

# Sperimentazione dell'efficacia di alcuni biocidi sui licheni

a cura di  
*Arcangela Valenti e Luigi Vinci*

*Protocollo sperimentale: Luigi Vinci*  
*Collaborazione: Arcangela Valenti, Eloisa Guarneri, Enza Anna Passerini.*

## **Premessa**

I licheni sono considerati tra i principali biodeteriogeni dei materiali lapidei di interesse storico artistico, sui quali, oltre ad alterazioni di natura estetica, possono operare un degrado chimico-fisico.

Al fine di contrastarne la diffusione e i relativi danni operati sul patrimonio colonizzato, si possono utilizzare delle sostanze biocide, le quali devono essere efficaci e, naturalmente, anche nel rispetto delle direttive comunitarie, non devono recare nocimento né all'opera, né all'ambiente, né all'operatore. Si è così deciso di dare avvio ad un protocollo sperimentale per saggiare quale dei biocidi comunemente utilizzati contro diversi microrganismi biodeteriogeni potesse risultare più efficace contro i licheni.

Per comprendere meglio la natura di questi organismi e il modo in cui interagiscono con il substrato colonizzato, analizziamo le loro caratteristiche principali.

I licheni sono vegetali appartenenti alle tallofite, cioè a quei vegetali considerati inferiori dal punto di vista organizzativo perché hanno un corpo vegetativo, denominato appunto tallo, non differenziato in radici, fusto e foglie come le piante superiori. Il tallo è un elemento caratteristico della specie e, dal punto di vista morfologico, se ne possono distinguere diverse tipologie: esistono infatti talli crostosi, strettamente aderenti al substrato mediante le ife fungine, fogliosi, attaccati al substrato tramite rizine nella parte centrale e sollevati nella parte marginale, fruticosi, che si sviluppano nelle tre dimensioni ancorandosi al substrato tramite un bottone fissatore, o squamulosi se sono composti da piccole squamule legate al substrato per una estremità; inoltre un tallo crostoso può essere *epilitico*, se cresce in superficie sulla roccia, o *endolitico* se invece cresce nello spessore della roccia essendo in grado di dissolverne attivamente la matrice carbonatica, che viene così colonizzata per alcuni millimetri di spessore.

I licheni sono costituiti da un'associazione mutualistica di simbiosi tra un'alga (*fotobionte*, organismo autotrofo), appartenente alle Chlorophyceae (alghe verdi) o alle Cyanophyceae (alghe azzurre o cianobatteri), e un fungo (*micobionte*, organismo eterotrofo), prevalentemente appartenente agli Ascomyceti, in cui i due simbionti traggono vantaggio reciproco. Alghe e cianobatteri, in presenza di luce e tramite i diversi pigmenti fotosintetici in essi contenuti, partendo da anidride carbonica ed acqua sono infatti in grado di sintetizzare le sostanze organiche che

servono al fungo; questo di contro, utilizzando le ife fungine, assorbe dal terreno acqua e sali minerali e li fornisce all'alga insieme alla protezione dal disseccamento.

## **Finalità e metodologia**

Con la presente sperimentazione si intende saggiare l'efficacia di alcuni biocidi su formazioni licheniche note, mediante l'utilizzo del test dell'ATP, con cui si può rilevare l'attività metabolica dell'agente biodeteriogeno prima e dopo il trattamento.

I saggi sono stati effettuati in laboratorio su dei campioni di roccia colonizzati da licheni, preventivamente caratterizzati e di cui è stata verificata la vitalità tramite appunto il test dell'ATP\*\*.

Su superfici della stessa dimensione dei campioni lapidei scelti, sono state distribuite quantità note di diversi biocidi, in concentrazioni comparabili, e poi i campioni sono stati posti in esterno per ricreare le normali condizioni ambientali.

Il trattamento è stato ripetuto dopo sette giorni ed alla fine si è rimisurata la quantità di ATP, per apprezzare quale azione biocida fosse stata più efficace, determinando la minore percentuale di attività metabolica residua.

## **Fasi della sperimentazione**

In una zona limitrofa al Parco della Favorita di Palermo sono stati prelevati cinque campioni di roccia carbonatica, a grana compatta, che possiamo definire omogenei poiché dal punto di vista geologico sono uguali e presentano lo stesso tipo di colonizzazione lichenica.

In laboratorio infatti, su tutti i campioni di roccia colonizzati si è proceduto alla caratterizzazione dei licheni, mediante la ricerca dei caratteri diagnostici. Osservazioni allo stereomicroscopio, prove biochimiche e studio delle sezioni sottili del tallo e degli organi di riproduzione sessuale (periteci) al microscopio ottico, con l'ausilio di specifiche chiavi analitiche, hanno condotto all'identificazione della specie infestante *Verrucaria nigrescens* Pers. e del suo *fotobionte*, appartenente al genere *Trebuxia*. (Chlorophyceae).

### **\*\*Test dell'ATP**

Il test dell'ATP (Adenosina Trifosfato) è un metodo indiretto per valutare la contaminazione delle superfici da microrganismi, poiché la presenza dell'ATP rivela l'esistenza di metabolismo cellulare. I sistemi comunemente in commercio per rilevare la presenza di questo metabolita si basano sulla scissione enzimatica delle molecole di ATP; i prelievi effettuati sulla superficie in esame, vengono sottoposti ad analisi per rilevare la presenza di Adenosina Trifosfato. Tramite l'azione di un complesso enzimatico (luciferina – luciferasi), l'ATP viene infatti ridotto a AMP + ADP, con emissione di energia sotto forma di luce (fotoni). Tale luminosità viene letta da un apparecchio (Bioluminometro), che ne quantifica l'intensità convertendola in un valore numerico. Più elevata è la presenza di materia vivente sulla superficie, più sarà elevata la quantità di ATP raccolta, e di conseguenza, la luce emessa durante la sua scissione e il valore misurato dal bioluminometro. Il test è sensibile ed aspecifico, poiché rivela anche piccole quantità di ATP senza tuttavia dirci nulla sui biodeteriogeni che la producono. La variabilità dei valori riscontrati dipende da diversi fattori (ambiente dove avviene il campionamento, tipo di superficie da testare) e, come già detto, è proporzionale al grado di contaminazione.

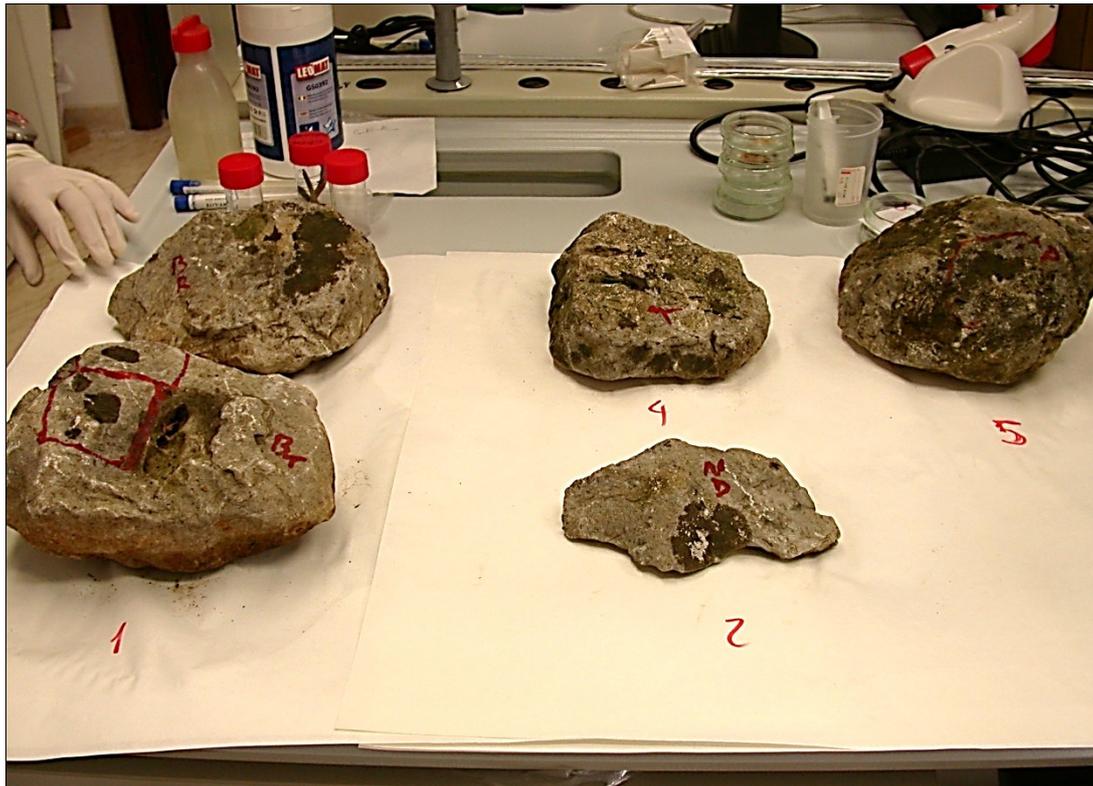


Foto n° 1 - lapidei scelti per la sperimentazione



Foto n° 2 - tallo di *Verrucaria nigrescens* Pers. - in evidenza i periteci scuri

Effettuata la caratterizzazione, i campioni sono stati tamponati con acqua distillata per ravvivare i licheni e, dopo un tempo di asciugatura, si è proceduto ad una prima determinazione dell'ATP sul materiale prelevato con tamponi a secco; i valori rilevati però sono stati mediamente bassi, poiché la *Verrucaria* è un lichene crostoso particolarmente compatto e difficile da rimuovere. Pertanto, al fine di standardizzare la metodica, da ogni campione di roccia si è prelevata, mediante bisturi, una quantità di lichene pari a 0,01 gr; tale quantità è stata sospesa in 1 ml di soluzione fisiologica addizionata (0,05%) con Tween 80 (polisorbato 80), un tensioattivo ed emulsionante non ionico.

I cinque campioni così preparati sono stati posti in agitazione con vortex per due minuti e poi 500 microlitri di ognuna delle sospensioni ottenute sono stati sottoposti al test dell'ATP. Avvenuta la reazione enzimatica si è passati alla lettura mediante il bioluminometro della Merck HY LITE 2, che ha restituito i seguenti valori di RLU:

campione 1 : 49000 RLU

campione 2 : 59000 “

campione 3 : 30000 “

campione 4 : 80000\* “

campione 5 : 17000 “



Foto n° 3 - test dell'ATP

\* Il campione n° 4 non era leggibile dal bioluminometro, poiché il valore era oltre la scala di lettura, quindi si è proceduto ad una diluizione 1:2, che ha dato il valore di 40000 RLU.

Dopo i procedimenti preliminari descritti si è passati all'attuazione fase esecutiva della sperimentazione. I valori elevati di luminosità rilevati, infatti, essendo proporzionali alla quantità di ATP presente, confermavano la vitalità dei licheni saggiati prima del trattamento, e quindi risultavano utili per potere procedere ad una comparazione a seguito dell'applicazione dei biocidi.

Sono stati quindi testate le seguenti sostanze:

NOME COMMERCIALE	PRODUTTORE o DISTRIBUTORE	PRINCIPI ATTIVI	% PRINCIPI ATTIVI
1) Biotin T	CTS	Cloruro di didecildimetilammonio Propan-2-olo 2-ottil-2 H-isotiazol-3-one Acido formico	40-60% 15-20% 7-10% 1-5%
2) New Des 50	CTS	Cloruro di didecildimetilammonio Isopropanolo	50% 10-25
3) Biotin R	CTS	2-(2-butossietossi)etanolo 3-iodo-2-propinilbutilcarbammato 2-ottil-2H-isotiazol-3one	50-100% 10-25% 2,5-10%
4) Trigene advance	BSS	Biguanide Cloridato Polimerica (Alchil Dimetil Benzil Ammonio Cloruro Didecil Dimetil Ammonio Cloruro)	<10% <10%
5) Preventol RI 80	CTS	Alchildimetilbenzilammoniocloruro Dipropilenglicolmetiletere	80% 8-12%

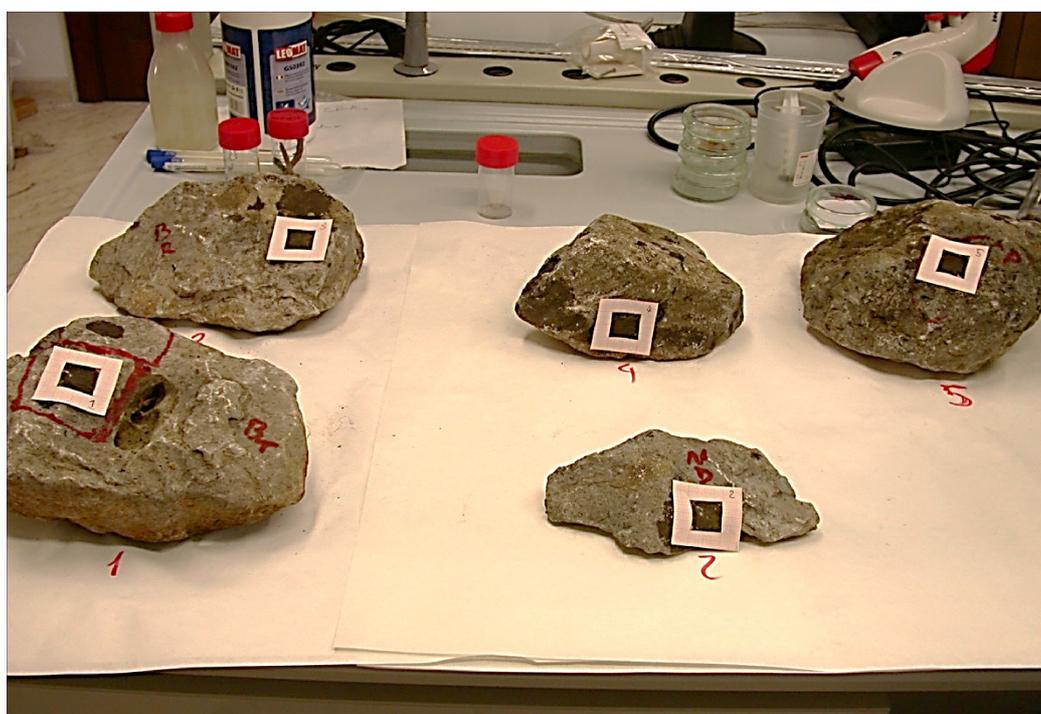


Foto n° 4 – aree di saggio delimitate con carta millimetrata

Sui cinque campioni, sono state delimitate, mediante carta millimetrata, le aree di saggio di dimensioni 2x2cm; si è quindi proceduto alla preparazione delle soluzioni dei biocidi da applicare a pennello. Considerando le diverse concentrazioni efficaci consigliate dai formulari, si è deciso di utilizzare le concentrazioni massime contemplate per ogni biocida. Le opportune diluizioni sono quindi state effettuate secondo il seguente schema:

BIOCIDA	QUANTITA' SOLUTO	QUANTITA' SOLVENTE	TIPO DI SOLVENTE	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO
1) Biotin T	3 ml	97 ml	H <sub>2</sub> O	3%
2) New Des 50 *	6 ml	94 ml	H <sub>2</sub> O	3%
3) Biotin R	5 ml	95 ml	White Spirit	5%
4) Trigene advance	1 ml	99 ml	H <sub>2</sub> O	1%
5) Preventol RI 80 * *	3 ml	97 ml	H <sub>2</sub> O	3%



Foto n° 5 - preparazione delle soluzioni di biocida

\*Per il New Des 50 non vengono prescritti particolari range di concentrazione, pertanto si è scelto di utilizzare una soluzione al 3% ; essendo il prodotto già diluito al 50%, per preparare la soluzione ne sono stati utilizzati 6ml;

\*\*Per il Preventol RI 80 il formulario consiglia una percentuale dal 2% al 10%; poiché viene ritenuto già efficace a partire dal 2%, utilizzare il 10% sembrava una concentrazione particolarmente elevata. Inoltre il predetto biocida rispetto al precedente Preventol R 80, dal punto di vista chimico, pur contenendo lo stesso sale di ammonio quaternario è potenziato con altra sostanza, il **dipropilenglicolmetiletere**, quindi si è ritenuto opportuno utilizzare una concentrazione al 3%, secondo il formulario del vecchio Preventol R 80.



**Foto n° 6 - soluzioni di biocida da applicare a pennello**

Una quantità pari a 0,5 ml di ogni soluzione è stata distribuita, mediante pennello, sulle aree di saggio, mentre su due superfici di controllo, delle medesime dimensioni, sono stati applicati soltanto i solventi H<sub>2</sub>O e White Spirit. Quindi i campioni sono stati posti all'esterno per simulare le normali condizioni ambientali.

Dopo sette giorni è stata ripetuta l'applicazione con le medesime concentrazioni e modalità.

Nella seconda settimana, dopo la seconda applicazione dei biocidi, i saggi sono stati soggetti a dilavamento naturale (pioggia). Non si è proceduto alla metodica dell'impacco, anche se probabilmente più efficace nell'eliminare i licheni, proprio perché era utile apprezzare un abbattimento non eccessivo, in quanto azioni troppo incisive rischiavano di livellare i valori di ATP verso il basso e non fare apprezzare le percentuali di attività metabolica residua.



Foto n° 7 - distribuzione dei biocidi mediante pennello



Foto n° 8 - campioni in ambiente esterno, sottoposti alle condizioni climatiche naturali

Dopo circa due settimane si è proceduto ad una nuova determinazione dell'ATP, secondo la metodica precedentemente descritta, ottenendo i seguenti risultati:

campione 1 : 1500 RLU

campione 2 : 2400

campione 3 : 25000

campione 4 : 29000

campione 5 : 1200

Si è quindi passati al calcolo della **percentuale di vitalità residua (PVR)** secondo la formula:

$$\text{valore iniziale} : \text{valore finale} = 100 : X \text{ (PVR)}$$
$$X \text{ (PVR)} = \text{valore finale} \times 100 : \text{valore iniziale}$$

I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella:

BIOCIDA	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	% VITALITA' RESIDUA
<b>1) Biotin T</b>	<b>3%</b>	<b>3%</b>
<b>2) New Des 50</b>	<b>3%</b>	<b>4%</b>
3) Biotin R	5%	83%
4) Trigene advance	1%	36%
<b>5) Preventol RI 80</b>	<b>3%</b>	<b>15%</b>

### Considerazioni finali

I biocidi contenenti una miscela di sali di ammonio quaternario, come il **Biotin T**, il **New Des 50** e il **Preventol RI 80**, rispetto agli altri saggiati, risultano i più efficaci sui licheni, mentre il **Biotin R**, ha dato il risultato più deludente; il nano biocida **Trigene advance**, efficace contro i batteri, virus e micromiceti, è stato sperimentato adesso sui licheni (che contengono un micromicete) con risultato non del tutto soddisfacente.

Sull'inefficacia del **Biotin R** sono state formulate diverse ipotesi quali: azione più tardiva rispetto agli altri biocidi, un diluente non adeguato, test dell'ATP falsato (anche se ripetuto più volte), oppure scarsa capacità di penetrazione nella pietra rispetto ai preparati a base di sale di ammonio quaternario e di conseguenza maggiore possibilità di dilavamento dalla pioggia; nella fattispecie, come già detto in precedenza, si trattava di una pietra a grana compatta ed è noto in bibliografia quanto influente sia il tipo di substrato sull'azione biocida, mentre poco significativa risulta l'interferenza dei diluenti.