

# Precipitazione bioindotta di **CALCITE** per la conservazione delle pietre monumentali

## ‘BIOREINFORCE PROJECT’

– PIERO TIANO – EMMA CANTISANI –

**U**n materiale lapideo in esposizione è soggetto ad alterazione a opera di diversi agenti dovuti a fattori fisici, chimici e biologici. Molti materiali di natura calcarea subiscono fenomeni di degrado in seguito a processi di dissoluzione della componente carbonatica, fenomeno che causa un aumento della porosità e una perdita delle caratteristiche fisico-meccaniche del materiale. Diversi prodotti sia inorganici che organici sono stati sperimentati con l'obiettivo di fermare o comunque decelerare il degrado

di un monumento (Amoroso, Fassina, 1983). Una delle principali caratteristiche di un trattamento deve essere quella di evitare l'introduzione di prodotti che potrebbero indurre cambiamenti irreversibili delle proprietà del materiale; l'uso infatti di alcuni prodotti con scarsa affinità chimica e diverso coefficiente di espansione termica, rispetto a quello della roccia trattata, può provocare ulteriori problemi di conservazione e in taluni casi addirittura accelerare il processo di degrado (Torraca, 1976).

L'uso di prodotti minerali con una composizione simile a quella delle pietre da trattare è sicuramente da preferire per il principio della compatibilità fisico-chimica. Recentemente i vecchi metodi (utilizzati fin da epoca romana), basati sull'applicazione di calce e acqua, sono stati riproposti per le malte dei dipinti murali e per alcune rocce calcaree, con lo scopo di conferire al materiale una certa idrorepellenza e un effetto consolidante (Moncrieff, Hempel, 1970; Peterson, 1981). Alcuni Autori hanno cercato di sviluppare metodi basati sulla reintroduzione di calcite nei pori ma hanno incontrato un ostacolo nella bassa solubilità del carbonato di calcio. Per raggiungere un certo grado di riempimento dei pori è necessario realizzare un irrealistico numero di applicazioni con una soluzione satura di carbonato di calcio. Altri Autori hanno cercato di utilizzare sali di calcio più solubili, quali idrossido e bicarbonato. In questo modo un numero maggiore di ioni calcio viene introdotto nei pori. L'idrossido di calcio, ad esempio, in un secondo momento è carbonatato in calcite. Nel caso del bicarbonato di calcio la soluzione gradualmente perde anidride carbonica determinando la precipitazione di calcite. Questi metodi permettono l'introduzione di un numero maggiore di ioni calcio con una singola applicazione ma comunque è sempre necessario un numero finale complessivo di applicazioni molto elevato.

Allo scopo di ridurre il numero di applicazioni è stato anche suggerito un metodo basato sulla simultanea applicazione di calcite colloidale (Price, 1984). Tuttavia, nessuno dei metodi precedentemente descritti consente di risolvere il problema relativo alla posizione dei nuovi cristalli di calcite all'interno dei pori del materiale, infatti mentre è auspicabile la cre-

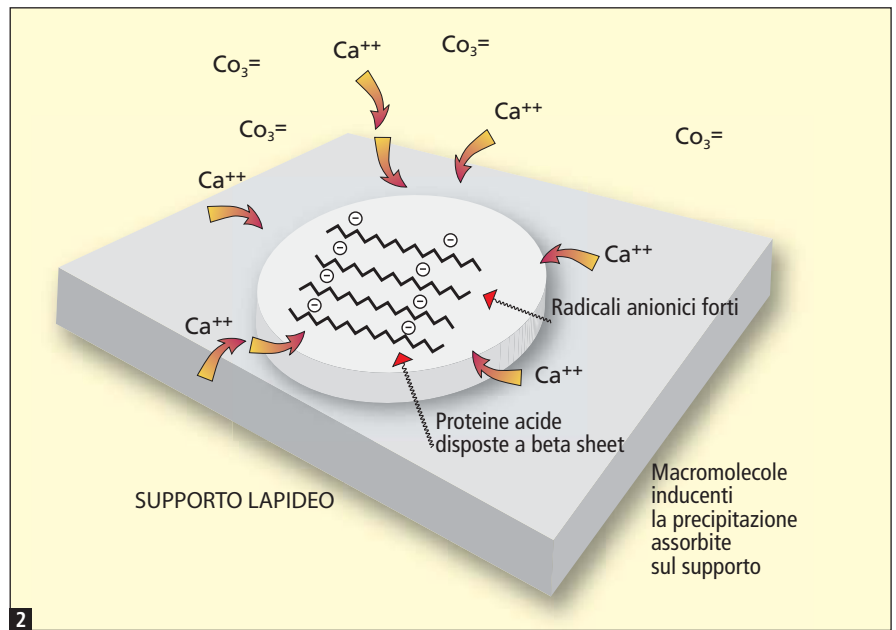
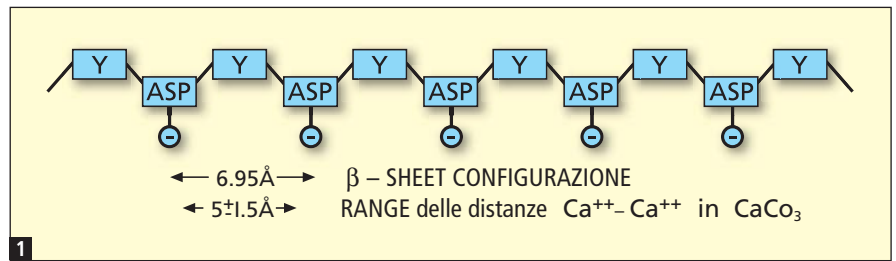
### S U M M A R Y

#### Bioinduced calcite precipitation for monumental stones conservation

Monumental stone decay is a consequence of the interaction between the material and environmental factors, such as water, heat, atmospheric pollutants and living organisms. This interaction starts at the stone's surface and progresses inward, leading to the gradual increase of stone porosity and weakening of the cohesion in mineral structures. Conservation of monuments foresees, in most cases, the application of consolidating products in order to strengthen the weathered stones and to avoid the dwindling and scaling of the material. Numerous kinds of organic and inorganic products have been used to this aim, but almost all have shown, in time, different negative results. In recent years new approaches have been attempted and tested, based on the use of bioremediation procedures in which biocontrolled, using living bacteria and biomediated, using bacterial cell fractions or organic matrix macromolecules, methodologies have been applied in order to induce, inside the stone porosity, the formation of new calcite crystals, a product very similar to the natural composition of calcareous rocks. These treatments should overcome the negative effects related both to the chemical structure and the use of solvents observed for organic products, and the very superficial formation of calcareous film, for inorganic ones. Besides, this bioinduced calcium carbonate should last for a longer period of time. In fact, due to its nature of composite material, it is less sensitive to the chemical and physical factors which remove inorganic products or degrade synthetic resins exposed to natural weathering. In this article is reported the result achieved in the work made in a EC funded project (Bioreinforce – EVK4 – CT2000-00037).

scita di grossi cristalli che creano dei ponti nei pori, la produzione di cristallini non legati alla superficie interna dei pori non da un sostanziale effetto di rinforzo al materiale. Il lavoro sperimentale qui presentato è stato sviluppato durante un progetto europeo che ha visto la partecipazione di cinque laboratori di ricerca altamente qualificati e due imprese specializzate nel restauro monumentale (tabella 1).

Il progetto nasce dalle ricerche fondamentali svolte dal gruppo israeliano nel settore della biomineralizzazione con l'isolamento delle macromolecole della matrice organica (OMM) presenti nelle conchiglie e in altri organismi viventi, che controllano in vivo i processi di formazione delle strutture calcaree. Le macromolecole di matrice organica sono ricche in aspartato e si dispongono in configurazione a  $\beta$ -sheet in cui i radicali acidi (anionici) favoriscono la cattura di cationi calcio (figura 1). Questo processo è stato studiato e ricreato in laboratorio con formazione *in vitro* di cristalli di calcite (Albeck, 1996; Addadi, Weiner, 1990; Berman, 1988) aventi le caratteristiche dei materiali compositi come quelli prodotti dagli organismi viventi. Prove di fattibilità, usando OMM estratte da conchiglie di cozza (*Mytilus californianus*), avevano messo in evidenza la nucleazione e la crescita del carbonato di calcio nei pori di materiali lapidei calcarei degradati (Tiano, 1995) secondo il meccanismo illustrato in figura 2.



**Figura 1** – Disposizione a  $\beta$ -sheet della frazione proteica solubile presente nella OMM.  
**Figura 2** – Rappresentazione schematica della precipitazione di calcite indotta dai gruppi anionici della proteina solubile adsorbita dal supporto lapideo e disposta nella conformazione  $\beta$ -sheet.

no, 1995) secondo il meccanismo illustrato in figura 2.

Data la difficoltà di estrarre le OMM in maniera standardizzata e nelle quantità necessarie a interventi di conservazione, il Progetto Bioreinforce si proponeva l'obiettivo di mettere a punto un trattamento conservativo per il materiale lapideo degradato basato sulla precipitazione bioindotta di calcite, individuando molecole sintetiche alternative e cercando di chiarire, in batteri calcificanti, il meccanismo genetico che sovrintende al fenomeno della biomineralizzazione.

## Parte sperimentale

Individuazione delle condizioni più idonee per la crescita biomedata dei cristalli di calcite nella porosità di provini di pietre calcaree.

**Selezione delle proteine.** È stato scelto un polipeptide sintetico composto di acido poliaspartico (Poly A) con 8400 (Sigma®; P-5387) come sostituto dell'OMM (estratta da *Mytilus edulis*), sebbene con efficacia minore, poiché si tratta di un prodotto commerciale, facilmente acquistabile ovunque. Inoltre sono stati provati due polipeptidi sintetizzati presso il Diparti-

mento di Chimica Organica dell'Università di Firenze con 15 e 25 aminoacidi di polyaspartato (PolyA 15, PM 1744 e PolyA 25, PM 2895).

**Modalità di introduzione delle proteine.** La profondità di penetrazione delle macromolecole organiche nei pori di un materiale poroso è stata valutata utilizzando una soluzione acquosa 0,025 M di Alizarina. La colorazione è stata realizzata su campioni di marmo poroso sia immergendoli in un recipiente contenente la soluzione colorante sia spruzzandoli con uno spray a base della stessa soluzione colorante. Con la tecnica spray è stata misurata una penetrazione di 8 mm, mentre con l'immersione è stata misurata una penetrazione di 2,5 mm.

**Metodi per la produzione di carbonato di calcio.** Per completare il meccanismo di bioinduzione è necessario fornire alle macromolecole sia ioni calcio che carbonato:

■ per le prove di laboratorio in ambiente confinato chiuso viene preparata una soluzione di 7,5 mM di cloruro di calcio e posta in un'atmosfera di ammoniaca e anidride carbonica ottenuti dalla decomposizione del carbonato di ammonio. Il pH della soluzione di-

### TABELLA 1

#### Progetto Bioreinforce – Biomediated Calcite Precipitation for Monumental Stones Reinforcement (EVK4 –2000-00037).

**Coordinatore:** Piero Tiano, CNR – Istituto per la Conservazione e la Valorizzazione del Patrimonio Culturale (Firenze, I).

**Laboratori:** Lia Addadi, Dept. of Structural Biology, the Weizmann Institute of Science (Rehovot, Isr); J. Tan Sutherland, Dept. of Chemistry, Loughborough University (Loughborough, UK), Giorgio Mastromei, Dept. of Animal Biology and Genetic, Florence University (Firenze, I), Marius Vendrell, Dept. of Crystallography and Mineralogy, Barcelona University (Barcelona, E).

**Imprese:** Trivella S.p.a. (Milano, I); Quélin SA (Rueil-Malmaison, F).

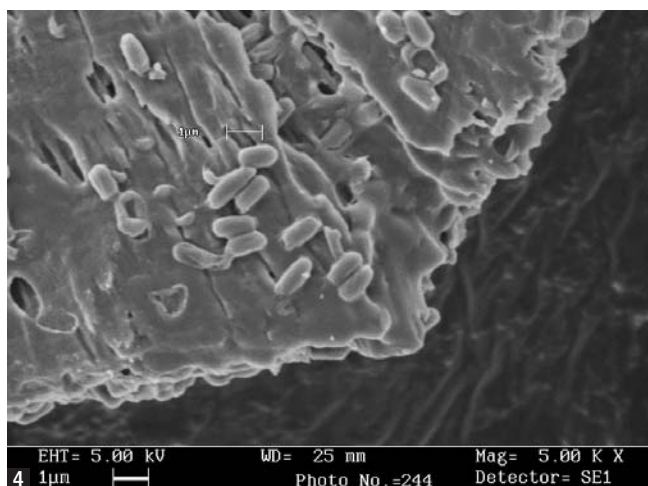
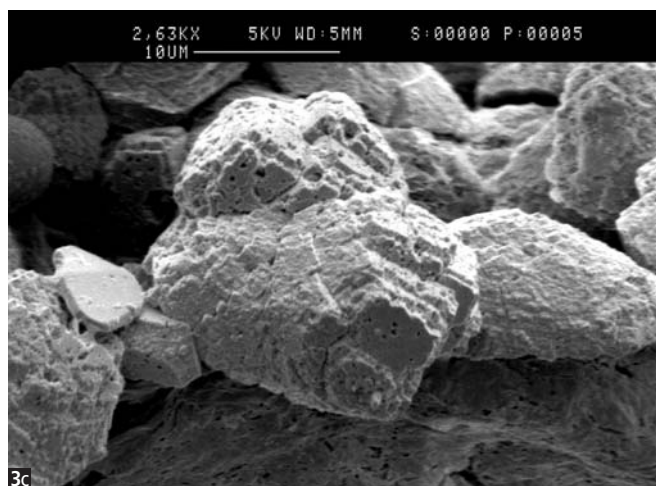
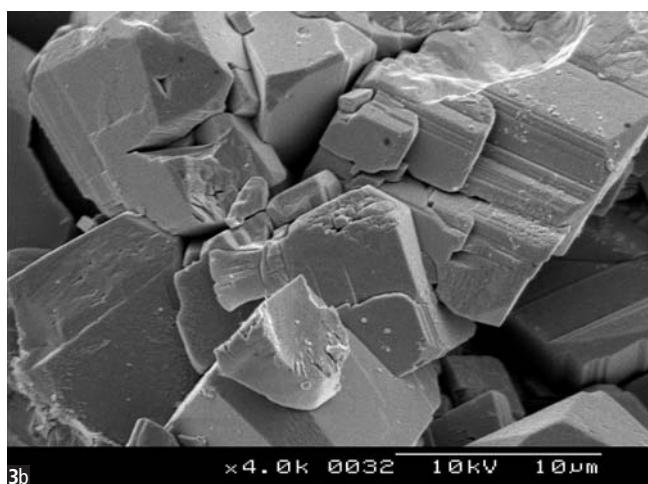
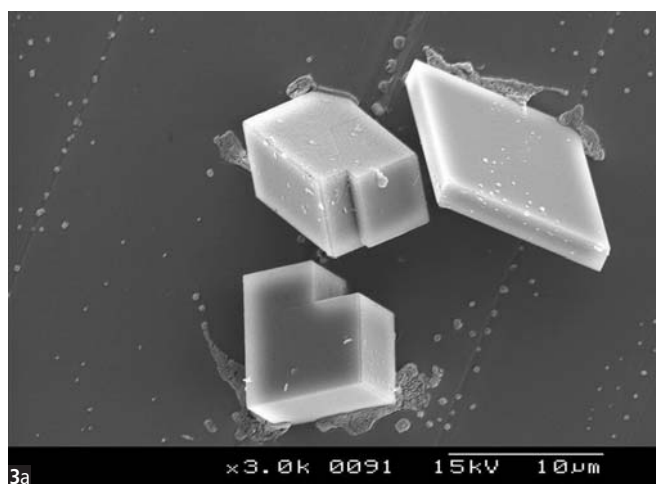


Figura 3 –Cristalli di calcite formati nella soluzione di riferimento  $\text{CaCl}_2=7,5\text{mM}$  dopo 6h (a); cristalli di Calcite e Vaterite formati nella soluzione bionducente  $\text{OMM}=20\text{mg/l}$  in  $\text{CaCl}_2=7,5\text{m}$  (b) e cristalli di Vaterite formati nella soluzione bionducente  $\text{PolyAsp}=30\text{mg/l}$  in  $\text{CaCl}_2=7,5\text{mM}$  (c).

IMMAGINI ESEGUITE AL SEM DA M. VENDRELL (DEPT. OF CRYSTALLOGRAPHY AND MINERALOGY, UNIVERSITY OF BARCELONA, SPAIN).

Figura 4 – Cellule di *Bacillus subtilis* sulla superficie di un cristallo di calcite di neoformazione.

venta alcalino e la reazione dell’anidride carbonica con il cloruro di calcio determina la formazione di cristalli di carbonato di calcio;

■ per le prove in ambiente esterno viene usata una soluzione di bicarbonato di calcio super saturo: questa soluzione è preparata gorgogliando anidride carbonica attraverso una sospensione di carbonato di calcio per un’ora a una velocità di 3 l/min. Il solido rimanente è rimosso per filtrazione. L’anidride carbonica passa, quindi, attraverso la soluzione filtrata alla stessa velocità per la successiva mezz’ora. Il bicarbonato è più solubile del carbonato e produce una soluzione supersatura di carbonato di calcio.

**Mantenimento delle condizioni di supersaturazione:** un modo per fornire ulteriori ioni calcio è quello di introdurre nella soluzione delle nanoparticelle (20 nm) di calcite (Socal®, Solvay). Infatti, le particelle più piccole sono più solubili di quelle più grosse e riescono a mantenere la supersaturazione nei pori (Sheng, 1994).

## Diagenesi dei cristalli di calcite

Mediante tecniche di XRD è stata seguita l’evoluzione della formazione dei nuovi cristalli di calcite nelle soluzioni bionducenti. Due fasi cristalline calcite e vaterite si formano con incremento della fase vaterite con il tempo. L’osservazione al SEM ha messo in evidenza la produzione di larghi cristalli nella prima ora con formazione di aggregati nelle prime 6 ore con diametro medio di 10 mm nelle soluzioni di PolyA e di 23 mm in quelle di OMM (figura 3). Per quanto riguarda la morfologia dei cristalli nella soluzione di riferimento (non inducente) sono presenti quasi esclusivamente cristalli romboedrici associati a calcite. Nelle soluzioni inducenti (OMM e PolyA) appaiono cristalli romboedrici (calcite) e globulari (vaterite); i cristalli e le sfere hanno un comportamento anisotropico in luce polarizzata (nicol incrociati) confermando la loro natura cristallina come emerso dagli spettri XRD. È noto che la vaterite è una fase instabile che appare all’inizio della

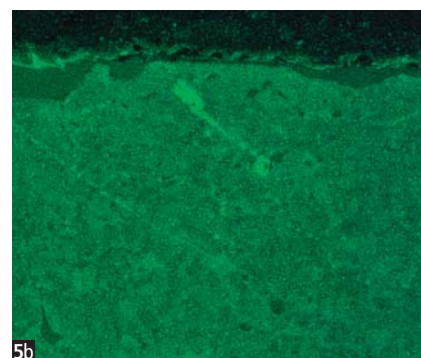
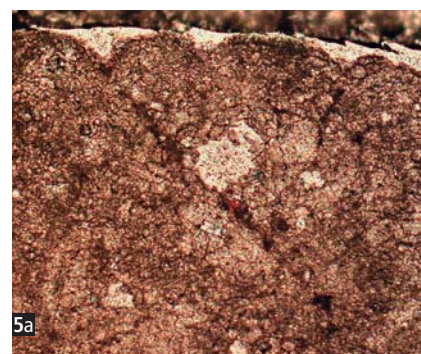


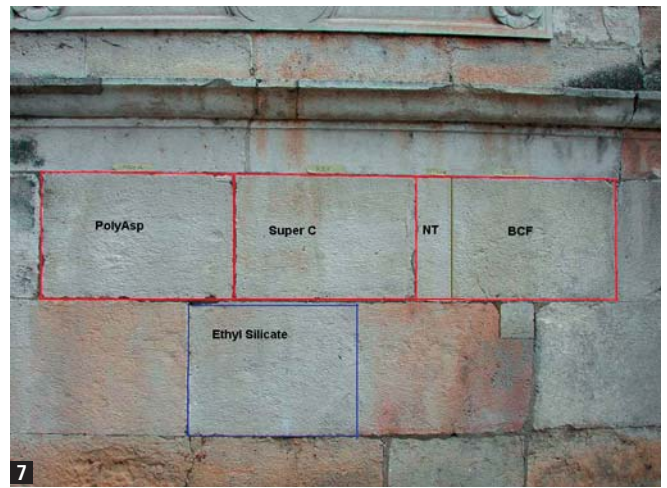
Figura 5 – Pietra d’Angera trattata a spray con Poly A colorata, Alizarina Red S, MO 20x (a) e con Poly A e calceina, MO luce UV, 40 x (b).



Figura 6 – Facciata della chiesa di Santa Maria ad Angera.

Figura 7 – Chiesa di Santa Maria: zone selezionate per l'applicazione dei diversi prodotti.

Figura 8 – Chiesa di Santa Maria: applicazione spray della soluzione bioinducente a base di BCF.



crystallization of calcium carbonate and is often associated with the presence of organic substance: bioinducers seem to stabilize vaterite and prolong their residence time.

**Ricerca della sequenza genetica e delle frazioni attive dei batteri calcinogenici.** A part of the work carried out in this project has been more strictly biological and has concerned the characterization of mutant bacterial calcinogenic (figura 4) for the precipitation of calcium carbonate and in particular the identification of the cellular fraction capable of inducing, as potential nucleus of crystallization, the biomineralization. At the same time a characterization of the mutant bacterial calcinogenic for the precipitation of calcium carbonate.

All the experiments were carried out on *Bacillus subtilis*. Preliminary results have shown the importance of the role of the cell wall; during the project work was done to standardize the procedure and obtain the active fraction (BCF) in laboratory conditions, on a small scale.

The standardized procedure consists of the following phases:

- the cells of *Bacillus subtilis* are grown in a calcium-rich medium and collected, by centrifugation, during the exponential growth phase. The number of cells obtained is about 1 g per liter of culture;
- the destruction of the cells occurs by freezing and subsequent treatment with alumina in a mortar for mechanical disaggregation. The quantities of alumina used per gram of cells and the treatment time are standardized. The suspension is then centrifuged at low speed to eliminate the non-viable cells;
- the resulting suspension is centrifuged at 10,000 rpm to separate two fractions: the supernatant containing the cytosol and the active BCF fraction containing the cell wall and the membrane.

The reported conditions allow to obtain a mean value of the BCF/cells ratio of 10%.

To increase the quantity, a lyophilization procedure of the BCF was tested at different temperatures to verify

its capacity to maintain calcinogenic activity. It was verified that the calcinogenic activity of BCF is generally stable under different temperatures and for a long period of time.

The cellular fraction of *Bacillus subtilis* (BCF) containing the cell walls is capable of inducing the precipitation of calcium carbonate; BCF can be in lyophilized form, maintaining for a long time its calcinogenic activity. This allows a more easy application outdoors.

## Prove di laboratorio

The new bioinducer treatment (BIT) was tested in laboratory on two different types of stones:

- Marmo Gioia: pure calcareous marble, average granulometry 150-200µ, polyhedral microstructure, total porosity 1%;
- Pietra di Lecce: calcareous bioclastic material composed mainly of foraminifera in a calcareous microsparitic matrix with 35% porosity;
- Pietra di Angera: bioclastic rock composed of dolomite, with 18% porosity.

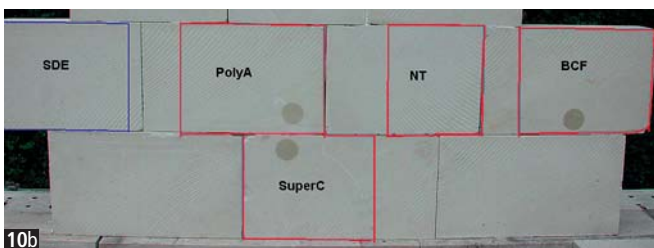
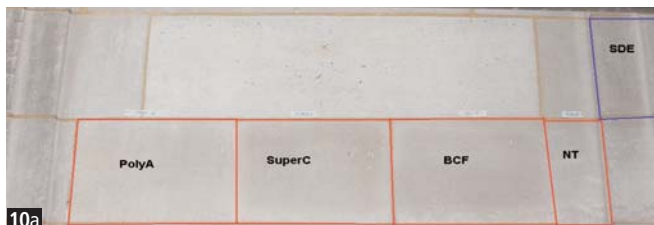


Figura 9 – Il Castello di Champs sur Marne.  
Figura 10 – Castello di Champs: zone selezionate per l'applicazione dei diversi prodotti sulla parete nord-ovest in Pietra di Meri (a) e sulla parete artificiale in blocchi di Tuffeau, esposizione nord (b).

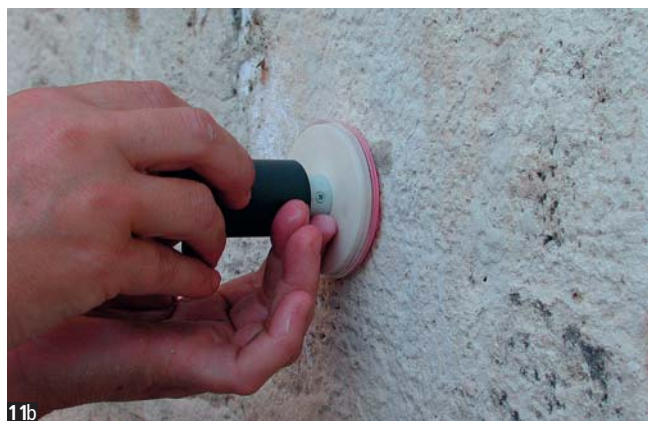


Figura 11 – Chiesa di Santa Maria, determinazione delle coordinate cromatiche prima dei trattamenti bioinducenti (a) e determinazione dell'assorbimento di acqua prima dei trattamenti bioinducenti (b).

Sono state utilizzate le seguenti sostanze:

- OMM (20 mg/l): macromolecole di matrice organica (estratte dalle conchiglie di *Mytilus edulis* dal Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israele);
- PolyA S (20 e 40 mg/l): Polyaspartic acid sodium saltz (Sigma P 5387 – mw 5.000-15.000);
- PolyA 15 (20 mg/l): Polyaspartic acid 15 AA (sintetizzato presso l'Università di Firenze – mw 1744);
- PolyA 25 (20 mg/l): Polyaspartic acid 25 AA (Università di Firenze – mw 2895);
- REF: soluzione CaCl<sub>2</sub> 7,5 mM, usata per dissolvere i polipeptidi e per le applicazioni per capillarità;
- Super C: soluzione supersatura di bicarbonato di calcio aggiunta di nanoparticelle di calcite, utilizzata per l'applicazione con spray;
- BCFp: *Bacillus subtilis*, sospensione autoclavata 10<sup>6</sup> cells/ml (positivo);
- BCFn: *Escherichia Coli*, sospensione autoclavata 10<sup>6</sup> cells/ml (negativo).

Il Marmo Gioia e la Pietra di Lecce sono stati trattati per assorbimento capillare, in ambiente chiuso per 3 giorni; la Pie-

tra d'Angera, utilizzata per simulare l'ambiente esterno, è stata trattata a spruzzo in laboratorio a intervalli regolari, sempre per 3 giorni.

- L'efficacia dei trattamenti è stata valutata con la misura dei seguenti parametri:
- coesione;
  - assorbimento d'acqua;
  - colore;
  - sviluppo di nuovi cristalli di calcite.

### Risultati

La coesione della pietra è stata determinata sia in profondità che in superficie. Il profilo di coesione fino a 10 mm di profondità è stato valutato con il DFMS – Drilling Force Measuring System (Tiano, 2001). La resistenza superficiale è stata valutata con il Rockwell Indenter (Galileo DG 201) utilizzando carichi diversi e con il Peeling tape test<sup>1</sup>.

La determinazione della quantità d'acqua assorbita è stata effettuata con le prove di assorbimento capillare (AAVV, 1986) per il Marmo Gioia e per la Pietra di Lecce e con il metodo della spugna di contatto per la Pietra d'Angera (Tiano e Pardini, 2004).

Il colore delle aree trattate è stato de-

terminato mediante misura delle coordinate cromatiche, utilizzando un colorimetro Minolta con una sorgente luminosa di tipo C (CIElab, 1976). Le variazioni cromatiche indotte dal trattamento sono state determinate calcolando il valore  $\Delta E [(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}]$ .

La formazione di nuovi cristalli di calcite è stata valutata solo sulla Pietra d'Angera, grazie alla sua composizione dolomitica. Applicando una soluzione di Alizarina Red S su una sezione sottile abbiamo messo in evidenza (colorazione rossa) la calcite neo formata, in contrasto con la porzione dolomitica il cui colore è rimasto invariato.

Un altro sistema utilizzato per testare la presenza di calcite all'interno dei campioni è stato quello di aggiungere alle soluzioni bioinducenti piccole concentrazioni di calceina. Osservando le sezioni sottili in luce ultravioletta, vengono evidenziati i cristalli di calcite neoformata in quanto al loro interno rimane inglobata la calceina fluorescente.

I dati relativi alla resistenza superficiale non rivelano grosse differenze tra i vari tipi di polipeptidi usati, una piccola differenza si nota (rispetto al REF) per i cam-

pioni di Pietra d'Angera trattati con Poly AS 20. Per quanto riguarda il peeling test effettuato sui campioni di marmo, se si confronta un campione trattato con uno non trattato è chiaro l'effetto rinforzante del trattamento, mentre appare difficile un confronto tra i diversi tipi di trattamento. Il drilling non è così sensibile per discernere piccole differenze tra i vari tipi di trattamento; infatti confrontando i valori medi non è possibile differenziare la variazione di coesione per ogni profilo, mentre è possibile ottenere conferme nel confronto effettuato rispetto a ogni singolo profilo di coesione, in particolare questo è evidente per il Poly AS 20.

Per quanto riguarda l'assorbimento d'acqua per il Marmo Gioia e la Pietra di Lecce non sono state misurate significative variazioni; risultati positivi sono stati ottenuti nella valutazione dell'assorbimento d'acqua della Pietra d'Angera realizzata con il metodo della spugnetta per i trattamenti con PolyA 20 e BCF. I cambiamenti di colore prima e dopo il trattamento sono trascurabili poiché sono stati calcolati valori di  $\Delta E$  inferiori a 3 (3 è il limite di detenzione dei cambiamenti da parete dell'occhio umano). Le osservazioni al microscopio ottico di sezioni sottili di Angera colorate con Alizarina red trattate con PolyA S 20 e BCF hanno evidenziato la presenza di cristalli di calcite sviluppatasi fino alla profon-

dità di qualche millimetro. Questo dato è stato confermato dall'osservazione dello stesso punto in fluorescenza (figura 5).

## Prove in esterno

Dopo la messa a punto della tecnica in laboratorio il metodo è stato testato in esterno su una piccola porzione della Cattedrale di Angera, costruita con la Pietra d'Angera su cui sono state condotte le stesse sperimentazioni in laboratorio (figure 6-8). Il trattamento è stato inoltre confrontato con un prodotto usato molto spesso nel campo del restauro monumentale, il silicato d'etile, anche se questo ha caratteristiche chimiche e modalità di applicazione assai diverse. Analoghi trattamenti sono stati realizzati in Francia, presso il Castello di Champs (figura 9), sulla facciata nord costruita in Pietra di Meri e su un muro artificiale in blocchi di Tuffeau (figura 10). In esterno sono stati effettuati i trattamenti evidenziati in tabella 2. La valutazione *in situ* dell'efficacia dei trattamenti con le soluzioni bioinducenti è stata realizzata attraverso la determinazione di:

- variazione del colore della superficie (coordinate tricromatiche);
- quantità di acqua assorbita (metodo della spugnetta);
- profilo di coesione (resistenza alla foratura);

- calcite neoformata (sezione sottile colorata con alizarina e calceina per i campioni di Pietra d'Angera, osservazione al microscopio elettronico a scansione per Meri e Tuffeau).

## Risultati

La capacità di assorbimento d'acqua dei tre diversi litotipi diminuisce sensibilmente nel caso del trattamento con il silicato d'etile, si può infatti osservare una diminuzione del 77% per Meri, del 90% per Tuffeau, del 60% per la Pietra d'Angera. Nel caso delle pietre di Meri e Tuffeau solo il trattamento con il BCF ha prodotto una diminuzione della capacità di assorbimento d'acqua, pari al 67% per Tuffeau e al 15% per Meri. La Pietra d'Angera ha subito una diminuzione della capacità di assorbimento d'acqua per i conci trattati con PolyA (figura 12). Molto probabilmente le grandi differenze registrate nel caso dei trattamenti con il silicato d'etile sono da attribuire alle caratteristiche d'idrorepellenza del prodotto, mentre la riduzione nel caso dei conci trattati con BIM può essere attribuita alla diminuzione della porosità della pietra dovuta dalla precipitazione indotta di nuovi cristalli di calcite.

Per quanto riguarda l'influenza del tipo di trattamento sul colore delle pietre, i maggiori cambiamenti sono stati registrati nei conci di Pietra d'Angera trattata con il silicato d'etile, in effetti la pietra trattata con questo prodotto diventa più scura, con la soluzione BIM è diventata leggermente più chiara, forse a causa della presenza di un residuo di nanoparticelle di cal-

Figura 12 – Valutazione della quantità d'acqua assorbita ( $WU=g/cm^2/min$ ) con il metodo della spugna di contatto.

Figura 13 – Valutazione dei cambiamenti di colore ( $\Delta E^*$ ) rispetto al REF Super C.

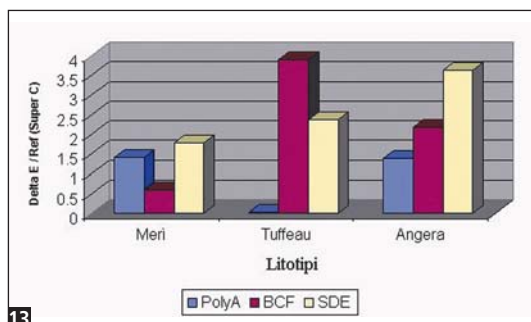
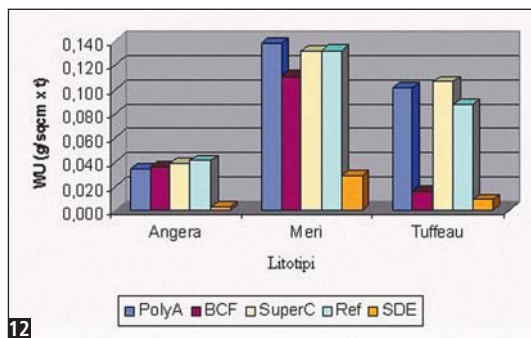


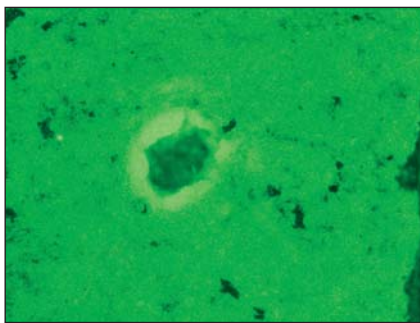
TABELLA 2

### Trattamenti effettuati nelle prove in esterno.

PRODOTTO	LITOTIPO	CONCENTRAZIONE	SUPERFICIE TRATTATA	APPLICAZIONI TOTALI
PolyA	Angera	1 g/l	0,3 m <sup>2</sup>	1 l/m <sup>2</sup>
	Meri	0,07 g/l	0,4 m <sup>2</sup>	1,5 l/m <sup>2</sup>
	Tuffeau	0,07 g/l	0,4 m <sup>2</sup>	2 l/m <sup>2</sup>
REF Super C*	Angera	–	0,3 m <sup>2</sup>	1 l/m <sup>2</sup>
	Meri	–	0,3 m <sup>2</sup>	1,5 l/m <sup>2</sup>
	Tuffeau	–	0,3 m <sup>2</sup>	2 l/m <sup>2</sup>
BCF	Angera	8,5 g/l	0,3 m <sup>2</sup>	1 l/m <sup>2</sup>
	Meri	4,5 g/l	0,4 m <sup>2</sup>	1,5 l/m <sup>2</sup>
	Tuffeau	4,5 g/l	0,4 m <sup>2</sup>	2 l/m <sup>2</sup>
SDE (Silicato di Etile)	Angera	75 %	0,3 m <sup>2</sup>	3 l/m <sup>2</sup>
	Meri	75 %	0,4 m <sup>2</sup>	5 l/m <sup>2</sup>
	Tuffeau	75 %	0,4 m <sup>2</sup>	5 l/m <sup>2</sup>
Blank**	Angera	–	0,3 m <sup>2</sup>	Non trattato
	Meri	–	0,3 m <sup>2</sup>	Non trattato
	Tuffeau	–	0,3 m <sup>2</sup>	Non trattato

\* REF Super C è stato addizionato con nanoparticelle di CaCO<sub>3</sub> (20 nm) 2%.

\*\*Blank è rappresentato da acqua distillata.



**Figura 14** - Sezione sottile di Pietra d'Angera trattata con Poly A (100x). L'area circolare, fluorescente a causa dell'aggiunta di calceina, è localizzata all'interno di un poro posto a circa 2 mm dalla superficie esterna (a destra).

cite. Per le pietre Merì e Tuffeau è stata osservata una leggera variazione in tutti i tipi di trattamento con un generale inscurimento molto probabilmente dovuto alla presenza di un elevato tasso di umidità all'interno dei conci, dovuto al prolungato periodo di pioggia durante le fasi delle misure. Confrontando i dati con quelli delle zone di riferimento si può osservare un significativo cambiamento per la Pietra Merì trattata con il silicato d'etile e per il Tuffeau trattato con il BCF (figura 13).

Per quanto riguarda la valutazione dell'effetto rinforzante indotto dai trattamenti (coesione), nel caso della Pietra d'Angera una sensibile azione di rinforzo è stata osservata per i conci trattati con il silicato d'etile (circa 30%). Questo tipo di trattamento induce un netto aumento fino a 15 N, dopo questo si registrano valori costanti, tra 5 e 7,5 N fino a 10 mm di profondità. Questo aumento è più significativo (circa 20 N) nella Pietra Merì ma per una minore profondità (circa 2,5 mm) mentre è più basso ma più profondo per il Tuffeau. Nel caso dei trattamenti BIM è stato osservato un effetto rafforzante (15%) nel profilo di coesione per i conci di Pietra d'Angera trattati con PolyA 40, ma con una bassa profondità di penetrazione (1-2 mm -). Considerando l'alta porosità delle pietre Merì e Tuffeau, il trattamento effettuato ha indotto un basso potere di rinforzo (circa 2,5 N) con una piccola profondità di penetrazione (circa 2,5 mm) sia per BCF che per PolyA.

L'osservazione in luce fluorescente (figura 14) e la colorazione con Alizarina red S di sezioni sottili, ricavate da carote prelevate nelle varie zone sottoposte ai diversi trattamenti della facciata della chiesa di Santa Maria in Angera, ha permesso di osservare la presenza di numerosi cristalli di calcite di neo formazione. Questi risultati, una volta confrontati con l'osservazione del quantitativo di calcite presente nel

REF (circa 8%), hanno permesso di discernere la quantità di calcite dovuta alla presenza di nanoparticelle residue rispetto a quelle neo formate. La presenza di nuovi cristalli di calcite nei conci delle pietre Merì e Tuffeau è stata verificata mediante osservazioni al microscopio elettronico a scansione. È stato osservato che molti cristalli si sviluppano in superficie ma con scarsa connessione con i minerali della roccia, in questo caso è difficile affermare che questi rappresentino un reale rinforzo per la pietra.

## Conclusioni

Il metodo testato basato sulla precipitazione mediata di calcite fornisce un nuovo approccio per il consolidamento superficiale e la conservazione delle pietre calcaree. Non introducendo nei pori materiale 'estraneo' i problemi relativi alle differenti proprietà chimico-fisiche del materiale sono superate, il prodotto finale è infatti della stessa natura e composizione della pietra trattata. La metodologia impiegata consente di lavorare con piccolissime concentrazioni di materiale bioinducibile capaci d'iniziare il processo di cristallizzazione. Il meccanismo di azione e le quantità applicate sono completamente differenti dal trattamento eseguito con il silicato d'etile.

Il risultato raggiunto con l'attività svolta all'interno del Progetto Bioreinforce ha confermato le ipotesi di partenza: sostituiti alternativi delle Macromolecole della Matrice Organica (OMM), quali il polyaspartato (PolyA) e frazioni selezionate della cellula batterica (BCF), sono capaci d'indurre la precipitazione di nuova calcite all'interno della porosità delle pietre. Questo tipo di trattamento bioinducibile (BIT) può trovare applicazione come trattamento di manutenzione preventiva di opere, in materiale calcareo, di alto valore storico e artistico per le quali sia auspicabile un intervento di minimo impatto per il mantenimento della coesione superficiale nell'ottica di una manutenzione programmata. ■

## nota

<sup>1</sup> Strisce di 3x1 cm di adesivo vengono leggermente appoggiate sulla superficie del campione e subito rimosse. La misura viene effettuata pesando la striscia adesiva prima e dopo il contatto con il materiale al fine di valutare il quantitativo di materiale asportato.

## BIBLIOGRAFIA

- NorMal 11/85:** *Capacità di assorbimento d'acqua per capillarità. Coefficiente di assorbimento capillare*, UNI, 1986.
- Addadi L, Weiner S:** *Stereochemical and Structural Relations between Macromolecules and Crystals in Biomineralization chemical and biochemical perspectives*, S. Mann, J. Webb, R.J.P. Williams Eds., VCH, FRG, 1990; 133-156.
- Albeck S, Weiner S, Addadi L:** *Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth in vitro*. In: *Chemistry European J.*, 2, 1996; 278-284.
- Amoroso GG, Fassina V:** *Stone decay and conservation*. In: *Material Science Monographs*, 11, ed. Elsevier, Amsterdam, 1983.
- Berman A, Addadi L, Weiner S:** *Interaction of sea-urchin skeleton macromolecule with growing calcite crystals. a study of intracrystalline proteins*. In: *Nature*, 331, 6156, 1988; 546-548.
- CIE - Commission Internationale de l'Eclairage:** *Colorimetry*, Publication N.15, 2nd ed., 1976.
- Moncrieff A, Hempel K:** *Work on the degeneration of sculptural stone. Conservation of stone and wooden objects*, New York Conference, 2nd Ed., ICC, Ed., London, vol. 1, 1970; 103-114.
- Peterson S:** *Lime water consolidation*. In (atti del convegno): *Mortar, Cements and Grouts used in the Conservation of Historic Buildings Symposium*, Rome, ICCROM Ed., 1981; 53-61.
- Price CA:** *The consolidation of limestone using a lime poultice and limewater*. In (atti del convegno): *Adhesives and Consolidants*, Paris, ICC Ed., London, 1984; 160-162.
- Sheng E, Sutherland I:** *A quantitative XPS study of spherical particles coated with an overlayer*. In: *Surface Science*, 314, 1994; 325-330.
- Tiano P:** *Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules*. In: *Studies in Conservation*, 40, 1995; 171-176.
- Tiano P:** *Una nuova metodologia per la valutazione "in situ" dei trattamenti consolidanti delle pietre monumentali - DFMS*. In: *Arkos*, 2, 2001, Utet PS, 2001; 42-49.
- Tiano P, Pardini C:** *Valutazione in situ dei trattamenti protettivi per il materiale lapideo. Proposta di una nuova semplice metodologia*. In: *Arkos*, 5, 2004; 30-36.
- Torraca G:** *Treatment of stone monuments a review of principles and processes*, in: *The conservation of stone*, ed. R. Rossi Manaresi, Bologna, 1976; 297-315.

## PROFILO AUTORI

**Piero Tiano**, è laureato in Scienze Biologiche; dipendente del CNR nell'Istituto per la Conservazione e la Valorizzazione dei Beni Culturali (ICVBC) di Firenze. Principali linee di ricerca: *biologia applicata alla conservazione del patrimonio culturale e sviluppo di nuovi metodi e strumenti per la valutazione dei trattamenti conservativi delle opere monumentali*.

**Emma Cantisani**, è laureata in Scienze Geologiche; dal 1999 collabora con il CNR-ICVBC con la qualifica di *Assegnista di Ricerca*. Principali linee di ricerca: *problematiche geologiche nella conservazione del patrimonio culturale, ricerche archeometriche, studio microstrutturale dei materiali lapidei mediante analisi dell'immagine*.