Ferrer S., Regue M. (1997), *Genetic Analysis of the Chitinase System of Serratia marcescens 2170*. Journal of Bacteriology, Vol. 179, No. 22, pp.7111–7117. American Society for Microbiology.
484. Webster A., May E. (2006), *Bioremediation of weathered-building stone surfaces*. TRENDS in Biotechnology, Vol. 24, No. 6, pp. 255-260.
485. Welham A. (2000), *The theory of dyeing (and the secret of life)*. J. Soc. Dyers Colour., Vol. 116, pp. 140-143.
486. Wen C.M., Tseng C.S., Cheng C.Y., Li Y.K. (2002), *Purification, characterization and cloning of a chitinase from Bacillus sp. NCTU2*. Biotechnol. Appl. Biochem., Vol. 35, pp. 213-219.
487. Wendelbo Ø., Fosse B. (1970), *Protein “surgery”. A restoring procedure applied on paper*, Restaurator, Vol. 1, No. 4, pp. 245-249.
488. Wendelbo Ø. (1970), *How enzymes work and when they can be used in paper restoration*. Restaurator, Vol. 1.
489. Wendelbo Ø. (1974), *Extraction of papyri from gesso cartonnage: A new method based on an enzymatic approach*. XVI International Congress of Papyrologists - Oxford, pp. 2337-2340.
490. Wendelbo Ø. (1974), *The use of enzymes for restoration purposes*. Archives et Bibliothèques de Belgique. Numéro Spécial, Vol. 12, pp. 235-241.
491. Wendelbo Ø. (1975), *Removal of papyrus from gesso cartonnage with some remark on separation of glued papyri*. Symbolae Osloenses, Vol. 50, pp. 156-157.
492. Wendelbo Ø. (1975), *The freeing of papyri from cartonnage*. Restaurator, Vol. 2, pp. 41-52.
493. Wendelbo Ø (1976), *General discussion and conclusions [of] the use of proteolytic enzymes in the restoration of paper and papyrus: a contribution to interdisciplinary applied research*. Division of the Faculty of Medicin of the University Library of Bergen, Norway.
494. Wendelbo Ø. (1976), *The use of proteolytic enzymes in the restoration of paper and papyrus*. University Library of Bergen, Norway.
495. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S.N. (2003), *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. Biotechnology Advances, Vol. 22, pp. 161–187.
496. Wolbers R.C. (1988), *Aspects of the examination and cleaning of two portraits by Richards and William Jennys* in “Preprints of the IIC Congress”, Lisbon, IIC. London, p.9.
497. Wong P.K., Yuen P.Y. (1996), *Decolorization and biodegradation of methyl red by Klebsiella pneumoniae RS-13*. Water. Res., Vol. 30, pp. 1736–1744.
498. Wood J. M., Jimbow K., Boissy R. E., Slominski A., Plonka P. M., Slawinski J., Wortsman J., Tosk J. (1999), *What’s the use of generating melanin?* Exp. Dermatol., Vol. 8, pp. 153-164.
499. Woolson R.F., Clarke W.R. (2002), *Statistical methods for the analysis of biomedical data*. Wiley Interscience - John Wiley & Sons Inc..
500. Wuhrmann K., Mechsner K.I., Kappeler Th. (1980), *Investigation on rate determining factors in the microbial reduction of azo dyes*. Eur. J. Appl. Microbiol., Vol. 9, pp. 325-338.

501. Xu M., Guo J., Sun G. (2007), *Biodegradation of textile azo dye by Shewanella decolorationi S12 under microaerophilic conditions*. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 76, pp. 719–726.
502. Yaroslavtsev A.M., Manucharova N.A., Stepanov A.L., Zvyagintsev D.G., Sudnitsyn I.I. (2009), *Microbial Destruction of Chitin in Soils under Different Moisture Conditions*. Eurasian Soil Science, Vol. 42, No. 7, pp. 797-806. Pleiades Publishing, Ltd., 2009.
503. Yatome C., Ogawa T., Itoh K., Sugiyama A., Idaka E. (1987), *Degradation of azo dyes by cell-free extracts from Aeromonas hydrophila var. 2413*. J. Soc. Dyers and Colourists, Vol. 3, pp. 389-395.
504. Yatome C., Ogawa T., Hishida H., Taguchi T. (1990), *Degradation of azo dyes by cell-free extracts from Pseudomonas stutzeri*. J. Soc. Dyers and Colourists, Vol. 106, pp. 280-282.
505. Young L., Yu J. (1997), *Ligninase-catalyzed decolorization of synthetic dyes*. Water Res., Vol. 31, pp. 1187–1193.
506. Youngchim S., Morris-Jones R., Hay R.J., Hamilton A.J. (2004), *Production of melanin by Aspergillus fumigatus*. Journal of Medical Microbiology, Vol. 53, pp.175–181.
507. Yu M.Y., Chang S.T. (1987), *Effects of osmotic stabilizers on the activities of mycolytic enzymes used in fungal protoplast liberation*. MIRCEN Journal, Vol. 3, pp. 161-167.
508. Yu J., Wang X., Yue P.L. (2001), *Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by Pseudomonas strains*. Wat. Res., Vol. 35, pp. 3579–3586.
509. Yunyu Y., Neufeld R.J. (2005), *Immobilization of Cells in Polysaccharide Gels*. In Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility - 2<sup>nd</sup> Edition. Dumitriu S., (ed.), Marcel Dekker Inc., NY, pp. 867-891.
510. Zhdanova N.N., Melezhik A.V., Vasilevskaya A.I. (1980), *Thermostability of some melanin-containing fungi*. Biol. Bull. Acad. Sci., Vol. 7, pp. 305–310.
511. Zhou W., Zimmermann W. (1993), *Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes*. FEMS Microbiol. Lett., Vol. 107, pp. 157-162.
512. Zimmermann T., Kulla H., Leisinger T. (1982), *Properties of purified Orange II azo reductase the enzyme initiating azo dye degradation by Pseudomonas KF46*. Eur. J. Biochem., Vol. 129, pp. 197–203.
513. Zink P., Fengel D. (1988), *Studies on the colouring matter of blue-stain fungi*. Holzforschung, Vol. 42, pp. 217-220.
514. Zink P., Fengel D. (1989), *Studies on the colouring matter of blue-stain fungi. Part 2. Electron microscopic observations of the hyphae walls*. Holzforschung, Vol. 43, pp. 371-374.
515. Zotti M., Ferroni A., Calvini P. (2007), *Inhibition properties of simple fungistatic compounds on fungi isolated from foxing spots*. Restaurator, Vol. 28, pp. 201-217, Saur, Munich – Printed in Germany.
516. Zyska B. (1997), *Fungi isolated from library materials: a review of the literature*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 40, No. 1, pp. 43–51.