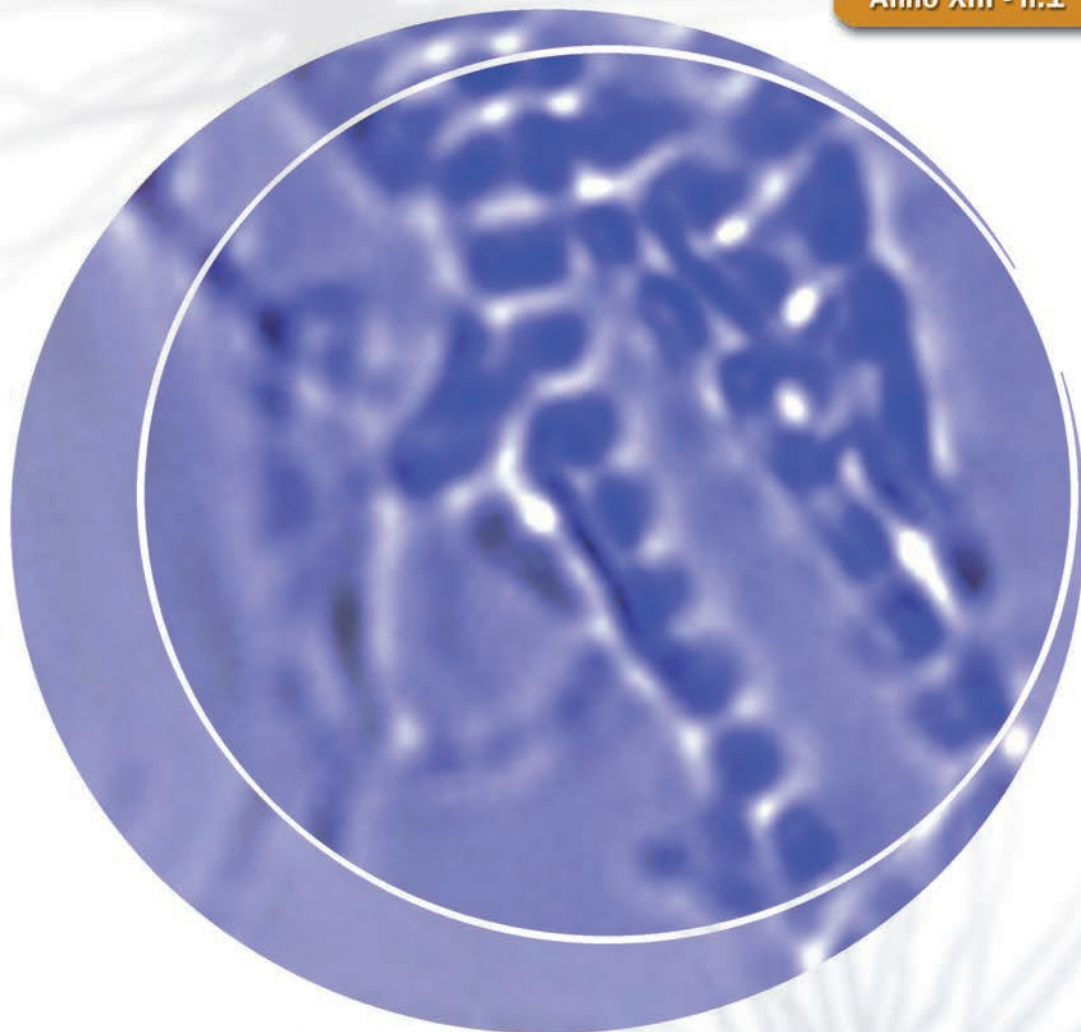


microscopie

Anno XIII - n.1 (25) Marzo 2016



Attività SISM 2016

Bando Premi SISM per tesi di dottorato

Contributi scientifici del Workshop SISM



**Società Italiana
Scienze Microscopiche**

www.sism.it

Presidente

ELISABETTA FALCIERI
Dipartimento di Scienze Biomolecolari,
Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"
Campus Scientifico "E. Mattei", via Ca' Le Suore 2,
61029 Urbino (PU)
Tel/Fax +39.0722.304284
E-mail: elisabetta.falcieri@uniurb.it

Vicepresidenti

ROBERTO BALBONI
Istituto per la Microelettronica e i Microsistemi,
CNR Bologna
via P. Gobetti 101, 40129 Bologna
Tel. +39.051.6399186 - Fax: +39.051.6399216
E-mail: balboni@bo.imm.cnr.it

STEFANIA MESCHINI
Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena 299, 00161 Roma
Tel. +39.06.49902783 - Fax: +39.06.4938 7140
E-mail: stefania.meschini@iss.it

Direttore responsabile del bollettino

MANUELA MALATESTA
Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina
e Movimento, Sezione di Anatomia e Istologia
Università degli Studi di Verona
strada Le Grazie 8, 37134 Verona
Tel. +39.045.8027569/8425115
E-mail: manuela.malatesta@univr.it

Consiglieri

CRISTIANO ALBONETTI
Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati (ISMN),
CNR Bologna
via P. Gobetti 101, 40129 Bologna
Tel. +39.051.6398531/6398523/6398526
Fax: +39.051.6398540
E-mail: c.albonetti@bo.ismn.cnr.it

REGINA CIANCIO
IOM-CNR TASC
Area Science Park Basovizza
S.S. 14 Km 163.5, 34012 Trieste
Tel. +39.040.3756467 - Fax: +39.040.226767
E-mail: ciancio@iom.cnr.it

MASSIMO TONELLI
CIGS, Centro Interdipartimentale Grandi Strumenti
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia
via Campi 213/a, 41125 Modena
Tel. +39.059.2055737 - Fax: +39.059.2055600
E-mail: massimo.tonelli@unimore.it

Organo Ufficiale della Società Italiana Scienze
Microscopiche
<http://www.sism.it>

Direttore Responsabile

Manuela Malatesta

Comitato di Redazione

Consiglio Direttivo della Società Italiana Scienze Microscopiche

Editore

PAGEPress s.r.l.
via Giuseppe Belli 7
27100 Pavia, Italy
Tel. +39.0382.1751762 - Fax: +39.0382.1750481.
info@pagepress.org - www.pagepress.org

Stampa

Press Up s.r.l.
via La Spezia, 118/C 00055 - Ladispoli (RM)
Tel. e Fax: +39.076152735.

Aut. Trib. n. 688 S.P. del 26 marzo 2008

In copertina: *Dettaglio di foglia di pomodoro al microscopio
ottico di V. Buxa e collaboratori.*

ndice

Editoriale del Presidente 3

Editoriale del Direttore Responsabile 5

Attività SISM

Verbale del CD di Agosto 2015 6

Attività promosse dalla SISM nel 2016 8

Bando Premi SISM per tesi di dottorato 13

Notizie

Eventi nazionali 14

Eventi internazionali 18

Contributi scientifici

Contributi del Workshop
La microscopia elettronica applicata allo studio dei beni culturali 25

Epifluorescence microscopy imaging of phytoplasmata in embedded leaf tissues
using DAPI and SYTO13 fluorochromes
V. Buxa, L. Pagliari, R. Musetti 49

Parameters optimization for focused ion beam fabrication of phase electron holograms
F. Venturi, G. C. Gazzadi 57

ISCRIZIONE

Possono iscriversi alla Società i ricercatori e gli operatori professionali comunque attivi nel campo delle diverse microscopie. Per l'iscrizione alla Società è necessario compilare la richiesta di associazione ed inviarla al Presidente. La scheda di associazione può essere compilata direttamente sul sito web della società all'indirizzo www.sism.it oppure può essere reperita in questo periodico ed inviata via fax. Le richieste verranno valutate dal Consiglio Direttivo nella prima riunione utile e l'approvazione dei nuovi Soci sarà comunicata personalmente agli interessati. Dopo tale comunicazione il nuovo Socio può procedere al pagamento della quota sociale secondo le modalità riportate sotto.

QUOTA SOCIALE

La quota sociale è di euro 35 per i Soci ordinari e di euro 25 per i non strutturati. I Soci non strutturati, unitamente alla quota sociale, dovranno far pervenire al Presidente della Società una dichiarazione attestante il proprio status.

Modalità di pagamento:

- mediante carta di credito dal sito www.sism.it
- mediante invio di un assegno bancario non trasferibile intestato a S.I.S.M.
l'assegno deve essere spedito alla Prof.ssa Elisabetta Falcieri, Dipartimento di Scienze della Terra, della Vita e dell'Ambiente (DiSTeVA), Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Campus Scientifico "E. Mattei", via Ca' Le Suore 2, 61029 Urbino (PU)
- mediante bonifico bancario intestato a S.I.S.M.
codice IBAN IT4300200802455000103039142
Presso Unicredit, Agenzia 3305 "Bologna Dante"
Causale: "NOME del SOCIO"

SEDE SOCIALE

Prof.ssa Elisabetta Falcieri
Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Campus Scientifico "E. Mattei", via Ca' Le Suore 2, località Crocicchia, 61029 Urbino
Tel/Fax +39.0722.304284
E-mail: elisabetta.falcieri@uniurb.it
P.IVA 05089821002 C.F. 80181630155

Si ricorda che le richieste di associazione verranno valutate dal Consiglio Direttivo e l'approvazione dei nuovi Soci verrà comunicata personalmente agli interessati.

Il pagamento della quota di associazione deve essere effettuato solo dopo il ricevimento della comunicazione dell'approvazione, da parte del Direttivo, della richiesta di associazione.

Il sottoscritto rischiede l'ammissione alla SISM in qualità di:

- Socio ordinario (35 euro)
 Socio non strutturato (25 euro)

Titolo, Nome e Cognome

Data di nascita

Titolo di studio e qualifica

Tipo di istituzione

- Università CNR Industria Commerciale Altro ente pubblico di ricerca

Istituto/Ente/Ditta

Dipartimento

Indirizzo

Città

CAP

Telefono

Fax

E-mail

Indirizzo cui inviare la corrispondenza, se diverso dal precedente

Settore di attività

- Biomedico Scienza dei materiali Commerciale Altro (specificare) _____

Come deliberato nell'Assemblea Generale del 24/09/2001 ogni Socio SISM è anche Socio EMS.

Questi stessi dati saranno pertanto automaticamente inviati anche all'EMS, di cui la SISM fa parte. I dati dei Soci sono utilizzati dalla Segreteria EMS per distribuire il Notiziario in forma elettronica, per annunciare informazioni importanti come Congressi, Corsi, Scuole e per pubblicare l'Annuario dei Soci EMS.

Se si desidera che i propri dati personali non compaiano nell'annuario EMS, selezionare l'apposita opzione.

- Chiedo che il mio indirizzo privato non compaia nell'annuario EMS
 Chiedo che il mio numero di telefono/fax non compaia nell'annuario EMS

Data _____

Firma _____

Inviare via fax a:

Prof.ssa Elisabetta Falcieri

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

Campus Scientifico "E. Mattei", via Ca' Le Suore 2, 61029 Urbino (PU)

Tel. +39.0722.304284 Fax: +39.0722.304244

Editoriale

Cari Amici e Colleghi,

durante i primi mesi del 2015 ci siamo intensamente dedicati all'organizzazione del MCM 2015, che si è svolto ad Eger (HU) dal 23 al 28 agosto scorso. La SISM, ed in particolare i membri del CD, hanno avuto un ruolo importante nell'organizzazione delle sessioni e nella scelta dei relatori, contribuendo a farne un evento di notevole livello scientifico, come i presenti hanno potuto verificare. La partecipazione italiana è stata numerosa anche grazie ai Premi di Partecipazione SISM, che hanno consentito la partecipazione di 10 giovani ricercatori non strutturati.

M. Battistelli, D. Curzi, S. Salucci, E. Vezzoli ed E. Viaggiù (per le scienze biomediche), assieme a A. Liscio, M. Marelli, R. Mazzaro, E. Rotunno e F. Venturi (per le scienze dei materiali), grazie a questa iniziativa, sono stati relatori al MCM 2015, portando un vivace contributo della microscopia italiana.

Durante il congresso si è tenuta l'Assemblea dei Soci, nel corso della quale ho fatto un breve report sulle attività e sul bilancio della SISM e Manuela Malatesta sulla gestione di Microscopie.

Sono state poi identificate le candidature per l'elezione del Presidente e dei membri del Consiglio Direttivo che, come da statuto, vanno rinnovati alla fine del biennio. La mia presidenza è stata riproposta, come anche quella di Roberto Balboni, Manuela Malatesta, Cristiano Albonetti, Stefania Meschini e Regina Ciancio a far parte del nuovo CD. Andrea Tombesi ha comunicato che, per i sopraggiunti impegni sempre più pressanti nella gestione del CIGS di Modena, avrebbe preferito declinare, pur dando ulteriore eventuale disponibilità, se necessario. È stato quindi contattato Massimo Tonelli, ricercatore esperto proveniente dalla stessa struttura, che ha dato la propria disponibilità, garantendo così nel CD la presenza di un'auto-revole figura trasversale.

Si è infine identificata la commissione elettorale (P. Mengucci e G. Barucca, Ancona, e M. Battistelli, Urbino), che ringrazio. Nelle settimane successive si è quindi proceduto alle votazioni e l'attuale nuovo Consiglio Direttivo è diventato operativo dal 1 gennaio 2016. Il nuovo assetto, sempre nel rispetto degli equilibri tra gli ambiti, è quindi il seguente: E. Falcieri (presidente), R. Balboni (vicepresidente e responsabile del sito web della società), S. Meschini (vicepresidente), M. Malatesta (direttore di Microscopie), M. Tonelli, C. Albonetti e R. Ciancio, consiglieri.

Le attività SISM che si sono svolte nell'autunno 2015, come indicato nel sito, sono state :

23-15 settembre, Modena, Scuola di "Microscopia confocale e TEM"

28-29 settembre, Urbino, "La microscopia elettronica applicata allo studio del Beni Culturali"

12-14 ottobre, Trieste, "School of Scanning Electron Microscopy on nanostructured materials and innovative applications".

Non è stato possibile invece, per problemi legati al riassetto dei dipartimenti dell'Università di Urbino, organizzare in novembre il workshop su "La microscopia elettronica SEM/ESEM nello studio dell' ambiente", in progress invece il 14-15 e 16 marzo 2016. Ne anticipo un breve profilo. Il 14 e il 15 marzo ci saranno, presso l'Aula Magna del Campus Scientifico, interventi di vari relatori, provenienti da diverse sedi italiane, sulla microscopia applicata a fattori abiotici, in ambiente acquatico e in ambiente terrestre. Il secondo giorno, oltre alle relazioni, ci sarà una sessione dedicata alle Aziende del settore e una di esercitazioni pratiche in laboratorio. Il 16 marzo sarà una giornata teorico-pratica presso i laboratori ESEM dell'ARPAM di

Editoriale

Pesaro. Altro evento in progress è il simposio “Nuclear structure and dynamics, through the microscopes”, organizzato a Pavia il 7-8 luglio 2016, da M. Malatesta, C. Pellicciari e M. Biggiogera, con il supporto della Società Italiana di Istochimica.

Con il patrocinio SISM, avremo la giornata su “Sopravvivenza e morte cellulare: nuove acquisizioni e ricadute applicative”, organizzata da S. Meschini presso l' ISS di Roma il 18 aprile p.v. e quella di “Nanomedicine Viterbo 2016”, organizzata all'Università della Tuscia il 21-23 settembre 2016.

Il 21-23 settembre 2016 Massimo Tonelli organizzerà a Modena il workshop “Corso Base integrato di microscopia confocale e microscopia elettronica a trasmissione”.

Il 29-30 settembre 2016 Cristiano Albonetti organizzerà a Bologna il workshop “STSPM”.

Nell'autunno p.v. organizzeremo nuovamente, ad Urbino, il workshop “La microscopia elettronica applicata allo studio dei Beni Culturali” e la Scuola TEM “Pier Giorgio Merli” verrà di nuovo organizzata da Roberto Balboni presso i laboratori CNR di Bologna in novembre-febbraio.

Novità di quest'anno è il bando di quattro Premi SISM di 500 euro per Tesi di Dottorato in cui la microscopia, in tutte le sue forme e applicazioni, sia parte integrante e rilevante, da finalizzare alla partecipazione ad un evento scientifico correlato. Trovate i dettagli nel sito web della Società e nel presente numero di Microscopie.

Vi informo infine che il dr. Balboni ed io -nei rispettivi ambiti- siamo stati coinvolti nell'organizzazione del prossimo Multinational Congress on Microscopy, che si terrà a Rovigno nel 2017. Saremo lieti di avere, fin da ora, indicazioni e suggerimenti da tutti voi.

Pur nelle difficoltà che le scarse risorse e gli appesantimenti burocratici ci creano, cerchiamo, come vedete, di garantire alla nostra Società una certa vivacità e uno spirito innovativo, nelle tematiche che scegliamo e nelle sinergie che cerchiamo con entusiasmo. A questo proposito, un mio doveroso ringraziamento va alla dr.ssa Sara Salucci che, con sempre maggiore impegno, si prende a cuore gli onerosi aspetti amministrativi della SISM. Ringrazio infine le Aziende, che ci supportano con contributi abituali o dedicati ai singoli eventi e saluto tutti voi che, con la partecipazione alle nostre attività e con le quote associative, ci consentite di continuare a far studiare, conoscere e amare la microscopia.

Elisabetta Falcieri

Editoriale

Cari Soci,

il nuovo Consiglio Direttivo, eletto lo scorso 2015, ha deciso di affidarmi, ancora una volta, la direzione di *Microscopie*: è il mio quinto mandato, ma l'entusiasmo per questo incarico è quello di sempre.

Negli scorsi anni, grazie all'impegno dei Presidenti, dei Membri del Consiglio, di Voi Soci e dell'Editore, PagePress, *Microscopie* ha visto progressivamente migliorare la varietà dei suoi contenuti scientifici, la qualità grafica e la sua diffusione. Ormai da un paio d'anni, oltre ai consueti articoli su argomenti in campo biomedico e di scienze dei materiali, pubblichiamo gli atti di convegni e workshop SISM durante i quali vengono presentati contributi scientifici originali; dal 2015, inoltre, i vincitori dei premi SISM sono chiamati a pubblicare un lavoro scientifico sull'argomento oggetto della loro partecipazione agli eventi congressuali. La parte strettamente scientifica della rivista è andata acquistando un'importanza via via crescente, grazie alla libera accessibilità online dei testi, attraverso il portale di PagePress (<http://www.pagepressjournals.org/index.php/microscopie>). È ormai attivo, da qualche mese, anche il sistema informatizzato per la sottomissione dei manoscritti (<http://www.pagepressjournals.org/index.php/microscopie/about/submissions>) e la loro gestione editoriale. Vi invito a visitare la pagina web di *Microscopie*: un totalizzatore riporta, per ciascun articolo pubblicato, il numero di visualizzazioni del riassunto e, cliccando sul titolo del lavoro, è anche possibile controllare quanto volte il file pdf dell'articolo è stato scaricato, avendo così una diretta valutazione dell'interesse suscitato nei lettori.

Il prossimo obiettivo, per un'ulteriore qualificazione della nostra rivista, è l'ottenimento del codice ISSN (International Standard Serial Number), il numero internazionale attribuito alle pubblicazioni periodiche, a stampa o elettroniche, che ne consente l'identificazione univoca e duratura: per riuscirci, è però necessario che *Microscopie* acquisisca una più netta connotazione di rivista scientifica pubblicando un maggior numero di articoli scientifici e proceedings. Certamente il Consiglio Direttivo si adopererà in questo senso, ma solo attraverso l'impegno di Voi Soci nell'inviare sempre più numerosi contributi sarà possibile raggiungere questo importante risultato.

Grazie sin d'ora per il Vostro aiuto e buona lettura!

Manuela Malatesta

Consiglio direttivo della SISM

Verbale della riunione del 27 agosto 2015

MC 2015 - Eger, Ungheria

Il giorno 27 agosto 2015, alle ore 14, presso la sede in cui era in corso l'MCM 2015, Eger (Ungheria), si è svolta una riunione del Consiglio Direttivo SISM, per discutere il seguente OdG:

1. Approvazione del verbale della riunione precedente.
2. Relazione scientifica ed economica della SISM nel biennio 2014-2015.
3. Attività 2015.
4. Approvazione della Relazione del Direttore di Microscopia sulla gestione scientifica della rivista.
5. Valutazione delle candidature per MCM 2017.
6. Definizione delle modalità di voto per il rinnovo delle cariche sociali.
7. Approvazione ammissione nuovi Soci.
8. Premi di partecipazione al MCM 2015.
9. Varie ed eventuali.

Sono presenti: *Cristiano Albonetti, Roberto Balboni, Regina Ciancio, Elisabetta Falcieri, Manuela Malatesta, Stefania Meschini.*

Assenti giustificati: *Andrea Tombesi.*

Presiede *Elisabetta Falcieri*; svolge le funzioni di segretario verbalizzante *Sara Salucci.*

1. Il verbale della riunione del Consiglio Direttivo del 10 febbraio 2015 viene approvato all'unanimità. Il Consiglio Direttivo all'unanimità ammette la presenza della Dott.ssa Sara Salucci in qualità di segretario verbalizzante della Società.
2. Il Presidente Elisabetta Falcieri riferisce sulla situazione economica della società, illustrando dettagliatamente il bilancio 2014 e la situazione del 2015 che ad oggi è di circa 31000 Euro di attivo. Si valuta di considerare tale positiva condizione come risorsa utile per migliorare il sito web della SISM.
3. Il Presidente dettaglia circa gli avanzamenti nell'organizzazione degli eventi SISM nell'anno 2015. Il Presidente si complimenta con Manuela Malatesta per il successo dell'iniziativa relativa alla "Microscopia elettronica e tecniche di imaging per lo studio degli alimenti" tenutosi a Verona il 19 giugno 2015. Il Presidente relaziona sugli eventi SISM che si terranno nell'autunno-inverno 2015 e per i quali sono aperte le iscrizioni:
"Corso Base integrato di microscopia confocale e microscopia elettronica TEM/STEM" (Università di Modena, 23-25 settembre),
"La microscopia elettronica applicata allo studio dei Beni Culturali" (Università di Urbino, 28-29 settembre),
"Scuola di microscopia elettronica a scansione su materiali nanostrutturati e applicazioni innovative" (CNR-IOM, Trieste, 12-14 ottobre).
"La microscopia elettronica SEM/ESEM nello studio dell'ambiente" (Università di Urbino, 19-21 ottobre).

4. Manuela Malatesta relaziona sulla gestione scientifica della rivista “Microscopie” pubblicata online sul sito della PagePress, sottolineando che tutti gli articoli pubblicati sono provvisti di doi e quindi tracciabili, citabili e di visibilità internazionale. Manuela Malatesta lamenta che, nonostante questo traguardo, pochi Soci contribuiscono con i loro articoli al buon andamento della rivista. Il Consiglio Direttivo decide di invitare fortemente coloro che sono risultati vincitori del premio SISM 2015 a scrivere articoli da pubblicare sulla rivista nell’anno 2016.
5. Il Presidente riferisce che il prossimo MCM si terrà a Rovigno, in Croazia, alla fine di settembre 2017, decisione presa durante l’MCM board tenutosi il 24 agosto ad Eger, a cui hanno partecipato quali rappresentanti italiani Elisabetta Falcieri e Roberto Balboni.
6. Il Presidente annuncia che occorre, come da statuto, ridefinire le cariche sociali per il biennio 2016-2017. Nell’occasione, tutto il Direttivo si ricandida fatta eccezione per il vice-presidente Tombesi che non si candida per sopravvenuti eccessivi impegni istituzionali. Ritenendo importante la candidatura di un microscopista di carattere trasversale, e dopo rapide ma efficaci consultazioni, viene proposto il dott. Massimo Tonelli, sempre del CIGS di Modena. Il CD approva unanime.
7. Approvazione nuovi associati: Raffaele Berti.
8. Il Presidente illustra la situazione dei premi SISM 2015, in totale 10 da 750 euro, 5 per il settore Biologico e 5 per il settore di Scienze dei Materiali. Le domande di partecipazione sono state sufficienti a coprire i 10 posti.
9. Il Consiglio Direttivo lamenta una certa rigidità del sito web della società: occorre valutare strategie per consentire senza problemi le iscrizioni ai diversi eventi SISM organizzati. Roberto Balboni se ne farà carico.

Alle ore 14:30, null’altro essendovi da deliberare, il Presidente dichiara chiusa la seduta.

*Elisabetta Falcieri
Roberto Balboni
Manuela Malatesta
Cristiano Albonetti
Regina Ciancio
Stefania Meschini*

Elenco delle attività promosse dalla SISM nel 2016

12-14 Marzo 2016, Urbino/Pesaro: Workshop teorico-pratico su **“La microscopia elettronica SEM/ESEM nello studio dell'ambiente”** a cura della Prof.ssa Elisabetta Falcieri e dei suoi collaboratori.

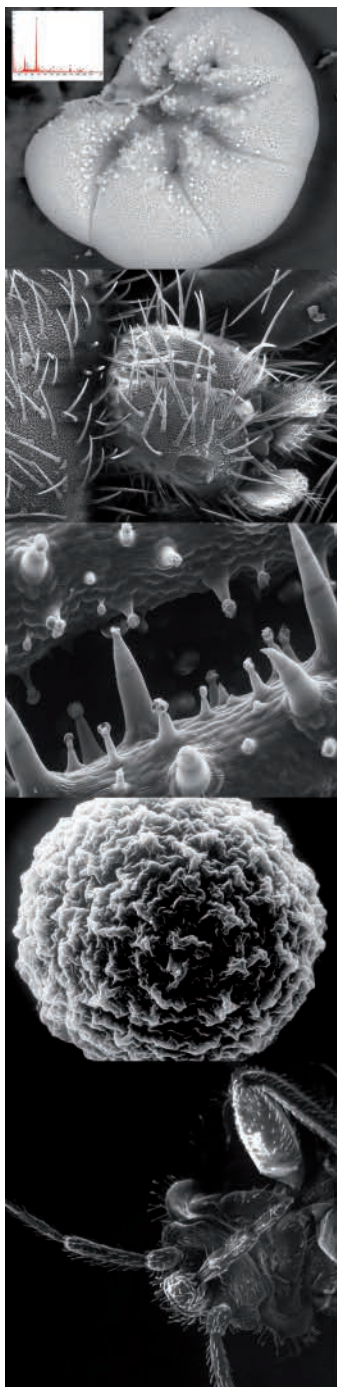
7-8 Luglio 2016, Pavia: Workshop: **“Nuclear structure and dynamics, through the microscopes”**, a cura della Prof.ssa Manuela Malatesta e del Prof. Carlo Pellicciari, in collaborazione con la Società Italiana di Istochimica.

Autunno 2016, Modena: Workshop teorico-pratico su **“Corso Base integrato di microscopia confocale e microscopia elettronica a trasmissione”** a cura del Dott. Massimo Tonelli e dei suoi collaboratori.

Autunno 2016, Bologna: **“Science through Scanning Probe Microscopy (StSPM'16)”**, a cura del Dott. Cristiano Albonetti e dei suoi collaboratori.

Autunno/inverno 2016, Urbino: Workshop teorico-pratico su **“La microscopia elettronica applicata allo studio dei beni culturali”** a cura della Prof.ssa Elisabetta Falcieri e dei suoi collaboratori.

Novembre 2016/Febrero 2017: **“Scuola TEM «Pier Giorgio Merli» 2016”**, a cura del Dott. Roberto Balboni e dei suoi collaboratori.

**Comitato scientifico**

E. Falcieri, M. Balsamo, P. Gobbi,
R. Santolini, C. Pizzagalli

Comitato organizzatore

D. Curzi, S. Burattini, M. Battistelli,
S. Salucci, L. Valentini

Per ulteriori informazioni

Elisabetta Falcieri,
DiSB,
Campus Scientifico "Enrico Mattei",
Via Ca' le Suore 2, Urbino (PU)
elisabetta.falcieri@uniurbno.it
www.sism.it



1906
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO
DISB
DIPARTIMENTO
DI SCIENZE
BIOLOGICHE

ERSU URBINO

La microscopia elettronica SEM/ESEM nello studio dell'ambiente

Urbino, 14-15-16 Marzo 2016

L'evento, organizzato dalla SISM, presso il Campus Scientifico dell'Università di Urbino Carlo Bo, è dedicato a professionisti, docenti, ricercatori, tecnici e studenti che operano nel campo dello studio dell'ambiente. Sarà dedicata particolare importanza alle applicazioni della microscopia elettronica a scansione SEM - ESEM, nei suoi diversi approcci metodologici. Relatori esperti dell'ambito illustreranno, nell'Aula Magna del Campus, i loro dati più recenti sulla caratterizzazione morfologica ultrastrutturale e chimica. Oltre le relazioni in aula, ci saranno delle esercitazioni pratiche sulla preparazione di campioni specifici.

Lunedì, 14 Marzo (Aula Magna)

14.00 *Registrazione*

14.30 *Benvenuto ai partecipanti e presentazione del workshop*

I° Sessione - Fattori abiotici

15.00 Identificazione a analisi di markers ambientali mediante microscopia elettronica (L. Valentini, Urbino)

15.30 Caratterizzazione chimico-fisica del PM2.5 nell'area di Roma (C. Fanizza - B. De Berardis, Roma)

16.00 Amianti e altre fibre inorganiche, naturali e sintetiche presenti nell'ambiente: indagine tramite SEM EDS per la valutazione del fondo ambientale e di situazioni di inquinamento (E. Belluso, Torino)

16.30 *Coffee break*

17.00 I vantaggi dell'utilizzo del SEM durante attività di bonifica ambientale (F. Paglietti, Roma)

17.30 Applicazione della microscopia elettronica a scansione nella nano(eco)tossicità (A.M. Gatti, Faenza)

II° Sessione - Ambiente acquatico

18.00 Approccio ultrastrutturale nel monitoraggio ambientale di fitoplancton, microfitorbenthos e microalghe tossiche (C. Totti, Ancona)

18.30 Il ruolo del SEM nella valutazione delle alterazioni indotte da inquinanti negli epitelii respiratori di organismi acquatici (E. Brunelli, Cosenza)

20.30 *Cena*

Martedì, 15 Marzo (Aula Magna)

09.00 I denti dei rotiferi nelle analisi ambientali (D. Fontaneto, Verbania Pallanza)

09.30 Tecniche di microscopia elettronica applicate al monitoraggio ambientale: i foraminiferi bentonici (F. Frontalini - D. Curzi, Urbino)

10.00 Nematodi marini: adattamenti e strategie di sopravvivenza all'ambiente (L. Guidi - F. Semprucci, Urbino)

III° Sessione - Ambiente terrestre

10.30 SEM/EDX e ESEM/EDX di campioni vegetali e substrati carboniosi, per la determinazione di metalli pesanti e semimetalli (M. Marmioli, Parma)

11.00 *Coffee break*

11.30 Microscopia elettronica nello studio dell'adesione e delle modificazioni in risposta a stress nei batteri (W. Baffone, Urbino)

12.00 Studio ultrastrutturale degli effetti sugli apparati ipò ed epigei della pianta in risposta ad approcci agronomici eco-sostenibili (A. Trincherà, Roma)

12.30 La microscopia elettronica nello studio della diversità ecologica di piante officinali conservate presso l'Orto Botanico Ghirardi di Toscolano Maderno (BS) (C. Giuliani, Milano)

13.00 *Pranzo al campus*

14.00 *Spazio dedicato alle Aziende*

15.00 *Esercitazioni pratiche: preparazione campioni per SEM*

Mercoledì, 16 Marzo (Laboratori ESEM, ARPAM Pesaro)

10.00 Presentazione della sessione (P. Gobbi, Urbino)

10.15 Benvenuto ai partecipanti (C. Pizzagalli, ARPAM Pesaro)

10.30 Il microscopio ESEM: tecnologia e applicazioni (F. Tatti, FEI Company)

11.30 Sessioni pratiche a cura di L. Valentini, D. Curzi e A.M. Gatti (Urbino) e A. Giusto (ARPAM Pesaro)

13.30 Chiusura della sessione e del Workshop

Informazioni pratiche

Sede: Aula Magna Campus Scientifico "Enrico Mattei" (Urbino) e ARPAM, Dipartimento di Pesaro

Quota d'iscrizione (entro e non oltre il 8 Marzo 2016): 200€

Dipendenti ARPAM, dottorandi, assegnisti, studenti e soci SISM alla data del 8 Marzo 2016: 150€

La quota comprende: partecipazione alle relazioni e alle esercitazioni pratiche in laboratorio, materiale didattico, pranzo, cena in un ristorante tipico di Urbino, coffee break, 2 pernottamenti al Collegio Internazionale, con prima colazione. Comprende inoltre la pubblicazione degli abstract delle relazioni su *Microscopie*.

Al termine del workshop sarà rilasciato un attestato di partecipazione.

Chi farà richiesta di associazione alla SISM sarà esonerato dal versamento della quota associativa per l'anno 2017.



Simposio

Nuclear structure and dynamics, through the microscopes

Pavia, Collegio Alessandro Volta - 7-8 Luglio 2016

Il simposio è organizzato congiuntamente dalla Società Italiana di Scienze Microscopiche e dalla Società Italiana di Istochimica, e verterà su diversi aspetti dell'organizzazione funzionale del nucleo (struttura della cromatina, organizzazione e dinamica dei domini nucleari, trascrizione, splicing e traffico molecolare), in differenti modelli sperimentali e nello sviluppo. Si darà particolare spazio alla moderna applicazione di tecniche morfologiche e istochimiche a microscopia ottica ed elettronica.

Sono previste comunicazioni ad invito e interventi orali dei partecipanti.

Lingua ufficiale del Simposio sarà l'Italiano e gli atti saranno pubblicati in lingua Inglese sulla rivista *Microscopie* (<http://www.pagepressjournals.org/index.php/microscopie>).

Comitato Scientifico: Marco Biggiogera, Elisabetta Falcieri, Manuela Malatesta

Comitato Organizzatore: Manuela Malatesta, Irene Masiello, Carlo Pellicciari

Programma preliminare

(Alle relazioni riportate si aggiungeranno gli interventi orali dei partecipanti)

7 Luglio

Ore 14.00: Registrazione

Ore 15.30: Apertura dei lavori (E. Falcieri, C. Pellicciari)

Ore 15.45 - 18.30: Sessione 1 (Moderatore: E. Falcieri):

N. M. Maraldi (Bologna): *The nuclear lamina as a chromatin organizer*

M. Malatesta (Verona): *Molecular composition and dynamics of nuclear foci in myotonic dystrophy.*

I. Masiello (Pavia): *Ultrastructural analysis of nucleic acids methylation*

20.00: *Cena al Collegio A. Volta*

8 Luglio

ore 9.00: Sessione 2 (Moderatore: M. Malatesta)

M. Biggiogera (Pavia): *Transcription time window applied to RNA modifications in HeLa cells.*

P. Sestili (Urbino): *Nuclear diffusion assays for the study of DNA damage at the single cell level*

L. Ghibelli (Roma): *Dose-dependent types of nuclear alterations induced by etoposide on human leukemia cells*

Ore 11.00: *Coffee break*

Ore 11.30: Sessione 3 (Moderatore: M. Biggiogera)

S. Burattini, B. Canonico (Urbino): *From Microscopy to Cytometry through fluorescence: cellular events at the nuclear level*

E. Falcieri (Urbino): *Highlighting the apoptotic nucleus: the precious contribution of the electron microscope*

Ore 13.00: *Pranzo al Collegio A. Volta*

Ore 14.30: Sessione 4 (Moderatore: A.M. Luciano):

V. Lodde, S. Modina, L. Terzaghi, A. M. Luciano (Milano): *Dynamics and regulatory mechanisms involved in immature oocyte chromatin remodeling*

M. Zuccotti (Parma): *Time-lapse dynamics of the chromatin organisation in developmentally competent and incompetent mouse oocytes during meiosis resumption*

P. Rebuzzini (Pavia): *Morphological and functional changes of cardiomyocytes differentiated from embryonic stem cells in the presence of arsenic trioxide*

17.00: Chiusura dei lavori (E. Falcieri, C. Pellicciari)



Informazioni pratiche

Sede

Collegio Alessandro Volta, Via A. Ferrata 17, Pavia (<http://www.collegiovolta.org/>)

Iscrizione

L'iscrizione al simposio è obbligatoria e deve essere effettuata, **entro il 15 Giugno 2016**, compilando l'apposita scheda on-line al sito www.sism.it

La quota di iscrizione comprende la partecipazione alle sessioni scientifiche, la cena del 7 Luglio, e coffee break e pranzo del giorno 8; comprende inoltre la pubblicazione dei riassunti delle relazioni sulla rivista *Microscopie*.

Al termine del simposio sarà rilasciato un attestato di partecipazione.

Quanti faranno richiesta di associazione alla SISM o alla SII saranno esonerati dal versamento della quota associativa per l'anno 2017.

Per informazioni: carlo.pellicciari@unipv.it

Alcuni Alberghi e B&B a Pavia

Hotel Moderno (Viale Vittorio Emanuele II, 41; Tel. 0382.303401) <http://www.hotelmoderno.it/>

Hotel Aurora (Viale Vittorio Emanuele II, 25; Tel. 038223664) <http://www.hotel-aurora.eu/>

Hotel Rosengarten (Via Cesare Lombroso 21/23 Angolo Viale Golgi; Tel. 0382 526312)
<http://rosengarten.pv.it/>

Hotel Excelsior (Piazzale Stazione, 25; Tel. 0382 28596) <http://www.hotelexcelsiorpavia.com/>

Guesthouse Maiocchi (Viale GOLGI 42; Tel. 335 5311527 / 328 6393588)
<http://www.guesthousemaiocchi.it/index.asp>

Affittacamere Amaca-Pavia (Via Alessandro Brambilla, 90; Tel. 3393029262 / 3459086901)
http://www.bb30.it/bed_and_breakfast/bed_and_breakfast_Amaca_Pavia_Pavia_BB3701.htm

ISTRUZIONI PER LA PREPARAZIONE E SOTTOMISSIONE DEL RIASSUNTO

Il riassunto (comprensivo di Titolo, Autori, Affiliazioni, Testo e Riferimenti bibliografici), redatto **in lingua Inglese, non dovrà eccedere i 2500 caratteri (spazi inclusi)** e dovrà essere preparato secondo l'esempio sotto riportato:

IMMUNOLocalIZATION OF COCAINE-AMPHETAMINE REGULATED TRANSCRIPT (CART) IN BILIARY EPITHELIUM

A. Casini¹, A. Renzi¹, G. Vivacqua¹, R. Vaccaro¹, A. Franchitto¹, G. Alpini², E. Gaudio¹, P. Onori¹

¹Department of Anatomical, Histological, Forensic Medicine, and Orthopedics Sciences, Sapienza University of Rome, Italy; ²Scott and White Digestive Disease Research Center, Scott and White Hospital and Texas A&M Health Science Center, College of Medicine, Temple, TX, USA

Cholangiocytes proliferation can be modulated by several neuroendocrine factors¹. The peptide cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) has various physiological functions and is widely expressed in many organs². CART increases the survival of hippocampal neurons by up-regulating Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)³. Recent study has detected the expression of BDNF and of its two receptors (TrkB and p75NT) in cholangiocytes of rat liver and their involvement in proliferation rate of biliary tree⁴. Aim of this study was to investigate the expression of CART in the rat biliary epithelium. Male Wistar rats were divided into normal (n=6) and BDL (n=6) group.

References

1. Gaudio E, et al. *Gastroenterology* 2006;130:1270-82.
2. Wierup N, et al. *Neurosci* 2007;8:51.
3. Wu B, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:656-61.
4. Vivacqua G, et al. *Ital J Anat Embryol* 2014;119:111-29.

Si suggerisce di usare preferibilmente il carattere Times New Roman 12.

I testi non saranno sottoposti a correzione da parte degli organizzatori e, pertanto, gli Autori sono pregati di prestare la massima attenzione nella stesura dei loro riassunti.

I riassunti (in formato .doc o .txt) dovranno essere inviati per posta elettronica, entro il 31 Maggio 2016, a carlo.pellicciari@unipv.it

Intitolare il file col proprio cognome (seguito da un numero progressivo, nel caso di invio di più riassunti).



S.I.S.M. società Italiana Scienze Microscopiche

PREMI SISM TESI DI DOTTORATO

La Società Italiana Scienze Microscopiche bandisce

4 PREMI dell'importo di **€ 500,00** ciascuno

a 4 tesi di dottorato (2 nell'ambito delle scienze biomediche e 2 nell'ambito delle scienze dei materiali, discusse negli anni 2013, 2014 e 2015) nelle quali la microscopia, in tutte le sue forme e applicazioni, sia parte integrante e rilevante.

Il premio sarà finalizzato **alla partecipazione**, entro un anno dalla discussione della tesi, **ad un evento correlato nazionale o internazionale**.

I partecipanti devono inviare **entro il 30 aprile**:

- 1) **domanda**
- 2) **copia della tesi di dottorato** (in formato pdf)
- 3) **curriculum vitae** di massimo due pagine, con autocertificazione della propria posizione.
- 4) indicazione dell'**evento** a cui si intende partecipare

L'iscrizione alla SISM, alla data della domanda, a parità di giudizio, costituirà titolo preferenziale.

Per partecipare alla selezione del bando, che verrà effettuata a giudizio insindacabile del Consiglio Direttivo, la documentazione richiesta va inviata per e-mail al presidente della SISM, prof.ssa Elisabetta Falcieri (elisabetta.falcieri@uniurb.it)

Al ricevimento della documentazione verrà inviata una e-mail di conferma dell'avvenuta ricezione.

I risultati della selezione verranno comunicati per e-mail ai candidati e pubblicizzati sulla pagina web della SISM, all'indirizzo www.sism.it

Elisabetta Falcieri

Urbino, 23 febbraio 2016

Eventi nazionali

2016

Tecnologie laser per il restauro

Pisa, 3-8 marzo 2016

<http://www.associazionear.com/wp/blog/2016/02/04/1562/>**International school of biophysics «Antonio Borsellino»****43rd Course: Nanoscale biophysics: focus on methods and techniques**

Erice, 17-24 aprile 2016

<http://www.ccsem.infn.it>**Sopravvivenza e morte cellulare: nuove acquisizioni e ricadute applicative**

Roma, 18 aprile 2016

http://www.onlus-aicc.org/calendario/action~oneday/exact_date~18-4-2016/**Fluorescence Microscopy**

Trieste, 2-4 maggio 2016

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology – ICGEB

<http://www.icgeb.org/microscopy-2016.html>**Fotonica 2016****18° Convegno Nazionale sulle Tecnologie Fotoniche**

Roma, 6-8 giugno 2016

www.fotonica2016.it**Exosomes in pathological conditions: new insights for biomarker development and therapeutic applications**

Roma, 9 giugno 2016

http://www.onlus-aicc.org/calendario/action~oneday/exact_date~9-6-2016/**62° Convegno del Gruppo Embriologico Italiano**

Napoli, 20-23 giugno 2016

<http://www.gruppo-embriologico.it/conv62.php#>**Microscopia Elettronica in Trasmissione (TEM) per metallurgisti**

Ancona, 27-30 Giugno 2016

<http://www.metallurgia-italiana.net/manifestazione.php?id=374&idc=2>

Eventi nazionali

77° Congresso dell'Unione Zoologica Italiana

Milano, 29 agosto - 1 settembre 2016

<http://www.uzionlus.it>

Nanomedicine Viterbo 2016

Viterbo, 21-23 settembre 2016

<http://www.nanodrug.cnr.it>

XXXIV Conferenza nazionale di citometria e scuola nazionale di citometria

Corsi Teorico-Pratici Residenziali di Formazione e Aggiornamento

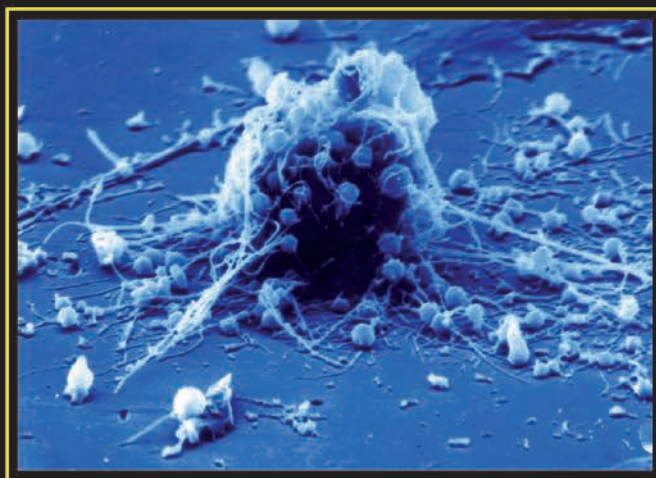
Urbino, 27-30 settembre 2016

<http://gic.casaccia.enea.it>

Istituto Superiore di Sanità



Sopravvivenza e morte cellulare:



nuove acquisizioni e ricadute applicative

Roma, 18 aprile 2016

**Istituto Superiore di Sanità
Aula Bovet**

**Convegno Co-organizzato da:
Dipartimento di Tecnologie e Salute e Dipartimento del Farmaco
Istituto Superiore di Sanità**



NANOMEDICINE VITERBO 2016

Viterbo, 21-23 September 2016
University of Tuscia

DIAGNOSIS
THERAPY
THERANOSTICS
DRUG DELIVERY
TISSUE
ENGINEERING

INVITED SPEAKERS

Luigi Ambrosio
Sophia G. Antimisiaris
Yechezkel Barenholz
Paola Luciani
Dusica Maysinger
Francesco Ricci
Ester Segal
Gert Storm
Vladimir P. Torchilin
Thomas J. Webster

Organized by
Institute of Chemical Methodologies, CNR, Rome
Department of Technology and Health, Istituto Superiore di Sanità, Roma
<http://www.nanodrug.cnr.it>



Eventi internazionali

2016**Focus on Microscopy 2016**

20 to 23 March 2016

International Convention Center – Taipei – Taiwan

Electron Back Scatter Diffraction Meeting 2016

22 and 23 March 2016

Manchester Conference Centre – Manchester – United Kingdom

Porto AFM Workshop 2016

16 to 19 April 2016

UCIBio@Requimte – Porto – Portugal

A Course in Cryo Electron Microscopy Techniques

17 to 22 April 2016

Rothamsted Research – Harpenden – United Kingdom

8th Aberration-Corrected Electron Microscopy and EELS School

29 May to 3 June 2016

McMaster University – Hamilton – Canada

ISM Golden Jubilee conference - The 50th annual meeting of the Israel society for microscopy

31 May to 2 June 2016

Leonardo Hotel – Haifa – Israel

NanoInBio 2016

31 May to 5 June 2016

Fort Royal Hall at La Creole Beach Hotel & Spa – Le Gosier – Guadeloupe

BIAMS International Workshop (Beam Injection Assessment of Microstructures in Semiconductors)

5 to 9 June 2016

University of Versailles-St Quentin – Versailles – France

Inter/Micro 2016

6 to 10 June 2016

McCrone Research Institute – Chicago, IL – USA

2016 Annual conference of the Nordic Microscopy Society

7 to 10 June 2016

Trondheim – Norway

1st International Conference on Nanoscopy

7 to 10 June 2016

Biozentrum University of Basel – Basel – Switzerland

1st International Conference on Helium Ion Microscopy and Emerging Focused Ion Beam Technologies

8 to 10 June 2016

Neumünster Abbey – Luxembourg City – Luxembourg

EMBO course "Advanced Methods of Electron Microscopy in Cell Biology"

14 to 24 June 2016

The shared campus of Biology Centre of CAS and University of South Bohemia – Ceske Budejovice – Czech Republic

15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry

19 to 22 June 2016

Military Museum Convention and Exhibition Center – Istanbul – Turkey

4th International CryoTEM Workshop 2016

20 to 24 June 2016

Eindhoven – Netherlands

Advance course Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM)

23 to 28 June 2016

UMC – Utrecht – Netherlands

International School on Fundamental Crystallography with applications to Electron Crystallography

27 June to 2 July 2016

Groenenborger Campus / University of Antwerp – Antwerp – Belgium

Ultrapath XVIII

11 to 15 July 2016

Calouste Gulbenkian Foundation – Lisbon – Portugal

12th International Congress of Cell Biology

21 to 25 July 2016

Prague – Czech Republic

ESRIC Super-Resolution Summer School 2016

8 to 12 August 2016

Edinburgh – United Kingdom

16th European Microscopy Congress

28 August to 2 September 2016

Convention Center – Lyon – France

43rd Annual Meeting of SCUR (Society for Cutaneous Ultrastructure Research)

29 and 30 August 2016

Convention Center – Lyon – France

RBSM Golden Jubilee Annual Meeting - The 50th year anniversary of the Royal Belgian Society for Microscopy

8 and 9 September 2016

Palais des Académies – Brussels – Belgium

LEEM/PEEM-10 Conference

11 to 15 September 2016

Portola Hotel & Spa – Monterey, CA – USA

Fourth Conference on Frontiers of Aberration Corrected

30 April to 4 May 2017

Kasteel Vaalsbroek – Netherlands

Organisation: Ernst Ruska-Centre in Jülich

Quantitative Electron Microscopy school

22 May to 2 June 2017

St-Aygulf – France

ISM2016

כנס הויובל של האגודה הישראלית למיקרוסקופיה
The Golden Jubilee Annual Meeting of the
Israel Society for Microscopy
May 31st – June 2nd, 2016
Leonardo Hotel, Haifa

Satellite Workshops
Lunch-break Workshops
Students Sound Bite Session
Poster Competition
Micrograph Competition
Device Fabrication Competition
Vendors Exhibition

PLENARY SPEAKERS

David A. Muller

Cornell University, USA

Peter Rez

Arizona State University, USA

David N. Seidman

Northwestern University, USA

Paula da Fonseca

MRC Laboratory of Molecular
Biology, UK

Hari Shroff

National Institute of Biomedical
Imaging & Bioengineering (NIH),
USA

Ernst H.K. Stelzer

Goethe-Universität Frankfurt am
Main, Germany

SESSIONS

Renown international and local invited speakers will present their work in the following sessions:

MATERIALS SCIENCE

- Advances in electron microscopy and related spectroscopy
- Energy related materials
- Low dimensional materials
- In situ electron microscopy
- Advances in electron diffraction
- Surface Plasmons, Cathodoluminescence, and Low-Loss EELS
- Soft and hybrid nanomaterials

LIFE SCIENCES

- 3D Electron microscopy
- Correlative light & electron microscopy
- Specialized methods
- Super resolution light microscopy
- Microscopy image analysis tools
- In-vivo optical imaging
- The dynamic cell

We encourage submissions related to additional topics



Web address:
www.ismicroscopy.org.il/ism2016

DEADLINES

- Feb. 15 Abstract submission for the Margulis Prize
Feb. 24 Abstracts submission for Oral and Poster presentations
Apr. 3 Speakers and poster presenters' registration and payment. Submission for the micrograph and fabrication competitions
Apr. 13 Early registration fees. Late breaking-results posters
May 24 On-site registration fees

THE LEV MARGULIS MEMORIAL PRIZE

will be awarded this year to two students – one from Materials Science and one from Life Sciences

ORGANIZING COMMITTEE

Bar-Ilan University: Y. Garini, A. Weiss
Ben Gurion University: M. Bar-Sadan, L. Meshi
Hebrew University: I. Popov
Technion: D. Danino, M. Duvshani-Eshet, W. D. Kaplan, Y. Kauffmann, E. Kesselman, E. Suss-Toby
Tel-Aviv University: Z. Barkay, A. Kohn
Weizmann Institute of Science: E. Shimoni
International Advisory Board: A. Diaspro, Italy
R. Dunin-Borkowski, Germany. A. Steven, USA

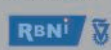
CONFERENCE SECRETARIAT

Diesenhaus-Unitours Incoming Tourism (1998) Ltd.
Conventions Department
3 Hamelacha Street | P.O.Box 57176 | 61571 Tel-Aviv | Israel
Tel: +972-3-5651344 ; +972-3-5651324 | Fax: +972-3-5610152
E-mail: meetings@diezenhaus.com



DIESENHAUS UNITOURS
Incoming Tourism Ltd.

SPONSORS



The Russell Berrie
Nanotechnology
Institute (RBNI),
Technion



Grand Technion
Energy Program



The Irving and Cherna Moskowitz
Center for Nano and Bio-Nano
Imaging at the Weizmann Institute
of Science



TEL AVIV UNIVERSITY
Pursuing the Unknown
Wolffson Applied Materials
Research Center



Bar-Ilan Institute for Nanotechnology
and Advanced Materials



The Ilse Katz Institute for
Nanoscale Science &
Technology, Bar-Gurion
University of the Negev

Image kindly contributed by Yechiel Elkabetz, Faculty of Medicine, Tel-Aviv University



15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry

ICHC 2016
ISTANBUL, JUNE 19-22, 2016

Dear Colleagues,

As Organizing Committee of ICHC 2016, we would like to invite you to attend ICHC 2016 ISTANBUL. **The extended deadline to submit your abstracts is February, 29, 2016.**

Please follow **the important dates** on the web page www.ichc2016.com.

We are sure that the congress program is inspiring with a considerable number of plenary and invited speakers in the field of Histochemistry and Cytochemistry.

- 1 keynote, 10 plenary and 39 invited lectures
- 21 scientific sessions, including 5 society-sponsored and 2 journal-sponsored sessions
- David Glick Lecture and Paul Nakane Prize
- 2 poster sessions
- **As Special sessions:** "Let's seniors share their expertise with juniors" and "Young Histochemists Awardees" sessions
 - Young Histochemist Award (IFSHC); Travel Award (Int. Federation of Cell Biology); TUBITAK Scholarships for Turkish students, Scholarships for Student members of TSEM; Best Poster awards and Best Micrograph Award
 - Workshops (Details will be announced soon).
- Social mixing environment-just before the start of the congress- for young congress participants during lunch time in June 19, 2016.
- A sponsored company-based exhibition will be organized during the congress.
- Welcome Reception, Gala Dinner on the Bosphorus, "**Free Visit to Dolmabahçe Palace**" and Pre- and post- congress tours are among the highlights of the social programme.

We would like to wish you an interesting and successful ICHC 2016 with lively discussions in a stimulating scientific atmosphere. If you have any questions or need more information about ICHC 2016, please do not hesitate to contact us at.

We are looking forward to welcome you in Istanbul,

Organizing Committee of ICHC 2016

Serap Arbak-President; Selma Yilmazer-Secretary General;
Melek Ozturk-Vice President; Suzan Daglioglu-Vice President

REMINDER

The Abstract Submission
Deadline has been
extended until the
29th of February, 2016

To submit your abstract
please click

[Abstract Submission](#)

The Early Registration
Deadline
29th of February, 2016

To Register please click

[Registration](#)

www.ichc2016.com

Congress Organizer  FIGÜR
ORGANIZER & FACILITATOR



Dear Colleagues, Microscopists, Exhibitors and Sponsors,

We have now opened the [Abstract submission](#) and the [registration](#) procedures for EMC2016. There are 28 scientific sessions planned within the 3 main symposiums: Life Sciences, Instrumentation and Methods, Materials Science. The co-chairs of these sessions have contacted more than 80 invited speakers on the basis of their propositions and of suggestions from the EMC2016 Committees. We are also honoured that 5 internationally recognized scientists have already accepted to attend the conference and give plenary lectures. The programme will be completed by the technical exhibit; this event should be very successful according to the enthusiastic participation of our partners.

In parallel to this, EMC2016 will host the SCUR annual meeting and several specific workshops and round tables.

We also respect the tradition of the EMC Conference series by proposing pre-congress training sessions, which will be organised by research teams from Lyon, Grenoble and St-Etienne with the participation of well-recognized experts attending the Conference.

Last but not least, we aim at promoting the participation of Young Scientists, and EMC2016 is willing to offer [scholarships](#) to our younger colleagues.

Updates of the [programme](#) and further information about all EMC2016 activities will be continually posted on the website. Feel free to [contact us](#) or our PCO partner for any additional details.

Hoping very sincerely to meet you in the beautiful city of Lyon next August!

Dr. Thierry EPICIER
Conference President
For all EMC2016 Committees.



Workshop proceedings
La microscopia elettronica applicata
allo studio dei beni culturali

28-29 Settembre 2015, Università di Urbino

LE NANOPARTICELLE DI $\text{Ca}(\text{OH})_2$ E $\text{Mg}(\text{OH})_2$ NELLA CONSERVAZIONE DEI BENI CULTURALI. PROCEDURA INNOVATIVA DI SINTESI E VALUTAZIONE PRELIMINARE DELLE POTENZIALITÀ APPLICATIVE

Lorenzo Arrizza¹, Giuliana Taglieri²

¹Centro di Microscopia, Università degli Studi dell'Aquila,
²Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione e di Economia, DIIE, Università degli Studi dell'Aquila, L'Aquila (Italia)

E-mail: lorenzo.arrizza@univaq.it
giuliana.taglieri@univaq.it

Dispersioni idro-alcoliche di nanoparticelle di idrossido di calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, comunemente chiamate nanocalce, stanno suscitando sempre maggiore interesse nel settore dei Beni Culturali come materiale eco-compatibile per la conservazione e la protezione di materiali lapidei, malte, stucchi, affreschi e, in generale, per tutti i substrati a matrice carbonatica.¹⁻³ La nanocalce, inoltre, insieme a sospensioni di nanoparticelle di $\text{Mg}(\text{OH})_2$, presenta interessi applicativi nella deacidificazione della carta e del legno, grazie alla loro elevata capacità di penetrazione.⁴

Tuttavia, tali dispersioni sono attualmente prodotte con metodi di sintesi che presentano diversi inconvenienti, quali lunghi tempi di produzione, alte temperature, elevato costo dei reagenti, impiego di solventi organici, passaggi complessi a più fasi, ed una resa finale di produzione bassa che porta a limitare le applicazioni a larga scala.

Nel Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università dell'Aquila è stato brevettato (PCT/IB2013/056195,^{5,6}) un processo di sintesi innovativo, che consente di produrre a temperatu-

ra ambiente, a partire da reagenti economici o rinnovabili e senza passaggi intermedi di lavaggio o procedure particolari, sospensioni pure di nanoparticelle di $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e $\text{Mg}(\text{OH})_2$. In tal senso, il metodo di sintesi brevettato presenta grandi vantaggi in termini di versatilità, abbattimento dei costi, ridotto impatto ambientale e, soprattutto, nella capacità di poter aumentare la produzione di nanoparticelle secondo una procedura ciclica. L'aumento nella produzione permetterebbe di definire, ottimizzare e testare nuovi protocolli per applicazioni di tipo estensivo nell'ambito dei Beni Culturali.

Bibliografia

1. Salvadori B, Dei L. Synthesis of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Nanoparticles from Diols. *Langmuir* 2001;17:2371-4
2. Rodriguez-Navarro C, Ruiz-Agudo E, Ortega-Huertas M, Hansen E, Nanostructure and Colloidal Behavior of $\text{Ca}(\text{OH})_2$: Implications for the Conservation of Cultural Heritage. *Langmuir* 2005;21:10948-57
3. Daniele V, Taglieri G. Synthesis of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nanoparticles with the addition of Triton X-100. Protective treatments on natural stones: Preliminary result., *J Cult Herit* 2012;13:40-6
4. Giorgi R, Bozzi C, Dei L, Gabbiani C, Ninham BW, Baglioni P. Nanoparticles of $\text{Mg}(\text{OH})_2$: synthesis and application to paper conservation. *Langmuir* 2005;21:8495-501
5. Volpe R, Taglieri G, Daniele V, Del Re G. A process for the synthesis of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nanoparticles by means of ionic exchange resin. Patent: Priority RM2011A000370, PCT/IB2013/056195
6. Taglieri G, Felice B, Daniele V, Volpe R, Mondelli C. Analysis of the carbonatation process of nanosized $\text{Ca}(\text{OH})_2$ particles synthesized by exchange ion process. *J Nanoeng Nanosyst* 2014;230:25-31

LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM) E A TRASMISSIONE (TEM) APPLICATA ALLO STUDIO DI CAMPIONI DA FILATI E LEGNO

Sabrina Burattini

Dipartimento di Scienze Biomolecolari (DiSB), Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Urbino (Italia)

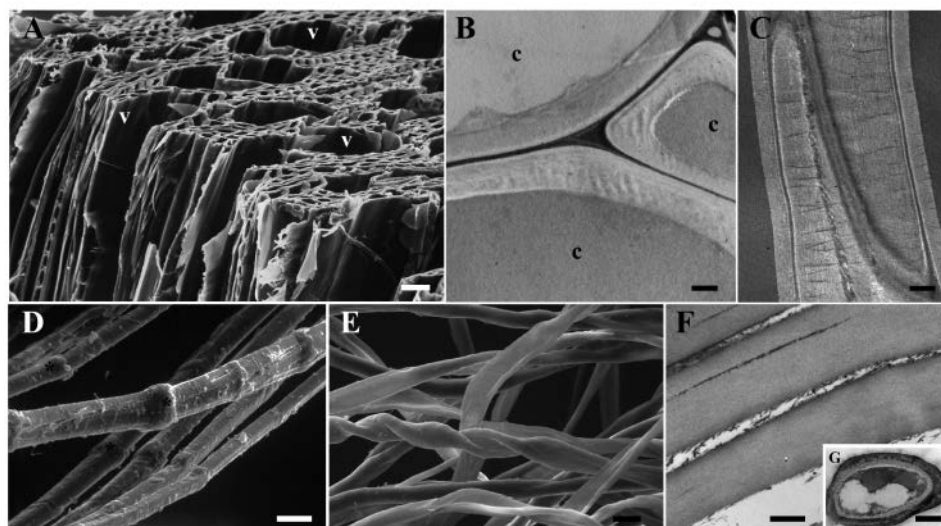
E-mail: sabrina.burattini@uniurb.it

La microscopia elettronica si è dimostrata negli anni parte integrante dei programmi di tutela e valorizzazione del patrimonio dei Beni Culturali, perché fornisce informazioni sulla morfologia ultrastrutturale e sulla composizione chimica elementare degli oggetti d'arte, oltre che sui processi di lavorazione dei materiali, che si rivelano preziose per la programmazione e la realizzazione degli interventi di conservazione e restauro. Lo studio al SEM, attraverso la rapidità di preparazione del campione, l'elevata risoluzione, e la profondità di campo, ci fornisce informazioni sugli aspetti morfologici, sulla natura e sulle proprietà di superficie, sulle modificazioni indotte sia da trattamenti tecnologici che provocate da cause accidentali, per azione di agenti chimici, fisici, meccanici o per esposizione ad agenti naturali. Nel caso di reperti tessili e lignei di interesse storico-artistico, ad esempio, il SEM può essere utilizzato a vari livelli

dell'intervento di conservazione, come l'identificazione della natura del campione attraverso lo studio della morfologia di superficie e l'alterazione della stessa, la caratterizzazione preliminare dello stato di degradazione del substrato, la valutazione dell'efficacia dell'intervento conservativo e lo studio del substrato restaurato al fine di verificare periodicamente lo stato di conservazione (A,D,E).¹⁻³ Invece l'osservazione al TEM, dopo un'opportuna preparazione del campione, grazie all'elevato potere risolutivo, permette l'analisi ultrastrutturale delle strutture interne di cellule e/o tessuti e consente un'indagine qualitativa dello stato di conservazione della struttura dei campioni provenienti da reperti che afferiscono ai più diversi contesti. Inoltre, rappresenta uno strumento particolarmente utile nell'individuazione degli agenti biotici del degrado (ife fungine, spore o altri microrganismi), permettendo di capire/ricostruire la storia del manufatto e aiutando ad impostare un corretto progetto di restauro e musealizzazione (B,C,F).⁴⁻⁶

Bibliografia

1. Jansen S, Baas P, Gasson P, Lens F, Smets E. Variation in xylem structure from tropics to tundra: evidence from vestured pits. *Proc Natl Acad Sci*



Osservazione al SEM (A, D,E) e al TEM (B,C,F,G) di legno (A-C) e filati (D-G). A, frammento di legno. Sono visibili numerosi vasi (v). B, legno in sezione trasversale, c = citoplasma. C, sezione longitudinale di legno di una tracheide. D, fibre di lino. Sono visibili numerosi nodi (*). E, fibre di cotone. F, cotone in sezione longitudinale. G, cotone in sezione trasversale.

- USA 2004;101:8833-7.
- Axsmith BJ, Andrews FM, Fraser NC. The structure and phylogenetic significance of the conifer *Pseudohirmerella delawarensis* nov. comb. from the Upper Triassic of North America. *Rev Palaeobot Palynol* 2004;129:251-63.
 - Long RL, Bange MP. Consequences of immature fiber on the processing performance of Upland cotton. *Field Crops Res* 2011;121:401-7.
 - Hellgren JM, Olofsson K, Sundberg B. Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol* 2004;135:212-20.
 - Zhong R, Ye Z-H. Transcriptional regulation of wood formation in tree species. In *Cellular Aspects of Wood Formation*, vol 20, Fromm J ed (Heidelberg, Germany: Springer Berlin), 2013, pp. 141-58.
 - Pedersen NB, Schmitt U, Koch G, Felby C, Thygesen LG. Lignin distribution in waterlogged archaeological *Picea abies* (L.) Karst degraded by erosion bacteria. *Holzforschung* 2014;68:791-8.

SIMULAZIONE TIPO MONTECARLO APPLICATA AI BENI CULTURALI

Alberto Conventi

Laboratorio Analisi Materiali Antichi, Sistema dei Laboratori, Università IUAV di Venezia, Venezia (Italia)

E-mail: alberto.conventi@iuav.it

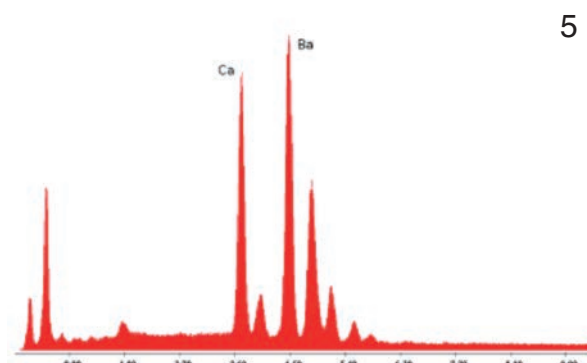
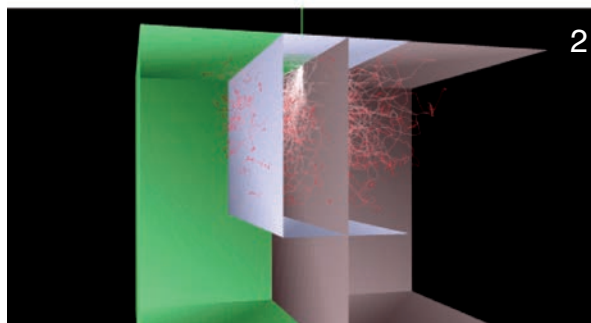
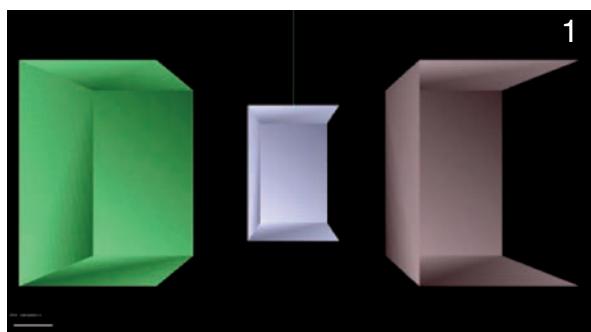
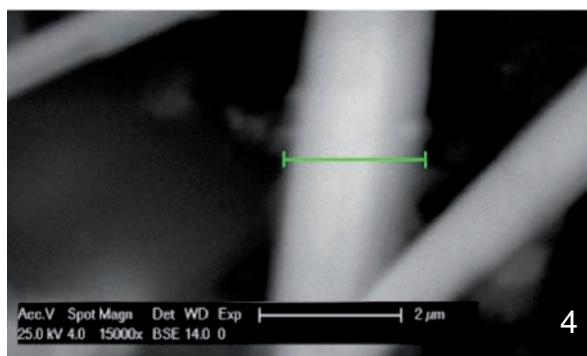
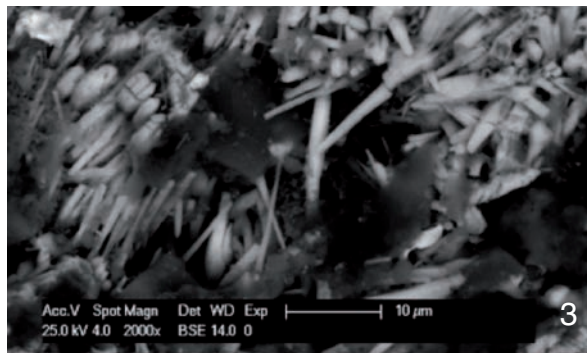
È stata sviluppata una simulazione del microscopio elettronico che permette di visualizzare il

comportamento degli elettroni in un campione costituito da fasi diverse. Si è poi verificata, con successo, la possibilità di utilizzare la simulazione per ottimizzare le condizioni sperimentali reali.

Descrizione del software sviluppato

Il software è stato sviluppato utilizzando il linguaggio di programmazione C++ e l'interfaccia di programmazione OpenGL con le librerie freeGLut.

È possibile assemblare un campione costituito da tre parallelepipedi (Figura 1) di dimensione e composizione diversa. Il fascio di elettroni a ener-



gia variabile è visualizzato in tre dimensioni e con colore variabile dal bianco, quando ha energia massima pari all'energia del fascio incidente, al rosso intenso quando ha energia vicina a zero. Il campione può essere ruotato e ingrandito (Figura 2). Il software è stato poi testato su casi noti, confrontando i risultati della simulazione sia con dati sperimentali su lamine sottili, sia con dati di bibliografia.

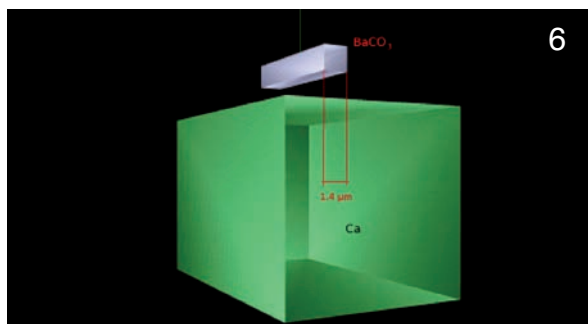
Applicazioni pratiche

Studio di un trattamento con idrossido di bario su pietra di Vicenza. Un primo caso in cui il software ha dato informazioni utili è stato quello dello studio di un trattamento protettivo all'idrossido di bario applicato su un campione di pietra di Vicenza. L'osservazione al microscopio elettronico ha evidenziato la presenza di bario sulla superficie ma anche la penetrazione dello stesso nelle zone più porose e lungo le fessurazioni del supporto lapideo. Una osservazione ad ingrandimenti più alti ha evidenziato la presenza di cristalli aghiformi (Figure 3-4) che analizzati hanno mostrato una composizione mista con la presenza di bario e calcio (Figure 4-5).

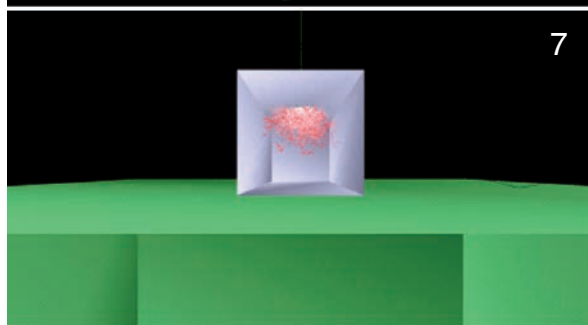
L'analisi è stata effettuata a 25 keV e quindi parte del segnale del calcio proveniva certamente dalla matrice della pietra. In questo caso la simulazione ci ha indicato l'energia da utilizzare per misurare solamente la composizione del cristallo. A questo scopo si è costruito un campione virtuale che assomigliasse il più possibile a quello reale su cui erano state fatte le misure.

Un parallelepipedo di carbonato di bario (con le stesse dimensioni del cristallo aghiforme, Figura 6) è stato appoggiato su una matrice di calcio e si è studiato il comportamento a energie diverse. Si è visto che utilizzando l'energia di 15 keV (Figura 7) gli elettroni non escono dal parallelepipedo. Si sono quindi rifatte le misure a questa energia confermando che il cristallo contiene calcio e di conseguenza c'è stata formazione di un carbonato misto di bario e di calcio.

Lamina d'oro di una tessera di mosaico. Un secondo caso in cui la simulazione è tornata utile è lo studio della composizione delle lamine d'oro di mosaici antichi. In particolare la tessera studiata in questo esempio presentava la complicazione che il supporto vetroso conteneva rame e, dato lo spessore della lamina inferiore ai 0,5 micron, il picco del rame era certamente da attribuire alla sua presenza sul supporto; non si poteva però



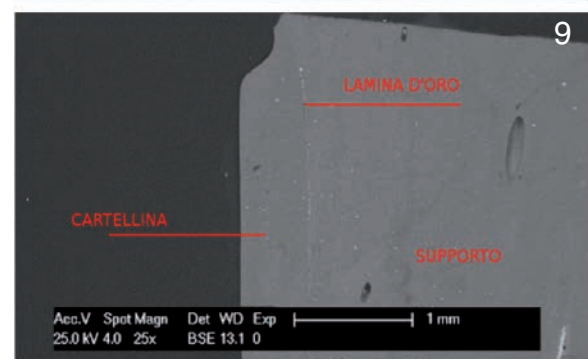
6



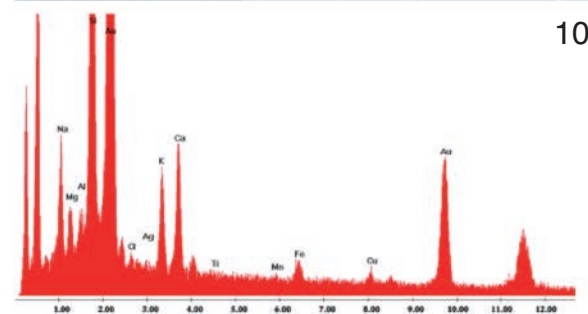
7



8



9

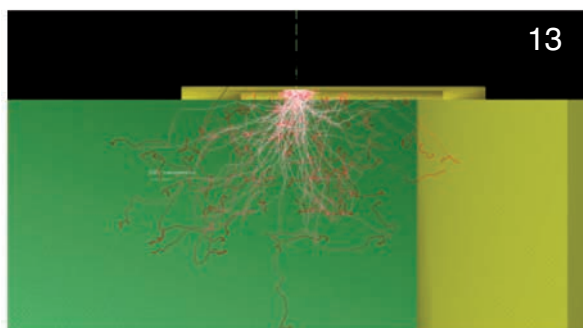
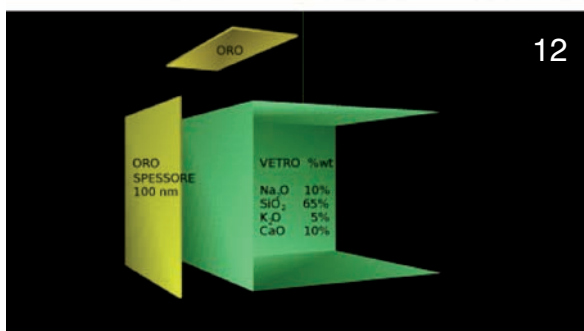
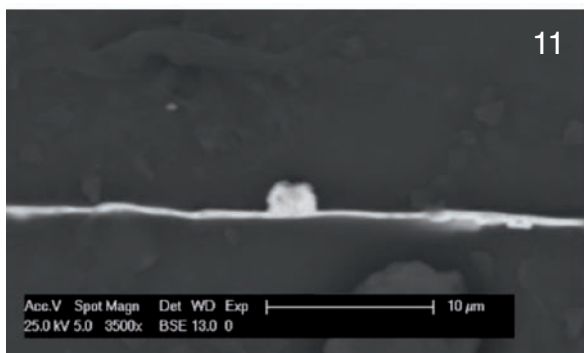


10

escludere che fosse presente anche nella lamina.

La sbavatura della lamina, riportata in Figura 11, unitamente all'utilizzo della simulazione è risultata risolutiva.

Anche in questo caso si è costruito un campione che assomigliasse il più possibile alla situazione sperimentale (Figura 12). Si è verificato che per energie intorno ai 16 keV e posizionandosi sulla sbavatura ad una certa distanza dalla lamina verticale (Figura 13), gli elettroni non penetravano né nel supporto né nella lamina. Si sono quindi eseguite le analisi al microscopio elettronico nelle condizioni simulate, verificando così l'assenza del rame nell'oro.



LA MICROSCOPIA ELETTRONICA IN PRESSIONE VARIABILE (VPSEM): UNA TECNICA DI DIAGNOSTICA NON INVASIVA PER LA CONSERVAZIONE DEI BENI CULTURALI

Paola Croveri

Laboratori scientifici, Centro Conservazione e Restauro "La Venaria Reale" e Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Torino, Torino (Italia)

E-mail: paola.croveri@centrorestaurovenaria.it
<http://www.centrorestaurovenaria.it/>

L'approccio metodologico al restauro dei beni culturali in Italia si contraddistingue per il forte aspetto conservativo non solo della componente estetica ma anche di quella materica. Una particolare attenzione da parte dei responsabili della tutela del patrimonio per la conservazione dei materiali antichi originali e dei materiali di restauro impiegati in passato, testimonianze storiche di abilità tecnologiche da preservare per le generazioni future, ha indirizzato la ricerca scientifica verso lo sviluppo e l'applicazione di tecniche di indagine non invasive e non distruttive. Il rispetto dell'integrità dell'opera e l'impiego di tecniche analitiche che permettono di ottenere informazioni senza effettuare campionamenti microdistruttivi sulle opere d'arte sono requisiti sempre più importanti, spesso richiesti nell'ambito di campagne conoscitive finalizzate ad approfondimenti archeometrici o alla conservazione e al restauro.

L'applicazione della microscopia elettronica in pressione variabile (VPSEM) riveste dunque un ruolo importante nell'ambito dei protocolli di indagini diagnostiche sui manufatti, in quanto permette di effettuare analisi morfologiche e composizionali dei materiali in maniera del tutto non invasiva. Le opere di piccole-medie dimensioni, per le quali il campionamento è generalmente limitato e raramente autorizzato, possono essere caratterizzate e studiate con questa tecnica che non provoca nessuna alterazione superficiale indotta dall'apporto di materiale estraneo (metallizzazione con Au, C, Pt...), senza effettuare microcampionamenti. Al requisito di non invasività della tecnica si aggiungono due caratteristiche che ne aumentano l'applicabilità nel settore dei BBCC, la sua intrinseca non distruttività e l'estrema versatilità nell'indagine di ogni tipologia di materiale (conduttivo e non conduttivo, antico e moderno, organico ed inorganico, biologico, naturale e di sintesi...).

Presso i Laboratori Scientifici del Centro

Conservazione e Restauro le potenzialità analitiche del VPSEM-EDX sono usualmente finalizzate al supporto diagnostico per l'intervento conservativo e alla sperimentazione di materiali e metodi innovativi di restauro (tecniche di pulitura di superfici pittoriche, lapidee, ceramiche, metalliche, tessili, a matrice organica; metodologie di consolidamento di substrati porosi, test di materiali consolidanti e protettivi, naturali e polimerici). L'analisi morfologica delle superfici, combinata alle informazioni composizionali puntuali, fornisce indicazioni sulla natura e sullo stato di conservazione dei manufatti, sulla presenza di materiali di restauro apportati nel corso di intervento pregressi: si esaminano patine, depositi e attacchi in atto di natura chimica o biologica. L'osservazione diretta delle aree di pulitura (tasselli test) permette di stimare l'efficacia della rimozione dei materiali sovrammessi, il rispetto dei materiali originali e la non nocività della tecnica fornendo dei dati per una valutazione scientifica oggettiva delle metodologie di intervento impiegata. Un esempio applicativo è riportato in Figura 1 dove si può osservare la superficie di una microscultura in avorio delle dimensioni di pochi

millimetri, la cui porzione di sinistra ha subito un trattamento di pulitura mediante laser Nd:YAG. I depositi superficiali sono stati rimossi e la morfologia superficiale dell'avorio non presenta segni di alterazione, tuttavia la permanenza di ife fungine anche sulla zona pulita con il laser indica che tale trattamento risulta inefficace per la rimozione specifica dei biodeteriogeni e che risulta necessario integrare l'intervento con un trattamento biocida ad hoc.

Bibliografia

- Stokes, DJ. Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9780470758731.ch2, 2008
- Araldi di Balme C, Croveri P, Luciani P, Poli T, Ravera M. Il restauro del "Trofeo militare" di G.M. Bonzanigo (1797-1802): scelte di pulitura con il laser dei materiali tessili e della microscultura (2009) in Atti VII Convegno Nazionale IGIIC Gruppo italiano dell'International Institute for Conservation "Lo stato dell'arte 7", 8-10 Ottobre 2009, Napoli, pagg.245-52

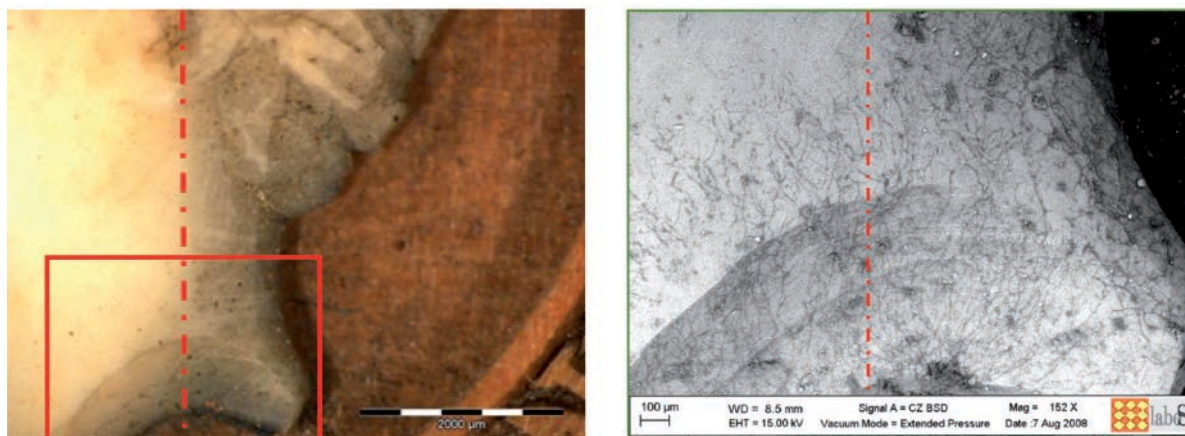


Figura 1. Osservazione in microscopia ottica (MO, a sx) e microscopia elettronica in pressione variabile (SEM-VP a dx, 20 Pa) di una microscultura in avorio, finalizzata alla valutazione degli effetti di pulitura mediante laser Nd:YAG delle superfici. La linea tratteggiata delimita la superficie pulita (a sx) da quella non pulita (a dx). L'immagine SEM-VP evidenzia la presenza di una "ragmatela" di ife fungine estesa sulla superficie di avorio.

IL SEM IMPIEGATO COME “PROVA DEL NOVE” PER IL RICONOSCIMENTO DELLE FIBRE TESSILI

Maria Benedetta Fazi, Maria Paola Salvarani

Scuola di Conservazione e Restauro, DiSBEF, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Urbino (Italia)

*E-mail: maria.fazi@uniurb.it
mariapaola.salvarani@uniurb.it*

Si definiscono tessili tutti quei prodotti costituiti da fibre che possono essere trasformate in filati e successivamente tessute secondo i diversi sistemi di intreccio. In base alla diversa origine questi filati possono essere considerati naturali, artificiali e sintetici¹. Questo lavoro sottolinea l'importanza del riconoscimento delle fibre tessili in rapporto al loro utilizzo come supporto per le pitture.

Il supporto tessile veniva impiegato già tra il I e il III secolo d.C., si conoscono infatti molti esemplari di ritratti funerari - ritratti del Fayum - dipinti a tempera su tele di lino². Durante tutto il Medioevo, fatta eccezione per gli stendardi (dopo il 1260), il supporto tessile non viene impiegato in modo autonomo ma piccole pezze di tela sono utilizzate per la preparazione delle tavole, principalmente lungo le giunture, così da migliorare le proprietà elastiche del tavolato e preservare gli strati pittorici. Il *Libro dell'Arte* di Cennino Cennini dà indicazioni sui supporti tessili nel capitolo CLXII «*Ora parliamo del modo di lavorare in tela, cioè in panno lino o in zendàdo[...]*». In Italia la comparsa della tela come supporto per i dipinti mobili avviene a metà del XV secolo, ne è un esempio il *S. Giorgio e il drago* di Paolo Uccello del 1460 c.a.; Andrea Mantegna è l'autore dei più antichi dipinti su tela, tra cui la *S. Eufemia* firmata e data al 1454. La pittura su tela si diffonde molto rapi-

damente in ambito veneto, i pittori riconoscono presto vantaggi quali la facilità di trasporto e la possibilità di impiego di nuovi medium pittorici come l'olio. Fino al XIX secolo le fibre maggiormente impiegate per i dipinti su tela sono il lino e la canapa oltre alla seta, principalmente in Oriente. La diffusione di queste fibre, rivelatesi idonee come supporti tessili per pittura dipende comunque anche dall'incremento della loro produzione industriale.

Da fonti ottocentesche relative alla pittura inglese emerge la preferenza per il lino, indicato come la fibra più in uso per la fabbricazione di tele utilizzate per dipingere e ritenuta migliore rispetto alla canapa che viene però apprezzata in ambito francese. Nel *Manuel des jeunes artistes et amateurs en peinture* del 1827, Bouvier la raccomanda infatti per superiore tenacità e, dallo studio delle fonti, si deduce che la tela di canapa è il supporto ricorrente nei dipinti dei secoli XVII e XVIII fino agli inizi del secolo successivo. All'inizio dell'Ottocento la produzione canapiera subisce una leggera flessione favorendo la produzione del lino, che rimarrà il supporto più impiegato per tutto il XIX secolo. La juta fa il suo ingresso a metà del XIX secolo quando gli artisti la prendono in considerazione come possibile supporto per la pittura; Van Gogh, Gauguin e gli espressionisti tedeschi, grazie alla sua economicità e alla peculiare superficie grezza, ne iniziano l'impiego omettendo gli strati preparatori e stendendo, direttamente sul supporto, la pittura.

L'uso di fibre ad elevato contenuto di lignina e l'assenza degli strati preparatori causano però un rapido deterioramento delle opere, ne è prova infatti lo stato precario dei dipinti che utilizzano questa tecnica.

¹I filati e i tessili sono soggetti a normativa merceologica. L'8 maggio 2012 è entrato in vigore il nuovo Regolamento (UE) n. 1007/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 settembre 2011 «relativo alle denominazioni delle fibre tessili e all'etichettatura e al contrassegno della composizione fibrosa dei prodotti tessili e che abroga la direttiva 73/44/CEE del Consiglio e le direttive del Parlamento europeo e del Consiglio 96/73/CE e 2008/121/CE.» Svolgono attività di vigilanza, oltre alla Camera di Commercio, anche Polizia Municipale, Guardia di Finanza ecc. Ad oggi le attività di vigilanza dei filati sono legati, ovviamente, al loro commercio. Nell'esercizio dell'attività di vigilanza e di prelievo campioni il controllo può essere di tre tipi: visivo/formale, documentale, materiale sul prodotto, con esecuzione di analisi di laboratorio a seguito di prelievo.

²La scelta del supporto, tessile o ligneo, è determinata dal momento di esecuzione del ritratto, precedente o successivo alla morte.

³I filati prima dell'analisi al Microscopio Elettronico a Scansione, sono stati montati con scotch di carbone biadesivo su stubs e ricoperti d'oro mediante sputtering. L'osservazione è avvenuta con microscopio elettronico a scansione SEM Philips515. Le analisi sono state eseguite dalla dott.ssa Sabrina Burattini, Dipartimento di Scienze della Terra, della Vita e dell'Ambiente (DiSTeVA), Sezione Morfologia e Tecnologie per la Salute, Campus Scientifico "Enrico Mattei", Università degli Studi di Urbino Carlo Bo.

In questa sede si vuole illustrare un metodo alternativo per il riconoscimento del filato e impiegare l'analisi al Microscopio Elettronico a Scansione come prova per l'attendibilità del metodo stesso. La sperimentazione proposta è finalizzata all'individuazione chimica del grado di lignificazione della fibra.

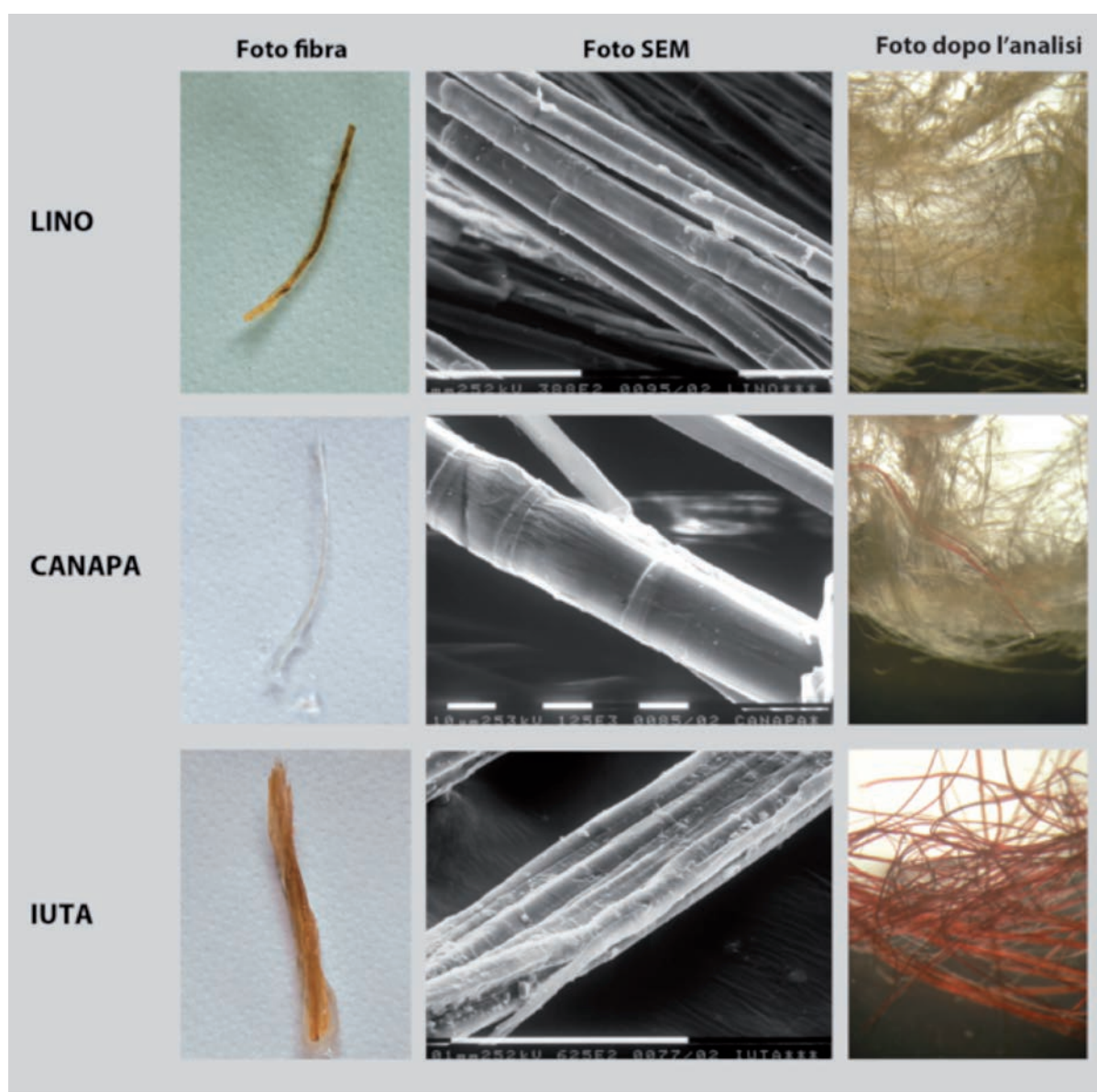
L'analisi è stata eseguita su campioni identificati

di lino, canapa e juta, dapprima osservati al SEM³ e successivamente trattati chimicamente.

L'indagine chimica⁴ è stata effettuata con la seguente procedura:

- I campioni sono stati immersi per qualche ora in alcool denaturato per pulire le fibre da eventuali impurità.
- Dopo il risciacquo con acqua demineralizzata

⁴L'analisi laboratoriale è stata effettuata con la collaborazione del prof. Luca Giorgi, Dipartimento di Scienze di Base e Fondamenti (DISBEF) Laboratorio Istituto di Scienze Chimiche "Prof. Fabrizio Bruner", Università degli Studi di Urbino Carlo Bo.



Prima colonna: Foto delle fibre prima dell'analisi chimica. Seconda colonna: Foto al SEM. Terza colonna: Foto delle fibre dopo l'analisi chimica

sono stati tagliati, sfibrati e cosparsi con qualche goccia di permanganato di potassio (KMnO_4) diluito in acqua all'1% per 1 minuto. Alla fine del trattamento le fibre hanno assunto una colorazione bruno-rossiccia.

- L'eccesso di soluzione è stato rimosso tamponando con carta assorbente e le fibre risciacquate due volte con acqua.
- Per sbiancare le fibre sono state utilizzate alcune gocce di acido cloridrico (HCl) 5M. Eliminato l'eccesso di acido con carta assorbente le fibre, già evidentemente decolorate, sono state lavate due volte con acqua.
- Ogni campione è stato trattato con alcune gocce di ammoniaca (NH_3) concentrata (35%).

Le tre fibre al termine della prova si sono colorate in modo differente: il lino ha mantenuto una colorazione bianco-gialla, alcune fibre della canapa sono diventate di un tono rosato mentre le fibre della iuta si sono colorate di un rosso acceso.

Le medesime indagini sono state eseguite su una fibra sconosciuta di un dipinto del XVII secolo così da poter verificare i dati incrociati e l'attendibilità del metodo. Il campione prelevato dal bordo destro della tela è stato sottoposto alla prova chimica. La fibra non si è colorata al termine della sperimentazione e quindi si è supposto fosse di lino. A conferma è seguita l'osservazione al SEM che ha potuto confermare la specie.

L'analisi qualitativa eseguita, finalizzata alla individuazione del diverso grado di lignificazione delle fibre vegetali, ha dimostrato che, ad una maggiore presenza di lignina, corrisponde una più decisa colorazione rossastra dei campioni.

Come già evidenziato, l'utilizzo dei supporti su

tela in pittura si differenzia nel corso dei secoli e il riconoscimento delle fibre tessili può contribuire a fornire indicazioni sulla datazione e collocazione dei dipinti.

Le fibre contenenti una maggior quantità di lignina risultano più sensibili al degrado, conseguentemente i dipinti eseguiti su supporti in juta e, a seguire, quelli in canapa necessitano una maggiore manutenzione. I supporti in lino, al contrario, sono quelli che meglio si conservano nel tempo.

Bibliografia

- Rinaldi S. Storia tecnica dell'arte. Materiali e metodi della pittura e della scultura (secc. V-XIX). Carocci Editore, 2011
- Cennini C. Il libro dell'arte. A cura di F. Frezzato, Neri Pozza Editore, Vicenza, 2003
- Caramiello R, Arobba D. Analisi di fibre tessili di origine vegetale in Manuale di Archeobotanica. Metodiche di recupero e studio. In F. Angeli, CNR-Progetto finalizzato Beni Culturali, Milano, 2003
- AA.VV. I supporti nelle arti pittoriche. Storia, tecnica, restauro. A cura di C. Maltese, vol. II, Mursia, 1990
- Barbera A, Albertazzi PG. Guida informativa di merceologia e chimica tessile: il mondo delle fibre intavole sinottiche. Zanichelli, Bologna, 1985
- AA.VV. Identification of textile materials, Ed. Textile Institute, Manchester, 1985, Seventh Edition
- Maltese C. Le tecniche artistiche. vol. II, Mursia, 1985
- Gay MC, Monroco R. Identification des fibres textiles naturelles par examen microscopique. Laboratoire de recherche des musées de France, 1972
- Bertoli P. Manuale delle fibre tessili. Etas Kompass, Milano, 1967

NUOVE TECNOLOGIE ED IL SEM-EDS NELLA DIAGNOSTICA NON TRADIZIONALE

Daniela Ferro

Istituto per lo Studio dei Materiali (ISMN) del CNR, Roma (Italia)

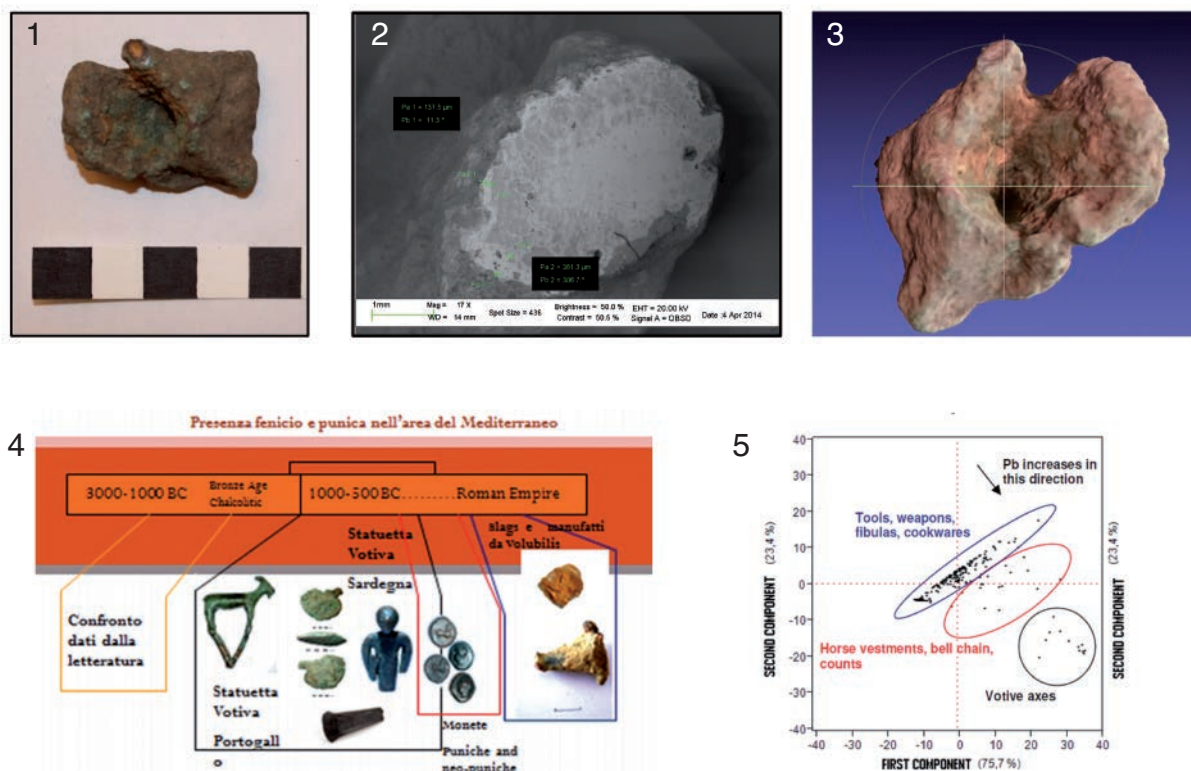
E-mail: daniela.ferro@ismn.cnr.it

Negli ultimi tempi stiamo assistendo, a quella che possiamo esprimere come una “evoluzione” della ricerca per i Beni Culturali, che deve da un lato rispondere a domande sempre più mirate da parte degli esperti in archeologia e storia dell’arte, dall’altro deve soddisfare le esigenze di una leggibilità immediata dei risultati. Non può essere esclusa da questa considerazione la microscopia elettronica a scansione che è diventata onnipresente in ogni determinazione analitica. Allo stato attuale delle richieste è richiesta anche per tale tecnica un adeguamento nell’ “evoluzione” dello studio dei Beni Culturali che si possono riassumere in: a) superamento dei limiti della diagnostica tradizionale, b) gestione di una grande mole di dati da fonti disomogenee, c) creazione di strumenti per conservatori scientifici / archeologi, d) fruizione non banale dei dati scientifici, e) lettura colta dell’oggetto in mostre ed esposizioni museali. Un esempio per ciascun argomento può illustrare meglio il concetto legato ad un utilizzo più attuale

della microscopia elettronica.

Un esempio del primo argomento è lo studio riguarda esemplari di *aes rude* (Figura 1) rinvenuti in contesti votivi e funerari nella zona meridionale del santuario etrusco di Pyrgi, che vanno dal V al III-II secolo a.C. Devono il nome alla loro forma irregolare ed al metallo costituente Cu (o sue leghe). Hanno varie forme e dimensioni ed il loro valore è legato ad un preciso sistema di pesi. La determinazione del loro peso originale, quindi, gioca un ruolo significativo per la definizione del sistema ponderale/pre-monetale. Gli archeologi basano i loro studi su semplici misurazioni con bilance, ma alterazioni del metallo rendono la misurazione improbabile. Lo studio SEM EDS consente di individuare la zona corrosa e le specie metalliche presenti (Figura 2), ma tuttavia, ricorrere alla formula per la densità $d = m/V$ (m, massa, V, volume) per risalire alla massa originaria rimane impossibile per l'impossibilità oggettiva della valutazione del volume. La difficoltà è superabile con l'utilizzo di software sviluppati per le stampanti 3D, (Figura 3) la cui misurazione in voxel ha consentito di passare da un peso in bilancia di 34,46 g a 63,5 g effettivi dell'oggetto nello stato originario.

Per il superamento di una comprensione ed immediatezza delle molteplici analisi EDS, può essere dato considerando i numerosissimi studi



archeometallurgici su manufatti antichi, ad esempio della tarda Età del Bronzo-prima Età del Ferro nelle regioni Sud-Ovest della penisola iberica. Le analisi composizionali riguardano ogni singolo reperto, ma per delle considerazioni sulle produzioni locali o alloctone per la definizione di traffici commerciali o sviluppo culturale basato sulla conoscenza, tra le altre, delle tecniche metallurgiche è necessario un confronto di dati. Un esempio è dato da parte di uno studio per la cronologia, di classi di oggetti (utensili o oggetto decorativo) (Figura 4) e composizione (Cu, Sn, Pb, As, Fe). Sono stati raccolti più di 500 e analizzati statisticamente tramite PCA (Figura 5). Il risultato è evidente e di lettura immediata in quanto si osserva lungo la linea del contenuto di piombo nel bronzo come ci sia una conoscenza delle proprietà meccaniche delle leghe bronzee per l'aggiunta di quantità precise di piombo, passando dalla realizzazione di armi ad oggetti per uso culturali.

Altre combinazioni tra studi SEM-EDS e nuove tecnologie riguardano l'interfacciamento con programmi di analisi di immagine per poter seguire in dettaglio anche le minime variazioni delle dimensioni delle decorazioni artistiche in reperti preziosi, o con programmi che consentano di rendere le immagini ottenute da specifici detector fruibili ad un pubblico che viene così accompagnato verso una lettura più intima dell'oggetto antico, entrando nei segreti della sua realizzazione e della sua materia.

Ringraziamenti

Gli esempi sono tratti da studi condotti con Angela Celauro, Valerio Graziani, Roberta Sulpizio.

STUDIO DI MATERIALI METALLICI DI INTERESSE ARCHEOLOGICO E STORICO-ARTISTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE

Gian Luca Garagnani, Elefra Fabbri

Dipartimento di Ingegneria, Università di Ferrara (Italia)

E-mail: gian.luca.garagnani@unife.it

Lo studio dei manufatti metallici di interesse archeologico e storico-artistico effettuato per mezzo delle metodologie di indagine chimica e strutturale, sia tradizionali che innovative, può fornire all'archeologo ed allo storico dell'arte un sicuro aiuto di tipo strumentale per la lettura dei reperti. È possibile in questo modo conoscere la struttura cristallina dei metalli e delle leghe, evidenziarne le caratteristiche ed i difetti, e risalire alle tec-

nologie di fabbricazione. In tal modo, analizzando anche la composizione chimica del materiale, si possono ricavare indicazioni riguardanti la provenienza ed altre informazioni utili per l'inquadramento storico e artistico dei manufatti studiati, risalenti alla più remota antichità od a tempi storici relativamente recenti.

Le indagini chimiche e microstrutturali permettono anche di conoscere l'influenza che possono aver avuto le condizioni ambientali sulle alterazioni dei reperti nel corso del tempo. Le indagini archeometriche, come oggi vengono comunemente definite le metodologie analitiche applicate ai Beni Culturali, sono quindi indispensabili per conoscere lo stato di conservazione delle opere d'arte in metallo, per risalire ai meccanismi di degrado e per definire i necessari interventi di restauro, in vista di una migliore conservazione del patrimonio artistico.

Lo studio dei metalli antichi è iniziato in coincidenza con la nascita della chimica moderna: già nel XIX secolo gli antichi reperti hanno suscitato l'interesse dei chimici, i quali analizzavano i manufatti, sia per determinarne la composizione quantitativa, che la datazione e la provenienza. È però solo negli ultimi decenni che l'archeometallurgia è divenuta un argomento di ricerca ufficiale, portato avanti da istituzioni adeguate e con il necessario bagaglio di conoscenza ed esperienza, con regolari contatti tra ricercatori ed educazione formale di studenti. Contemporaneamente è cresciuto l'interesse degli studiosi di formazione umanistica per questo tipo di problematiche e per le informazioni in tal modo raggiungibili. Infatti solo mediante uno studio integrato scientifico-umanistico è possibile raggiungere risultati approfonditi, per una migliore fruizione delle conoscenze acquisite.

Oggi gli studi e le analisi sui manufatti metallici vengono condotti con sempre maggior interesse, ma dovrebbero divenire prassi consolidata, funzionale non solo alla conoscenza, ma anche alla corretta conservazione. Le indagini archeometallurgiche, preliminari e complementari alle operazioni di restauro, vengono oggi impiegate dopo una opportuna messa a punto per quanto riguarda le metodologie operative mediante tecniche sempre più sofisticate, fino ad ora impiegate per i materiali metallici innovativi di interesse industriale.

L'applicazione di queste tecniche su reperti archeologici impone la soluzione preliminare di alcuni problemi. Infatti, data l'unicità dei beni oggetto di studio, è preferibile disporre di "tecniche non distruttive", tali cioè da fornire il maggior numero di dati senza danneggiare il manufatto ed avere indicazioni fondamentali su difetti ed altera-

zioni presenti nel materiale, anche se in modo più qualitativo che quantitativo.

Le tecniche oggi impiegate, grazie anche al loro continuo perfezionamento, richiedono frammenti di sempre minor entità (qualche milligrammo di peso o qualche mm² di superficie). Sono molti i metodi appartenenti a questa categoria (tecniche “paradistruttive”) e tra tutti si possono ricordare le analisi microstrutturali mediante microscopia ottica ed elettronica a scansione, la microanalisi elettronica a raggi X, la microdiffrazione.

Nello studio dei manufatti finiti è necessario porre grande attenzione su un altro aspetto importante quale è la scelta della zona da esaminare e del punto di prelievo del campione. Due sono le esigenze contrastanti da far convergere, o quantomeno da soddisfare nel migliore dei modi e cioè: a) il fatto che talvolta anche l’asportazione di un piccolo campione può causare danno all’oggetto; b) la considerazione che la significatività delle analisi è correlata non solo al numero dei prelievi, ma anche alla localizzazione della zona da studiare che, spesso, deve essere scelta in funzione dalla tecnica di fabbricazione del manufatto.

I risultati che ci si possono attendere dall’uso coordinato delle tecniche di analisi sopra citate nello studio di reperti metallici sono molteplici. Lo studio della composizione chimica delle singole impurezze e degli elementi in tracce, piuttosto che quella dell’intero manufatto, diventa estremamente interessante per avere informazioni sul livello tecnologico raggiunto nelle operazioni di fusione e raffinazione del metallo. Qualsiasi manufatto metallico conserva infatti non solo il ricordo delle tecniche di lavorazione, ma anche, almeno a livello di impurezze, un preciso ricordo del minerale costituente la materia prima: è quindi talvolta possibile individuare le miniere di probabile provenienza (minerale → metallo puro → lega → oggetto finito) e conoscere il ruolo dei vari popoli e civiltà nel commercio dei minerali e dei metalli nel mondo antico. Inoltre, dall’analisi della composizione chimica delle leghe e delle patine superficiali, è possibile stabilire se i reperti sottoposti ad indagine siano originali o falsificazioni più recenti.

L’utilizzo di una vasta gamma di tecniche analitiche consente quindi di valutare al meglio lo stato di conservazione e le cause dell’eventuale degrado dei reperti, permettendo così di ottimizzare la scelta delle strategie di intervento per una più accurata salvaguardia del patrimonio culturale attraverso azioni preventive di conservazione e a tecniche di restauro sempre più innovative.

Bibliografia

- Garagnani GL, Spinedi P, Baffetti A. Caratterizzazione microstrutturale ed analisi chimiche dei reperti metallici. Catalogo della mostra “Vulcano a Mezzano (Insediamento e produzioni artigianali nella media Valle del Fiora nell’età del Bronzo), maggio 1993, Comune di Valentano Ed. 1993; pp. 87-95.
- AA VV. La Metallografia nei beni culturali. A cura di Cavallini M. e Montanari R. CNR – Progetto Finalizzato Beni Culturali; AIM - Associazione Italiana di Metallurgia, Milano 2003.
- Scott DA. “Metallography and microstructure of ancient and historic metals” The Getty Conservation Institute. The J. Paul Getty Museum. Archetype Books 1992.
- Garagnani GL, Imbeni V, Martini C. Analisi chimiche e microstrutturali di manufatti in rame e bronzo dalle Terramare. In “Le Terramare - La più antica civiltà padana”, Electa, Milano 1997; pp. 554-66.
- Tylecote RF. A History of Metallurgy. The Institute of Materials, London 1992.
- Acquaro E, Martini C, Prandstraller D, Savio G, DeSandre G, Garagnani GL. Archaeometallurgical studies on Tharros craftsmanship. Proc Int Conference “Archaeometallurgy in Europe”, Milano, 24-26 settembre 2003. AIM, Milano 2003;2:137-46.
- Martini C, Chiavari C, Ospitali F, Grazi F, Scherillo A, Soffritti C, Garagnani GL. Investigations on a brass armour: authentic or forgery? Mater. Chem. Phys 2013;142:229-37.
- Soffritti C, Fabbri E, Merlin M, Garagnani GL, Monticelli C. On the degradation factors of an archaeological bronze bowl belonging to a private collection. Appl. Surf. Sci. 2014;313:762-70.
- Soffritti C, Fabbri E, Fortini A, Merlin M, Garagnani GL. Fakes in African art: study of a reliquary figure (Mbulu-Ngulu) from Gabon. La Metallurgia Italiana (Int J It Ass Metall) 2015;4:9-13.

L'OCCHIO DEL SEM NELLA PITTURA MODERNA E CONTEMPORANEA. CASI STUDIO E CONSIDERAZIONI ANALITICHE

Giancarlo Lanterna

Laboratorio Scientifico MiBACT - Opificio delle Pietre dure, Firenze (Italia)

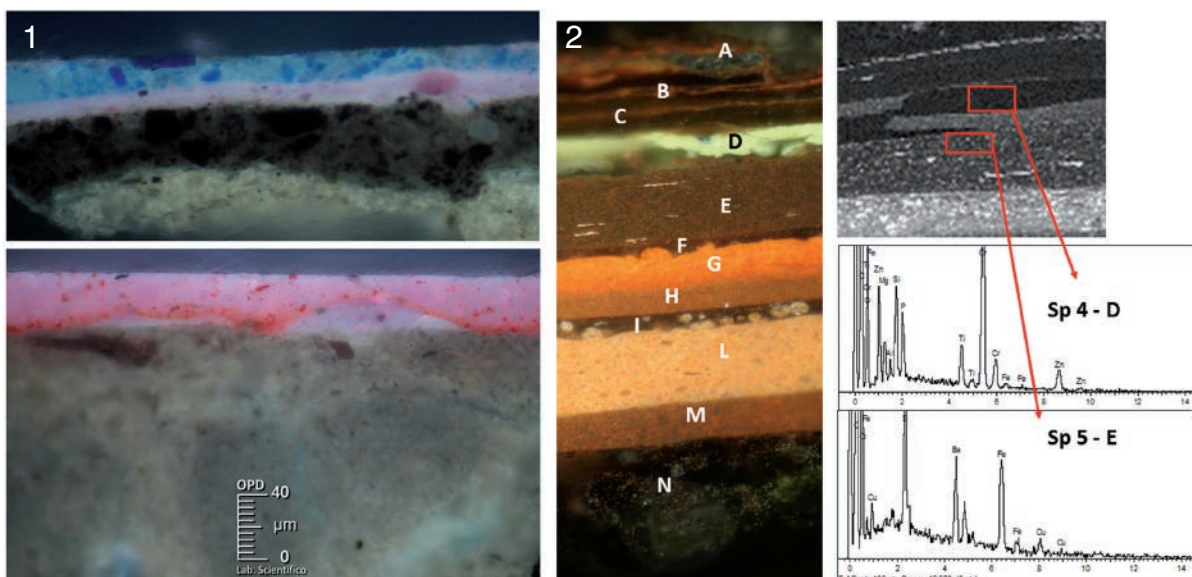
E-mail: giancarlo.lanterna@beniculturali.it

Il valore intrinseco del microscopio elettronico a scansione (SEM) e delle sue possibilità analitiche nel campo dello studio dei materiali artistici, specialmente i dipinti, è indubbio e consolidato. Numerosi protocolli di analisi vedono il SEM come strumento di punta nella delucidazione dei componenti principali degli strati pittorici. In particolare modo le analisi sulle sezioni stratigrafiche (le cross-sections) evidenziano gli elementi costitutivi: è insostituibile specialmente per i pigmenti poiché è capace di individuarne gli elementi distintivi esattamente nei singoli strati della successione di stesure. Numerosissime sono le opere e gli autori di cui l'Opificio si è occupato durante i suoi 40 anni di attività, e molti esempi di analisi al SEM su pitture sono riportati nella pubblicazione annuale "OPD restauro" e su monografie dedicate a singoli restauri importanti (tra gli ultimi "La Muta" di Raffaello, "Venere e Amore" di Tiziano, la "Pala di San Zeno" di Andrea Mantegna.¹

Parlando di materiali e tecniche artistiche, la pittura tradizionale storica ha due connotazioni precise: la prima riguarda il suo "esistenza", cioè la caratteristica di durare nel tempo; per questo scopo i materiali da impiegare, pigmenti e leganti, erano accuratamente selezionati (talvolta dagli artisti stessi piuttosto che dagli "specialisti") e stesi con perizia tecnica e secolare sapienza (Figura 1);

la seconda concerne la maestria degli artisti per rendere esteticamente un risultato estremamente concreto rispecchiante la realtà. Per l'arte contemporanea le connotazioni sono diverse: la selezione dei materiali non passa più direttamente dallo speciale o dall'artista stesso, ma viene demandata all'industria; non solo, ma spesso vengono usati colori derivanti dalla produzione seriale e destinati alla colorazione di oggetti o manufatti (come gli "house paints" di Jackson Pollock). La tecnica o l'uso di materiali totalmente estranei all'arte (materie plastiche e polimeri, metalli e loro protettivi, carta, minerali) porta ulteriori complicazioni nel quadro degli elementi rilevabili in un dipinto contemporaneo e dilata enormemente le combinazioni di alterazione, degrado e interazione tra tutti questi materiali.

Nel primo esempio presentato ("Rampa del neutrino" di Alice Aycock, ferro dipinto, parco di Villa Celle, Santromato, PT) si documenta la complessa struttura di un'opera in ferro conservata in esterno. Il metallo è stato protetto già in origine e successivamente ha subito almeno altri due interventi con protettivi e convertitori di ruggine. Il SEM ha contribuito a determinare la natura degli elementi presenti negli strati messi in evidenza dalla sezione stratigrafica e a delucidare la successione delle stesure tramite l'osservazione in BSE e le analisi di aree e spot condotte su tutta la stratigrafia (Figura 2). La complessità stratigrafica è assolutamente elevata: oltre ai materiali applicati dall'artista si rilevano numerosi altri strati a base di protettivi per i metalli e di pigmenti, stesi probabilmente per ridare un tono omogeneo ad una vernice a smalto di produzione industriale, notevolmente alterata a causa dell'esposizione all'aperto e

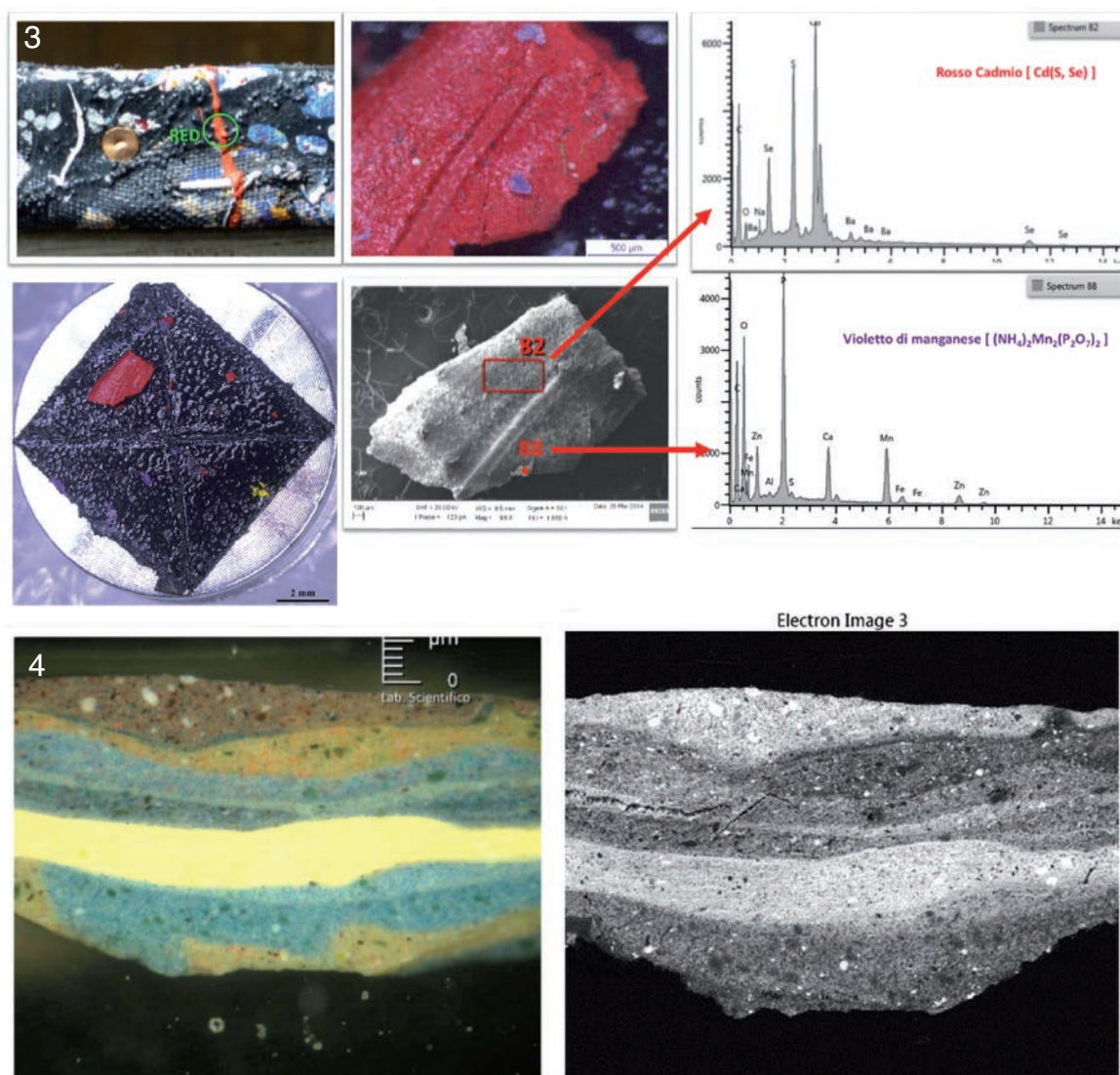


dalle prevedibili variazioni dimensionali della struttura in ferro della scultura (dilatazione/contrazione del metallo) dovuta alle notevoli derive termiche. Da notare l'applicazione pedissequa di strati di protettivi alternati anche quando la superficie originale del metallo resta molto in profondità e i protettivi proteggono solo strati organici (clorocaucciù, colori alchidici).

Nel secondo esempio ("Alchemy" di Jackson Pollock, dripping su tela del 1947, appartenente alla Peggy Guggenheim collection di Venezia), restauro terminato all'inizio del 2015, oltre alla caratterizzazione dei colori, la maggior parte di essi destinati ad applicazioni in campo commerciale o domestico (house paint), il SEM ha contribuito a esplorare a forti ingrandimenti la micro e la nanostruttura del "dripping" che, come in un vortice frattale, all'osservazione a qualsiasi ingrandimento, ottico od elettronico, dei più intimi dettagli della pittura mostra una strutturazione simila-

re. Se un osservatore distingue attentamente ogni singola goccia, o colatura o filamento di colore nei circa due metri quadri del dipinto, l'osservazione con riprese macro consente di apprezzare minuscoli schizzi sulle gocce, con il microscopio ottico si individuano micro gocce sulle precedenti e con il SEM si riescono a caratterizzare delle nanoparticelle di colori diversi sulle microgocce, rassomigliando apparentemente ad una zoomata senza fine che rende questo dipinto ancora più affascinante (Figura 3). Inoltre la caratterizzazione dei materiali costitutivi dei vari strati sovrapposti è stata di ausilio per inquadrare le sovrapposizioni dei materiali radioopachi, in modo da rendere comprensivi i risultati della radiografia del dipinto. Infatti il rilievo dagli spessori estremamente vari, la sovrapposizione e l'alternanza di varie campiture cromatiche deviano l'interpretazione dai canoni usuali della radiografia artistica.

Il terzo caso, la "Maternità", di Gaetano Previati,



grande dipinto ad olio su tela, eseguito nel 1891 con tecnica divisionista, mostra la tremenda stratificazione prodotta da tale tecnica. In questo caso occorre ripensare tutto il protocollo delle analisi non invasive (XRF, tecniche spettroscopiche di superficie, imaging) poiché in casi come questo non si possono ricavare dati utili a chiarificare la composizione e la tecnica del dipinto. Solo un prelievo, ahimè, e gli studi stratigrafici possono tentare di trovare una lettura più oggettiva, sebbene puntuale (Figura 4).

In conclusione, il caso di un dipinto contemporaneo degli anni '60 del novecento, eseguito con colori a olio professionali commerciali. Anche in questo caso ciò che ci si aspetta da un protocollo tradizionale di analisi viene smentito dalle indagini stratigrafiche e le analisi elementali al SEM. Il problema che si pone sempre più stringentemente oggi è quello della natura dei pigmenti. Anche nelle linee più curate e prestigiose dei produttori internazionali di materiali artistici, sono rimaste le denominazioni tradizionali (biacca, rosso cadmio, vermiglione, etc) ed i colori corrispondono effettivamente alle sfumature del "Colour Index" ma la sostanza dei pigmenti e dei colori non è più quella: la legge, la salute e la convenienza, unitamente alla ricerca tecnologica, ha fatto in modo da sostituire la maggior parte dei pigmenti in tubetto (a tempera, a olio) con dei coloranti organici, talvolta precipitati come lacche, tal'altra adsorbiti su bianchi moderni a corpo (Zn, Ti), allo scopo di limitare i costi, eliminare elementi tossici o pericolosi per la salute; pertanto XRF e tecniche di remote sensing non "leggono" più gli elementi dei colori (Pb, Cd, Se, Hg) e la delucidazione dei materiali e della tecnica è fortemente compromessa. Il SEM, insieme a tecniche microspettrofotometriche su sezione, è in grado di discriminare gli elementi relativi al tipo di pittura.

Da questa panoramica sull'arte moderna e contemporanea si avverte che le prossime sfide della scienza della conservazione incroceranno sempre più spesso le strade di questi prodotti, ben diversi da quei materiali, quasi "esclusivi", che gli artisti fino al XVIII sec. erano soliti selezionare, procurarsi e formulare autonomamente.

Uno strumento come il SEM, in mani esperte e fidate, deve contribuire ora più che mai agli studi sulle policromie attuali, un campo certamente irto di difficoltà e nuove sfide diagnostiche.

Bibliografia

1. Collana OPD restauro. CentroDi Ed., Firenze.

ANALISI DI MANUFATTI CARTACEI ATTRAVERSO MICROSCOPIA ELETTRONICA

M. Celeste Leuzzi, Mila Crippa, Giorgio A. Costa

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale (DCCI),
Università degli Studi di Genova, Genova (Italia)*

E-mail: costa@chimica.unige.it

Il lavoro, condotto con l'uso della microscopia elettronica, per il riconoscimento dei materiali nei Beni Culturali, dal team dell'Università degli Studi di Genova è stato svolto con lo scopo di identificare i componenti costitutivi di un reliquiario con *paperoles*, ovvero una teca votiva decorata con ricami di carta. Lo studio diagnostico del manufatto si è focalizzato sul materiale cartaceo che ricopre il fondo della teca, al fine di identificarne la tipologia, la qualità e la manifattura. A tal fine, sono state eseguite delle analisi di microscopia ottica ed elettronica su due campioni, l'uno prelevato dal manufatto e l'altro di produzione industriale. L'uso della microscopia elettronica con EDS è stato esteso al pigmento blu prelevato dal fondo del reliquiario, identificato come smaltino.

Il manufatto in analisi è classificato come arte minore, si tratta di un oggetto di devozione destinato a un pubblico ristretto di fedeli e collezionisti. Si caratterizza per la ricchezza delle decorazioni, eseguite con la tecnica dei *paperoles*¹ sottili strisce di carta dorata arrotolate a imitazione della filigrana. Di antica tradizione nordica, i reliquiari con *paperoles* venivano creati soprattutto all'interno di conventi femminili e maschili. L'opera qui trattata fu realizzata, come sottolineato dalle fonti storiche (registri del Convento della Chiesa della Madonnetta), tra la fine del 1650 e la prima metà del 1700, da suore di clausura presenti sul territorio genovese. Nel reliquiario in nostro possesso, il fondo, caratterizzato da uno strato sottile di smaltino, è stato coperto da una velina in origine di colore rosso, che si presenta in cattivo stato di conservazione, dati i numerosi attacchi di agenti xilofagi. Presenta inoltre zone molto sbiadite.

L'analisi SEM su campioni di carta prelevata nelle zone nascoste dell'opera, ha evidenziato la metodologia di lavorazione della carta. Questa presenta un impasto compatto di fibre, identificate come lino e cotone², spezzate (con ogni probabilità dall'azione dell'*olandese*) e ricoperte di collante (possibile colla di coniglio o di graminacee). La carta di fattura contemporanea, invece, presenta fibre "pulite" e lineari indicative della produzione industriale. Questo risultato ha consentito di riconoscere la metodologia di preparazione della carta del reliquiario, in linea col periodo storico dell'opera e presumibilmente di origine antica³. L'analisi con microscopia elettronica

ed EDS, ha rivelato la natura chimica del pigmento che ricopre il fondo ligneo del reliquiario, classificato come smaltino per la presenza di Co, probabilmente contaminato da As, rilevato in grande percentuale, ma l'identificazione è stata accertata anche attraverso la microscopia ottica. La carta mista lino e cotone, ad oggi, non si trova in commercio, ed è stata sostituita da carta in cotone. Quest'ultima, tuttavia, possiede la stessa grammatura della carta mista e anche la medesima colorazione rossa, ottenuta tramite i fiori di *Hibiscus*.⁴

In conclusione la microscopia elettronica ha permesso di identificare le fibre che costituiscono la carta e il pigmento blu presente sul fondo dell'opera. Questa tecnica affiancata ad altre tipologie di strumentazione offre un eccellente panorama analitico di conferma dei risultati.

Bibliografia

1. AA.VV, Meraviglie di carta - Devozioni creative dai monasteri di clausura, Corraini Edizioni, 2012
2. Martuscelli E. Degradazione delle fibre naturali e dei tessuti antichi, PAIDEIA-Firenze, 2006
3. "Scartafascio" di Mele - campionario del 1887 di carte colorate, conservato presso il Comune di Mele (GE)
4. Vankar et al, J Appl Polym Sci 2011;122:3361-8.

APPLICAZIONE DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA ALLO STUDIO DI BRONZI DORATI A FUOCO

Carla Martini

Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università di Bologna, Bologna (Italia)

E-mail: carla.martini@unibo.it

In questo intervento viene presentato lo studio microstrutturale e compositivo di bronzi dorati a fuoco o ad amalgama di mercurio (preparati secondo la procedura descritta da Cellini nel suo trattato sull'oreficeria del 1568¹), prima e dopo l'invecchiamento accelerato in condizioni che simulano l'esposizione a pioggia stagnante o battente.² Lo studio è motivato dalla necessità di una migliore comprensione dei fenomeni di corrosione nei bronzi dorati, dovuti in termini generali ai difetti presenti nello strato d'oro e al conseguente accoppiamento galvanico Cu/Au. Il fenomeno corrosivo, innescato nei difetti intrinseci della doratura, porta alla crescita di prodotti all'interfaccia Au/bronzo, quindi alla rottura o allo sfogliamento dello strato di oro. Inoltre, in questo lavoro è stata valutata la capacità di riprodurre, mediante invecchiamento accelerato, le morfologie e la stratigrafia tipica della corrosione dei bronzi

dorati, in modo da poter disporre di repliche rappresentative dei casi reali, da usare per la messa a punto di efficaci strategie conservative.³

Questo caso di studio è stato scelto per discutere l'applicazione della microscopia elettronica ai beni culturali perché i bronzi dorati pongono diverse sfide, sia dal punto di vista morfologico (la doratura a fuoco è uno strato relativamente sottile (da 1 a 5 µm circa) a base di un metallo molto duttile, quindi facilmente deteriorabile durante la preparativa metallografica convenzionale), sia dal punto di vista analitico (compresenza di elementi come Au, Hg e Pb, i cui segnali EDS sono parzialmente sovrapposti). Per ovviare ai problemi legati allo spessore e alla deformabilità dello strato dorato, si è fatto ricorso alla preparazione mediante Focused Ion Beam (FIB) milling, mentre per gli aspetti legati alla composizione chimica si è adottato un approccio analitico integrato, comprendente tecniche spettroscopiche sia convenzionali (Glow-Discharge Optical Emission Spectroscopy (GD-OES) e X-ray Photoinduced Spectroscopy (XPS)) che a base di radiazione di sincrotrone (High-Resolution Synchrotron Radiation Photo-Emission Spectroscopy (HR-SRPES), per la mappatura della composizione e dello stato chimico degli elementi indagati⁴).

Le analisi mediante microscopia elettronica in scansione, sia convenzionali che combinate (FIB+FEG/SEM, SEM/EDS+µRaman) hanno permesso di caratterizzare in modo approfondito gli strati di doratura a fuoco, prima e dopo prove di corrosione accelerata, dimostrando la capacità di riprodurre mediante prove di laboratorio le morfologie di corrosione dei materiali di riferimento e contribuendo ad una maggiore conoscenza riguardo ai fenomeni di corrosione in atto in questo sistema.

Bibliografia

1. Cellini B. I trattati dell'oreficeria e della scultura secondo il codice Marciano. Hoepli, Milano, 1927.
2. Chiavari C, Bernardi E, Balbo A, Monticelli C, Raffo S, Bignozzi MC, Martini C. Atmospheric corrosion of fire-gilded bronze: corrosion and corrosion protection during accelerated ageing tests. Corrosion Science 2015, in stampa. <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2015.08.013>.
3. Balbo A, Chiavari C, Martini C, Monticelli C. Effectiveness of corrosion inhibitor films for the conservation of bronzes and gilded bronzes. Corrosion Science 2012;59:204-12.
4. Chiavari C, Bernardi E, Robbiola L, Esvan J, Masi G, Bignozzi MC, et al. Fire-gilded bronze: investigation of the corrosion mechanism by synchrotron radiation (nanoscale XRF and XPS). EMRS Spring Meeting, Lille, 1-15 Maggio 2015.

**TRA LE ANTICHE PIETRE PREZIOSE:
IL CONTRIBUTO DELLE INDAGINI SEM-EDX
ALLA CONOSCENZA DEI MATERIALI
E DEL LORO USO**

Pasquino Pallecchi

Soprintendenza Archeologia della Toscana

E-mail: pasquino.pallecchi@beniculturali.it

Nel quattrocento Cosimo il Vecchio inizia una raccolta di gemme antiche a partire, forse, da quelle acquisite dall'eredità dell'amico Niccolò Niccoli morto nel 1437; la raccolta sarà poi incrementata dai figli e dal nipote Lorenzo il Magnifico. L'originaria provenienza di queste gemme è assai varia e spesso incerta: alcune erano state rinvenute nelle sepolture romane, altre provenienti dalla Grecia e dal Medio Oriente per mano dei crociati dopo il sacco di Costantinopoli del 1204 oppure tramite mercanti veneziani o i profughi greci in fuga verso occidente dopo la caduta di Costantinopoli ad opera dei turchi nel 1453. Oltre alla raccolta delle gemme antiche i Medici promuovono anche la produzione glittica a Firenze con nuovi artisti come Giovanni delle Corniole (1470-1516), autore di un ritratto di Lorenzo il Magnifico eseguito in una piccola corniola. Parte delle gemme più antiche di questa collezione nel 1537 furono ereditate da Margherita d'Austria poi confluite nelle raccolte borboniche ora al Museo Nazionale di Napoli. La raccolta medicea comunque sopravvive e si arricchisce anche sotto Ferdinando I il quale continua l'opera di inserimento di cammei e intagli in nuove montature in oro. La realizzazione di alcune di queste ultime

sono riconducibili a Benvenuto Cellini e ad altri artisti dell'epoca che lavorano anche all'integrazione di intagli e cammei frammentari utilizzando lo stesso oro o fantasiose composizioni in vetro e vernici.

La parte più antica di questa collezione, conservata nel Museo Archeologico Nazionale di Firenze, alcuni anni fa è stata oggetto di una vasta campagna diagnostica finalizzata a precisare le caratteristiche materiche delle pietre e delle montature di ciascuna gemma. La metodica analitica utilizzata per queste indagini è la microscopia elettronica a scansione corredata da spettrometro EDS. Tale scelta risponde all'esigenza di osservare le tracce di lavorazione della pietra e nello stesso tempo confermare la sua composizione e quella del metallo utilizzato per la realizzazione della eventuale montatura. Considerata la particolarità dei reperti da analizzare si doveva utilizzare un metodo non invasivo che potesse fornire i risultati prefissati senza arrecare danni al manufatto e senza rendere necessari troppi spostamenti e manipolazioni dei preziosi reperti. Lo strumento utilizzato è un SEM FEI, mod Quanta 200 con un portacampioni opportunamente realizzato in modo da poter ospitare oggetti di dimensioni molto diverse tra loro. Le analisi sono ottenute con una spettrometro EDAX-DX4 utilizzando gli standard di riferimento del laboratorio. È stato così possibile acquisire un numero elevato di dati la cui elaborazione non è al momento conclusa. In particolare si stanno studiando le tecniche di incisione delle gemme e la composizione dei castoni in modo da verificare la cronologia della realizzazione di questi manufatti e distinguere così le gemme antiche da even-



tuali imitazioni cinquecentesche o ancora più recenti. Le componenti chimiche delle montature sono state invece riportate in un diagramma ternario Au-Ag-Cu dall'osservazione del quale si evince, insieme una notevole dispersione delle caratteristiche composizionali, la presenza di gruppi di montature omogenee per composizione della lega. Uno di questi gruppi comprende la biga con figura maschile (Figura 1) la cui parziale ricostruzione è attribuita a Benvenuto Cellini e un Apollo in oro applicato su un cammeo in calcedonio attribuito più genericamente agli orafi del 1500. Considerando quindi che l'uniformità nella composizione dei castoni compresi in ogni gruppo sia da ricondurre ad una singola bottega, nel caso specifico prima citato tutti i componenti del gruppo comprendete la biga con figura maschile sarebbe da ricondurre al Cellini la cui attività in questo campo è documentata nella *Vita* (I, cap. 27).

IL SEM-EDX NELLO STUDIO DEI MATERIALI CARTACEI ANTICHI E MODERNI: DALLA ARCHEOLOGIA ALLA CONSERVAZIONE

Flavia Pinzari¹, Piero Colaizzi²

¹Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria. Centro di ricerca per lo studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo (CREA-RPS), Roma;

²Laboratorio di Biologia, Istituto Centrale per il Restauro e la Conservazione del Patrimonio Archivistico e Librario, Roma (Italia)

E-mail: flavia.pinzari@entecra.it

Nel corso dei secoli la manifattura della carta ha subito continui cambiamenti, rispetto sia alle fibre vegetali che ai processi di fabbricazione. La carta, antica o moderna, è composta da una matrice cellulosa ma anche da sostanze inorganiche che complessivamente ne fanno un materiale chimicamente e strutturalmente complesso. Le caratteristiche compositive della carta talvolta ne determinano la conservazione nel tempo e la capacità di resistere ai fattori chimici, fisici o biologici di degradazione. L'osservazione dei materiali cartacei per mezzo della microscopia elettronica a scansione a pressione variabile ed in particolare l'utilizzo di detector per elettroni retrodiffusi, permette di visualizzare i materiali inorganici presenti nelle fibre, distinguendone la composizione dalla matrice organica grazie al diverso numero atomico degli elementi chimici di cui sono costituiti (Figura 1). La caratterizzazione tramite microanalisi dei minerali presenti nelle scansioni rappresenta uno strumento di indagine molto potente. I composti inorganici presenti nei supporti cartacei possono avere le più svariate origini e solo l'esperienza, ed una

vasta casistica di riferimento, possono essere di qualche supporto alla diagnostica.

Alcune "impurezze" presenti fra le fibre di cellulosa possono essere attribuite al processo di produzione della pasta di cellulosa. Nel caso della carta moderna a pasta chimica è possibile trovare, ad esempio, residui di cloro, sodio e zolfo non imputabili alla carica minerale ma piuttosto al tipo di sbiancatura. I processi di produzione più diffusi sono, infatti, alla soda, al solfato, al bisolfito di calcio, monosolfito di sodio e alla cloro-soda. La presenza di metalli come il ferro, il rame, il piombo e lo zinco, possono dipendere dall'acqua utilizzata per la manifattura, o dai macchinari e dagli utensili utilizzati per dare forma ai fogli. Molte sono le sostanze minerali che giungono sui supporti cartacei a seguito della stampa o comunque dell'utilizzo. Mercurio ed arsenico venivano aggiunti di proposito come biostatici, per una migliore conservazione delle opere e di essi sono presenti tracce in molti manoscritti antichi. Talvolta è possibile incontrare nelle carte sia antiche che moderne oggetti curiosi, come teche silicee di diatomee, druse di ossalato di calcio di origine biologica e fitoliti, ovvero piccoli sassi dalla forma caratteristica e talvolta specie-specifica che vengono sintetizzati da alcune specie vegetali per conferire resistenza a fusti e foglie (Figura 1). Si tratta di tracce che possono rappresentare utili indizi per ricostruire la micro-storia di alcune opere, aggiungendo ad esse valore e significatività. La possibilità di verificare l'esistenza di una correlazione fra la presenza localizzata di alcune sostanze minerali e il manifestarsi di fenomeni di degradazione permette, inoltre, di intervenire in modo mirato ed efficace nelle fasi di restauro.

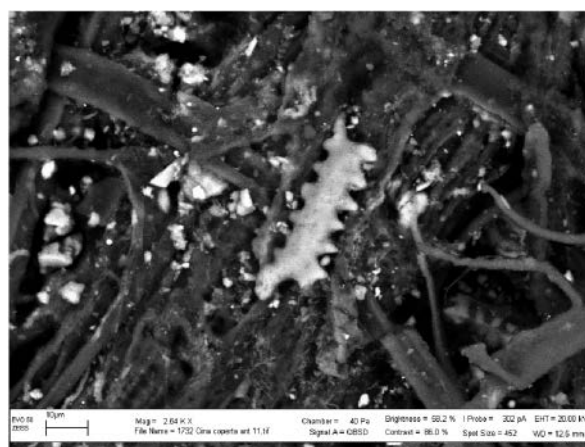


Figura 1. Immagine ottenuta al microscopio elettronico a scansione (20 keV, pressione variabile, detector per elettroni retrodiffusi) di una cellula vegetale silicizzata presente in una carta cinese del 1732 (Tesi Dr.ssa Yirong Ma, ICRCPAL)

APPLICAZIONE DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA IN PETRO-ARCHEOMETRIA E ARCHEOMETALLURGIA

Patrizia Santi

Dipartimento di Scienze della Terra, della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Urbino (Italia)

E-mail: patrizia.santi@uniurb.it

Questa relazione prende spunto da un caso studio¹ in cui l'impiego della Microscopia Elettronica, intesa come SEM, EDAX, BSE e mapping ha avuto un ruolo efficace nella caratterizzazione dei materiali esaminati riconducibili a processi archeometallurgici.

L'utilizzo di tecniche scientifiche applicabili all'estrazione metallifera è di grande importanza nell'ambito dei Beni Culturali per: (i) migliorare la conoscenza del grado di evoluzione tecnologica di antiche civiltà che, in molti casi, hanno lasciato poche tracce; (ii) consentire un'ulteriore valorizzazione del patrimonio artistico-culturale e archeologico. È inoltre importante sottolineare che il rinvenimento dei cosiddetti "indicatori di produzione metallurgica" è abbastanza raro dal momento che molto spesso le fornaci venivano distrutte sia per recuperare tutti i masselli metallici prodotti (nel caso del ferro soprattutto) sia per la chiusura del processo produttivo.

Essendo finalizzati all'individuazione delle tecniche di estrazione e lavorazione dei metalli, gli studi di archeometallurgia sono indirizzati preva-

lentemente alla caratterizzazione tessiturale e composizionale del maggior numero di reperti possibile. Più in particolare questo caso studio è stato rivolto a frammenti di scorie (smelting slags) e di tuyères (tubi di ventilazione in ceramica refrattaria) rinvenuti nel sito fenicio-punico di Tharros (Sardegna occidentale).

Combinando le diverse tecniche analitiche della microscopia elettronica è stato possibile definire la natura dei materiali coinvolti per l'estrazione del ferro, l'impiego di flussanti per abbassare la temperatura di estrazione del metallo e le condizioni operative del processo pirometallurgico stesso. I dati così raccolti hanno dimostrato l'alto livello tecnologico raggiunto dagli artigiani di Tharros addetti alla fusione ("smelters"): (i) nel mantenimento delle condizioni di atmosfera riducente in difetto controllato di ossigeno per l'estrazione del ferro, (ii) nell'aggiunta di componenti adatti a rendere sempre più efficiente la reazione metallurgica e (iii) nell'ambito delle competenze per la produzione di manufatti ceramici refrattari che dovevano resistere alle alte temperature raggiunte nelle fornaci.

Bibliografia

1. De Caro T, Ricucci C, Parisi EI, Renzulli A, Del Moro S, Santi P, Faraldi F. Archaeo-metallurgical studies of tuyères and smelting slags found at Tharros (north-western Sardinia, Italy). *Applied Physics* 2013;113:933-43.

LO STUDIO DEI FENOMENI DI BIODETERIORAMENTO DEI MATERIALI FOTOGRAFICI PER MEZZO DI TECNICHE DI MICROSCOPIA ELETTRONICA, SPETTROSCOPIA E MICROANALISI

Maria Carla Sclocchi¹, Piero Colaizzi¹, Marina Bicchieri¹, Domenico Pangallo,² Flavia Pinzari³

¹Istituto Centrale Restauro e Conservazione Patrimonio Archivistico e Librario (ICRCPAL), MIBACT, Roma (Italia);

²Slovak Academy of Sciences, Institute of Molecular Biology (IMB), Bratislava (Repubblica Slovacca); ³CREA -Centro di ricerca per lo studio delle relazioni tra pianta e suolo, Roma (Italia)

E-mail: mariacarla.sclocchi@beniculturali.it

Il biodeterioramento è un problema comune in molte collezioni fotografiche ed è considerato uno dei principali fattori all'origine di danni irreparabili e quindi della perdita di documenti di importanza storico-artistica. Tuttavia, solo pochi studi sono stati finora rivolti ai meccanismi con cui hanno luogo simili fenomeni di degradazione su questi materiali. Vi è la necessità di una migliore comprensione del tipo di interazione che ha luogo tra i microrganismi, il micro-ambiente ed il complesso sistema di sostanze organiche ed inorganiche che compongono i diversi materiali fotografici. Lo scopo di questo lavoro è stato lo studio dei danni causati da una infezione fungina e batterica su del materiale fotografico del XX secolo¹. Lo studio completo e gli aspetti sistematici sugli organismi mostrati sono pubblicati in Bučková *et al.* 2014².

È stato studiato il danno causato da un attacco biologico su buste in carta traslucida, pellicole in nitrato di cellulosa e stampe alla gelatina-sali d'ar-

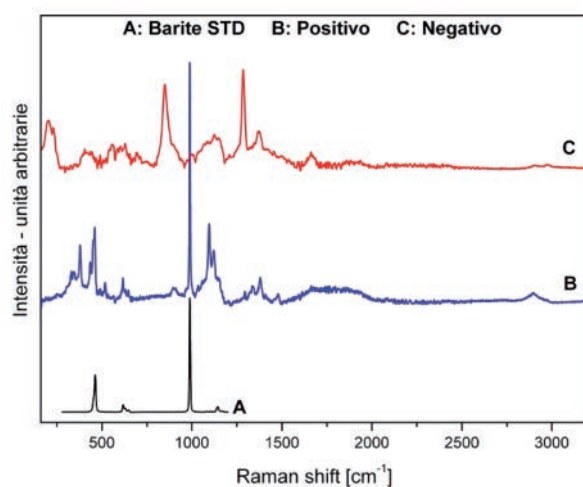


Figura 1. Spettri Raman dei due supporti, negativo e positivo. Per confronto è riportato lo spettro standard di barite. Gli spettri sono distanziati per una migliore lettura.

gento degli anni 1938-40 (Archivio Ente E.U.R. - Archivio Centrale dello Stato), mediante tecniche di microscopia elettronica a scansione (SEM) e microanalisi (EDS), microscopia Raman (μ -Raman) e microscopia (μ -FTIR). È stato possibile inserire gli oggetti interi nella camera porta-campione del SEM trattandosi di un sistema capace di operare in pressione variabile, che permette di osservare i campioni senza la necessità di prepararli o metallizzarli. La pressione nella camera è stata regolata a non meno di 50 Pa per non arrecare danni ai materiali. Con queste attenzioni il VP-SEM-EDS si può considerare una tecnica non invasiva e non distruttiva.

Gli strumenti utilizzati sono stati i seguenti:

- 1) Microscopio Raman Renishaw (Renishaw, New Mills, Wotton-under-Edge, Gloucestershire GL12 8JR, UK) In-Via Reflex Raman dotato di un laser a diodi Renishaw a 785 nm (300 mW di potenza massima). Le misure sono state eseguite interponendo dei filtri neutri tra il laser e il campione, in modo da diminuire la potenza a 1 mW e non danneggiare il campione in analisi. Gli spettri Raman dei supporti analizzati sono riportati in Figura 1.
- 2) Microscopio μ -FTIR Nexus Nicolet-Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02454) accoppiato al Continuum

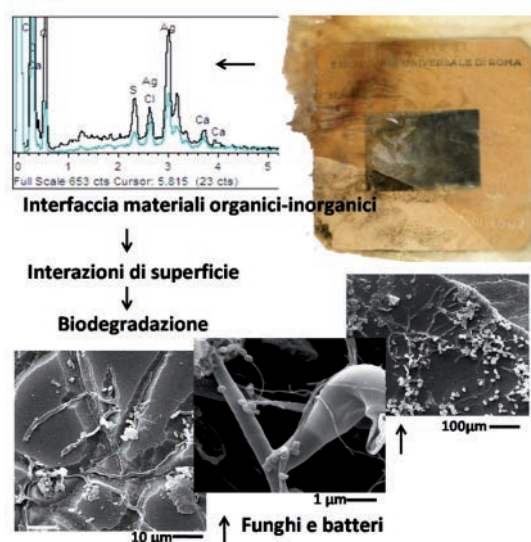


Figura 2. Lo studio dei materiali con metodi di microscopia avanzata ha permesso di caratterizzare la composizione chimica ma anche di mettere in evidenza la co-occorrenza di batteri e funghi e particolari effetti del biodeterioramento sui substrati organici. Nelle immagini al microscopio, da sinistra a destra, solchi scavati dagli enzimi fungini, cellule fungine e batteriche assieme, network ife e spore fungine sui materiali.

Microscope e dotato di un detector MCT/A raffreddato con azoto liquido (-70°C). Le misure sono state effettuate nel range 4000-650 cm⁻¹ con una risoluzione di 8 cm⁻¹.

- 3) Microscopio SEM a pressione Variabile Zeiss EVO 50 (Carl-Zeiss Electron Microscopy Group, Oxford, UK) equipaggiato con un detector quadrupolo per elettroni retrodiffusi (BSD) e con un detector per elettroni secondari (VPSE). Il sistema lavora con un filamento di tungsteno, anche in alto vuoto.
- 4) Sistema per microanalisi (EDS) INCA Energy 250 (Oxford Instruments).

La co-presenza di funghi e batteri è stata documentata sia sulla gelatina che sulla carta traslucida (Figura 2). La presenza di argento (Ag) nella gelatina e di bario (Ba) sulla carta apparentemente non hanno comportato un'azione biostatica sugli organismi sia fungini che batterici. Secondo il principio di esclusione competitiva in ecologia, non esistono due specie che possono occupare la stessa nicchia nello stesso ambiente per molto tempo. Ciò significa che la co-presenza di più organismi su un piccolo oggetto può essere dovuta o ad una successione di eventi di colonizzazione da parte degli stessi, od alla costituzione di una vera e propria comunità dove diverse specie possono occupare diverse nicchie ecologiche svol-

gendo un ruolo diverso nel deterioramento del substrato. La comprensione delle diverse attività ed interazioni dei funghi e dei batteri sui substrati di cui sono composti i materiali fotografici ha un ruolo primario nel campo della conservazione. I trattamenti di disinfezione su oggetti così fragili, infatti, possono risultare dannosi od inefficaci se indirizzati alle specie non direttamente implicate nei meccanismi di deterioramento.

Ringraziamenti

Il lavoro descritto è stato finanziato dalla Slovak VEGA Agency, progetto n. 2/0103/14 "Protecting our memories: investigation into the biodeterioration of photographic and cinematographic materials".

Bibliografia

1. Sclocchi D, Damiano E, Matè D, Colaizzia P, Pinzaria F. Fungal biosorption of silver particles on 20th-century photographic documents. *Int Biodeter Biodegr* 2012;84:367-71
2. Bučková M, Puškárová A, Sclocchi MC, Bicchieri M, Colaizzi P, Pinzari F, Pangallo D. Co-occurrence of bacteria and fungi and spatial partitioning during photographic materials biodeterioration. *Polym Degrad Stab* 2014;108:1-11

APPLICAZIONE DEL SEM/EDS ALLO STUDIO DEI DIPINTI. CONSIDERAZIONI DI INTERPRETAZIONE ED ATTRIBUZIONE

Tea Zubin Ferri

Research Center for Materials of Region of Istria - Metris, Pula (Croazia)

E-mail: tea.zubin@centarmetris.hr

Le tecniche di microscopia, microanalisi e microspettroscopia sono ad oggi di fondamentale importanza nello studio dei beni culturali, in particolar modo dei dipinti. Le limitazioni più rilevanti in questo senso riguardano *in primis* la quantità di campione, l'enorme diversità di materiali e loro combinazioni, la necessità dell'applicazione di metodi non-distruttivi in modo tale da poter eseguire ulteriori analisi sugli stessi campioni in un secondo momento. L'interpretazione dei risultati e la loro correlazione con i dati storici di un dipinto possono infine rappresentare il passo più complicato, soprattutto quando non coincidono completamente e da ciò è facile dedurre come un approccio interdisciplinare, a questo tipo di ricerche, è sempre necessario. L'interdisciplinarietà è stata una prerogativa inevitabile anche nello studio della pala d'altare "Crocifissione" attribuita a Gianfrancesco da Tolmezzo, attualmente in restauro presso l'Istituto Croato di restauro a Zagabria. La pala, tempera su

tavola di notevoli dimensioni, è stata commissionata da Luka de Szeged per la Cattedrale di Zagabria nel 1505 dove subì gravi danni a causa di un incendio nel Seicento e poi di un terremoto alla fine del Ottocento. Le radiografie compiute hanno infatti rivelato la presenza di numerosi rifacimenti e restauri di cui sono noti il restauro condotto prima del 1914 a Vienna da Eduard Geritsch e l'ultimo eseguito da Zvonimir Wyroubal presso l'Istituto di Restauro di Zagabria negli anni 1958-1960. Al fine di definire gli strati pittorici originali, i pentimenti nonché i restauri ed i ritocchi, sono stati prelevati ed inglobati in resina 29 campioni. Mediante la caratterizzazione chimica dei materiali pittorici presenti (pigmenti, cariche, leganti, stuccature, etc.) si è voluto differenziare i materiali originali da quelli aggiunti in seguito a restauri in modo tale da cercare di ricostruirne la storia. In riguardo al numero di campioni e all'impossibilità di analizzare in dettaglio tutti gli strati presenti (più di 80), ognuno inoltre composto da almeno due tipi di materiali, si è proceduto mediante microscopia ottica, utilizzando la luce visibile, ultravioletta e polarizzata in modo tale da determinare eventuali foglie metalliche, materiali recenti che assorbono la luce UV e di scegliere quali campioni sottoporre ad analisi mediante microscopia elettronica e sonda EDS (SEM/EDS) e microspettroscopia FT-IR (microFT-



Figura 1. Pala d'altare "Crocifissione", Gianfrancesco da Tolmezzo., 1505, Zagabria.

IR ATR). Tra i pigmenti originali sono stati determinati la terra verde, la malachite, l'azzurrite, il cinabro, il giallo di stagno, nero d'ossa, l'ocra rossa, il bianco di piombo e la cocciniglia. È stato inoltre determinato l'impiego della foglia d'oro e di quella di argento mentre per quanto riguarda la preparazione è stato visto come sia stata stesa utilizzando colla animale e una miscela di calcite ed aragonite con l'aggiunta di una piccola quota di materiale silicatico. Tra gli strati pittorici originali sono state trovate due tipologie di cariche, il solfato di piombo, utilizzato sempre assieme al bianco di piombo, nonché vetro macinato, aggiunto all'azzurrite del cielo e del drappeggio blu di una delle figure. Il vetro macinato in pittura è stato molto usato in tutta Europa durante i secoli XV e XVI sia in dipinti a tempera che ad olio dove poteva essere aggiunto in qualità di siccativo o come inerte, migliora inoltre la lavorabilità dell'impasto e rende i colori più profondi. La sua macinatura poteva variare, con grani di dimensioni da 2 a 50 micron, a volte arrotondati per levigatura. Nel dipinto studiato la dimensione dei grani di vetro varia dai 20 ai 50 micron e in base all'analisi EDS a parte il silicio, l'ossigeno e il calcio, il vetro contiene potassio e sodio. In alcuni campioni sono stati studiati i materiali aggiunti in seguito a

ritocchi e restauri e sono stati trovati il bianco di zinco, il verde cromo, il bianco di titanio, stuccature in gesso e strati protettivi in cera. La collocazione di tali materiali sulla pala ha permesso di presumere quali parti dell'opera abbiano subito interventi e ritocchi ed in quale epoca, in base ai pigmenti allora disponibili.

Ringraziamenti

Si ringrazia i restauratori e responsabili del progetto di restauro della pala presso l'Istituto Croato di restauro, la dott.ssa Višnja Brali e il restauratore Pavao Leroti, per i dati e i consigli forniti.

Bibliografia

- Spring M. "Colourless powdered glass as an additive in fifteenth- and sixteenth-century european paintings", Technical Bulletin, National Gallery, London, 2012.
- Feller RL. Barium Sulfate – Natural and Synthetic, in: Artists' Pigments, A handbook of their history and characteristics, Volume 1, Publishing Office on the national Gallery of Art Washington in Association with Archetype Publications, Ltd, London, (1986.) 2012.

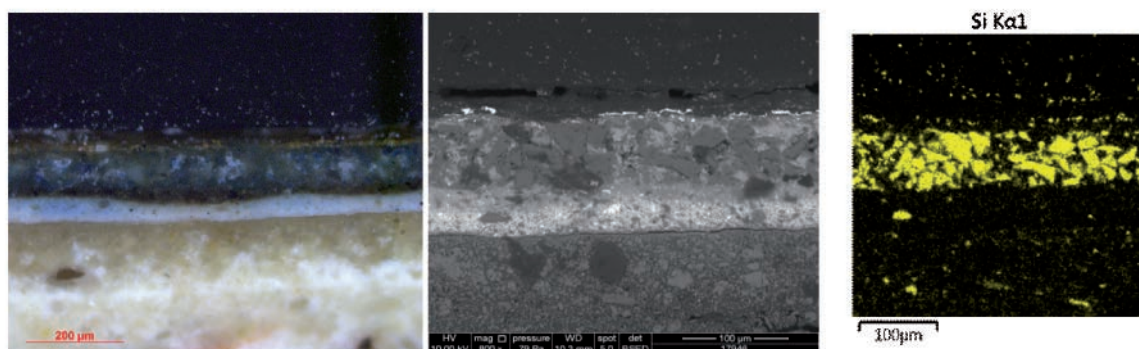


Figura 2. Foto al microscopio ottico, elettronico a scansione (elettroni retrodiffusi) e mappa del silicio in *cross section* di campione prelevato dal cielo contenente particelle di vetro.

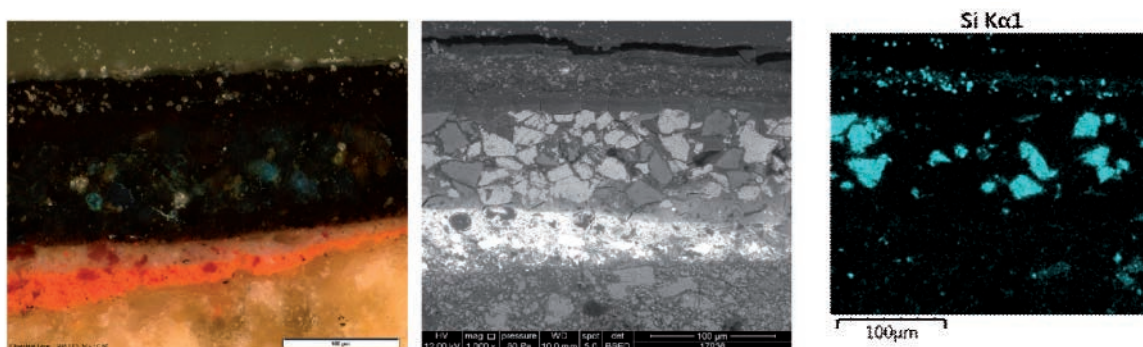


Figura 3. Foto al microscopio ottico, elettronico a scansione (elettroni retrodiffusi) e mappa del silicio in *cross section* di campione prelevato dal drappeggio blu contenente particelle di vetro.



Epifluorescence microscopy imaging of phytoplasmas in embedded leaf tissues using DAPI and SYTO13 fluorochromes

S.V. Buxa,¹ L. Pagliari,² R. Musetti²

¹Department of Phytopathology and Applied Zoology, Justus Liebig University, Giessen, Germany

²Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Italy

Corresponding author: Rita Musetti

Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, via delle Scienze, 206, I-33100 Udine, Italy

Tel. +39.0432.558521.

E-mail: rita.musetti@uniud.it

Summary

The use of DNA-specific dyes, i. e. DAPI, is extensively reported for phytoplasma detection in fresh plant materials. However, fluorescence-based microscopy and imaging of fresh tissues often evidences technical limitations which are more significant in infected tissues, because phenolic and other defense-related compounds accumulate in the cell wall and in the vacuole making difficult sample preparation. In this paper we describe a method based on the use of epifluorescence microscopy and the DNA probes DAPI and SYTO13® for phytoplasma visualization in resin-embedded plant tissues. The method allows detection of phytoplasmas and it is recommended for tissues that are recalcitrant to conventional imaging.

Key words: DAPI, epifluorescence microscopy, phytoplasmas, stolbur, SYTO13®, tomato.

Introduction

Phytoplasmas are wall-less prokaryotes, pleomorphic in shape (looking as filamentous, beaded or simply spheroid), belonging to the class *Mollicutes*; they are bound by a tri-layered unit membrane, contain ribosome and DNA and range up 1.2 µm in diameter (Musetti *et al.*, 1992). Phytoplasmas are associated to hundreds of diseases affecting economically important crops, such as ornamentals, vegetables, fruit trees, and grapevines (Lee *et al.*, 2000). They are located in phloem sieve elements of host plants and transmitted to other plants by phloem-sap feeding leafhoppers or psyllids in a persistent manner (Hogenhout *et al.*, 2008).

The association of these pathogens with plants exhibiting “yellows” symptoms was at first demonstrated by Doi and co-workers (1967) using transmission electron microscope (TEM). Since then, many authors have used light (for review, see Musetti, 2013) and electron microscopy to reveal phytoplasmas in the phloem tissues (Devonshire, 2013) and to

study cytological interactions occurring between these pathogens and their hosts (Kartte and Seemüller, 1991; Musetti *et al.*, 1994; 2000; 2010).

Moreover, fluorescence microscopy operating with nucleic acid specific DAPI [4,6-diamidino-2-phenylindole (for review see Andreade and Arismendi, 2013)] and SYTO13® (Christensen *et al.*, 2004) stainings has been used for the detection of phytoplasmas in infected tissues using hand-cut or freezing-microtome sectioned plant materials.

Nevertheless, fluorescence-based microscopy and imaging of fresh plant tissues often evidences technical limitations caused by plants' intrinsic properties. The transmission of light through plant cells is impeded by the heterogeneous refractive indices of the cell wall and cytoplasm, and light is often absorbed by pigments. In addition, the fluorescence of pigments and aromatic molecules further reduces the signal-to-noise ratio in images. In case of infected plants, phenolics and other defense-related compounds accumulate in the cell wall and in the vacuole making difficult sample preparation.

In the last 10 years there has been significant interest in imaging fluorescent molecules in semithin sections obtained from resin-embedded materials (for review, see Cortese *et al.*, 2009). Luby-Phelps and colleagues (2003) first described a method for retaining green fluorescence protein (GFP) signal in zebrafish embryos after fixation and resin embedding, but their method has not got widespread application.

Recently, methods to achieve information using thick optical sections of the tissue to locate cells of interest and subsequently imaged using TEM, have been described. However, there have been few attempts to retain fluorescent molecules in resin-embedded plant tissues and in particular in the sieve elements of the phloem, due to the small size of phloem cells and their deep location within plant organs (Nelson and van Bel, 1998). Pfeiffer *et al.*, (2003) were able to image sieve elements and companion cells of barley and pea leaf tissues using high-pressure freezing, followed by freeze substitution in acetone and resin embedding. Afterwards Bell *et al.*, (2013) explored a number of approaches for retaining fluorescent proteins in resin-embedded Arabidopsis tissues and described a simple method suitable for a number of conventional fluorescent

dyes, allowing localization studies.

In this work we describe a microscopy approach based on the use of epifluorescence microscopy and specific DNA probes (DAPI and SYTO13®) for phytoplasma visualization *in situ*, using resin-embedded plant tissues. Resin-embedded leaf sections of healthy and phytoplasma-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) plants, [used as hosts of the 'Candidatus Phytoplasma solani' ('Ca. P. solani'), the pathogen associated to stolbur disease] were prepared, stained with DAPI or SYTO13® fluorochromes and then observed by epifluorescence microscope (EFM). In parallel, to confirm EFM analyses, transmission electron microscopy (TEM) observations have been performed using the same embedded materials.

Materials and Methods

Plant material

Three *Solanum lycopersicum* plants ('cv Micro-Tom') were infected with the stolbur phytoplasma 'Candidatus Phytoplasma solani' ('Ca. P. solani' subgroup 16 SrXII-A, Quaglino *et al.*, 2013), by grafting shoot tips from naturally infected tomato plants grown in the field onto healthy tomato plants grown

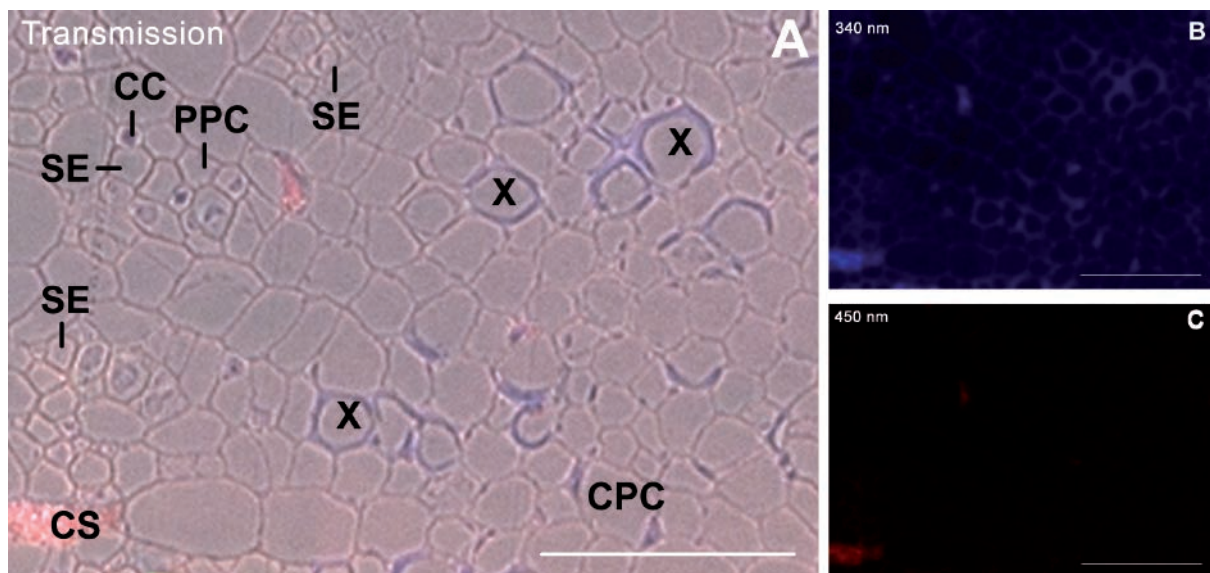


Figure 1. A through C. Autofluorescence and background images of untreated tomato tissue. Overlay (A) of bright-field image and images excited with 340 nm (B) and 450 nm (C) served as a staining control, respectively. CC, companion cell; CPC, cortex parenchyma cells; CS, crystalline structure; PPC, phloem parenchyma cell; SE, sieve element; X, xylem vessel. Scale bars: 50 µm.

from seeds in a greenhouse (27°C day, 20°C night). Three healthy uninfected tomato plants, also grown in a greenhouse, were used as controls. After two months from grafting, characteristic stolbur symptoms, such as yellowing, witches' brooms and stunting, emerged in infected tomato plants (Buxa *et al.*, 2015).

Embedding procedures for epifluorescence and electron microscopy

Fifteen randomly chosen leaf midrib segments were excised from symptomatic-infected or healthy tomato plants. Segments were cut into small portions (6-7 mm in length), fixed in 0.2% glutaraldehyde, rinsed in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4 and dehydrated in grad-

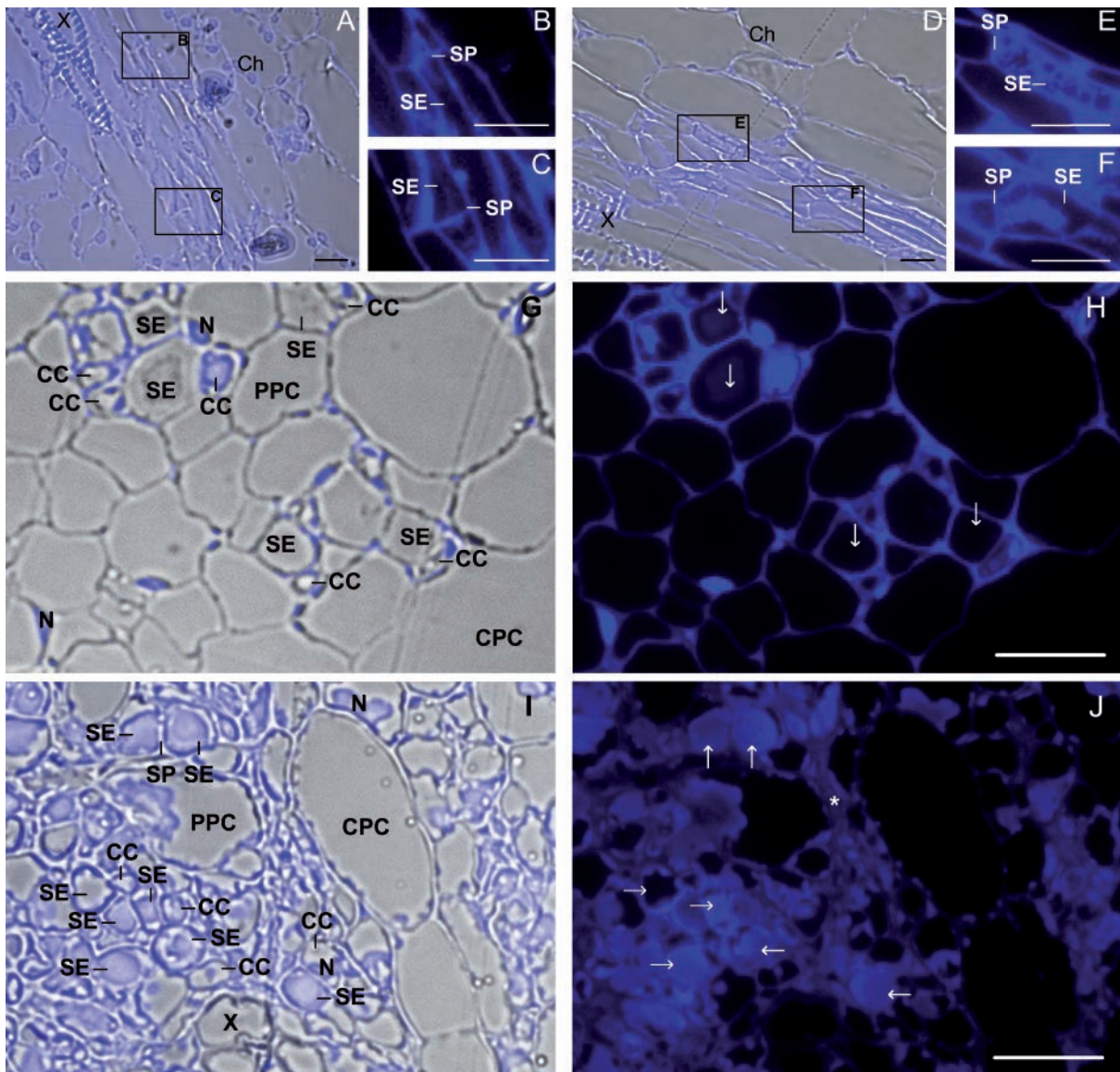


Figure 2. Light and epifluorescence microscopy images from longitudinal (A through F) and cross sections (G through J) of healthy (A through C, G and H) and stolbur-diseased (D through F, I and J) tomato leaves. Phytoplasma presence in the LRW-embedded main vein was revealed using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a DNA marker. Arrows point to the sieve-element lumen and asterisks indicate altered cell-wall thickness. CC, companion cell; Ch, chloroplast; CPC, cortex parenchyma cells; N, nucleus; PPC, phloem parenchyma cell; SE, sieve element; SP, sieve plate; X, xylem vessel. Scale bars: 10 μ m.

ed ethanol series (25%, 50%, 75%, 30 minutes for each step) at 4°C. After one hour of the final 100% ethanol step, the samples were infiltrated in a hard-grade London Resin White (LRW, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) -100% ethanol mixture in the proportion 1:2 for 30 minutes, followed by LRW:ethanol 2:1 for 30 minutes, and 100% LRW (two immersion periods: the first for 1 hour, followed by overnight infiltration) at room temperature. The samples were embedded in Eppendorf tubes using fresh LRW containing benzoyl peroxide 2% (w/w) according to manufacturer's protocol and polymerized for 24 h at 60°C (Musetti *et al.*, 2002).

Epifluorescence microscopy imaging

Embedded samples were cut to obtain semithin sections (1 to 2 µm) using a diamond knife on a

Reichert Leica Ultracut E ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Serial semi-thin sections of at least 100 samples from each healthy and stolbur-diseased plant were placed on glass slides. To detect phytoplasmas inside sieve elements of diseased plants sections were incubated with fluorescent dyes as reported below. Stained tissues were observed under an automated epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera (Leica DFC, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Cell imaging was performed using Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF®). As visual examination of primary fluorescence unstained samples were observed at the same excitation wavelengths used for the fluorochromes (340 nm and 450 nm, respectively) as visual controls (Figure 1).

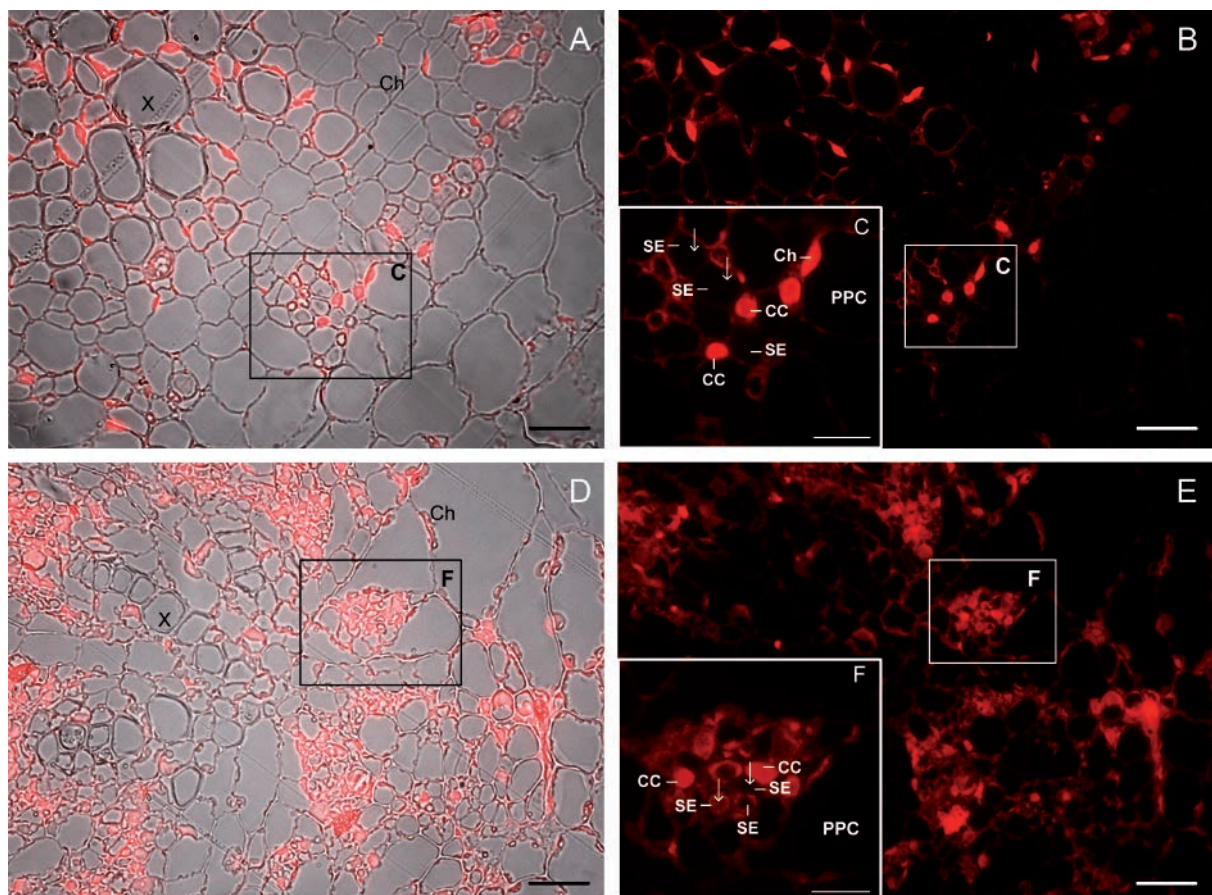


Figure 3. Light and epifluorescence microscopy images from healthy (A through C) and stolbur-diseased (D through F) tomato leaves. Phytoplasma presence in the LRW-embedded main vein was revealed using SYTO13® as a DNA/RNA specific marker. Arrows point to the sieve-element lumen. CC, companion cell; Ch, chloroplast; PPC, phloem parenchyma cell; SE, sieve element; X, xylem vessel. Scale bars: 25 µm (A,B,D,E); 10 µm (C,F).

Fluorochromes

To identify phytoplasmas inside sieve elements, as well as to detect nuclei in companion and parenchyma cells, sections were stained with 0.3 μM of DAPI [4,6-diamidino-2-phenylindole, Molecular Probes® (Invitrogen, Eugene, OR, USA)] or 0.5 $\mu\text{L/mL}$ SYTO13® dissolved in 1x phosphate saline buffer

(PBS) for 2.5 hours (Loi *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2004). Briefly before observation the slides were washed twice with PB and air-dried. For observation, slides were consecutively exposed to excitation wavelengths within the spectral windows of 340 nm to 380 nm and 450 nm to 490 nm under a DM 4000 fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar,

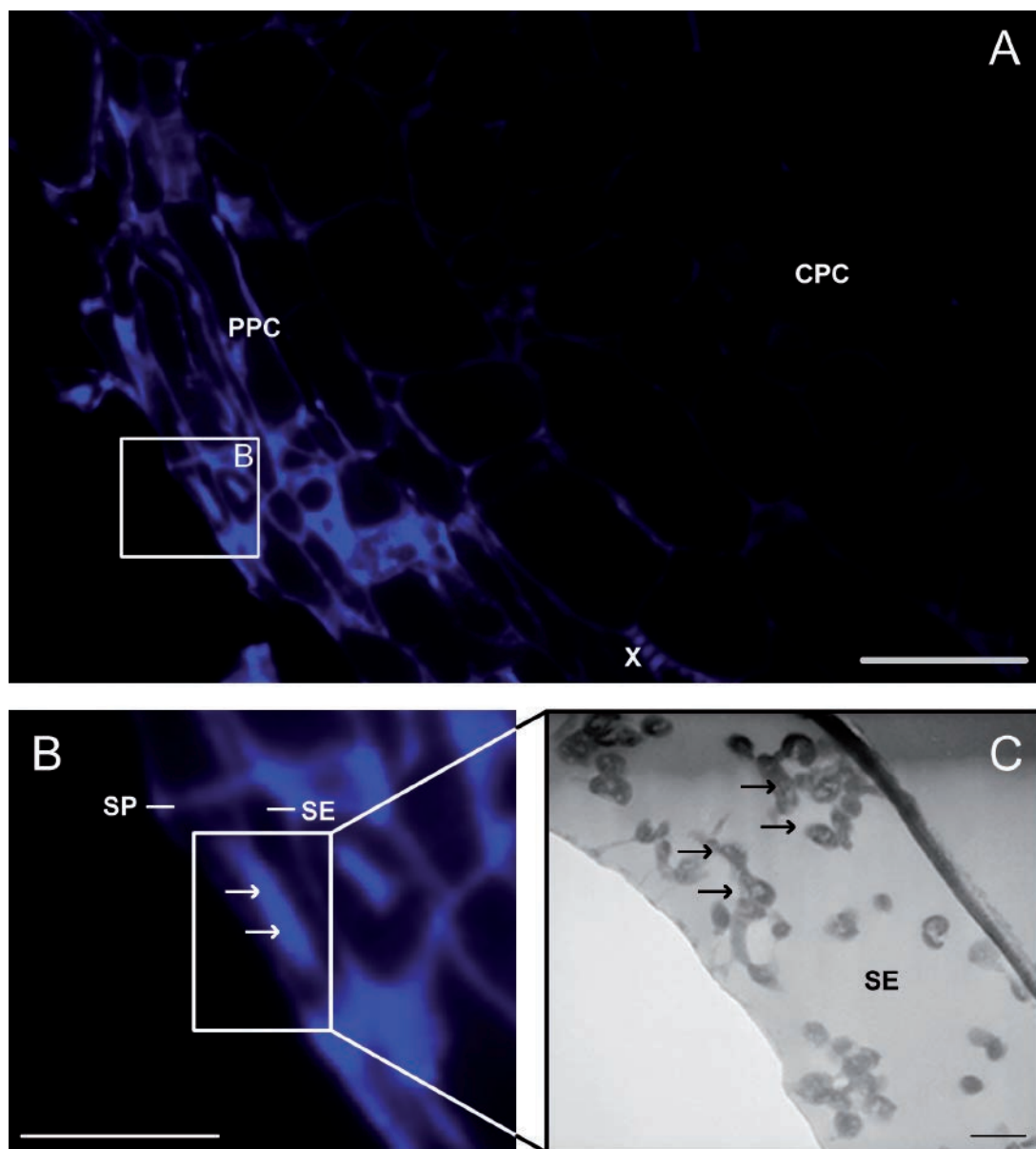


Figure 4. Representative image of combination of epifluorescence (A through B) and transmission electron microscopy (C): spatial overlap of signals in stolbur-diseased tomato tissue is well visible. Phytoplasma presence was visualized by fluorescent staining 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI (A through B), and heavy metals staining uranyl acetate and lead citrate (C). Arrows point to the particular signals. CPC, cortex parenchyma cells; PPC, phloem parenchyma cell; SE, sieve element; SP, sieve plate; X, xylem vessel. Scale bars: 25 μm (A); 10 μm (B); 1 μm (C).

Germany). Observations were performed using 63x oil objective and long-pass filters starting from 425 nm and 515 nm, respectively. False-color fluorescence image of DAPI (blue) and SYTO13® (red) were processed using Adobe Photoshop (CS, USA) to optimize brightness, contrast, and coloring.

Transmission electron microscopy

For TEM analyses, serial ultrathin sections (60-70 nm) of at least 100 samples from each healthy or infected plant, were cut using the ultramicrotome and collected on 200 mesh uncoated copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate

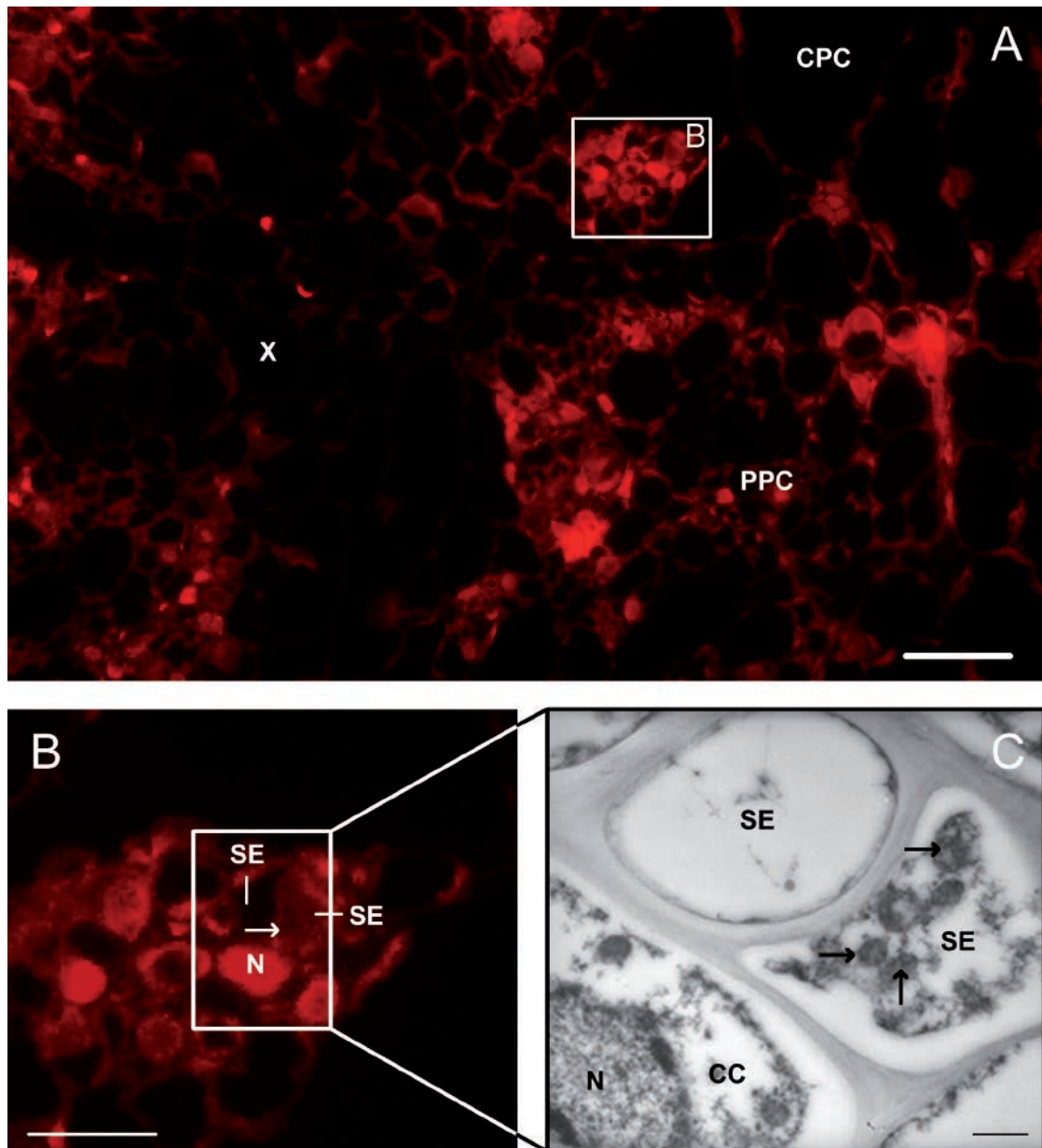


Figure 5. Representative image of combination of epifluorescence (A through B) and transmission electron microscopy (C): spatial overlap of signals in stolbur-diseased tomato tissue is well visible. Phytoplasma presence was visualized by fluorescent staining SYTO 13® (A through B), and heavy metals staining uranyl acetate and lead citrate (C). Arrows point to the particular signals. CC, companion cell; CPC, cortex parenchyma cells; N, Nucleus; PPC, phloem parenchyma cell; SE, sieve element; X, xylem vessel. Scale bars: 25 μ m (A); 10 μ m (B); 1 μ m (C).

(Reynolds, 1963) and then observed under a PHILIPS CM 10 (FEI, Eindhoven, The Netherlands) transmission electron microscope operating at 100 kV.

Results and Discussion

Phytoplasmas were identified and precisely localized both in longitudinal (Figure 2A through F), and cross-sections (Figure 2G through J) obtained from LRW-embedded leaf midribs, stained with the DNA specific marker DAPI. Epifluorescence microscopic (EFM) images of longitudinal sections, showed no DAPI signal in sieve elements of healthy samples (Figure 2A through C). Only signals from nuclei in other phloem cells, chloroplasts in parenchyma cells (Figure 2A) and strong autofluorescence of the cell walls showed up (Figure 2B and C). In infected samples, phytoplasmas emerged as aggregates of fluorescent dots inside sieve elements (Figure 2D), especially at the sieve plates (Figure 2E and F). Cross-sections of healthy leaves, demonstrated a good quality of preservation (Figure 2G). No fluorescent signals were visible inside sieve elements (Figure 2H), whereas nuclei of companion cells and phloem parenchyma cells stand out clearly (Figure 2G and H). By contrast, stolbur-diseased samples showed strong fluorescent signals in sieve elements, which is indicative of phytoplasma presence (Figure 2I and J). As in controls, fluorescent signals from nuclei of companion cells and phloem parenchyma cells were detected (Figure 2I and J).

In LRW-embedded leaf midribs of healthy (Figure 3A through C) and stolbur-diseased samples (Figure 3D through F) fluorescent signal from DNA/RNA specific marker SYTO13[®] was strongly visible in nuclei in non-sieve-element cells, chloroplasts in parenchyma cells and autofluorescence of the cell walls (Figure 3B and C). As DAPI, no fluorescent signal was present in sieve element of healthy samples (Figure 3B and C). In infected samples fluorescent signal showed up SYTO13[®]-positive sieve elements (Figure 3E and F), next to background staining.

TEM observations of ultrathin sections, cut serially immediately after the semithin sections, confirmed the presence of phytoplasma cells in correspondence of the fluorescence signals observed in the sieve elements by EFM and DAPI (Figure 4) or SYTO13[®] staining (Figure 5). The nucleic acid-specific fluorescent probe DAPI was extensively used for *in situ* imaging of phytoplasmas in fixed hand-cut plant

materials (Hiruki and da Rocha, 1986; Loi *et al.*, 2002) and, more recently, *in vivo* in intact sieve elements (Musetti *et al.*, 2013). Christensen *et al.*, (2004) first used SYTO13[®] for phytoplasma detection in unfixed plant tissues, under multiphoton confocal laser scanning microscope.

Here, DAPI and SYTO13[®] were used as a novelty to detect phytoplasmas in LRW-embedded leaf samples: samples retain DAPI/SYTO13[®] fluorescence indicating phytoplasma presence in the sieve elements of stolbur-infected *S. lycopersicum*. DNA fluorescence in embedded tissue was sufficient to highlight phytoplasma accumulation in both longitudinal and cross-sections of sieve elements. Moreover the tissue morphology is of sufficient quality. The possibility to use DAPI and SYTO13[®] in this context allows various combination of dyes for multicolor labeling. The effective correspondence between the fluorescence signal imaged by EFM and phytoplasmas was confirmed by TEM visualization of ultrathin sections obtained from the same resin-embedded blocks used for fluorescence analysis.

The possibility to preserve the embedding materials for a long time may be of great utility for phytoplasma microscopical diagnosis when sectioning and observation is required at a later time. Sections could be counter-stained with a number of conventional fluorophores and antibodies, allowing co-localization studies. The described simple methods allow successive imaging of phytoplasmas with the light and electron microscope, combining the strengths of both imaging platforms. We believe this approach will have significant utility for tissues (as those collected from infected plants) that are recalcitrant to conventional imaging.

Acknowledgements

This work was supported by the International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL) founded by the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), and by the University of Udine. Authors are grateful to Alberto Loschi, Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, for providing tomato plants and to Dr. D Cesselli and Prof. CA Beltrami, Dipartimento di Scienze Mediche e Biologiche, University of Udine, for kindly providing the EFM equipment.

References

- Andreade N, Arismendi NL. DAPI staining and fluorescence microscopy techniques for phytoplasmas. 2013 pp. 115-121. In: Dickinson M, Hodgett J, Eds. *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media, LLC 2011, New York.
- Buxa SV, Degola F, Polizzotto R, De Marco F, Loschi A, Kogel K-H, et al. Phytoplasma infection in tomato is associated with re-organization of plasma membrane, ER stacks, and actin filaments in sieve elements. *Front Plant Sci* 2015;6:650.
- Bell K, Mitchell S, Paultre D, Posch M, Oparka K. Correlative imaging of fluorescent proteins in resin-embedded plant material. *Plant Physiol* 2013;161:1595-603.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant-Microbe Interact* 2004;17:1175-84.
- Cortese K, Diaspro A, Tacchetti C. Advanced correlative light/electron microscopy: current methods and new developments using Tokuyasu cryosections. *J Histochem Cytochem* 2009;57:1103-12.
- Devonshire BJ. Visualization of phytoplasmas using electron microscopy. 2013 pp. 123-138. In: Dickinson M, Hodgett J, Eds. *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media, LLC 2011, New York.
- Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuyama H. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 1967;33:259-66.
- Hiruki A, da Rocha A. Histochemical diagnosis of mycoplasma infection in *Catharanthus roseus* by means of a fluorescent DNA-binding agent, 2,6-diamidino-2 phenylindole-2HCl (DAPI). *Can J Plant Pathol* 1986;8:185-8.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar E, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* 2008;9:403-23.
- Kartte S, Seemüller E. Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. *J. Phytopathol* 1991;131:149-60.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev. Microbiol* 2000;54:221-55.
- Loi N, Ermacora P, Carraro L, Osler R, Chen TA. Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *Eur J Plant Pathol* 2002;108:81-86.
- Luby-Phelps K, Ning G, Fogerty J, Besharse JC. Visualization of identified GFP-expressing cells by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2003;51: 271-4.
- Musetti R. Dienes' Staining and Light Microscopy for Phytoplasma Visualization. 2013 pp. 109-113. In: Dickinson M, Hodgett J, Eds. *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media, LLC 2011, New York.
- Musetti R, Buxa SV, De Marco F, Loschi A, Polizzotto R, Kogel K-H, van Bel AJE. Phytoplasma-triggered Ca²⁺ influx is involved in sieve-tube blockage. *Mol Plant-Microbe Interact* 2013;26:379-86.
- Musetti R, Carraro L, Loi N, Ermacora P. Application of immunoelectron microscopy techniques in the diagnosis of phytoplasma diseases. *Microsc Res Tech* 2002;56:462-4.
- Musetti R, Favali MA, Carraro L, Osler R. An attempt to differentiate by microscopic methods two plant mycoplasma-like organisms. *Cytobios* 1992;72:71-82.
- Musetti R, Favali MA, Carraro L, Osler R. Histological detection of Mycoplasma-like organisms causing leptonecrosis in plum trees. *Cytobios* 1994;78:81-90.
- Musetti R, Favali MA, Pressacco L. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 2000;102:133-47.
- Musetti R, Paolacci A, Ciaffi M, Tanzarella OA, Polizzotto R, Tubaro F, et al. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* 2010;100:390-9.
- Nelson RS, van Bel AJE. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Prog Bot* 1998;59:476-533.
- Pfeiffer S, Beese M, Boettcher M, Kawaschinski K, Krupinska K. Combined use of confocal laser scanning microscopy and transmission electron microscopy for visualisation of identical cells processed by cryotechniques. *Protoplasma* 2003;222: 129-37.
- Quaglino F, Zhao Y, Casati P, Bulgari D, Bianco PA, Wei W, et al. 'Candidatus *Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63: 2879-94.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-12.

Parameters optimization for focused ion beam fabrication of phase electron holograms

F. Venturi,^{1,2} G. C. Gazzadi²

¹Dipartimento FIM, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italy

²CNR-Istituto Nanoscienze, Modena, Italy

Corresponding author: Federico Venturi

Dipartimento FIM, Università di Modena e Reggio Emilia, Via G. Campi 213/a, I-41125 Modena, Italy

Tel. +39 059 205 5038.

E-mail: federico.venturi@unimore.it

Summary

Phase plate electron holograms allow the information of a wavefunction to be encoded onto a physical substrate (i.e. a Si₃N₄ membrane) and recovered in a transmission electron microscope in diffraction mode. One widespread means of fabrication of phase holograms is focused ion beam (FIB), however, fabrication parameters have to be carefully chosen in order to obtain the aimed results. In this work, we present the FIB fabrication of phase holograms encoding an Ince-Gaussian beam, and investigate their characteristics with varying fabrication parameters.

Key words: nanofabrication, electron holography, focused ion beam, phase holograms.

Introduzione

Since the early works of D. Gabor on electron holography (Gabor, 1948; Gabor, 1949; Gabor, 1951) and the introduction of the electron biprism (Mollenstedt and Duker, 1956), many different holographic techniques have been developed, and up to 20 different forms were counted 50 years after (Cowley, 1992). The term holography, literally “whole writing”, stands in general for those techniques that are able to encode the whole optical information of an object, i.e. its amplitude and its phase, which is then decoded by interferometric techniques (Gabor, 1956). One of the main applications of electron holography so far has been the imaging of magnetic and electric fields in matter (Pozzi, 2013), but recently also nanomanipulation (Verbeeck *et al.*, 2013) and electron beam shaping (Harris *et al.*, 2015; Grillo *et al.*, 2015) are attracting increasing interest. The particular holographic technique object of this work is that called synthetic holography (Lesem *et al.*, 1968), where the amplitude or phase information, and even both (Bolduc *et al.*, 2013; Grillo *et al.*, 2015), is encoded on a phase plate (also called kinoform (Lesem *et al.*, 1969)) and decoded when the phase plate is illuminated by a coherent source. This holographic scheme is applicable both to light optics and to electron optics, the difference lying in the kind of phase plate used:

spatial light modulators (SLMs) for light (Sampsel, 1990), transmission electron microscope (TEM) membranes for electrons (Uchida and Tonomura, 2010). While SLMs are computer-controlled and any phase profile can be easily encoded on them, TEM membranes are physical substrates that require a longer and more difficult preparation (Grillo *et al.*, 2014). Furthermore, both temporal and spatial coherence are important in order to obtain the desired interference effects; when working with a TEM, a Schottky field emission gun (FEG) is recommended, and the area occupied by the hologram should be as small as possible so that the plane wave approximation for the impinging wavefunction holds. A class of holograms that require high precision are those containing a blazed transmission grating. These holograms enhance the diffraction intensity at the first diffraction order as the blazing depth approaches a value corresponding to a 2π phase shift of the wavefront (Davis *et al.*, 1999). The phase shift of a wavefront passing through a material is linearly proportional to its mean inner potential; in this work we are using Si₃N₄ membranes, whose mean inner potential causes a 2π phase shift after a thickness of about 60 nm for 200 keV electrons (Grillo *et al.*, 2014). The aim of this paper is to investigate the influence of FIB fabrication parameters on the blazing depth, in order to approach the 2π phase shift.

Materials and Methods

Computer generation of the hologram

The wavefunctions we chose to encode on the holograms, are a class of high order Gaussian beams named Ince-Gaussian modes. They are a family of exact solutions of the paraxial wave equation described by a set of Ince polynomials, which have an intrinsic elliptical symmetry (Bandres and Gutiérrez-Vega, 2004). The generation of the hologram was done with Stem_cell software (Grillo and Rotunno, 2013), producing a bitmap pattern that was converted in an array of x and y coordinates and a value t (with $1 < t < 100$) representing the normalized greyscale intensity for each point. This so-built file is then used for FIB fabrication: x and y coordinates drive the beam position, and the t values give the beam dwell time on the point in 10^{-7} s units; the longer the dwell time the more the milling depth.

Hologram fabrication by FIB

The procedure to imprint a hologram on a membrane is composed of three steps. First, Au is deposited (~100 nm) with a sputter coater on a Si₃N₄ TEM membrane in order to inhibit electron beam transmission, then a circular area of the Au deposit is removed by FIB to let the beam pass through it, finally the previously obtained Computer Generated Hologram (CGH) is patterned on this circular area. Whereas the first two steps are quite arbitrary, the third one is the most delicate. As far as Au deposition and removal are concerned, the important thing is to obtain a thickness of the Au layer that is about 100 nm, any higher value is still good and the removal time has to be increased accordingly. The FIB cur-

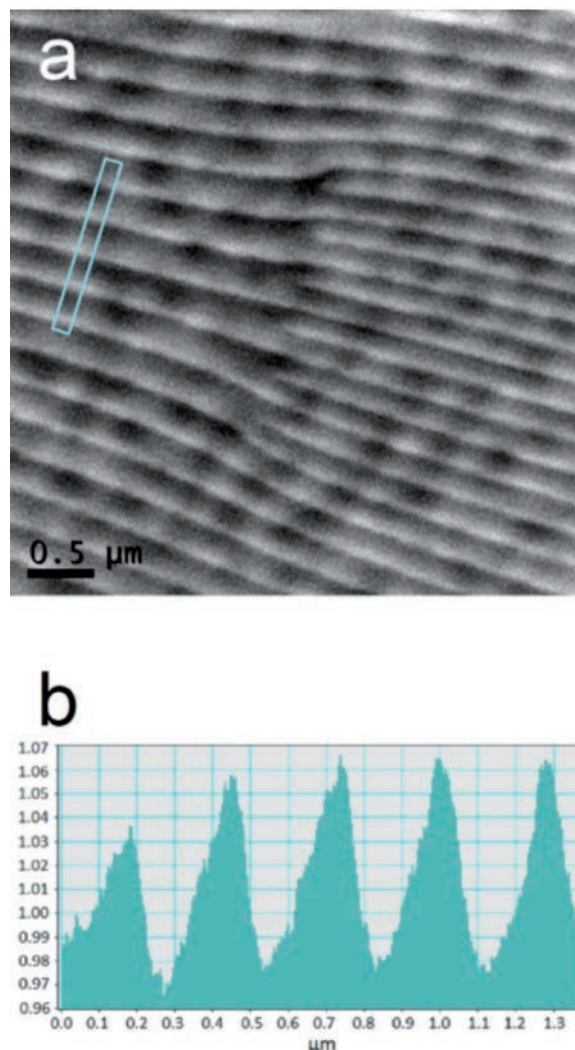


Figure 1. (a) EFTEM thickness map of the sample with starting set of parameters and (b) thickness profile calculated from the rectangular area in a.

Table 1. Sets of parameters used for samples fabrication. Notice that I2, R2, S2, M2 have the same set of parameters, which is the starting set, and are actually the same sample.

Sample	I1	I2	I3	R1	R2	R3	R4	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Probe current (pA)	27	44	296	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
Repetition number	218	134	20	67	134	201	268	67	134	536	536	134	67
Step size	2	2	2	2	2	2	2	1	2	4	2	2	2
Magnification	7750X	7750X	7750X	7750X	7750X	7750X	7750X	7750X	7750X	7750X	3875X	7750X	15500X

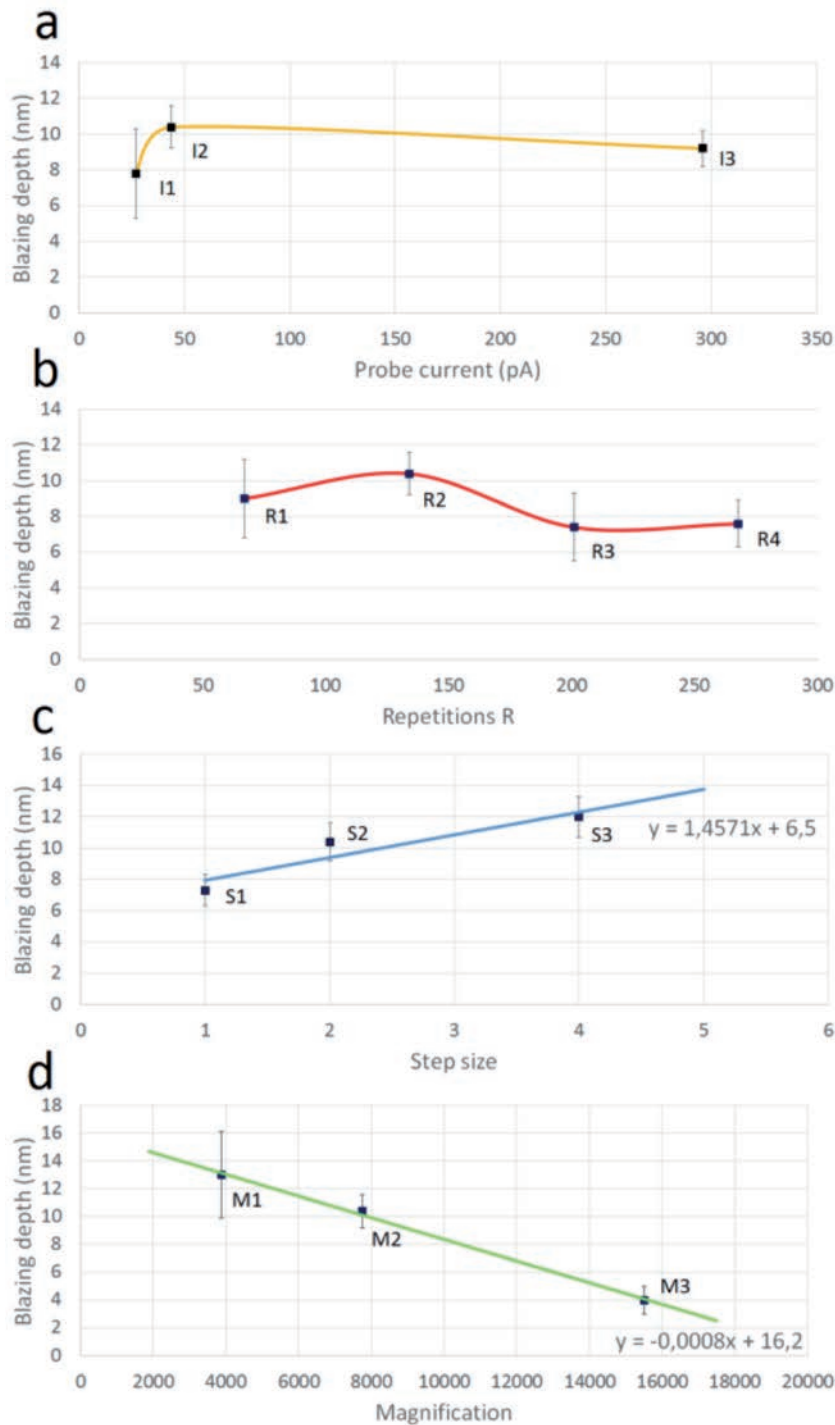


Figure 2. Trends of the blazing depth measured on samples fabricated with different varying parameters. The complete set of parameters can be found in table 1. In (a) probe current varies while step size and magnification are kept constant, in (b) repetitions vary while all the other parameters are kept constant, in (c) step size varies while probe current and magnification are kept constant, in (d) magnification varies while probe current and step size are kept constant. All the other parameters that vary are scaled in order to keep constant the number of ions per unit area. In (a) and (b) the lines are only a guide for the reader; in (c) and (d) the lines are obtained from linear fits.

rent used for Au removal can be chosen as high as needed, in order to reduce the removal time, without affecting the quality of the milling. Regarding the CGH patterning, on the contrary, many FIB parameters can have an influence on the quality of the fabrication, and these will be the object of our study.

We used a FEI Strata DB235M Dual Beam system operated at 30 kV, investigating the quality of the blazed patterning as a function of instrumental parameters like the FIB probe current (I), and on patterning parameters such as the number of repetitions (R), the step size (S) and the magnification (M). The FIB current is related to the probe size, with higher currents corresponding to larger probe sizes. The ion probe is convoluted with the hologram pattern and represents a lower boundary for the smallest feature that can be written. The number of repetitions is the

number of times the whole pattern is scanned on the substrate, it affects the overall patterning time and the maximum depth reached. The step size is the number of pixels separating two adjacent points in the patterning file; since the space of the pattern file is dimensionless, the actual dimension of the step size and of the whole pattern will depend on the magnification chosen while patterning.

TEM analyses

Once the holograms were fabricated, their analysis has been carried out inside the TEM; the microscope used is a JEOL JEM-2010 TEM operated at 200 kV, equipped with Gatan Imaging Filter (GIF). The technique used is Energy Filtered-TEM (EFTEM) thickness mapping (Williams and Carter, 2009); the thick-

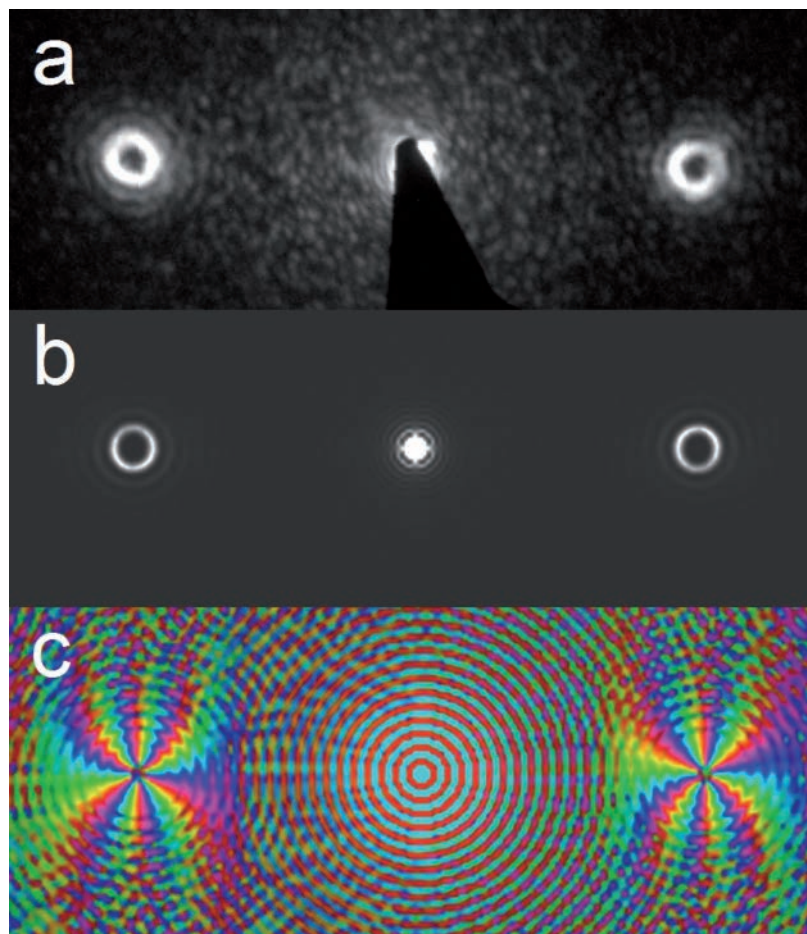


Figure 3. Diffraction pattern generated by hologram “B”: experimental intensity (a), simulated amplitude (b) and simulated phase (c). The micrograph in (a) is taken in experimental conditions where the TEM is not calibrated (high camera length), therefore any scale bar is present.

ness map data obtained with the Log-Ratio method (Egerton, 2011), expressed in number of total inelastic mean free paths (λ_i), are then converted in nanometres using the value of λ_i inside the Si_3N_4 , which is approx. 126 nm for 200 keV electrons (Egerton, 2011). From each of these maps, obtained from samples fabricated with different parameters, thickness profiles of similar zones were extracted and the average blazing depth was calculated. Furthermore, once the best fabrication parameters were determined, the hologram was observed inside a TEM in low angle diffraction mode. For this purpose, we chose a FEI Tecnai F20 ST TEM operated at 200 keV. The resulting diffraction pattern was compared with the expected amplitude and phase profiles, which were simulated with the software Stem Cell starting from the CGH.

Results and discussion

Ten holograms were fabricated with different parameters, and analysed; they belong to four different series, and each series has only one varying parameter. A *starting set* of parameters, supposed to be the best for our purposes, was chosen, and represents a jointing point of these series. This starting set of parameters is: $I = 44$ pA, $R = 134$, $S = 2$, $M = 7750X$, corresponding to an hologram area with diameter $d = 10$ μm , and minimum feature size of 280 nm. A thickness map of this sample, taken in the central zone where the dislocations are visible, is shown in fig.1a; the thicker regions appear here as brighter. The marked rectangular area is the one where the thickness profile in Fig.1b was calculated, and was chosen because it is uniform across its length, not presenting bright or dark spots, which are mainly due to the membrane surface roughness. The thickness profile in fig.1b shows the average membrane thickness, expressed in number of total inelastic mean free paths. From this profile, an average blazing depth of (10 ± 1) nm is calculated by measuring the average peak-to-valley difference and multiplying it by the mean free path length.

The same analysis was done on all the holograms; a chart with the fabrication parameters of the holograms is shown in Table 1. The results of the analyses are presented in the graphs of Figure 2. A trend of the blazing depth as a function of the FIB probe current is shown in figure 2(a): in order to conserve the overall dose, writing times (i.e. repetition number) have

been rescaled accordingly. The maximum blazing depth is reached for probe current values around 50 pA. Both higher and lower probe currents give worse results but for two different reasons: higher probe currents mean larger FIB probes with extended tails that round the features and decrease the blazing depth; lower probe currents, on the other hand, would improve spatial resolution, but the increased writing times bring in mechanical stability issues that worsen the quality of fabrication.

As far as the number of writing repetitions is concerned, we can see from Figure 2(b) that blazing depth is not proportional to the repetition number as we expected, but it has a maximum for $R=140$ and then decreases. A possible reason for this trend is the re-deposition of sputtered material in between the features, an effect that is known to limit the aspect ratio of FIB-milled nanostructures (Ishitani and Ohnishi, 1991).

Step size and magnification, instead, exhibit the expected linear behaviour, as it can be seen from the linear fit of the data in Figure 2(c) and figure 2(d). In both cases, in order to conserve the overall dose, writing times (i.e. repetition number) have been rescaled accordingly. As far as the step size is concerned, we increased the pixel interval between adjacent points of the pattern, keeping the magnification constant; as a result, the smallest patterned feature (140 nm for S1, 280 nm for S2 and 560 S3) and the hologram diameter (5 μm for S1, 10 μm for S2, 20 μm for S3) were increased. As far as magnification is concerned, we kept the step size constant ($S=2$) and increased the magnification in order to obtain reversed data sets for the minimum feature size (560 nm for M1, 280 nm for M2 and 140 nm for M3) and the hologram diameter (20 μm for M1, 10 μm for M2, 5 μm for M3). Given the fact that the beam current, and so the probe size, remained constant while changing both the step size and the magnification, these results show that the limiting factor for depth resolution is the size of the beam with respect to the smallest patterned feature.

The results show that we obtain larger blazing depths with parameters corresponding to a hologram diameter of 20 μm , double than the one of the starting set of parameters. Recalling that it is fundamental to maintain high spatial and temporal coherence, a large hologram would give spatial coherence problems because the plane wave approximation for the impinging wavefunction can be valid only on a restricted area. For this reason there has to be a com-

promise between small holograms, with a high coherence condition but low blazing depth, and large holograms, with high blazing depth but low spatial coherence. In order to check if the starting set of parameters was a suitable choice, the hologram corresponding to series named I2, R2, S2 and M2, was analysed with low angle diffraction. The resulting diffraction intensity pattern is shown in figure 3(a). This pattern has to be compared with the one in figure 3(b), which is the simulated diffraction amplitude profile, obtained using the CGH. The experimental and simulated pattern agree, confirming that the chosen parameters are a suitable choice for both blazing depth and hologram area. Figure 3(c) shows then the simulated phase profile, which reveals a phase shift along one complete turn on the diffracted ring of $6 \times 2\pi$, corresponding to a beam with $6\hbar$ orbital angular momentum (OAM) (Bliokh *et al.*, 2007).

Conclusions

Electron holograms were fabricated on Si_3N_4 membranes by means of focused ion beam. Various fabrication parameters (probe current, number of repetitions, step size and magnification) were changed in

order to find the optimal conditions for a higher blazing depth. The best results were obtained for probe current of 50 pA and a number of repetitions close to 140. Increasing the step size and decreasing the magnification also led to better results due to an increase of the hologram area and to an increase of the smallest patterned feature. However, the hologram area must be kept reasonably small, in order to maintain high spatial coherence in the interferential encoding process. The sample fabricated according to the starting set of parameters was observed in low angle diffraction-TEM, and the resulting intensity profile was found to be in good agreement with the simulated amplitude profile. Phase profile was also simulated, showing that the generated beam possesses an OAM equal to $6\hbar$.

Acknowledgements

We would like to thank Stefano Frabboni from University of Modena and Reggio Emilia and Vincenzo Grillo from CNR-Nano S3 Modena for their kind support. Part of the experimental work done by Roberto Balboni at CNR-IMM Bologna is gratefully acknowledged.

References

- Bandres MA, Gutiérrez-Vega JC. Ince-Gaussian beams. *Optics Letters* 2004;29(2):144-6.
- Bliokh KY, Bliokh YP, Savelev S, Nori F. Semiclassical dynamics of electron wave packet states with phase vortices. *Phys. Rev. Lett.* 2007;99:190404.
- Bolduc E, Bent N, Santamato E, Karimi E, Boyd RW. Exact solution to simultaneous intensity and phase encryption with a single phase-only hologram. *Optics Letters* 2013;38(18):3546-9.
- Cowley JM. Twenty forms of electron holography. *Ultramicroscopy* 1992;41:335-48.
- Davis JA, Cottrell DM, Campos J, Yzuel MJ, Moreno I. Encoding amplitude information onto phase-only filters. *Appl. Optics* 1999;38(23):5004-13.
- Egerton RF. *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the electron microscope*. 3rd ed. New York: Springer; 2011.
- Gabor D. A new microscopic principle. *Nature* 1948;161:777-8.
- Gabor D. Microscopy by reconstructed wave-fronts. *Proc. Roy. Soc. A* 1949;197:475.
- Gabor D. Microscopy by reconstructed wave fronts: II. *Proc. Phys. Soc. B* 1951;64:244.
- Gabor D. Theory of electron interference experiments. *Rev. Mod. Phys.* 1956;28(3):260.
- Grillo V, Rotunno E. STEM_CELL: A software tool for electron microscopy: part I - simulations. *Ultramicroscopy* 2013;125:97-111.
- Grillo V, Gazzadi GC, Karimi E, Mafakheri E, Boyd RW, Frabboni S. Highly efficient electron vortex beams generated by nanofabricated phase holograms. *Appl. Phys. Lett.* 2014;104:043109.
- Grillo V, Pierce JS, Karimi E, Harvey TR, Balboni R, Gazzadi GC, et al. Structured electron beam illumination: a new control over the electron probe weird probes and new experiments. *Microsc. Microanal.* 2015;21(S3):25.
- Grillo V, Karimi E, Balboni R, Gazzadi GC, Venturi F, Frabboni S, et al. Electron holograms encoding amplitude and phase for the generation of arbitrary wavefunctions. *Microsc. Microanal.* 2015;21(S3):503.
- Harris J, Grillo V, Mafakheri E, Gazzadi GC, Frabboni S,

- Boyd RW, et al. Structured quantum waves. *Nature Physics* 2015;11(8):629-34.
- Ishitani T, Ohnishi T. Modeling of sputtering and redeposition in focused-ion-beam trench milling. *J. of Vacuum Science & Technology A* 1991;9:3084.
- Lesem LB, Hirsch PM, Jordan JA. Computer synthesis of holograms for 3-D display. *Jr. Commun. (ACM)* 1968;11:661-74.
- Lesem LB, Hirsch PM, Jordan JA. The kinoform: a new wavefront reconstruction device. *IBM Jr. of Research and Development* 1969;13:150-5.
- Mollenstedt G, Duker H. Beobachtungen und messungen an biprisma-interferenzen mit elektronenwellen. *Z. Phys.* 1956;145:377-9. German.
- Pozzi G. *Microscopia e olografia con elettroni*. 1st ed. Bologna: Bononia University Press; 2013. Italian.
- Sampsel JB, inventor; Texas instruments Inc., assignee. Spatial light modulator. United States patent US 4954789. 1990 Sep 4.
- Uchida M, Tonomura A. Generation of electron beams carrying orbital angular momentum. *Nature* 2010;464:737-9.
- Verbeeck J, Tian H, Van Tendeloo G. How to manipulate nanoparticles with an electron beam?. *Advanced Materials* 2013;22(8):1114-7.
- Williams DB, Carter CB. *Transmission electron Microscopy*. 2nd ed. New York: Springer; 2009.

I VANTAGGI DEI SOCI SISM

Essere Soci SISM (Società Italiana Scienze Microscopiche) vuol dire far parte di una Società Scientifica che, nata dalla consolidata tradizione scientifica della SIME (Società Italiana di Microscopia Elettronica), opera con uno spirito di forte dinamicità nei diversi settori della Microscopia, è sempre attenta alle continue evoluzioni tecniche e scientifiche in ambito Biologico, Biomedico e in Scienza dei Materiali e ha voluto fare della integrazione tra Ricercatori, Tecnici e quanti sono interessati alle applicazioni ed al progresso delle Scienze Microscopiche il suo obiettivo costante. La Società promuove Congressi Scientifici a livello nazionale ed internazionale, organizza e sponsorizza Scuole, Corsi teorico-pratici, Workshops, Seminari su specifici temi di particolare interesse e/o attualità per favorire l'aggiornamento teorico-applicativo di ricercatori, operatori professionali e personale specializzato delle aziende del settore.

Essere Soci SISM vuol dire:

- far parte dell'EMS (European Microscopy Society, www.eurmicsoc.org) e usufruire delle opportunità offerte dalla Società Europea in termini di informazioni, aggiornamenti, Corsi e Congressi a cui si può partecipare con quote ridotte;
- avere la possibilità di ricevere la rivista semestrale *Microscopie* che contiene informazioni riguardanti non solo le attività della Società, ma anche le novità che possono offrire le Ditte legate al settore, recensioni su pubblicazioni di interesse per i microscopisti, articoli scientifici e contributi dai diversi Centri di Microscopia che, diffusi su territorio nazionale, offrono grandi potenzialità in termini di strumentazioni e di competenze scientifiche facilmente condivisibili tra i Soci SISM;
- essere informati delle attività, Congressuali e non, che coinvolgono il mondo della microscopia in tutti i suoi aspetti;
- partecipare con quote vantaggiose a tutte le attività della Società;
- partecipare con quote vantaggiose alle iniziative accreditate secondo il progetto ECM (Educazione Continua in Medicina);
- avere la possibilità, per i giovani non strutturati, di usufruire di premi e borse di studio intese a favorire la partecipazione a Congressi di Microscopia nazionali ed internazionali e a premiare la ricerca svolta;
- avere libero accesso, a richiesta, a materiale didattico e scientifico prodotto dalla Società su argomenti di particolare attualità e interesse;
- avere la possibilità, per i Soci che siano promotori di attività di spin-off, di partecipare, con quote vantaggiose, alle iniziative della Società.

In conclusione, essere Soci della SISM vuol dire far parte di una Comunità di Microscopisti attiva, dinamica e in continua evoluzione non solo su scala nazionale, ma anche in un contesto europeo.

Per maggiori informazioni si prega di consultare il sito all'indirizzo www.sism.it.

TARIFE INSERZIONI PUBBLICITARIE

La rivista *Microscopie* è una pubblicazione a carattere tecnico-scientifico edita dalla Società Italiana Scienze Microscopiche (SISM) che viene distribuita a tutti i soci. La rivista ha periodicità semestrale ed è stampata in b/n in formato A4 con copertina a colori. A pagamento possono essere inserite pagine interne a colori. Le tariffe per le inserzioni pubblicitarie sono le seguenti:

Pagina interna colore € 500,00

Seconda, terza o quarta di copertina (colore) € 800,00

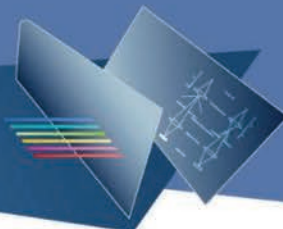
I prezzi si intendono per singola pagina, IVA esclusa.

Il materiale pubblicitario, di elevata qualità, deve essere fornito su supporto digitale e deve essere inviato almeno 15 giorni prima della pubblicazione della rivista al seguente indirizzo:

Manuela Malatesta
Dipartimento di Neuroscienze Biomedicina e Movimento, Sezione di Anatomia e Istologia
Università degli Studi di Verona, strada Le Grazie, 8 37134 Verona
Tel. +39.045.8027569/8425115
E-mail: manuela.malatesta@univr.it

Date di pubblicazione della rivista: 15 Marzo e 15 Settembre.

Istruzioni per gli autori: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/microscopie/about/submissions>



F2: Cold FEG Multi-purpose Electron Microscope

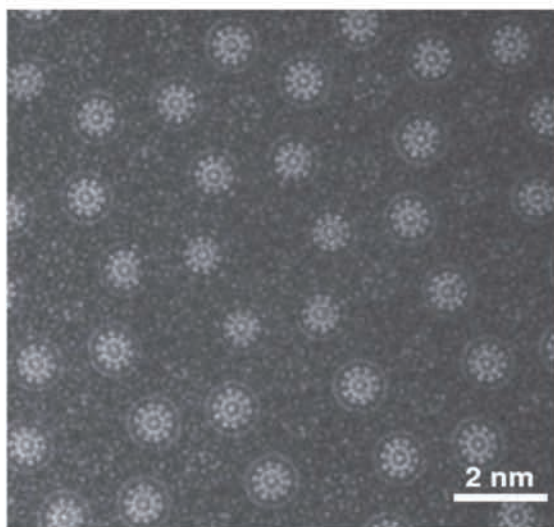
PN-TEM-003

The **F2** is a new concept of **20-200kV TEM** equipped with a **Cold FEG**. This new generation of multi-purpose electron microscope is designed specifically to meet today's diversified needs.

Thanks to the high brightness and small probe size of the Cold FEG, the F2 is able to reach an unprecedented guaranteed resolution for **STEM (0.14nm)**, **EDS (1.7sr)** and **EELS (0.3eV)** at the same time; creating a new class of high-end non-corrected TEM.



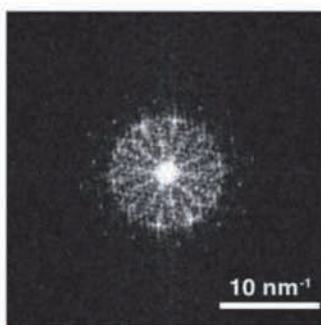
Over the last decades, STEM has emerged as a powerful tool for studying nanomaterials. Many techniques have been developed, Bright Field, Dark Field, High Angle Annular Dark Field, and Annular Bright Field, to characterize materials. By using a STEM detector with a large inner radius, diffraction contrast can be avoided, leading to HAADF image intensity being linked to Z-contrast (atomic number). This allows for even complicated crystal systems, such as Quasicrystals, to be visualized. Coupled with the **Cold FEG** and **F2's new DeSCAN** system, wide area HAADF images can be analyzed with high energy resolution EELS.



STEM-HAADF image

Specimen: Quasicrystal

Courtesy of Professor Emeritus K. Hiraga - Tohoku University



High-resolution analytical systems, such as transmission electron microscope (TEM) and scanning transmission electron microscope (STEM), are attracting increasing attention. Higher resolution and higher efficiency are required for modern systems, along with upgraded and intuitive ease of operation. As the Schottky was not able to meet all these needs, the Cold FEG **F2** has been developed as a **next-generation electron microscope**.



Scientific / Metrology Instruments
Multi-purpose Electron Microscope

F2

Entirely revolutionized TEM

New features of F2 :

- Improved Cold FEG
- Advanced EELS
- Dual SDD EDS
- Advanced Scan System
- Smart Design
- SpecPorter
- Environment-friendly

