

I BIOFITOFARMACI NEL RISANAMENTO DEI BENI CULTURALI

L. SCRANO

Dipartimento di Scienze dei Sistemi Culturali, Forestali e dell'Ambiente
Università della Basilicata, Via dell'Ateneo lucano 10, 85100, Potenza
laura.scrano@unibas.it

RIASSUNTO

Con il termine lotta biologica si definisce, nella difesa fitosanitaria, l'uso di agenti biotici (virus, batteri, funghi, piante superiori, protozoi, nematodi, acari, insetti, etc.) per contenere le popolazioni di organismi potenzialmente dannosi al di sotto di soglie di dannosità economica. I biofitofarmaci, quei prodotti fitosanitari i cui principi attivi sono costituiti da microrganismi viventi, a differenza dei prodotti tradizionali di sintesi, possiedono una specificità di azione contro il patogeno: per questo motivo hanno un impatto sugli organismi non target limitato e non inducono resistenza sugli organismi target. Una applicazione particolare dei biofitofarmaci è il biorisanamento di manufatti lapidei: infatti grazie ai processi "virtuosi" biogeochimici e di risanamento messi in atto dai microrganismi, riproducendo in condizioni ottimali e controllate gli stessi processi biologici che essi compiono in natura, si possono ottenere dei discreti risultati di biorisanamento ecocompatibile efficace e duraturo. Al momento, i risultati ottenuti non sono applicabili su qualsiasi materiale lapideo.

Parole chiave: lotta biologica, biofitofarmaci, beni culturali

SUMMARY

BIOPESTICIDES FOR REMEDIATION OF CULTURAL HERITAGE

Biological control is defined as the reduction of pest populations by natural enemies (virus, bacteria, fungi, etc.). Biopesticides are products containing natural organisms and are viewed as an attractive alternative to chemical pesticides because they attack specific pest targets. An important application of biopesticides is the bioremediation of cultural heritage: in optimized and controlled conditions, it is possible to obtain effective, durable and eco-compatible bioremediation, like the biological processes that occur in the environment. At the moment, many applications should be still explored.

Keywords: biological control, biopesticides, cultural heritage

INTRODUZIONE

Con il termine lotta biologica si definisce, nella difesa fitosanitaria, l'uso di agenti biotici (virus, batteri, funghi, piante superiori, protozoi, nematodi, acari, insetti, etc.) per contenere le popolazioni di organismi potenzialmente dannosi al di sotto di soglie di dannosità economica.

Gli interventi di lotta biologica si dividono in:

- a. Propagativi, ossia contenimento di un organismo nocivo, mediante l'introduzione artata di fattori biotici,
- b. Inondativi, cioè distribuzione in massa di agenti biotici di controllo allo scopo di realizzare un rapido decremento della popolazione dell'organismo dannoso,
- c. Protettivi, ossia protezione e potenziamento dell'azione svolta dai nemici naturali presenti negli agro ecosistemi.

Quest'ultimo appare essere, dal punto di vista ecologico, quello più corretto per la gestione e il controllo dei fitopatogeni. Infatti, si cerca di rendere l'agroecosistema più simile, in termini di biodiversità, ad un ecosistema naturale, in modo che in esso alberghino stabilmente gli

organismi antagonisti dei patogeni. L'aumento della biodiversità avvicina il sistema ad un equilibrio meno fragile, perché aumentano resistenza e resilienza (Odum,1983).

Il concetto di malattia può essere espresso come l' interazione tra tre fattori:

- patogeno,
- ospite suscettibile,
- ambiente.

Questo concetto può essere ben rappresentato da un triangolo ai cui vertici siano collocati i tre fattori. Alcuni autori aggiungono come quarto fattore i microrganismi antagonisti, mentre per altri il quarto fattore sarebbe rappresentato dal tempo in quanto gli antagonisti sarebbero parte integrante dell'ambiente (Matta A., 1996) (figura 1)

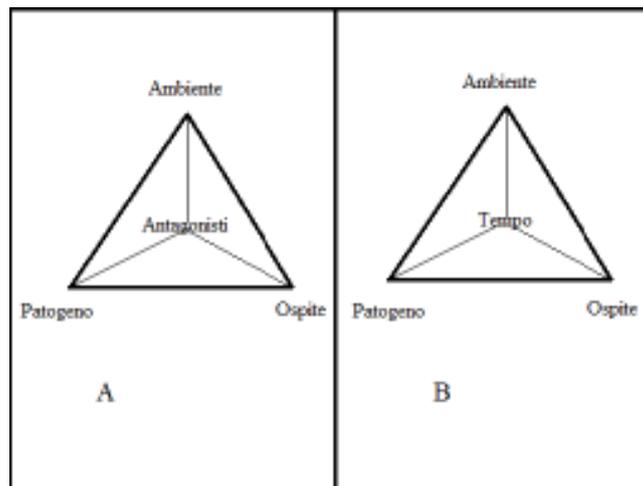


Figura 1. Tetraedro idealmente rappresentante il concetto di malattia in cui il quarto fattore è rappresentato dagli antagonisti (A) o dal fattore tempo (B) [Matta 1996]

Per molto tempo la difesa dai patogeni si è basata sull'uso di prodotti chimici di sintesi che, pur possedendo immediatezza e ampio spettro d'azione, facilità di preparazione ed applicazione, ha prodotto effetti collaterali negativi quali inquinamento ambientale, rottura degli equilibri ecologici, sviluppo di specie resistenti e danni alla salute umana. Attualmente l'orientamento europeo e mondiale è volto all'utilizzo di sostanze naturali a basso impatto: i biofitofarmaci ossia quei prodotti fitosanitari i cui principi attivi sono costituiti da organismi viventi. Come è facile intuire, uno dei maggiori punti di forza di questi prodotti è la sicurezza ambientale.

Nel biofitofarmaco, il principio attivo è un organismo vivente (batteri, funghi, virus, protozoi, parassitoidi ecc.) e/o tossine o enzimi; gli organismi che costituiscono il principio attivo possiedono una specificità di azione contro il patogeno, hanno un impatto limitato sugli organismi non target e non inducono resistenza sugli organismi target (Franklin *et al.*,1999).

Queste sostanze, però, mostrano un ridotto spettro d'azione rispetto ai prodotti di sintesi: l'impiego dei biofitofarmaci è possibile quando la pressione della malattia non è ancora troppo elevata, altrimenti l'organismo è incapace di contenere la popolazione target poiché ha bisogno di tempo per svilupparsi ed agire nel contenimento della popolazione infestante.

Un altro svantaggio proprio dei biofitofarmaci riguarda la durata (shelf-life =sopravvivenza del 50% dei propaguli) e le condizioni di conservazione. La shelf life dei biofitofarmaci non può essere inferiore ai 18 mesi, mentre l'ideale sarebbe di 2 - 4 anni. Temperatura e umidità sono anche fattori importanti, tanto nella fase di produzione che in quella di conservazione.

Benchè quanto descritto non ne faciliti la diffusione, l'impiego di microrganismi antagonisti in programmi di lotta integrata e/o biologica alle malattie è da tempo esplorato come possibile alternativa ai presidi fitosanitari. Inoltre, con la riforma europea della legislazione in materia di prodotti fitosanitari e la conseguente esclusione dal mercato di molte molecole di sintesi, si sono aperte nuove prospettive, sia per chi sviluppa e vuole vendere tali prodotti di origine naturale sia per le imprese agricole che si trovano a poter disporre di nuovi mezzi per la lotta fitopatologica per di più a basso impatto ambientale.

L'uso di "biofitofarmaci" rientra nella più ampia, e ormai classica, definizione di lotta biologica che Cook e Baker nel 1983 descrissero come "Riduzione degli effetti indesiderabili di un organismo attraverso l'azione di un altro organismo che non sia l'ospite o l'uomo".

Predazione, Parassitismo, Competizione, Antibiosi, Induzione di resistenza sono i meccanismi messi in atto dagli organismi utilizzati.

Molto importante è l'*antibiosi*, cioè la produzione di un metabolita diffusibile, prodotto da un microrganismo che riesce ad inibire il normale sviluppo di un altro microrganismo a concentrazioni pari a 100 µg ml⁻¹ o inferiori. L'antibiotico è un composto altamente attivo con bersagli cellulari specifici (Deacon, 2006) che è prodotto dall'antagonista per difendersi e per mantenere il possesso di un substrato nutritivo relativamente ricco. Una strategia adottata nel biocontrollo consiste nel manipolare questi antagonisti affinché producano antibiotici, non solo per la loro sopravvivenza ma soprattutto per interferire con l'attività del patogeno nel sito d'infezione, oppure sovrappoendosi a questo nella crescita saprofitica (caso di *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium* spp. che producono sostanze volatili e non volatili capaci di inibire fortemente lo sviluppo miceliare di importanti patogeni appartenenti ai generi *Rhizoctonia*, *Phythium*, *Fusarium* (Lynch, 1990)) Tuttavia c'è uno studio (Baker, 1992) che evidenzia come queste sostanze potrebbero anche essere utilizzate come substrato da qualche altro microrganismo.

Ceppi di *Trichoderma* spp. producono anche numerosi antibiotici che inibiscono la crescita di funghi patogeni, ma, ad eccezione dei peptaiboli, non vi sono chiare evidenze per il ruolo di queste sostanze nel meccanismo di biocontrollo (Harman and Kubicek, 1997; Lorito *et al.*, 1996; Schirmböck *et al.*, 1994); anche i batteri appartenenti al genere *Bacillus* contrastano i funghi fitopatogeni. Loeffler *et al.* (1986) hanno, infatti, individuato la produzione da parte di *Bacillus subtilis* di due antibiotici la bacilysina, un dipeptide che inibisce lieviti e batteri e la fengymicina, un complesso di lipopeptidi, attivo contro i funghi filamentosi (*Rhizoctonia solani* su riso).

APPLICAZIONE: I BENI CULTURALI

Una applicazione particolare dei biofitofarmaci è il biorisanamento di manufatti lapidei: infatti grazie ai processi "virtuosi" biogeochimici e di risanamento messi in atto dai microorganismi, riproducendo in condizioni ottimali e controllate gli stessi processi biologici che essi compiono in natura, si possono ottenere dei discreti risultati di biorisanamento ecocompatibile efficace e duraturo.

I microorganismi inizialmente erano considerati corresponsabili del deterioramento dei materiali lapidei (Ranalli *et al.*, 2003, 2005), poi ci si è resi conto sia della loro azione efficace nella rimozione di sostanze dannose presenti su oggetti artistici (Gauri *et al.*, 1992, Ranalli *et al.* 1997, 2005) sia nell'azione di ricalcificazione del materiale degradato (Perito *et*

al., 2000). Già nel 1976 Hempel fu il primo a prospettare l'uso di microorganismi nella pulizia del materiale lapideo mostrando risultati soddisfacenti. Kouzeli (1992), successivamente riportò analoghi risultati in combinazione con EDTA e bicarbonato di ammonio.

Gauri *et al.*, 1989,1992; Heselmeyer *et al.*, 1991; Cappitelli *et al.*, 2006 riferiscono studi preliminari basati sull'applicazione di *Desulfovibrio desulfuricans* su beni marmorei per l'eliminazione delle croste nere: il batterio convertirebbe il calcio solfato (nero) in calcio carbonato. Gli stessi autori, in altre sperimentazioni, adottando colture di *Pseudomonas stutzeri* A29, selezionate in virtù della elevata capacità di effettuare attività denitrificante, in condizioni controllate di anaerobiosi in laboratorio, hanno ottenuto rimozioni medie di nitrati di circa 90% dopo 30 ore a 28°C. Ranalli *et al.*, 1997; 2000 ha confermato tali risultati.

L'applicazione di batteri selezionati di *Pseudomonas stutzeri* A29, sugli affreschi del Camposanto Monumentale di Pisa (XIV secolo) opere del maestro Spinello Aretino, alterati da un tenace strato di colla animale applicato in passato per strapparli dalle pareti originarie (Ranalli *et al.*, 2005; Sorlini *et al.*, 2003a) ha mostrato efficaci risultati.

Konkol ha mostrato come l'enzima del fungo *Trametes versicolor* sia capace di invertire la colorazione biologica del marmo (Konkol *et al.* 2009).

Secondo De Muynck, De Belie, and Verstraete, 2010, il *Thiobacillus* consente la rimozione di licheni da beni culturali.

Geweely Neveen e Afifi Hala, 2011, riportano risultati soddisfacenti circa l'utilizzo di enzimi ottenuti da *Trichoderma reesei* e da *Fusarium oxysporum* per la pulizia del tempio di Karnak sito in Luxor, Egitto.

I batteri eterotrofi possono essere utilizzati per eliminare i composti organici che si depositano sulle superfici dei manufatti lapidei esposti in aree industrializzate e urbane, quali gli idrocarburi alifatici ed aromatici. Daffonchio *et al.*, 2000; Zanardini *et al.*, 2000 hanno riportato studi di selezione e isolamento direttamente da campioni litoidi esposti per alcuni anni agli inquinanti atmosferici di Milano di colture miste di ceppi batterici in grado di utilizzare idrocarburi alifatici ed aromatici come unica fonte di carbonio ed energia.

Colture microbiche selezionate sono state usate per la rimozione di solfati, nitrati e sostanza organica su materiali lapidei e su oggetti artistici (Bellucci *et al.* 1999, Heselmeyer, K.,1991) e per eliminare la patina di ossalato di calcio dai monumenti: anche in questo caso l'ossalato di calcio è risultato fonte di carbonio e di energia per i microorganismi (Ranalli *et al.*,2000).

Riguardo all'applicazione su manufatti lapidei di batteri desulfuricante, denitrificante, e batteri eterotrofi, nell'ambito del progetto europeo BIOBRUSH "Novel approaches to conserve our European heritage: BIOremediation for Building Restoration of the Urban Stone Heritage in European States", che ha visto riuniti università, società private e restauratori di diverse nazionalità (Italia, Inghilterra, Germania, Grecia e Lettonia) con l'obiettivo di rimuovere particolari patologie della pietra mediante l'utilizzo di formulati biologici a base di microorganismi opportunamente selezionati ed immobilizzati su supporti inerti di diverso tipo (Zanardini *et al.*, 2003; Cappitelli *et al.*, 2003; Sorlini *et al.*, 2003b) i risultati hanno mostrato una non generalità di applicazione.

Infatti un'eccessiva applicazione di batteri, può provocare incrinature a livello superficiale del materiale lapideo. L'università di Portsmouth, partner nel progetto ha valutato, inoltre, anche gli effetti del materiale di supporto adoperato per l'applicazione dei batteri sulla pietra. Non è stato possibile giungere a conclusioni definitive per l'utilizzo del *carbogel*, ma è stato scoperto che nella maggior parte dei casi si verifica un aumento di porosità e di assorbimento idrico. In generale, la tecnica si adatta molto bene ad alcuni tipi di pietra (es. l'arenaria) ma meno ad altri (es. il calcare).

Appare evidente, da questa brevissima disamina, l'enorme potenzialità di una ricerca ancora agli albori. Gli organismi antagonisti rappresentano una buona opportunità nella formulazione di fitofarmaci biologici anche se allo stato attuale ci sono ancora molte incertezze soprattutto sulla epidemiologia.

LAVORI CITATI

- Baker, R. 1992. Molecular biology in control of fungal pathogens in: "Handbook of applied mycology volume 1 Soils and Plants". Marcel Dekker inc. New York, Basel, Hong Kong, 259-293.
- 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* 44, 278-281.
- Cappitelli F., Zanardini E., Ranalli G., Mello E., Daffonchio D., Sorlini C., 2006. Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*.
- Daffonchio D., Borin S., Zanardini E., Abbruscato P., Realini M., Urzi C., Sorlini C., 2000. Molecular tools for the detection and the analysis of the diversity of bacteria on deteriorated stonework. In: *Of Microbes and Art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. O. Ciferri, P. Tiano and G. Mastromei (Eds.), Kluwer Academic/Plenum Pub. Company, New York, 21-38.
- Deacon J. W., 2006. Fungal biology, John Wiley & Sons, - 371.
- Franklin R. Hall, Julius J. Menn, 1998. Biopesticides: Use and Delivery. *Methods in Biotechnology*, Vol. 5., Eds. Humana Press .
- De Muynck, W., N. De Belie, and W. Verstraete, 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering* 36 (2): 118–36.
- Geweely, Neveen; Afifi, Hala, 2011. Bioremediation of Some Deterioration Products from Sandstone of Archeological Karnak Temple Using Stimulated Irradiated Alkalophilic Purified Microbial Enzymes. *Geomicrobiology Journal*, Volume 28, 1., 56-67(12).
- Gauri L. K., Chowdhury, A.N., Kulshreshtha, N.P., Punuru, A.R., 1989. The sulphation of marble and the treatment of gypsum crust. *Studies in Conservation*, 34. 201-206.
- Gauri L. K., Parks L., Jaynes J., Atlas R., 1992. Removal of sulphated-crust from marble using sulphate-reducing bacteria. In: *Proceedings of The International Conference on Stone cleaning and the nature, soiling and decay mechanisms of stone*, Webster R.G.M. (Ed.), Donhead, Edinburgh, U.K. 14-16 April, 160-165.
- Harman G.E. & Kubicek C. P. 1997 *Trichoderma and Gliocladium* Vol 1. Taylor & Francis. London.
- Hempel K., 1976. An improved method for the vacuum impregnation of stone. *Studies in Conservation* 21 (1): 40–43.
- Heselmeyer K., Fischer U., Krumbein K.E., Warscheid T., 1991. Application of *Desulfovibrio vulgaris* for the bioconversion of rock gypsum crusts into calcite. *BIOforum* 1/2: 89
- Heselmeyer K., Fischer U., Krumbein W.E., Warscheid T., 1991. Application of *Desulfovibrio vulgaris* for the Konkol, N., C. McNamara, J. Sembrat, M. Rabinowitz, and R. Mitchell. 2009. Enzymatic decolorization of bacterial pigments from culturally significant marble. *Journal of Cultural Heritage* 10 (3), 362–66.
- Kouzeli K., 1992. Black crust removal methods in use: Their effects on Pentelic marble surfaces. In *Proceedings of the 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Lisbon, 15–18 June 1992*, ed. J. Delgado Rodrigues, F. Henriques,

- and F. Telmo Jeremias, 1147–56. Lisbon: Laboratorio Nacional de Engenharia Civil. Conversion of rock gypsum crusts into calcite. *BIOforum* 1/2: 89.
- Loeffler W., J.S.-M., Tschen N., Vanittanakom M., Kugler E., Knorr T.-F., Hsie T., G. Wu., 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115(3), 204-213.
- Lorito M.; Mach R.; Sposato P.; Strass J.; Peterbauer C.K., Kubicek, C.P., 1996. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 1486-1487.
- Lynch J. M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interaction. John Wiley and sons, New York.
- Matta A. 1996. Fondamenti di patologia vegetale, Patron Editore, ISBN: 8855523848.
- Odum E. P. 1983. Le popolazioni nella comunità. In: (Eds E. P. Odum), *Basi di ecologia*, a cura di L. Rossi, traduzione di L. Nobile, Piccin Nuova Libreria Padova 544.
- Perito S., Biagiotti L., Daly S., Galizzi A., Tiano P., Mastromei G., 2000. Bacterial genes involved in calcite crystal precipitation. *Of Microbes and Art - The role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*, Kluwer Academic-Plenum Publisher, O. Ciferri, P. Tiano, G. Mastromei Eds., 217-228.
- Ranalli G., Zanardini E., Sorlini C., 1997. The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40 (2-4), 255-261.
- Ranalli G., Matteini M., Tosini I., Zanardini E., Sorlini C., 2000. Bioremediation of cultural heritage: removal of sulphates, nitrates and organic substances. ICM, Firenze In: *Of Microbes and Art. The role of Microbial Communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Ciferri O., Tiano P., Mastromei G. eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 231-245.
- Ranalli G., E. Zanardini, P. Pasin, A. Rota. 2003. Rapid biodeteriogen and biocide diagnosis on artworks: a bioluminescent low-light imaging technique. *Ann. Microbiol.* 54, 1–13.
- Ranalli G., Alfano G., Belli C., Lustrato G., Colombini M. P., Bonaduce I., Zanardini E., Abbruscato P., Cappitelli F., Sorlini C. 2005. Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes, *Journal of Applied Microbiology* 98, 73-83.
- Schirmböck M., Lorito M., Wang Y.L., Arisan-Atac I., Scala F., Kubicek C.P., 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 60, 9-16.
- Sorlini C., Zanardini E., Ranalli G. 2003a. Biorestauro degli affreschi del Camposanto Monumentale di Pisa. *Disinfestazione & Igiene Ambientale*, suppl. 5, 1-4.
- Sorlini C., Zanardini E., Cappitelli F., Abbruscato P., Zangrossi M., Realini M., Ranalli G., May E., Inkpen R., Webster A., Vicente D., Mottershead D., Kuever J., Rudolph C., Peterschewsky J., Gärtner M., Büsselmann P., Ilse I., Krage L., Vitina I., Sidraba I., Igaune S., Aide R., Vgenopolous A., Katsinis D., Patra A.M., Papida S., Mello E., Gianferri R., La Russa M.F., Marsala F., Giangiulio E. 2003b. Il progetto finanziato europeo “Bioremediation for Building Restoration of the Urban Stone Heritage in European States (BIOBRUSH)”. *Proc. Convegno Biologia e beni culturali 22-23/9/2003, Villa Gallia, Como: 30.*