POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Trattamento con oli essenziali di materiale cartaceo alluvionato e biodeteriorato

Relatori

prof. Davide Fissore
prof. Francesca Bosco

Candidato

Carola Martina

Dicembre 2019

Indice

Indice **1**

1. Introduzione **3**

1.1 *Il deterioramento della carta* 5

1.2 *Tecniche per l'asciugatura della carta* 5

1.2.1 La liofilizzazione 6

1.2.1.1 Definizione e fasi del processo 6

1.2.1.2 Apparecchiatura e condizioni operative 8

1.2.1.3 Effetti della liofilizzazione sul materiale cartaceo 10

1.3 *La contaminazione microbica della carta* 12

1.4 *Interventi di recupero della carta contaminata da microrganismi* 14

1.4.1 Il congelamento e la liofilizzazione quali tecniche per il recupero di materiale cartaceo contaminato 15

1.5 *Gli oli essenziali* 17

1.5.1 L'estrazione degli oli essenziali 17

1.5.2 L'attività antimicrobica degli oli essenziali 18

1.5.3 Il meccanismo d'azione degli oli essenziali 21

1.5.4 Metodi per la valutazione antimicrobica degli oli essenziali 23

1.5.5 Gli oli essenziali per inibire la crescita microbica su carta 25

1.6 *Scopo del lavoro* 25

2. Materiali e metodi **27**

2.1 *Materiali* 27

2.2 *Composizione dei campioni cartacei* 28

2.2.1 Microrganismi e condizioni colturali 28

2.2.2 Inoculo dei microrganismi su carta 30

2.2.3 Immersione dei blocchetti di carta 32

2.2.4 Composizione dei campioni 33

2.3 *Trattamento tramite liofilizzazione* 34

2.3.1 Congelamento dei campioni 34

2.3.2 Scongelamento dei campioni....35
2.3.3 Processo di liofilizzazione....35
2.3.4 Analisi fisiche post-liofilizzazione....35

2.4 *Trattamento con oli essenziali*....36
2.4.1 Preparazione degli oli essenziali....36
2.4.2 Prove preliminari con gli oli essenziali....36
2.4.2.a Prove con il metodo di diluizione....36
2.4.2.b Prove con olio essenziale nebulizzato....41
2.4.3 Trattamento dei campioni post-congelamento e post-liofilizzazione....42
2.5 *Analisi microbiologica dei campioni*....43
2.6 *Trattamento con olio essenziale di un volume cartaceo contaminato*....44

3. Risultati e commenti....47
3.1 *Investigazione preliminare dell'effetto degli oli essenziali*....47
3.1.1 Studio dell'effetto degli oli essenziali in terreno liquido....47
3.1.2 Studio dell'effetto dell'olio essenziale su microrganismi cresciuti su supporto cartaceo....52
3.2 *Effetto della liofilizzazione sui campioni cartacei*....56
3.3 *Studio dell'effetto dell'olio essenziale sui microrganismi liofilizzati*....60
3.3.1 Effetto su *Rhodotorula mucilaginosa*....60
2.3.2 Effetto su *Staphylococcus epidermidis*....61
2.3.3 Effetto su *Alternaria alternata*....63
3.4 *Confronto dell'effetto dell'olio essenziale post-congelamento e post-liofilizzazione*....70
3.5 *Effetto dell'olio essenziale su un caso reale*....76

4. Conclusioni....79
5. Bibliografia....81
Ringraziamenti....85

1 Introduzione

L'Italia è un paese a grave rischio idrogeologico, colpito sempre più frequentemente da violenti acquazzoni e alluvioni. L'acqua, a differenza di quanto si possa pensare, può essere molto dannosa poiché, dove non distrugge, ha effetti che si possono manifestare nel tempo. L'esempio più lampante delle conseguenze distruttive dell'acqua è il danno che arreca alla carta, la quale non è solo un materiale di uso comune, ma anche un supporto su cui viene tenuta traccia di gran parte del nostro passato. Infatti, nonostante stiamo vivendo in un'era in continua digitalizzazione, il nostro Paese è colmo di archivi pubblici e privati, storici e correnti, in cui vengono conservati milioni di documenti cartacei, che l'acqua è in grado di danneggiare facilmente. Basti pensare al disastro avvenuto a seguito dell'alluvione nel novembre del 1966 a Firenze, a causa della quale vennero rovinati centinaia di documenti, arrecando moltissimi danni al patrimonio artistico della città (Figura 1.1).

Figura 1.1: archivio ospedaliero di Firenze in seguito all'alluvione del '66. *Figura tratta da http://www.sa-toscana.beniculturali.it/alluvione.*

È in questo contesto che esperti restauratori, biologi e ingegneri hanno unito le proprie conoscenze per sviluppare tecnologie sempre più avanzate per il recupero dei beni documentali danneggiati da acqua, fango e altre sostanze in seguito ad allagamento e incendi. L'asciugatura dei documenti, infatti, richiede estrema competenza e l'impiego di tecnologie sofisticate ne permette il recupero in tempi rapidi.

Il processo che offre la soluzione migliore per questo genere di interventi è la liofilizzazione, un particolare metodo di essiccazione in cui il materiale viene prima congelato e poi, per effetto dell'abbassamento della pressione nell'ambiente in cui il materiale viene alloggiato, il liquido di cui è imbevuto passa direttamente dalla fase solida a quella vapore. Questa tecnologia consente di ridurre l'umidità residua dei campioni a valori molto bassi ed è in grado di minimizzare le modifiche irreversibili della struttura del materiale che sono inevitabili a valle di un processo di asciugatura, oltre a poter essere

applicata a sostanze termolabili: per questo motivo l'impiego della liofilizzazione è diventata una prassi usuale per il recupero dei beni archivistici e librari. L'intervento sui materiali danneggiati dall'acqua, però, deve avvenire in maniera tempestiva, per evitare la proliferazione di microrganismi fungini e batterici (Figura 1.2).

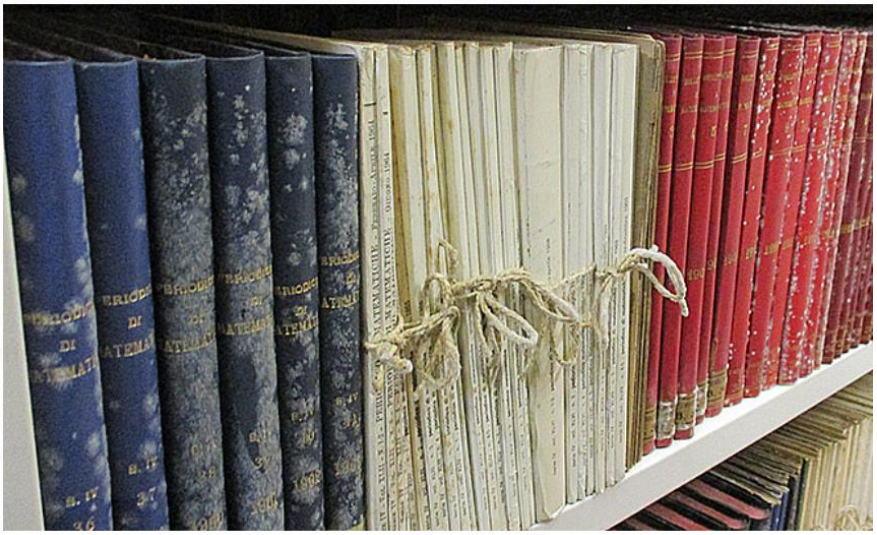

Figura 1.2: muffe su volumi archivistici: conseguenze di danni da acqua. *Figura tratta da http://www.prodoc.it/recupero-documenti-in-caso-di-attacchi-microbici-e-muffe.*

Un problema molto importante e da tenere sempre in considerazione nel mondo delle biblioteche e degli archivi è, infatti, quello del biodeterioramento: i supporti scrittori possono subire modificazioni causate da organismi o microrganismi, i quali li utilizzano come fonte di nutrimento o come supporto al proprio sviluppo in condizioni ambientali adatte alla loro proliferazione.

Nonostante la liofilizzazione si sia dimostrata essere di grande utilità in tutti i casi in cui è stato necessario bloccare la proliferazione di microrganismi, poiché nei materiali congelati non si ha ulteriore crescita microbica, l'essiccazione sottovuoto può solo ritardare e non impedire un eventuale deterioramento biologico. Inoltre, non può essere considerata un procedimento di prevenzione per successivi attacchi di microrganismi. Perciò, per prevenire e controllare il biodeterioramento della carta sono stati messi a punto differenti metodi, che principalmente consistono nell'applicazione di prodotti chimici allo stato gassoso o liquido.

In questo quadro, la potenziale attività antimicrobica di sostanze quali gli oli essenziali riveste un particolare interesse. Gli oli essenziali sono composti naturali, volatili e complessi, estratti da piante aromatiche che li producono come metaboliti secondari. Nel corso degli ultimi decenni, infatti, la resistenza dei microrganismi verso gli antibiotici è aumentata in modo significativo e, per questo motivo, la ricerca scientifica ha cominciato a valutare nuove classi di molecole "naturali", efficienti ed a minor impatto ambientale; tra queste gli oli essenziali sembrano essere molto promettenti.

1.1 Il deterioramento della carta

La carta, con il tempo, subisce un invecchiamento naturale che determina una modificazione del suo stato originario. Tale deterioramento è causato sia da fattori intrinseci, quali i materiali di cui è costituita, che da fattori estrinseci, come, per esempio, dagli eventi della sua storia conservativa.

Il degrado della carta colpisce generalmente la struttura chimica delle fibre provocando la frammentazione o l'indebolimento delle catene cellulosiche di cui è composta: le cause di tale infragilimento sono da ricercare in fenomeni di origine chimica, fisica o biologica, oppure nel loro effetto sinergico. Il degrado chimico della carta è legato a reazioni di ossidazione o di idrolisi. Le reazioni di ossidazione aumentano l'acidità nella carta, che si manifesta con un suo imbrunimento più o meno accentuato e non sempre uniforme. In ambienti con elevati valori di umidità relativa, l'acqua assorbita è responsabile di reazioni di idrolisi della cellulosa che vanno ad incidere ulteriormente sul suo degrado. Un elevato tasso d'umidità relativa, inoltre, influisce in modo determinante anche sulle caratteristiche estetiche dei materiali cartacei, le cui fibre possono subire un rigonfiamento e una conseguente deformazione.

Il deterioramento del materiale cartaceo è un processo naturale e irreversibile, che può essere solo rallentato, tenendo sotto controllo i fattori ambientali che tendono ad accelerarlo. Temperatura, umidità relativa, luce, inquinamento atmosferico costituiscono i principali fattori ambientali che influiscono sul degrado della carta ed eventi catastrofici come incendi o alluvioni ne accelerano il processo (Pagano, 2005).

1.2 Tecniche per l'asciugatura della carta

In seguito ad allagamenti e alluvioni, qualsiasi trattamento di restauro su libri e documenti danneggiati dall'acqua richiede sempre, in primo luogo, un intervento di asciugatura, da eseguirsi con grande cura e attenzione, a cui possono o devono seguire altri interventi di restauro e conservazione. I beni bagnati, infatti, devono essere manipolati in maniera oltremodo cauta per evitare danni di natura meccanica e devono essere rapidamente congelati, al fine di impedire lo sviluppo di agenti biologici. La rapidità dell'intervento è, infatti, fondamentale per evitare danni ulteriori causati dalla proliferazione di muffe e batteri che usano i componenti organici costituenti la carta come fonte di nutrimento: nelle emergenze si impiega qualsiasi tipo di congelatore reperibile sul territorio e solo in un secondo momento si procede alla rimozione del ghiaccio e all'asciugatura.

Le tecniche di asciugatura più frequenti, specialmente su oggetti ancora rilegati, si basano sull'interfoliazione e sull'asciugatura in ambienti ventilati, o al più con l'uso di armadi essiccatori a circolazione forzata di aria: queste operazioni necessitano di locali ampi, numerosa manodopera, grandi quantità di carta da interfoliazione e una ventilazione con aria essiccata, non sempre disponibile.

Un metodo efficace ed efficiente di asciugatura, alternativo a quello tradizionale, è la liofilizzazione: il suo successo, nei confronti di altri processi di essiccamento, è dovuto al fatto che è condotto a bassa temperatura, la quale consente di preservare maggiormente le caratteristiche qualitative del prodotto (Fissore *et al*., 2017).

1.2.1 La liofilizzazione

1.2.1.1 Definizione e fasi del processo

Il processo della liofilizzazione, messo a punto agli inizi dal Novecento da ricercatori francesi presso il Collège de France, consiste nella disidratazione per sublimazione di prodotti liquidi, pastosi o solidi, preventivamente congelati.
La sublimazione del ghiaccio, ovvero il suo passaggio diretto dallo stato solido allo stato di vapore, senza passare dallo stato liquido, avviene dipendentemente dalle condizioni di temperatura e pressione in cui si trova il materiale. In particolar modo, osservando il diagramma di stato in Figura 1.3, che presenta in funzione della temperatura e della pressione lo stato fisico in cui si trova l'acqua, si nota che l'unico modo per far avvenire la sublimazione è quello di lavorare a una pressione inferiore a quella del punto triplo, pari a 6.117 mbar, andando ad aumentare la temperatura.

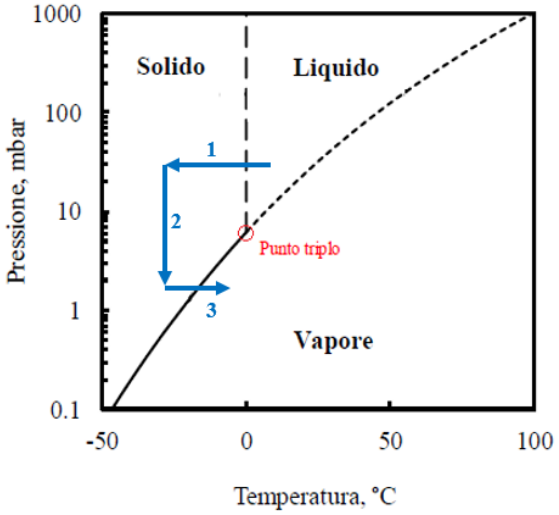

Figura 1.3: diagramma di stato dell'acqua con evidenziate le fasi della liofilizzazione dei volumi cartacei (1: congelamento, 2-3: essiccamento primario). *Figura tratta da Fissore et al. (2017) con modifiche.*

Nel processo di liofilizzazione si distinguono tre fasi:

1. il congelamento dell'acqua,
2. l'essiccamento primario,
3. l'essiccamento secondario.

Durante la prima fase, l'abbassamento della temperatura a pressione atmosferica consente il passaggio dell'acqua dallo stato liquido allo stato solido. Lo stadio del congelamento può svolgere spesso un ruolo importante per quanto riguarda la qualità del prodotto finito. Per esempio, il congelamento ad alta velocità porta alla formazione di cristalli di ghiaccio di dimensioni minori e ciò consente di ottenere, alla fine del processo, un prodotto con più elevata resistenza meccanica. È da sottolineare, però, che in questa fase non tutta l'acqua congela: una piccola quantità, denominata acqua legata, non forma cristalli di ghiaccio, ma rimane adsorbita e legata alle molecole del materiale trattato. Il quantitativo di acqua legata in un materiale dipende dalle caratteristiche del prodotto e in genere non supera qualche percento del totale (Fissore *et al.*, 2017).

La liofilizzazione prevede, come anticipato, due fasi consecutive: l'essiccamento primario, nella quale il ghiaccio sublima, consentendo così la completa rimozione dell'acqua libera, e l'essiccamento secondario, nella quale si riduce il contenuto di acqua legata, così da ottenere il valore desiderato di umidità nel prodotto finale. Le condizioni operative di temperatura e pressione delle due fasi sono differenti: solitamente l'essiccamento secondario viene condotto aumentando la temperatura e diminuendo ulteriormente la pressione all'interno dell'ambiente in cui il materiale è processato, rispetto ai valori utilizzati durante l'essiccamento primario, al fine di agevolare il processo di desorbimento dell'acqua legata.

Nel caso in cui ad essere liofilizzati siano libri e materiale cartaceo si può ritenere soddisfacente la deumidificazione che si ottiene al termine dell'essiccamento primario, senza quindi effettuare l'essicamento secondario. La carta non necessita infatti di una completa disidratazione, ma solo di una asciugatura, mantenendo quella quantità d'acqua che ogni costituente contiene naturalmente, mettendosi poi in equilibrio con l'ambiente di conservazione. I beni librari e archivistici sono, inoltre, oggetti polimaterici dove carta, pergamena, cuoio e altro convivono e ai quali non sempre si possono applicare i parametri e i processi utilizzati per la sola carta: possedendo caratteristiche diverse, un essiccamento completo potrebbe produrre un ulteriore danno. Quindi, con riferimento alle frecce in Figura 1.3, le diverse fasi della liofilizzazione relative ai volumi cartacei, possono essere così riassunte:

- congelamento dell'acqua, che avviene a temperatura e pressione maggiori di quelle del punto triplo, *freccia 1*;
- abbassamento della pressione all'inizio dell'essiccamento primario, *freccia 2*;
- innalzamento della temperatura durante l'essiccamento primario, con il quale il ghiaccio sublima, *freccia 3*.

La sublimazione del ghiaccio e il desorbimento dell'acqua legata sono processi endotermici, e, quindi, durante l'intero processo è necessario fornire energia al prodotto: generalmente, il materiale da processare viene riscaldato facendo scorrere un fluido tecnologico a temperatura idonea all'interno dei ripiani su cui poggia. Come illustrato schematicamente in Figura 1.4, durante il processo di liofilizzazione si crea un'interfaccia di sublimazione, ossia una superficie di separazione tra il prodotto ancora congelato e il prodotto essiccato: in corrispondenza di tale interfaccia il ghiaccio sublima e il vapore si allontana lasciando dietro di sé il prodotto essiccato (Fissore *et al*., 2017).

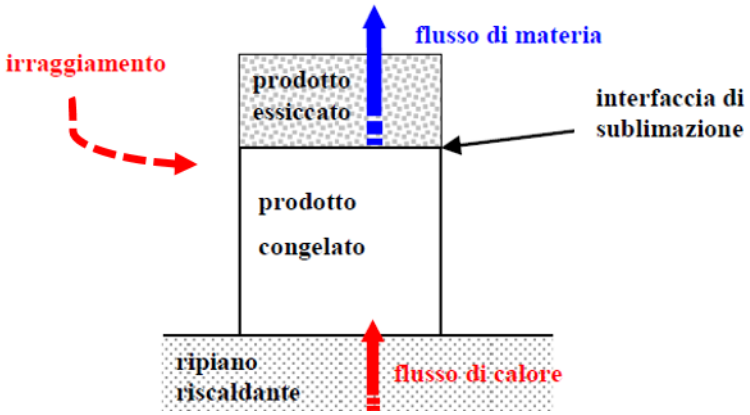

Figura 1.4: schema di un prodotto durante il processo di liofilizzazione. *Figura tratta da Fissore et al. (2017), con modifiche.*

È da sottolineare che, durante l'essiccamento, il riscaldamento avviene inevitabilmente anche per irraggiamento delle pareti, facendo procedere la liofilizzazione anche dalle superfici laterali del campione e non solo dalla superficie superiore (Crespi *et al.*, 2008). Il progredire dell'interfaccia di sublimazione dovuto al contributo energetico dell'irraggiamento è bene visibile in Figura 1.5, che riporta delle immagini a tempi diversi del nucleo di ghiaccio presente all'interno di un blocchetto di carta durante il processo di liofilizzazione. Con il procedere dell'essiccamento, lo spessore del prodotto congelato si restringe progressivamente: in particolare, si nota che il nucleo di ghiaccio all'interno del blocco di carta mantiene inizialmente una forma rettangolare e, solo verso la fine dell'essiccazione primaria, si arrotonda (Crespi *et al.*, 2008).

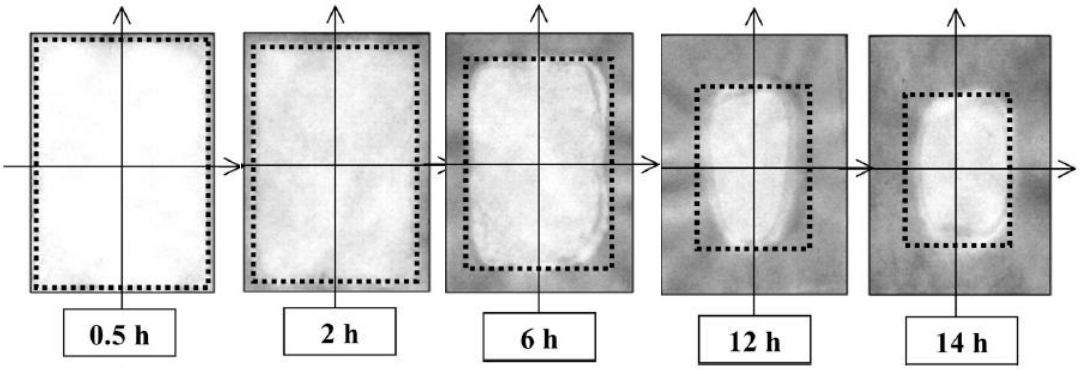

Figura 1.5: evoluzione dell'interfaccia di sublimazione in un foglio posto a metà spessore del campione processato durante il processo di liofilizzazione. *Figura tratta da Crespi et al. (2008), con modifiche.*

1.2.1.2 Apparecchiatura e condizioni operative

La Figura 1.6 presenta in maniera schematica un tipico impianto di liofilizzazione.

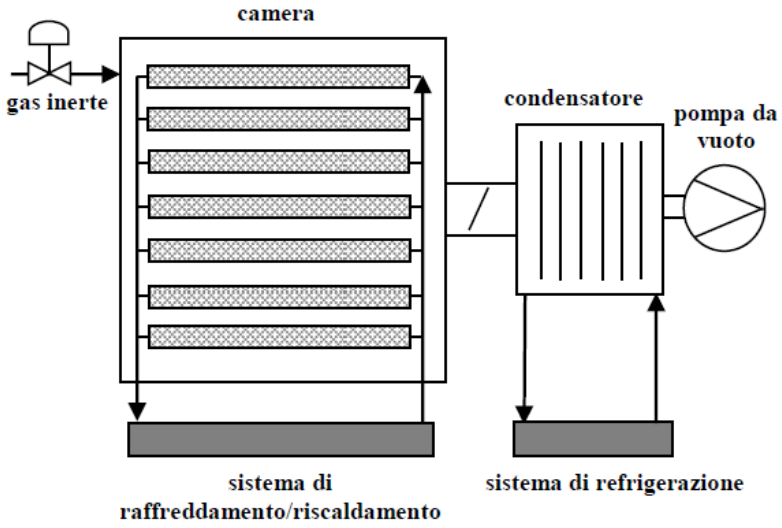

Figura 1.6: schema di un impianto di liofilizzazione. *Figura tratta da Fissore et al. (2017) con modifiche.*

L'apparecchiatura è costituita da una camera che presenta al suo interno dei ripiani, sui quali il materiale da trattare viene disposto. All'interno di tali ripiani viene fatto scorrere un fluido tecnologico che, all'inizio del processo, serve per raffreddare il prodotto causando il congelamento dell'acqua, mentre in seguito, durante le fasi di essiccamento primario e secondario, fornisce calore al prodotto. Una pompa da vuoto consente di mantenere il livello desiderato di pressione all'interno della camera di liofilizzazione. Tra la camera e la pompa vi è un condensatore, dove viene fatto brinare il vapor d'acqua estratto dalla camera di liofilizzazione, così da ridurre la portata volumetrica di gas che la pompa da vuoto deve evacuare; l'apparecchiatura, a tal scopo, viene mantenuta a temperatura molto bassa mediante un sistema di refrigerazione. Utilizzando due condensatori, alternativamente uno in uso e uno in fase di sbrinamento, è possibile ridurre le dimensioni di tale apparecchiatura e diminuire il tempo morto legato allo sbrinamento del condensatore alla fine del processo. L'apparecchiatura è, in genere, dotata di due sensori che misurano la pressione in camera: un manometro capacitivo (tipo Baratron) che permette di misurare la pressione totale e una sonda termoconduttiva (tipo Pirani), la quale invece rileva un valore di pressione influenzato dalla composizione dell'atmosfera in camera. Attraverso il rapporto dei valori forniti da questi due sensori è possibile, quindi, valutare la fine dell'essiccamento primario. Tale curva ha un andamento caratteristico, rimanendo costante per la maggior parte della fase di essiccamento primario, per poi scendere tendendo ad un asintoto orizzontale corrispondente al valore unitario. Quando questo accade le due sonde registrano lo stesso valore di pressione, e ciò sta ad indicare l'assenza di vapore acqueo in camera e, quindi, la conclusione dell'essiccamento (Fissore *et al*., 2017).

Le condizioni operative con cui condurre la liofilizzazione, ovvero la temperatura dei ripiani riscaldanti e la pressione nella camera di liofilizzazione, costituiscono un aspetto critico. Esse, infatti, devono essere accuratamente scelte in modo tale da evitare di danneggiare il prodotto a seguito della fusione del ghiaccio, qualora la temperatura del prodotto sia troppo elevata, e di prolungare eccessivamente la durata del processo, che può raggiungere anche parecchi giorni, qualora la temperatura del prodotto sia troppo bassa. Infatti, seppur dall'esame del diagramma di stato dell'acqua (Figura 1.3) appare che si può avere la sublimazione conducendo il processo di liofilizzazione a una pressione qualsivoglia inferiore ai 6.117 mbar e a una temperatura qualsiasi, operare in tale maniera risulta estremamente rischioso. Occorre, difatti, distinguere tra la pressione parziale dell'acqua nella camera di liofilizzazione e la pressione parziale dell'acqua all'interfaccia di sublimazione, che è superiore alla precedente altrimenti non si avrebbe la forza spingente che consente il flusso di materia dal prodotto congelato all'ambiente esterno, attraverso quello essiccato. Se quindi nell'ambiente si ha una pressione di 6.117 mbar, all'interfaccia la pressione dovrà essere superiore e l'allontanamento dell'acqua potrebbe avvenire passando attraverso la fusione del ghiaccio. Occorre, quindi, lavorare a pressione inferiore a tale valore, considerando anche che il diagramma di Figura 1.3 si riferisce al solo ghiaccio, ma nelle applicazioni di interesse è possibile avere la presenza di soluti, che causano uno spostamento del punto triplo verso il basso e verso sinistra, quindi verso valori di pressione inferiori (Fissore *et al*., 2017). È da sottolineare che, inoltre, la durata del processo non dipende solamente dalla temperatura e dalla pressione in camera di liofilizzazione, ma è funzione anche dello spessore: in particolare, il tempo di essiccamento è, con buona approssimazione, proporzionale al quadrato dello spessore. Quindi, se possibile, sui ripiani del liofilizzatore sarebbe preferibile caricare materiale di spessore non eccessivo e soprattutto uniforme, così da utilizzare l'apparecchiatura nel modo più efficiente possibile (Fissore *et al*., 2017).

1.2.1.3 Effetti della liofilizzazione sul materiale cartaceo

Nota l'efficacia della liofilizzazione come tecnica per il recupero di beni archivistici e librari allagati rispetto ad altri metodi di essiccazione, gli studi scientifici si sono focalizzati sulla valutazione degli eventuali danni che potrebbe provocare alla carta. Gli esiti di queste ricerche, in generale, hanno ribadito che questa tecnologia permette di non alterare la qualità del prodotto che viene liofilizzato, nel quale vengono preservate le caratteristiche qualitative del prodotto iniziale, come struttura e aspetto. Infatti, come si può notare nell'esempio mostrato in Figura 1.7, l'essiccamento della carta mediante liofilizzazione consente di avere minimi fenomeni di arricciamento e accartocciamento, di mantenere il colore originario e, in generale, di riportare i volumi in condizioni prossime a quelle precedenti l'allagamento (Fissore *et al*., 2017).

Figura 1.7: effetto della liofilizzazione sull'aspetto esteriore di un libro sottoposto al processo dopo allagamento. *Figura tratta da Fissore et al., 2017 con modifiche*

Questo aspetto è stato indagato più nel dettaglio da Carlsen (1999) che, nel suo lavoro, si è proposto di valutare come la liofilizzazione influenzi la resistenza meccanica e la stabilità all'invecchiamento di tre tipi differenti di carta. Per condurre tale studio sono stati utilizzati come indicatori il contenuto di umidità, la riserva alcalina, la resistenza meccanica e la resistenza allo strappo. I risultati ottenuti hanno messo in luce che, in tutti i tipi di carta presi in esame, la resistenza allo strappo risulta essere aumentata, probabilmente come conseguenza di un rafforzamento dei legami tra le fibre, dovuto al contatto del materiale con l'acqua, ma la resistenza meccanica diminuisce e ciò potrebbe essere causato da una possibile idrolisi della cellulosa.

Un altro articolo in cui viene investigata la degradazione del materiale cartaceo post liofilizzazione è quello di Bicchieri *et al*. (2006). In questo studio non vengono effettuate misure meccaniche, in quanto considerate poco sensibili alle modifiche strutturali che possono manifestarsi, bensì vengono utilizzate analisi chimiche e ottiche, che sono particolarmente influenzate da variazioni minime delle condizioni ambientali.
Le prove effettuate nel lavoro di Bicchieri *et al*. (2006) sono state:

- la misura delle coordinate di colore e del contenuto in funzioni ossidate, eseguite per accertare se la liofilizzazione potesse aver favorito eventuali degradazioni di tipo ossidativo, con formazione di gruppi cromofori e conseguente ingiallimento della carta;

- la determinazione del pH con estrazione a caldo, per valutare un eventuale incremento di acidità della cellulosa, dovuta a reazioni di ossidazione e di idrolisi;
- la misura del grado di polimerizzazione medio viscosimetrico, per verificare se il trattamento potesse aver indotto la rottura delle catene di cellulosa, con conseguente diminuzione delle caratteristiche di resistenza meccanica dei fogli.

Ciò che ne risulta è che il metodo di asciugatura con liofilizzazione è innocuo nei confronti della cellulosa, in quanto i campioni esaminati non mostrano variazioni di rilievo delle loro caratteristiche chimico-fisiche, né a seguito di congelamento, né dopo essere stati sottoposti al trattamento di asciugatura.

Infine, è da evidenziare che, finora, il metodo della liofilizzazione usato per rimuovere l'acqua dalla carta a seguito di diverse calamità, quasi sempre impiega impianti industriali o di ricerca, non ideati appositamente per questi scopi. Il ricorso a soluzioni di fortuna comporta una serie di problemi pratici non sempre di facile soluzione. In primo luogo, i parametri di funzionamento degli impianti ad uso alimentare o farmaceutico devono essere riconfigurati in funzione delle necessità del materiale librario da trattare e, inoltre, per evitare qualsiasi tipo di contaminazione incrociata, è necessario eseguire un'accurata pulizia e disinfezione di tutto l'impianto sia prima sia dopo il trattamento dei volumi. A queste vanno aggiunte le difficoltà logistiche, derivanti dalla necessità di trasportare dal luogo della catastrofe a quello del trattamento ingenti quantitativi di materiali librari danneggiati e congelati. Tutti questi aspetti, insieme, rendono questo tipo di intervento notevolmente costoso. Per tale ragione, si è pensato di realizzare un impianto trasportabile specifico per le caratteristiche del materiale cartaceo da asciugare. Tra i vari progetti è di particolare interesse l'impianto "Book's WIND", rappresentato in Figura 1.8, il quale, con la sua capienza di circa 1.5 m^3 e la sua forma studiata per facilitare l'inserimento e la rimozione dei volumi, permette di ottimizzazione i tempi, evitando qualsiasi rischio di degradazione del materiale processato (Bicchieri *et al*., 2006).

Figura 1.8: operazione di caricamento dei volumi nell'impianto "Book's WIND". *Figura tratta da Bicchieri et al. (2006), con modifiche.*

1.3 La contaminazione microbica della carta

Una delle principali cause di degrado dei materiali cartacei, in particolar modo in seguito ad un allagamento, è l'attacco degli agenti biologici, costituiti da microrganismi e insetti. La carta, infatti, è caratterizzata da un'alta "biorecettività", definita come l'abilità di un materiale di essere colonizzato da microrganismi (Sequeira *et al*., 2012). Le conseguenze della crescita microbica sono spesso molto gravi: si altera la struttura delle fibre per l'aumento della percentuale d'acqua e, una volta iniziato l'attacco, il microrganismo continua a crescere indipendentemente dalle condizioni di umidità dell'ambiente (Figura 1.9). La biodegradazione della cellulosa causata dai batteri e dai funghi può giungere fino ad un tale indebolimento del supporto cartaceo da rendere molto difficoltosi i trattamenti ai quali i restauratori possono sottoporrei volumi attaccati dai microrganismi (Troiano *et al*., 2012).

Figura 1.19: volume danneggiato da muffe associate al danno da acqua piovana a seguito del terremoto dell'Aquila nel 2009. *Figura tratta da Troiano et al. (2012) con modifiche.*

Le cause che favoriscono l'alta biorecettività della carta vanno ricercate sia nella sua composizione, che nella sua igroscopicità. La carta è costituita principalmente da cellulosa, un polimero organico formato da una sequenza di unità molecolari di glucosio, che rappresenta una fonte di carbonio per i microrganismi (Figura 1.10), così come molti altri componenti come amido, gelatina, collanti, composti organici e inorganici che possono fungere da nutrienti per la crescita di funghi e batteri (Sequeira *et al*., 2012).

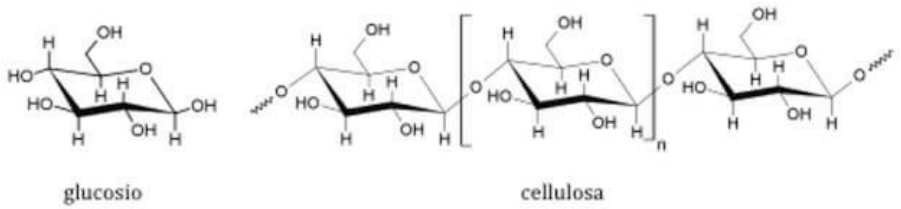

Figura 1.10: struttura chimica del glucosio e della cellulosa. *Figura tratta da https://www.chimica-online.it/organica/cellulosa.htm.*

La struttura fisica e chimica della cellulosa influenza la biorecettività della carta: rispetto alla cellulosa naturale, principalmente cristallina, quella contenuta nella carta ha molti più siti amorfi, derivati dai processi a cui viene sottoposta per la sua produzione. Inoltre, per aumentare la qualità della carta, durante i processi di fabbricazione avviene la rimozione della lignina, che in natura ha il ruolo di aumentare la resistenza della cellulosa all'attacco microbico. Entrambi questi aspetti amplificano la biorecettivitàdella carta, e conseguentemente, la possibilità di biodeterioramento (Gallo *et al*., 1998; Allsopp *et al.*, 2004).

Come anticipato, l'altra causa che favorisce l'alta biorecettività della carta è la variazione del suo contenuto d'acqua, conseguente al mancato controllo dei valori termo-igrometrici degli ambienti deputati alla conservazione di tale materiale. Se, in un ambiente, la temperatura è intorno ai 20°C e il valore di umidità relativa risulta maggiore del 65%, il contenuto d'acqua nella carta supera il 10% e ciò può favorire la germinazione delle spore e la crescita microbica (Karbowska-Berent *et al.*, 2011).

La combinazione dell'intrinseca biorecettività della carta e delle condizioni di conservazione inadeguate rende questo materiale molto suscettibile ai microrganismi biodeteriogeni, principalmente ai funghi. Infatti, nonostante i batteri possano attaccare il materiale cartaceo, i funghi richiedono valori di umidità inferiori per svilupparsi, perciò le condizioni ambientali normalmente esistenti nelle biblioteche, negli archivi o nei musei sono più favorevoli alla crescita dei funghi rispetto a quella dei batteri. Quando un fungo attacca la carta, per crescere e riprodursi necessita di nutrienti: per tale ragione inizia a produrre e secernere enzimi extracellulari che idrolizzano la cellulosa in zuccheri a basso peso molecolare, più facilmente assimilabili (Sequeira *et al*., 2012).

Il biodeterioramento della carta può essere dovuto, oltre che all'attiva crescita dei microrganismi, ai metaboliti che essi secernono durante la crescita e che, accumulandosi nel materiale, possono continuare a danneggiarlo anche dopo la loro morte. Tra questi prodotti extracellulari troviamo la glicerina, che aumenta l'attività dell'acqua e agisce come attivatore di spore, favorendo la diffusione della contaminazione, e i lipidi che, a seguito di auto-ossidazione, generano radicali liberi e perossidi che contribuiscono alla comparsa di colorazioni marroni sulla carta (Florian, 2002).

Vista l'importanza della problematica, molti studi scientifici si sono focalizzati sull'isolamento e identificazione dei microrganismi che frequentemente attaccano il materiale cartaceo conservato all'interno di librerie e archivi. Zyska (1997), nel suo lavoro, evidenzia la complessità di tale processo, dovuta alla vastissima collezione di documenti presenti in tutto il mondo, appartenenti a diverse epoche storiche, da quelle più antiche a quelle più moderne, e costituiti da differenti materiali, come carta, pergamena, tessuto, cere, pelle, colla e inchiostro. Dal lavoro svolto, risulta che i più frequenti ceppi fungini isolati nelle librerie appartengono ai generi *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhodotorula*. Tale risultato conferma quanto ottenuto nello studio di Gallo (1961), nel quale i generi fungini *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Stemphilium* vengono riportati come i più frequenti nel materiale librario. Per quanto riguarda i batteri, invece, un lavoro condotto da Karbowska-Berent *et al.* (2011) ha riportato che il gruppo dominante è quello dei Gram-positivi con i generi *Micrococcus* e *Staphylococcus* (in particolare *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*).

Il biodeterioramento della carta a causa di funghi e batteri è un grave problema nella conservazione della materiale cartaceo e archivistico, non solo a causa dei danni che provoca su di essi, ma anche perché la carta contaminata può costituire un grave rischio per la salute umana, in quanto molti di questi microrganismi possono essere patogeni o tossinogeni. In alcuni casi, anche se i funghi sono morti, le loro strutture possono contenere composti allergenici e/o tossici per l'uomo (Sequeira *et al*., 2012).

È necessario, quindi, per tutte le ragioni elencate in questo capitolo, eseguire degli interventi sul materiale cartaceo e archivistico, in particolare su quello alluvionato, per prevenire o bloccare il loro biodeterioramento.

1.4 Interventi di recupero della carta contaminata da microrganismi

Il mantenimento di bassi livelli di umidità e temperatura, insieme ad una buona circolazione dell'aria, sono procedure ben note per prevenire lo sviluppo di microrganismi biodeteriogeni. Tuttavia, non tutte le biblioteche e gli archivi hanno la possibilità di raggiungere condizioni ambientali adeguate, perciò vi sono una serie di procedure alternative che vengono eseguite per controllare il biodeterioramento dei volumi in essi contenuti.

Nel corso della storia della conservazione del patrimonio culturale, diversi composti chimici tossici (azoli, composti con ammonio quaternario, etc.) sono stati utilizzati per prevenire e controllare il deterioramento della carta da parte di microrganismi, costituendo però un pericolo per la salute delle persone che hanno a che fare direttamente con questi materiali, a causa dei residui tossici lasciati dai trattamenti. Negli ultimi anni, la crescente preoccupazione per l'ambiente e la salute degli operatori ha portato a cercare nuove alternative a minore tossicità e minor impatto ambientale (Pinzari *et al*., 2011).

L'efficacia di un metodo antimicrobico dipende da diversi fattori, come il suo meccanismo d'azione, la sua concentrazione e il tempo di contatto. Inoltre, la sensibilità ad un particolare composto o ad un metodo antimicrobico può variare con lo stesso ceppo microbico, la sua fase di sviluppo, e con l'eventuale appartenenza ad un biofilm (Sequeira *et al*., 2012).

La grande maggioranza dei metodi antimicrobici utilizzati per prevenire o bloccare il biodeterioramento della carta è stata presa in prestito da altre discipline scientifiche, come per esempio la protezione dei materiali, l'agricoltura o la medicina. Questi metodi spaziano dal ridurre l'attività dell'acqua, all'applicazione di prodotti chimici allo stato gassoso o liquido, o all'utilizzo di temperature estreme o di radiazioni. Generalmente, i metodi fisici non hanno un'azione a lungo termine e, dal momento che non lasciano residui, la loro azione antimicrobica è istantanea. La maggior parte dei metodi chimici, invece, anche quando si utilizzano sostanze allo stato gassoso, lasciano dei residui che possono prolungare il loro effetto antimicrobico per un periodo di tempo limitato (Sequeira *et al*., 2012).

Un metodo antimicrobico si può considerare adeguato quando ha un ampio campo di utilizzo, una buona stabilità chimica, un basso costo, non ha effetti negativi sul materiale trattato e non risulta essere tossico per l'uomo (Sequeira *et al*., 2012).

1.4.1 Il congelamento e la liofilizzazione quali tecniche per il recupero di materiale cartaceo contaminato

Negli ultimi decenni, diversi trattamenti di liofilizzazione sono stati utilizzati e documentati nel caso di materiali librari danneggiati da alluvioni o andati sommersi per altre ragioni.
Nella liofilizzazione, come descritto nella *sezione 1.1*, l'acqua contenuta nel materiale viene per prima cosa congelata: questa operazione deve avvenire in maniera tempestiva, al fine di inibire la crescita dei microrganismi presenti sul materiale. Il congelamento viene considerato nel lavoro di Sequeira *et al.* (2012) come uno dei metodi di tipo fisico da attuare per bloccare la crescita microbica in modo immediato. Infatti, in generale, la temperatura influenza il tasso di attività metabolica dei microrganismi e, quindi, il loro tasso di crescita: ogni specie microbica ha la propria temperatura ottimale di crescita, compresa tra un limite massimo e uno minimo. L'abbassamento della temperatura, con il conseguente congelamento, causa inoltre una diminuzione dell'attività dell'acqua nel substrato: quando il suo valore è inferiore a 0.66 la maggior parte dei microrganismi non è in grado di crescere.

Gli effetti sui microrganismi causati dal congelamento sono dipendenti dalla temperatura e dal tempo: è solo mantenendo la temperatura ad un valore di almeno -20°C che la crescita microbica può essere fermata; quando infatti la temperatura oscilla tra 0°C e -4°C una piccola frazione di acqua continua a rimanere nel materiale allo stato liquido, rimanendo disponibile ai microrganismi (Florian, 1990).

Il congelamento può provocare sui microrganismi danni di tipo fisico o chimico. I danni fisici sono legati alla formazione di ghiaccio extracellulare o intracellulare che può causare la rottura di membrane e di organelli: i cristalli di ghiaccio durante il congelamento si espandono di circa l'8,5%, provocando così danni cellulari. I danni chimici, invece, si verificano quando l'acqua congela e i soluti extracellulari e intracellulari si raccolgono nella frazione non congelata, dove anche i microrganismi tendono a concentrarsi, creando così un ambiente sfavorevole alla loro crescita (Sequeira *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda il processo della liofilizzazione nella sua interezza, è riportato che questo metodo risulta essere più efficiente nell'inibizione della crescita microbica rispetto al solo congelamento seguito dallo scongelamento, a causa della sua capacità di rimuovere anche l'acqua legata, non più disponibile così per le cellule microbiche. In generale le cellule dotate di una parete più spessa presentano una maggiore resistenza al trattamento di liofilizzazione (Sequeira *et al*., 2012).

Alle stesse conclusioni si è giunti nel lavoro di Troiano *et al.* (2012), che descrive l'effetto della liofilizzazione sui funghi che contaminano la carta. In questo studio vengono utilizzati campioni di carta contaminata da tre specie diverse di funghi e la

vitalità a seguito del trattamento di liofilizzazione è verificata con due test differenti: un test colturale e l'analisi del contenuto in ATP. Dai risultati ottenuti, si evidenzia che la liofilizzazione ha comportato, rispetto al controllo, una diminuzione sensibile del contenuto in ATP di tutti e tre i ceppi fungini. Per quanto riguarda, invece, i risultati dei test culturali, per due specie (*C. cladosporioides* e *T. viride*) vi è una diminuzione della capacità di sviluppare micelio rispetto al controllo, mentre la crescita del fungo ascomicete testato (*C. globosum*) è risultata stimolata. La differenza fra dato colturale e contenuto in ATP è data dal diverso effetto della liofilizzazione nei confronti del micelio vegetativo rispetto ai conidi ed alle ascospore. La liofilizzazione è capace di uccidere o inibire il micelio e, solo in parte, i conidi. Al contrario, le ascospore, in quanto dotate di una parete spessa e, pertanto, più resistente ai trattamenti subiti, risultano stimolate. Infatti, è noto che le ascospore di molte specie fungine sono stimolate a germinare a seguito di shock fisici, quali il calore e il gelo (Troiano *et al.*, 2012).

I risultati ottenuti da Troiano *et al.* (2012) sono in linea con quelli di Lucchese (2019) che, durante la sua Tesi condotta presso il DISAT (Politecnico di Torino), ha valutato a valle del congelamento e del processo di liofilizzazione la vitalità del fungo *Alternaria alternata*, con micelio sporificato e non, cresciuto su supporto cartaceo. A seguito del congelamento, la crescita del fungo con micelio non sporificato è risultata rallentata, mentre per quello con il micelio sporificato, dopo una fase di latenza di 24 ore, la crescita è ripresa con velocità confrontabile a quella del controllo. Dalle sperimentazioni è emerso che il processo di liofilizzazione è più efficiente rispetto al solo congelamento, in quanto si è osservato un rallentamento della crescita del fungo, indipendentemente dalle condizioni operative utilizzate. Tuttavia, la via più efficace per il controllo della crescita di *A. alternata* prevede il congelamento in liofilizzatore a -40°C, seguito dall'essiccamento primario. In questo caso, infatti, la liofilizzazione ha determinato un allungamento della fase di latenza di 72 ore, per il micelio non sporificato, e di 48 ore per quello sporificato. In seguito a questa fase di latenza, la crescita del fungo è risultata rallentata per il micelio non sporificato, mentre per quello sporificato la crescita è ripresa con velocità paragonabile a quella del controllo. Anche in questo studio, quindi, si è constatata la maggiore efficienza del processo di liofilizzazione sull'inibizione della crescita del micelio vegetativo, rispetto a quella delle spore, più resistenti a bassi valori di acqua libera.

Oltre al lavoro condotto su *A. alternata*, Lucchese (2019) ha studiato la vitalità del batterio *Staphylococcus epidermidis* e del lievito *Rhodotorula mucilaginosa* a seguito del processo di liofilizzazione. In questo caso, le analisi condotte sui microrganismi hanno evidenziato che l'essiccamento non ha inibito la loro crescita ma che, al contrario, essa risulta maggiormente stimolata rispetto al controllo. I risultati ottenuti in questo lavoro di Tesi (Lucchese, 2019), ad oggi, risultano essere gli unici riportati in letteratura che descrivono l'effetto della liofilizzazione sulla crescita batterica su carta.

1.5 Gli oli essenziali

1.5.1 L'estrazione degli oli essenziali

Le piante elaborano numerose sostanze per la loro sopravvivenza: accanto a quelle che fanno parte del metabolismo primario (come carboidrati, lipidi, *etc*.) ne producono altre, non necessarie per le loro funzioni vitali, che costituiscono il prodotto del metabolismo secondario. Questi composti sono utili, ma non indispensabili: non vengono prodotti in continuazione e variano a seconda della famiglia della pianta. Proprio da alcune di queste sostanze del metabolismo secondario vengono estratti gli oli essenziali (IRCPAL, 2018).

Gli oli essenziali sono miscele di molecole organiche piuttosto complesse che vengono estratte sotto forma di minuscole goccioline dai fiori, dalle foglie, dalle radici, dalla resina e dal legno di molte piante aromatiche. Ci sono due metodi per l'estrazione degli oli essenziali:

- La distillazione in corrente di vapore

  Questo metodo è il più utilizzato per l'estrazione degli oli essenziali; il 93% di essi viene estratto con questo sistema. Per poter comprendere come funziona la distillazione in corrente di vapore è importante conoscere due caratteristiche fondamentali degli oli essenziali: essi sono volatili e idrofobici, ovvero evaporano facilmente se esposti all'aria e non si mescolano con l'acqua. Come schematizzato in Figura 1.11, il metodo prevede che la materia prima vegetale sia collocata in una camera di estrazione, sul fondo della quale viene veicolato del vapore, prodotto portando a ebollizione l'acqua in un'altra camera. Quando il vapore attraversa il materiale vegetale, sia il vapore che l'olio essenziale risalgono verso l'alto (questo perché gli oli essenziali sono volatili) e vengono convogliati in un'altra camera dove saranno lasciati a raffreddare. Quando la miscela si raffredda, l'olio essenziale, essendo idrofobico, sale nella parte superiore separandosi dalla restante parte idrofila che resta sul fondo (Bellardi, 2018).

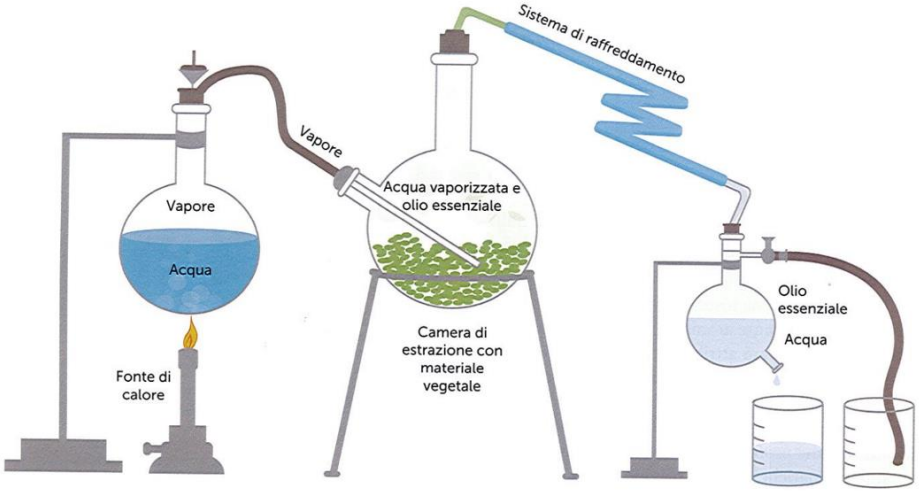

Figura 1.11: scema della distillazione in corrente di vapore per la produzione di oli essenziali. *Figura tratta da https://www.aromatools.com/books-media.html.*

Dalla distillazione derivano due sostanze: l'olio essenziale e gli idrolati. Negli oli essenziali si concentrano gli elementi liposolubili, mentre negli idrolati gli elementi idrosolubili. Gli idrolati, infatti, sono costituiti prevalentemente da composti ossigenati, quindi risultano essere più solubili in acqua e, perciò, più versatili dal punto di vista delle formulazioni. Seppur fino a qualche anno fa venivano considerati un prodotto di scarto o al massimo impiegati nell'industria cosmetica per la confezione di acque profumate, in questi ultimi anni si è risvegliato un interesse nei loro confronti, da affiancare a quello per gli oli essenziali, trasformando in valore aggiunto quello che fin ora è stato un rifiuto (Bellardi, 2018).

- La spremitura

La spremitura a freddo, o a pressione a freddo, è il metodo più comunemente utilizzato per estrarre gli oli essenziali dagli agrumi. La pressione meccanica applicata al materiale vegetale permette di 'spremere' gli oli essenziali, solitamente dalla scorza o buccia. L'olio essenziale di arancio, per esempio, si trova in sacche oleifere presenti nella scorza (Figura 1.12), che è costituita da una sottile strato esterno colorato chiamato *flavedo* e uno strato interno fibroso chiamato *albedo*. Le sacche oleifere si trovano nel flavedo. Con la spremitura, le sacche si rompono e l'olio essenziale in esse contenuto fuoriesce (Bellardi, 2018).

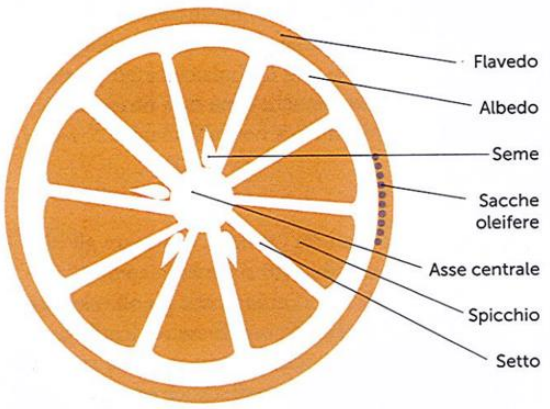

Figura 1.12: schema di un'arancia con indicate le varie parti che la costituiscono. *Figura tratta da https://www.aromatools.com/books-media.html.*

1.5.2 L'attività antimicrobica degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono l'oggetto di studio di numerose ricerche scientifiche atte ad investigare le potenzialità del loro utilizzo da parte dell'industria farmaceutica, dalle quali è emerso il loro ampio spettro di proprietà biologiche, tra cui una conclamata attività antimicrobica.

Questa attività varia da un olio ad un altro e da un ceppo microbico testato ad un altro, ma è sempre strettamente collegata alla loro composizione chimica. È da evidenziare che i costituenti e le loro relative concentrazioni negli oli essenziali non dipendono solamente

dalla specie della pianta. Infatti, tra gli altri fattori che influenzano la loro composizione, i più importanti sono la provenienza della pianta, la parte di essa utilizzata, il suo stadio di sviluppo, le condizioni del suolo, l'uso di fertilizzanti, il clima, l'altitudine, la stagione e il metodo della raccolta, così come la distillazione e le condizioni di stoccaggio (Kalemba e Kunicka, 2003). Ad esempio, il timo comune, o *Thymus vulgaris*, produce chemiotipi diversi a seconda delle condizioni in cui cresce, del clima e dell'altitudine; la presenza di alte concentrazioni di timolo dipende dal momento dell'anno in cui l'olio viene raccolto: se la raccolta avviene a metà estate o verso la fine dell'autunno, possono esserci livelli più alti di tale composto (Hudaib *et al*., 2002).

Gli oli essenziali sono composti principalmente da sostanze terpenoidi, ossia da biomolecole costituite da catene dell'unità isoprenica (Figura 1.13) (Sequeira *et al*., 2012).

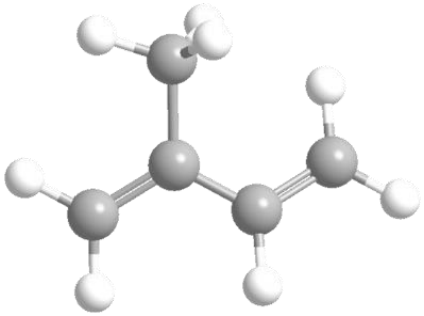

Figura 1.13: struttura dell'isoprene. *Figura tratta da https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/i/isoprene.html.*

I monoterpeni, che costituiscono con i sesquiterpeni i componenti principali degli oli essenziali, possono essere classificati in base ai gruppi funzionali e al loro grado di ossidazione in:

- *idrocarburi aliciclici* (es. mircene, ocimene, fellandrene) e *ciclici* (es. limonene, pinene, p-cimene);
- *alcoli* (es. geraniolo, nerolo, linalolo, lavandulolo, citronellolo, mentolo, borneolo, terpineolo);
- *aldeidi* (es. geraniale e cotronellale);
- *chetoni* (es. mentone, carvone, canfora);
- *fenoli* (es. timolo, carvacrolo);
- *ossidi* (es. eucaliptolo);
- *esteri* (es. linalilacetato).

Nell'azione antimicrobica dei componenti dell'olio essenziale, il carattere lipofilo del loro scheletro, costituito da idrocarburi, e la natura idrofila dei loro gruppi funzionali sono la caratteristica più importante. Il grado di attività dei componenti dell'olio essenziale è il seguente: *fenoli* > *aldeidi* > *chetoni* > *alcoli* > *etere* > *idrocarburi* (Kalemba e Kunicka, 2003).

La più alta attività antimicrobica è stata riconosciuta per gli oli essenziali che presentano i fenoli come principali composti, come timolo, carvacrolo ed eugenolo: ciò è spiegato dalla natura acida del gruppo ossidrilico, il quale può formare legami idrogeno con i siti attivi enzimatici, destabilizzandoli. Inoltre, lo spettro di attività di questi oli è il più ampio. Essi comprendono l'olio di timo e di origano, contenente timolo e carvacrolo, e

l'olio di chiodi di garofano, contenente eugenolo. Anche l'olio di cannella, con la cannellaldeide come componente principale, è un membro di questo gruppo (Kalemba e Kunicka, 2003).

Gli oli essenziali con composti alcolici predominanti presentano attività antimicrobica minore rispetto ai precedenti. Tra questi vi è l'olio di tea tree (principale composto terpinolo), di geranio (geraniolo e citronellolo), di menta piperita (mentolo) e di lavanda (linalolo e il suo acetato).

I chetoni sono i principali costituenti dell'olio di salvia (thujone, camforo) e l'olio di menta piperita (mentone, carvone), mentre gli idrocarburi sono i principali componenti degli oli essenziali estratti dagli agrumi e dalle conifere (Kalemba e Kunicka, 2003) e presentano l'attività antimicrobica più bassa.

Le strutture dei principali componenti degli oli essenziali sono presentate in Figura 1.14.

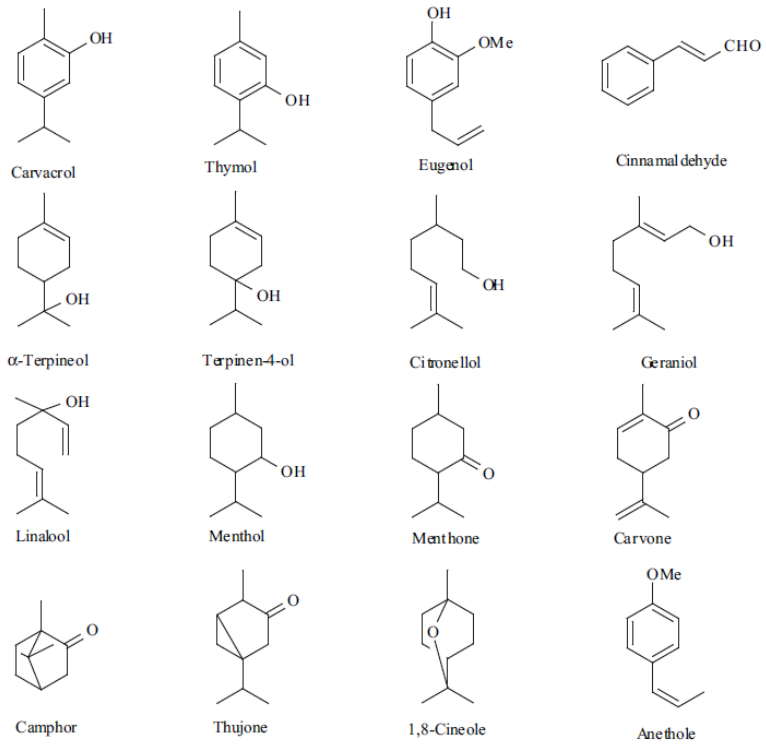

Figura 1.14: struttura di alcuni dei componenti degli oli essenziali.
Figura tratta da Kalemba e Kunicka (2003), con modifiche.

Numerosi studi si sono focalizzati sulla correlazione tra la composizione degli oli essenziali e l'attività antimicrobica, tuttavia non si è pervenuti a conclusioni univoche. Presumibilmente, l'attività antimicrobica è principalmente influenzata dal rapporto tra i vari componenti che costituiscono l'olio essenziale piuttosto che dalla loro quantità assoluta rispetto al totale (Kalemba e Kunicka, 2003).

1.5.3 Il meccanismo d'azione degli oli essenziali

Il meccanismo d'azione degli oli essenziali verso i microrganismi è molto complesso e, per tale ragione non è ancora stato completamente spiegato. In generale, è riconosciuto che l'azione antimicrobica degli oli essenziali dipende dal loro carattere idrofilo o lipofilo. I terpenoidi di cui sono costituiti gli oli sono agenti lipidici che influenzano le attività degli enzimi, in particolare di quelli localizzati nella membrana cellulare. Quest'azione biocida è dovuta principalmente ai composti dotati di gruppi funzionali, come gli alcoli, i fenoli e le aldeidi, che interferiscono con la membrana, interrompendo l'attività delle proteine enzimatiche ad essa associate. Alcuni componenti degli oli essenziali possono agire, invece, come disaccoppianti, ostacolando a livello mitocondriale la traslocazione protonica e interrompendo di conseguenza la fosforilazione dell'ADP in ATP (Knobloch *et al.*, 1989).
L'efficacia degli oli essenziali come agenti antimicrobici dipende, comunque, dal tipo di microrganismo ed è principalmente legata alla struttura della loro parete (Kalemba e Kunicka, 2003).

Per esempio, i batteri Gram-negativi mostrano una resistenza intrinseca ad un'ampia varietà di oli essenziali. Questo è associato al fatto che la loro membrana esterna è idrofila, ricca di molecole di lipo-polissaccaridi, che formano una barriera contro gli agenti tossici. Seppure alle piccole molecole idrofile sia consentito il passaggio attraverso la membrana esterna a causa della presenza di numerosi pori a carattere proteico, tuttavia, le macromolecole idrofobiche, come i costituenti degli oli essenziali, sono incapaci di penetrare tale barriera. Alcuni dei componenti degli oli essenziali di natura fenolica, ad esempio il carvacrolo e il timolo, però, possono causare una rottura dello strato esterno di lipo-polioaccaridi, causando la rottura parziale della membrana (Kalemba e Kunicka, 2003).

Per quanto riguarda, invece, l'azione degli oli essenziali contro i batteri Gram-positivi e i funghi sembra che essa sia molto simile. I componenti che costituiscono gli oli essenziali distruggono la parete cellulare batterica e fungina e la loro membrana citoplasmatica, causando una perdita del citoplasma (Knobloch *et al.*, 1989). Gli oli essenziali, inoltre, sia nelle cellule fungine che in quelle batteriche inibiscono anche la sintesi di DNA, RNA, proteine e polisaccaridi; in particolare nei funghi, causano effetti simili agli antibiotici (Kalemba e Kunicka, 2003).

L'azione dell'olio essenziale sui funghi può determinare cambiamenti morfologici, sia a livello macroscopico (aspetto della colonia fungina) che microscopico. Ad esempio, trattando numerose muffe con oli essenziali contenenti l'eugenolo e il carvacrolo, il loro micelio da morbido ed elastico si trasforma in indurito e fragile, con protuberanze simili a vescicole (Kalemba e Kunicka, 2003).

Gli stessi risultati sono stati ottenuti nel lavoro di Soylu e Kose. (2015): gli esperimenti sono stati condotti sul fungo *A. alternata*, il cui micelio è stato esposto a diverse concentrazioni di vapore di oli essenziali. Le osservazioni effettuate al microscopio ottico hanno mostrato una evidente alterazione della morfologia ifale rispetto al controllo (micelio non trattato). In presenza degli oli essenziali, infatti, la crescita del fungo risulta essere inibita: le ife appaiono svuotate e prive dei propri organelli ed inoltre è ben visibile

la coagulazione citoplasmatica e la comparsa di grandi vescicole all'interno delle cellule (Figura 1.15).

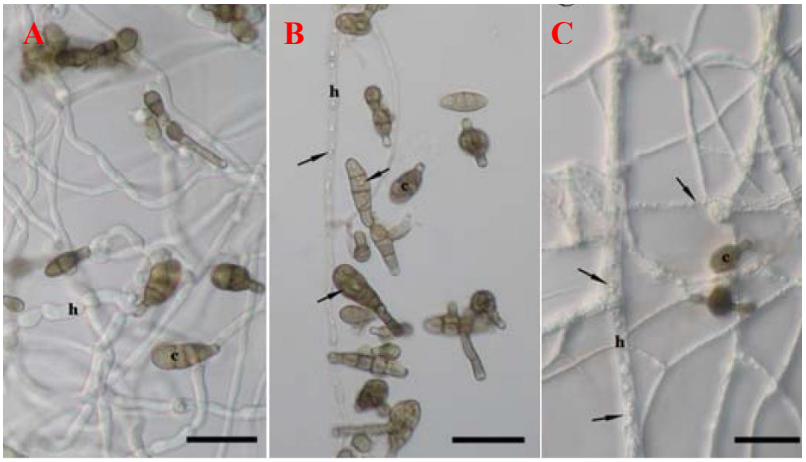

Figura 1.15: Effetto dell'olio essenziale di origano sulla morfologia di *A. alternata* al microscopio ottico. (A) controllo. (B) e (C) micelio trattato con presenza di coagulazione e di vescicolazione citoplasmatica (frecce) nelle ife e nei conidi. **h**, ife; **c**, conidio. *Figura tratta da Soylu e Kose (2005), con modifiche.*

L'alterazione morfologica e la riduzione delle dimensioni delle ife e dei conidi nei campioni trattati con gli oli essenziali è evidente nelle immagini SEM: nella Figura 1.16, è possibile osservare la presenza di aggregati ifali contenenti vescicole. Tali modificazioni possono essere dovute al fatto che gli oli essenziali interferiscono con gli enzimi che regolano la sintesi della parete, riuscendo quindi ad attraversare la membrana plasmatica, arrecando danni all'interno delle cellule (Soylu e Kose, 2005).

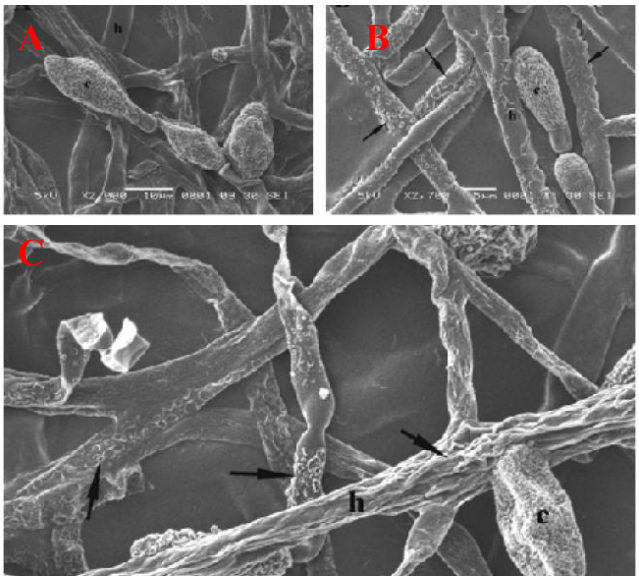

Figura 1.16: Effetto dell'olio essenziale di origano sulla morfologia di *A. alternata* visto al microscopio elettronico. (A) controllo. (B) e (C) alterazioni delle strutture morfologiche delle ife e dei conidi tra cui restringimento a valle del trattamento con oli essenziali, vescicole e necrosi. **h**, ife; **c**, conidio. *Figura tratta da Soylu e Kose (2005), con modifiche.*

1.5.4 Metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali

In tutti gli articoli in cui vengono investigate le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali è emerso che l'attività antimicrobica è sempre dipendente dalla loro concentrazione e, pertanto, i risultati ottenuti vengono espressi come *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Sequeira *et al*., 2012).
La MIC è definita come la concentrazione minima, in mg/L, di un agente antimicrobico capace di inibire la crescita di un microrganismo. Questo valore fornisce informazioni sulla sensibilità o sulla resistenza di un organismo nei confronti di un agente antimicrobico. Questo valore è influenzato dalle condizioni operative utilizzate durante il test e dal metodo utilizzato (Eucast E.DEF 7.1, 2008).

Per la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali esistono diversi metodi, in particolare, due sono comunemente applicati:

- il metodo di diffusione in agar,
- il metodo di diluizione (su agar o in terreno liquido).

Testare e valutare l'attività antimicrobica degli oli essenziali risulta spesso complicato a causa della loro volatilità, dell'insolubilità in acqua e della loro complessità: tali proprietà richiedono alcune modifiche ai metodi messi a punto per testare l'attività di agenti antimicrobici solubili in acqua. Inoltre, si deve controllare se le concentrazioni applicate dell'emulsionante o del solvente influenzano la crescita dei microrganismi testati e se le condizioni sperimentali e i lungi tempi di incubazione provocano l'evaporazione o la decomposizione di alcuni dei componenti degli oli essenziali (Kalemba e Kunicka, 2003).

Il metodo di diffusione in agar è la tecnica più diffusa poiché permette di stimare il grado di inibizione della crescita dei microrganismi in modo semplice. Esso è considerato preciso e affidabile, anche se produce risultati semi-quantitativi e, secondo alcuni autori (Janssen *et al*, 1987; Kalodera *et al*, 1997), qualitativi. Secondo questo metodo, le capsule Petri di diametro di 9 cm sono riempite con 10-20 ml di terreno di coltura agarizzato e inoculate con il microrganismo da testare. Sono possibili due modalità di incorporazione dell'olio essenziale: su un disco di carta o in un pozzetto realizzato nell'agar. Il diametro del disco di carta o del pozzetto, la quantità di olio essenziale, così come il tipo di dispersione nel solvente, sono i parametri che devono essere tenuti sotto controllo per la valutazione dei risultati con questo metodo. L'olio essenziale è raramente testato puro: di solito vengono utilizzate delle soluzioni a diverse concentrazioni e, per verificare la sua attività, viene utilizzata più frequentemente la variante del disco di carta, perché è facile da eseguire e richiede solo piccole quantità di olio (Kalemba e Kunicka, 2003).

L'efficacia degli oli essenziali come agenti antimicrobici è valutata confrontando gli aloni di inibizione che si vengono a creare, come illustrato in Figura 1.17: maggiori sono le dimensioni della zona di inibizione intorno al disco o al foro, più l'olio essenziale è efficace. Il metodo di diffusione in agar è considerato spesso inappropriato per gli oli essenziali, in quanto i loro componenti volatili potrebbero evaporare insieme al solvente di dispersione durante la fase di incubazione, mentre i loro componenti scarsamente solubili non diffondono bene nel terreno (Kalemba e Kunicka, 2003).

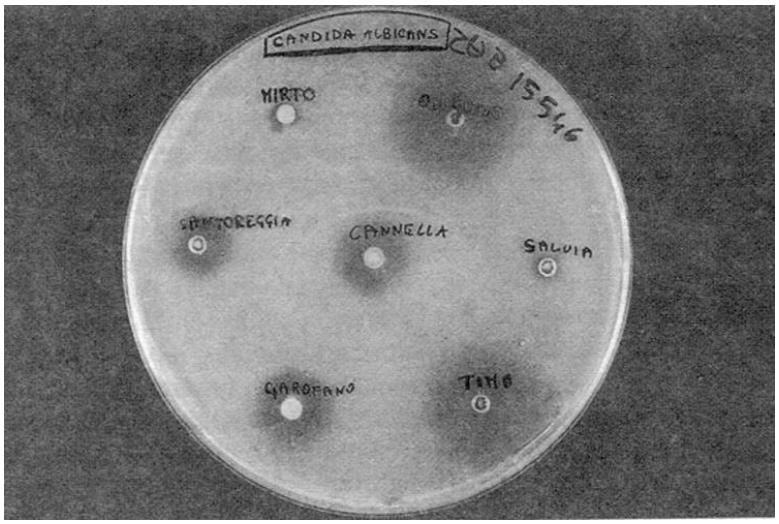

Figura 1.17: antibiogrammi relativi a microrganismi batterici o fungini trattati con oli essenziali. *Figura tratta da http://159.213.95.28/portale_atc/attachments/article/Firenzuoli%20Carceri%20Empoli%202015%20(3%20parte).pdf.*

Il metodo di diluizione viene utilizzato sia per i batteri che per i funghi, principalmente in terreno liquido. Le colture su terreno liquido sono effettuate all'interno di piastre "multiwell" con diverse capacità dei pozzetti, dove oltre al terreno liquido vengono inseriti l'olio essenziale a diverse concentrazioni e l'inoculo. L'effetto antimicrobico dell'olio essenziale è misurato attraverso prove di turbidimetria o con il metodo della conta vitale (CFU) e i risultati possono essere espressi con il valore di MIC o con l'indice di inibizione della crescita, definito come il rapporto percentuale tra la crescita avvenuta nel campione e quella nella piastra di controllo, senza olio essenziale (Kalemba e Kunicka, 2003).

Un altro metodo che ha permesso di ottenere buoni risultati è quello a contatto di vapore: recentemente, infatti, alcuni studi hanno riferito la maggiore efficacia dell'olio essenziale in stato di vapore rispetto a quella che si ha in soluzione. Tra questi lavori vi è quello di Tullio *et al.* (2007), nel quale sono state testate sette diverse specie fungine e i risultati ottenuti hanno evidenziato che il metodo a contatto di vapore permette di ottenere valori di MIC che risultano essere inferiori rispetto a quelli ottenuti con il metodo di diluizione in terreno. Le differenze tra i valori di MIC ottenuti con i due diversi metodi evidenziano che la quantificazione dell'attività antimicrobica è influenzata dal metodo utilizzato. L'efficacia dell'olio essenziale in stato di vapore è probabilmente attribuibile alla sua diretta deposizione sui miceli fungini lipofilici e all'assorbimento indiretto attraverso l'agar (Inouye *et al.*, 2000). Inoltre, i molteplici componenti degli oli essenziali hanno diversi gradi di lipofilia e perciò si distribuiscono in maniera più o meno omogenea nella fase acquosa. Se un olio essenziale è composto principalmente da molecole con bassa solubilità in acqua, questo mostrerà di conseguenza un'attività debole se utilizzato in forma liquida. È il caso degli oli di lavanda e di limone i cui costituenti (linalolo, linalil-acetato e citronella, limonene rispettivamente) hanno mostrato un'attività molto buona solo quando è stato utilizzato il metodo a contatto di vapore (Inouye *et al*., 2000). Nel complesso, quindi, i risultati ottenuti da Tullio *et al.* (2007) mostrano la maggiore efficienza degli oli essenziali nello stato di vapore rispetto a quello in soluzione, suggerendo inoltre che in questo modo gli oli potrebbero essere utilizzati a concentrazioni più basse.

Queste osservazioni suggeriscono che le proprietà fisiche, come la solubilità e volatilità, influenzano notevolmente l'attività antimicrobica degli oli essenziali, anche se l'efficacia di un olio essenziale è dovuta in primo luogo alla sua composizione chimica. Quindi non è sorprendente che, anche nel lavoro di Tullio *et al*. (2007), gli oli di timo, di origano e di chiodi di garofano, grazie alla bioreattività dei fenoli in essi contenuti, abbiano avuto un elevato effetto inibitorio sia in fase liquida che in fase vapore.

1.5.5 Gli oli essenziali per inibire la crescita microbica su carta

I lavori bibliografici disponibili sullo studio dell'efficacia antimicrobica degli oli essenziali sul patrimonio archivistico sono scarsi e prodotti solamente negli ultimi dieci anni. Tra questi vi è lo studio di Rakotonirainy *et al*. (2005), il quale ha testato, su una miscela di nove ceppi fungini isolati da archivi storici, i vapori di nove diversi oli essenziali. I risultati hanno mostrato che gli oli di melaleuca e di lavanda e i loro principali componenti, eugenolo e linalolo, sono particolarmente attivi sull'inibizione della crescita dei ceppi fungini. Inoltre, i test eseguiti con un sistema statico di nebulizzazione, finalizzati a valutare la capacità dei vapori del linalolo di penetrare all'interno di libri, hanno dimostrato che il principio attivo non è in grado di diffondere nel libro pur confermandone la sicurezza d'uso e l'azione antifungina a livello superficiale.

In un secondo lavoro, lo stesso gruppo di ricerca ha testato l'uso dei vapori del linalolo sul pellame e sul materiale fotografico usato nei libri, applicando sia metodi di diffusione statica che dinamica. È risultato che il loro uso potrebbe non essere sicuro per le opere cartacee contenenti fotografie o pelli, sconsigliandone quindi l'impiego nella conservazione di tali opere (Rakotonirainy *et al.*, 2007).

Nonostante siano ancora poche le evidenze scientifiche sull'uso degli oli essenziali come antimicrobici da applicare ai beni culturali, i dati ad oggi ottenuti sono comunque incoraggianti.

1.6 Scopo del lavoro

Lo scopo di questa Tesi è quello di investigare l'efficacia dell'utilizzo degli oli essenziali come trattamento successivo alla liofilizzazione al fine di inibire o rallentare la crescita di microrganismi contaminanti il materiale archivistico allagato. Gli oli essenziali testati sono l'olio essenziale di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e quello di origano spagna (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375); i microrganismi biodeteriogeni presi in esame sono stati *Alternaria alternata* ceppo BNR, *Staphylococcus epidermidis* e *Rhodotorula mucilaginosa.*

Sono stati eseguiti inizialmente dei test per verificare quale sia, tra i due oli essenziali scelti, quello con il maggior effetto inibente sulla crescita microbica in fase liquida, su di un terreno nutritivo solido e su di un supporto cartaceo.

In seguito, è stato valutato l'effetto dell'olio essenziale risultato più efficace sui microrganismi cresciuti su materiale cartaceo trattato mediante liofilizzazione per rimuovere l'acqua. Al fine di valutarne l'effetto nel tempo, l'olio è stato nebulizzato a valle del trattamento e nuovamente dopo 24 ore. Il test è stato condotto anche su campioni solamente congelati.

Infine, si è valutato l'effetto dell'olio essenziale individuato come ottimale a valle della sperimentazione su di un caso reale, ovvero un volume che presentava contaminazione microbica legata alla sua permanenza in un ambiente favorevole alla crescita microbica stessa.

2 Materiali e metodi

2.1 Materiali

Durante la sperimentazione condotta in questo studio, i volumi presenti all'interno di librerie e archivi sono stati simulati, su scala di laboratorio, preparando blocchetti di carta moderna bianca (80 g/cm^2) aventi le dimensioni di 6 cm x 6 cm e altezza di 1 ± 0.3 cm.

Gli oli essenziali impiegati sono stati quello di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e di origano spagna (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375): entrambi sono stati forniti dall'azienda Witt Italia Spa (Figura 2.1). Questi oli essenziali sono stati selezionati in seguito alle informazioni reperite nella letteratura scientifica (Sequeira *et al*., 2012; Tullio *et al.*, 2006; Kalemba e Kunicka, 2003; Souly e Kose, 2015; Saglam *et al.*, 2009; Salehi *et al.,* 2018). Essi sono risultati essere tra i migliori dal punto di vista dell'inibizione della crescita di funghi e batteri, grazie alla bio-reattività dei loro componenti fenolici.

Figura 2.1: oli essenziali utilizzati durante il lavoro di Tesi.

Come si può notare dalle fotografie riportate in Figura 2.1, gli oli essenziali sono caratterizzati da una serie di frasi di pericolo di tipo H. In Tabella 2.1, si riportano le informazioni reperite dalle schede di sicurezza fornite dall'azienda produttrice.

Tabella 2.1: frasi di pericolo degli oli essenziali utilizzati durante la sperimentazione.

O.E. ORIGANO SPAGNA	H301	può essere nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata
	H302	nocivo se ingerito
	H304	può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione delle vie respiratorie
	H315	provoca irritazione cutanea
	H317	può provocare una reazione allergica cutanea
	H319	provoca grave irritazione oculare
O.E. TIMO ROSSO	H226	liquido e vapori infiammabili
	H304	può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione delle vie respiratorie
	H314	provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari
	H411	tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata

Gli oli essenziali utilizzati sono stati diluiti in una soluzione acquosa di TEGO SML 20, un tensioattivo non ionico di origine vegetale, noto anche come *polisorbato 20,* che si presenta come un liquido ambrato (Figura 2.2).

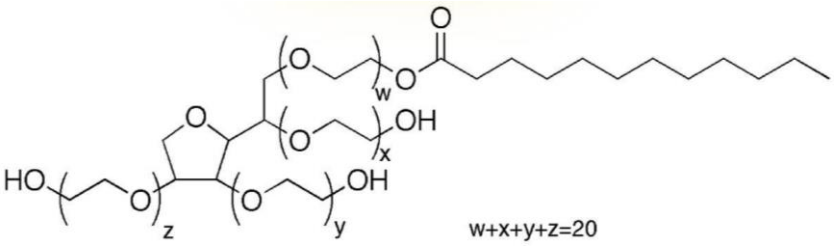

Figura 2.2: formula chimica del polisorbato 20.
Figura tratta da https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Polysorbate_20.png

2.2 Composizione dei campioni cartacei

2.2.1 Microrganismi e condizioni colturali

I microrganismi selezionati per il caso di studio in esame sono stati:

1. *Alternaria alternata* ceppo BNR, un fungo ascomicete parassita delle piante;
2. *Rhodotorula mucilaginosa,* un lievito pigmentato unicellulare, caratterizzato da colonie arancioni/rosse;
3. *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474, un batterio Gram-positivo normalmente presente sulla cute umana.

La decisione di impiegare questi microrganismi, illustrati in Figura 2.3, è stata presa sulla base di indicazioni della letteratura scientifica (Gallo, 1961; Zyska, 1997; Karbowska-Berent *et al.,* 2011) da cui è emerso che sono dei frequenti contaminanti del materiale cartaceo. Inoltre, l'effetto della liofilizzazione su questi microrganismi è stato studiato in un precedente lavoro di Tesi (Lucchese, 2019).

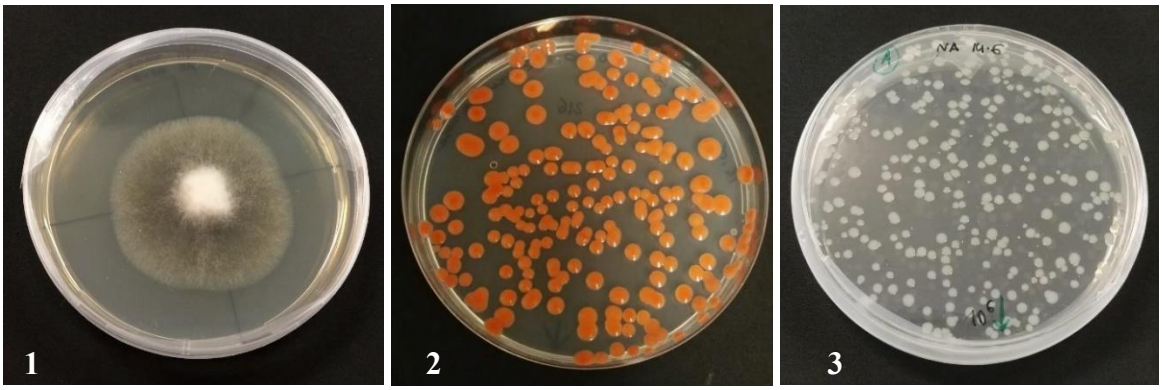

Figura 2.3: microrganismi utilizzati in questo lavoro di Tesi: 1. *Alternaria alternata,* 2. *Rhodotorula mucilaginosa,* 3. *Staphylococcus epidermidis.*

Il fungo filamentoso *A. alternata* è stato mantenuto e coltivato, nel corso delle prove sperimentali, su terreno solido Czapeck Dox Agar (CZ), la cui composizione è la seguente:

- 3 g/L di $NaNO_3$;
- 1 g/L di K_2HPO_4;
- 0,5 g/L di $MgSO_4$;
- 0,5 g/L di KCl;
- 0,01 g/L di $FeSO_4$;
- 30 g/L di glucosio;
- 20 g/L di agar.

Il lievito *R. mucilaginosa* è stato mantenuto e coltivato su terreno solido Malt Extract Agar (MEA), avente la seguente composizione:

- 20 g/L di estratto di malto;
- 2 g/L di peptone;
- 20 g/L di glucosio;
- 20 g/L di agar.

Lo stesso terreno, privato dell'agar, è stato utilizzato come successivamente indicato nella *sezione 2.4.2.a* per testare il lievito in coltura liquida.

Infine, il batterio *S. epidermidis* è stato mantenuto e coltivato su terreno solido Nutrient Agar, NA, (Oxoid CM003), e in alcuni casi, testato in coltura liquida nello stesso terreno senza agar (*Sezione 2.4.2.a*). La composizione è la seguente:

- 2 g/L di estratto di lievito;
- 5 g/L di peptone;
- 5 g/L di NaCl;
- 1 g/L di Lab-Lemco powder;
- 15 g/L di agar.

A.alternata e *R. mucilaginosa* sono stati coltivati alla temperatura di 30°C, *S. epidermindis* è stato invece coltivato alla temperatura di 37°C.

2.2.2 Inoculo dei microrganismi su carta

I microrganismi cresciuti su terreno solido agarizzato sono successivamente trasferiti su carta. Operando in condizioni di sterilità, all'interno di capsule Petri (diametro 9 cm) si è depositato un foglietto di carta bianca (6 cm x 6 cm) precedentemente sterilizzato in autoclave (temperatura di 121°C, pressione di 2 atm, per 20 minuti). Per favorirne l'adesione è stata utilizzata una pinzetta (Figura 2.4).

A. alternata è stato inoculato su carta depositando, in posizione centrale, un quadratino di micelio di circa 5 mm di lato, prelevato dal bordo di una colonia cresciuta per 7 giorni alla temperatura di 30°C (Figura 2.4).

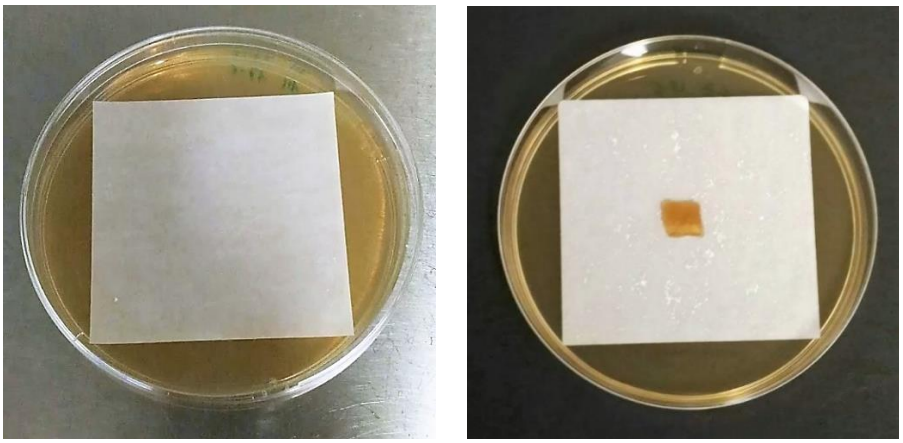

Figura 2.4: foglio di carta adeso al terreno agarizzato all'interno della capsula Petri (a sinistra) e inoculo di *A. alternata* su carta sterile (a destra).

Le piastre sono poi chiuse con Parafilm e vengono incubate a temperatura controllata di 30°C per 120 ore e per 48 ore, per ottenere rispettivamente una colonia fungina con micelio sporificato e una con micelio non sporificato (Figura 2.5).

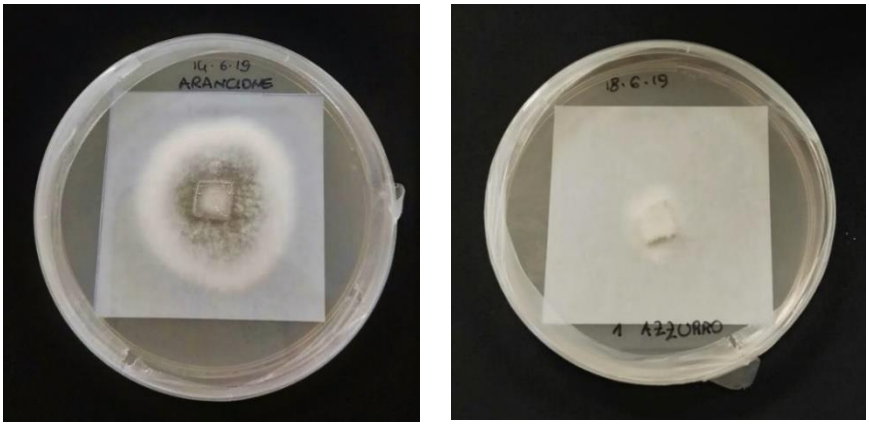

Figura 2.5: crescita di *A. alternata* su carta: a sinistra dopo 120 ore e a destra dopo 48 ore.

Per quanto riguarda, invece, *S. epidermidis* e *R. mucilaginosa*, l'inoculo su carta è avvenuto attraverso la tecnica del "replica-plating". È stato necessario ottenere,

innanzitutto, delle piastre contenenti colonie distinte e separate dei due microrganismi unicellulari.
Per fare ciò si è partiti da una piastra cresciuta per 24 ore e si è effettuata con acqua sterile una sospensione microbica, opportunamente diluita al fine di ottenere un inoculo standardizzato con una densità ottica compresa tra 0,8 e 1 (a 620 nm per il lievito e a 650 nm per il batterio). Dall'inoculo standardizzato sono state effettuate poi ulteriori diluizioni fino ad ottenere una soluzione con una concentrazione di microrganismi pari a 10^6 cfu/mL: da quest'ultima si sono prelevati 100 µL che vengono piastrati su terreno solido. Le piastre sono state incubate per 48 ore a 37°C per il batterio e 30°C per il lievito e, in questo modo, si sono ottenute colonie separate con diametro di circa 1 mm (Figura 2.6).

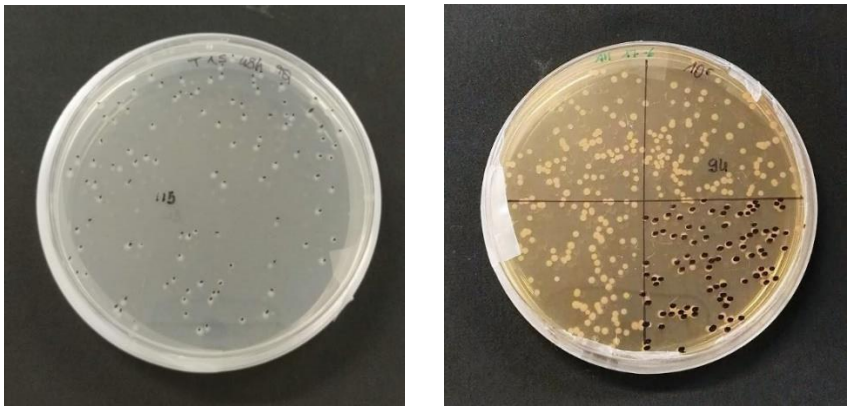

Figura 2.6: *S. epidermidis* (a sinistra) e *R.mucilaginosa* (a destra) cresciuti in colonie distinte e separate.

Sulla piastra contenente le colonie separate è stato appoggiato delicatamente uno stampo in legno ricoperto da uno strato di carta da filtro sterile, in modo da farvi aderire qualche cellula per ciascuna colonia. Lo stampo viene poi premuto successivamente su 3 piastre contenenti i fogli sterili: in questa maniera le cellule si sono depositate sul materiale cartaceo e, dopo l'incubazione, hanno generato colonie disposte come erano nella piastra primaria; in questo modo si sono ottenute repliche identiche tra loro (Figura 2.7). Le piastre vengono, infine, chiuse con Parafilm e lasciate in incubazione per 24 ore alla temperatura ottimale di crescita per il batterio e il lievito.

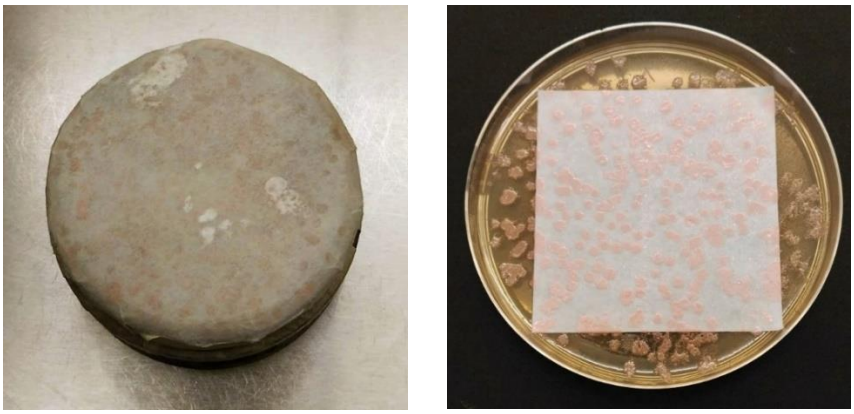

Figura 2.7: stampo utilizzato per la tecnica del "replica-plating" (a sinistra) e piastra contenente l'inoculo su carta di *R. mucilaginosa* dopo 24 ore di incubazione (a destra).

Oltre ai fogli contaminati dai singoli microrganismi, si è deciso di prepararne altri contenenti, contemporaneamente, tutti e tre i microrganismi. Quindi, per ciascuna delle due specie unicellulari è stata prodotta una sospensione microbica con densità ottica compresa tra 0.8 e 1 e per il fungo filamentoso una sospensione di frammenti di ife, sempre avente densità ottica compresa tra 0.8 e 1. Queste tre sospensioni sono state poi miscelate a parità di volume per creare un inoculo misto. 30 µL di questa sospensione sono stati depositati al centro del foglio sterile. Le piastre, infine, sono chiuse con Parafilm e lasciate in incubazione alla temperatura di 30°C per 120 ore (Figura 2.8)

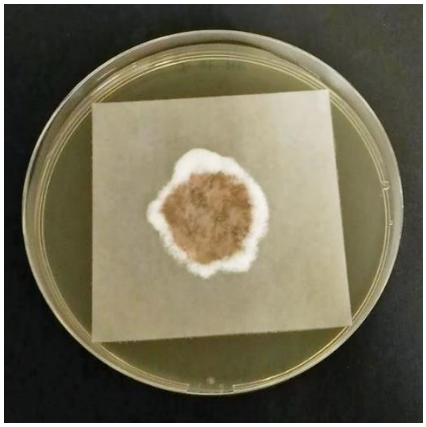

Figura 2.8: piastra contenente l'inoculo misto su carta dopo 120 ore di incubazione.

2.2.3 Immersione dei blocchetti di carta

Con questa fase della sperimentazione si è simulato l'allagamento del materiale cartaceo. I blocchetti di carta dalle dimensioni riportate nella *sezione 2.1* vengono, per prima cosa, pesati utilizzando una bilancia di precisione. In seguito, ognuno di essi viene bloccato con un elastico tra due griglie di plastica con passo di 1 cm, precedentemente tagliate in modo da avere le stesse dimensioni dei fogli. I blocchetti così formati sono poi inseriti, quattro alla volta, all'interno di vasi ermetici in vetro e mantenuti in posizione verticale inserendo al centro un becher da 150 ml (Figura 2.9).

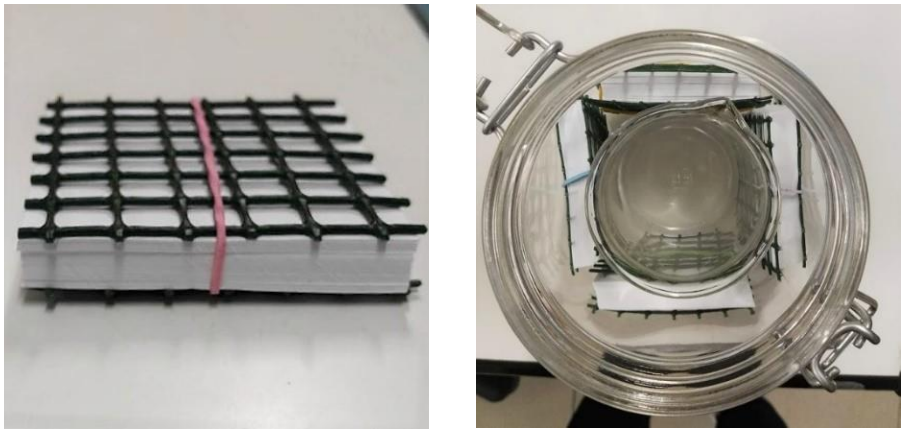

Figura 2.9: esempio di campione cartaceo utilizzato durante la sperimentazione (a sinistra) e disposizione dei blocchetti all'interno del vaso ermetico (a destra).

Infine, si è inserita all'interno dei vasi ermetici l'acqua distillata, in quantità tale da riuscite ad immergere completamente i campioni cartacei. Essi sono lasciati in immersione per 18 ore, dopo di che l'acqua viene rimossa e i campioni vengono scolati per circa un minuto, girando sotto sopra il vaso ermetico (Figura 2.10). I campioni sono poi pesati per conoscere la loro variazione di peso e, di conseguenza, la quantità di acqua assorbita dalla carta.

Figura 2.10: blocchetti immersi in acqua distillata (a sinistra) e fase di sgocciolamento dei campioni (a destra).

2.2.4 Composizione dei campioni

Per comporre i campioni da utilizzare durante la fase di liofilizzazione si è partiti dai blocchetti sgocciolati e si è posizionato al loro interno, a metà spessore circa, un foglio di carta inoculato, secondo le modalità descritte nella *sezione 2.2.2*: l'operazione è stata eseguita in sterilità utilizzando un'ansa e una pinzetta.

Prima di comporre i campioni cartacei contaminati con il fungo *A. alternata*, viene rimosso il quadrato di agar utilizzato come inoculo, al fine di mantenere la planarità del campione da liofilizzare e trattare.

Infine, i blocchetti così composti vengono inseriti all'interno di un sacchetto di plastica. I campioni preparati, in tutto, sono stati sessanta:

- 10 contaminati da *R. mucilaginosa,*
- 10 contaminati da *S. epidermidis,*
- 10 contaminati da *A. alternata* con micelio non sporificato,
- 10 contaminati da *A. alternata* con micelio sporificato,
- 20 contaminati dai tre microrganismi contemporaneamente.

2.3 Trattamento tramite liofilizzazione

2.3.1 Congelamento dei campioni

Le buste contenenti i campioni vengono poste all'interno di un congelatore domestico, che mantiene la temperatura a -20°C.

Il tempo di congelamento è stato di:

- 30 giorni per i blocchetti contaminati da *S. epidermidis;*
- 16 giorni per i blocchetti contaminati da *A. alternata* non sporificata;
- 7 giorni per i blocchetti contaminati da *A. alternata* sporificata, per quelli contaminati da *R. mucilaginosa* e per i campioni contenenti l'inoculo misto.

Terminata la fase di congelamento i campioni vengono recuperati dal freezer. I campioni destinati al processo di liofilizzazione vengono rimossi dalla busta di plastica e dalle griglie e, successivamente, sono avvolti in 4 strati di tessuto-non-tessuto, precedentemente tagliato con dimensioni di circa 21 cm x 29 cm, sigillato con la pinzatrice in modo da formare una busta (Figura 2.11). Questa operazione viene eseguita molto rapidamente per evitare lo scongelamento dei campioni.

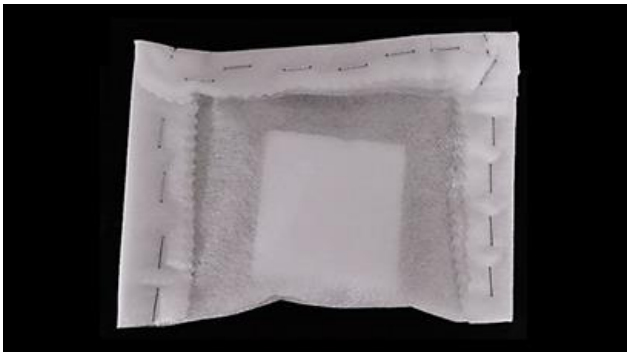

Figura 2.11: blocchetto congelato sigillato all'interno di una busta di quattro strati di tessuto-non-tessuto.

Questa modalità operativa è dovuta al fatto che si è presa in considerazione l'eventuale contaminazione del liofilizzatore, problema che si presenta solo nel caso in cui si utilizzi, come nel caso in esame, un'apparecchiatura da laboratorio, dove non è possibile effettuare una sterilizzazione mediante vapore acqueo a valle della liofilizzazione. La soluzione di utilizzare 4 strati di tessuto-non-tessuto è stata scelta in seguito a una serie di prove effettuate nel lavoro di Lucchese (2019): in questo modo è possibile contenere la dispersione dei microrganismi e, allo stesso tempo, permettere la fuoriuscita del vapore acqueo durante l'essiccamento primario.

2.3.2 Scongelamento dei campioni

I campioni non destinati al processo di liofilizzazione, ossia 10 blocchetti con l'inoculo misto, terminato il congelamento in freezer, sono collocati all'interno di vasi ermetici e posti in un termostato, per far avvenire lo scongelamento. Il processo ha avuto una durata di 3 ore ed è stato condotto alla temperatura controllata di 25°C.

2.3.3 Processo di liofilizzazione

I campioni congelati vengono posizionati sui ripiani all'interno della camera del liofilizzatore. I liofilizzatori utilizzati durante le prove sperimentali sono stati due:

- il liofilizzatore Millrock modello Revo,
- il liofilizzatore Telstar modello Lyobeta 25.

Entrambi sono gestiti da un software installato su pc, grazie al quale è possibile impostare i valori di pressione, temperatura e durata delle diverse fasi del processo. Quindi, inizialmente, si è impostata una temperatura dei ripiani pari a -5 °C e una pressione di 400 μbar per avere una condizione di partenza uguale per tutte le prove: tale fase solitamente dura 5 minuti. Dopo di che, sono stati impostati i valori di temperatura e pressione che determinano l'avvio dell'essicamento primario: i ripiani sono mantenuti a 0°C mentre la pressione all'interno della camera è fissata a 200 μbar.

Queste condizioni vengono mantenute per circa di 72 ore. Tuttavia, poiché l'apparecchiatura è dotata sia di un sensore termoconduttivo, tipo Pirani, che di uno capacitivo, tipo Baratron, è possibile valutare la fine dell'essiccamento primario, come illustrato nel capitolo introduttivo (*Sezione 1.2.1.2*). Quando, infatti, non vi è più vapore acqueo in camera i due sensori forniscono lo stesso valore e il loro rapporto raggiunge il valore unitario, determinando la fine dell'essiccamento primario.

2.3.4 Analisi fisiche post-liofilizzazione

Terminata la liofilizzazione, i campioni vengono scaricati e, in seguito sono pesati con una bilancia di precisione, al fine di verificare la quantità di acqua allontanata durante la fase di essiccamento. Per il trasporto dei campioni tra il liofilizzatore e la bilancia è stato necessario utilizzare un essiccatore per far sì che essi, essendo altamente igroscopici, non assorbano l'umidità dell'aria e rimangano quindi nelle condizioni raggiunte a valle del processo di liofilizzazione per effettuare la misura di interesse. Infine, si è valutata la variazione dell'altezza dei campioni per avere un'indicazione dei cambiamenti fisici e meccanici subiti dalla carta durante il processo di liofilizzazione.

2.4 Trattamento con oli essenziali

2.4.1 Preparazione degli oli essenziali

Come anticipato nella *sezione 2.1*, durante la sperimentazione in esame gli oli essenziali non vengono utilizzati puri. Per preparare le diluizioni degli oli, per prima cosa, si è dovuta ottenere una soluzione acquosa di TEGO SML 20 all'1.5% v/v. In accordo con la metodica *Eucast* per la determinazione del valore di *Minimal Inibitory Concentration* (Eucast E.DEF 7.1, April 2008), sono state preparate otto diverse concentrazioni (Tabella 2.2), a partire da 0.75% v/v fino a 0.0059% v/v: le diluizioni intermedie si sono ottenute dimezzando ogni volta la concentrazione.

Tabella 2.2: concentrazioni utilizzate di olio essenziale.

	Concentrazione dell'olio essenziale [%]
1	0.7500
2	0.3750
3	0.1875
4	0.0938
5	0.0469
6	0.0234
7	0.0117
8	0.0059

2.4.2 Prove preliminari sugli oli essenziali

2.4.2.a. Prove con il metodo di diluizione in liquido

Queste prove preliminari hanno avuto lo scopo di testare quale tra i due oli essenziali scelti, l'olio di origano e l'olio di timo, ha il maggior effetto inibente sui microrganismi *S. epidermidis* e *R. mucilaginosa*, i quali non sono inibiti nella crescita dal trattamento di liofilizzazione (Lucchese, 2019).

Tali sperimentazioni sono effettuate seguendo il *broth dilution method*, secondo la metodica *Eucast* (Eucast E.DEF 9.3 dicembre 2015). Per fare ciò, sono state utilizzate delle piastre multiwell sterili da 96 pozzetti (Figura 2.12).

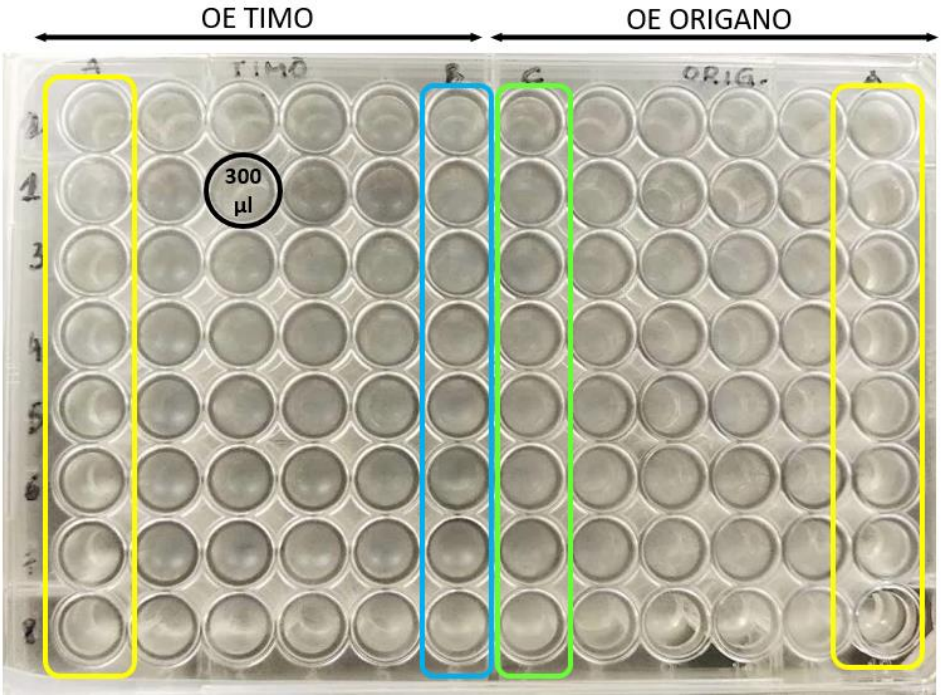

Figura 2.12: piastra multiwell da 96 pozzetti utilizzata per la prova preliminare sugli oli essenziali.

I due microrganismi sono testati separatamente, perciò si sono preparate due piastre da 96 pozzetti, una per il lievito e una per il batterio. Lo schema sperimentale è stato il seguente:

i) la prima e l'ultima colonna, contrassegnate nella Figura 2.12 con la lettera A e circondate in giallo, sono utilizzate per il controllo biotico e, quindi, contengono all'interno di ogni pozzetto:

- 200 µL di terreno colturale liquido,
- 100 µL di inoculo;

ii) la sesta colonna, indicata con la lettera B e cerchiata in azzurro, è usata per il controllo abiotico e perciò i pozzetti sono riempiti con:

- 100 µL di terreno colturale liquido alla concentrazione 2X,
- 100 µL di acqua sterile,
- 100 µL di olio essenziale di timo con le concentrazioni indicate in Tabella 2.2, in ordine crescente, dall'alto verso il basso dei pozzetti della piastra multiwell.

iii) la settima colonna, distinta nella Figura 2.12 con la lettera C e il colore verde, serve a verificare se la soluzione di TEGO SML 20, utilizzata per diluire l'olio essenziale, possa avere un effetto di inibizione sulla crescita microbica. I pozzetti contengono:

- 100 µL di terreno liquido alla concentrazione 2X,
- 100 µL di inoculo,
- 100 µL di soluzione con TEGO SML 20 alla concentrazione 1.5%.

iv) Tutte le altre colonne sono riempite con:

- 100 µL di terreno liquido alla concentrazione 2X,
- 100 µL di inoculo,
- 100 µL di olio essenziale, a destra con olio di timo mentre a sinistra con olio di origano, con le concentrazioni indicate in Tabella 2.2, in ordine crescente, dall'alto verso il basso dei pozzetti della piastra multiwell.

Il terreno colturale utilizzato è stato per il lievito il terreno a base di estratto di malto e per il batterio il Nutrient Medium, come indicato nella *sezione 2.2.1*.

L'inoculo dei due microrganismi unicellulari, secondo la metodica utilizzata, è preparato in modo tale che sia compreso tra $1 \cdot 10^5$ e $2{,}5 \cdot 10^5$ cfu/mL.

Dopo aver preparato la piastra multiwell, essa viene chiusa con Parafilm, avvolta con uno strato di pellicola trasparente per alimenti e incubata in condizioni statiche alla temperatura ottimale di ciascuno dei due microrganismi, per un tempo pari a 24 ore. L'avvolgimento nella pellicola è un accorgimento atto ad evitare l'evaporazione dell'olio essenziale.

Per quanto riguarda la lettura dei risultati, la metodica utilizzata prevede che l'individuazione della concentrazione di MIC avvenga visivamente, osservando in quali pozzetti non sia avvenuta crescita microbica. Per fare ciò si utilizza un foglio metà bianco e metà nero, da inserire al di sotto della piastra multiwell, in modo che la linea tra il bianco e il nero possa apparire nitida e distinta solo nel caso in cui non sia avvenuta una crescita microbica (Figura 2.13).

Figura 2.13: illustrazione di come l'uso di un foglio bianco e nero dietro la piastra multiwell aiuti a riconoscere la differenza tra i pozzi in cui è avvenuta una crescita elevata (cerchio rosso), una crescita debole (cerchio arancione) o in cui non è avvenuta (cerchio verde). *Figura tratta da EUCAST E.DEF 9.3 dicembre 2015, con modifiche.*

A differenza degli altri agenti antimicrobici gli oli essenziali, anche a basse concentrazioni, sono caratterizzati da un'elevata torbidità e opacità, perciò questa modalità per analizzare i risultati è difficoltosa. Si è pertanto utilizzato il metodo della conta vitale su piastra, come indicato da Kalemba e Kunicka (2003). Da ogni pozzetto sono prelevati 100 µL di soluzione che vengono piastrati all'interno di capsule Petri contenente l'adeguato terreno solido di coltura. Ogni concentrazione è testata in triplicato. Dopo di che, le piastre sono lasciate in incubazione per 24 ore e, trascorso questo periodo di tempo, si è contato il numero delle colonie microbiche. In questo caso, il valore di MIC corrisponde al valore più basso di concentrazione di olio essenziale che ha determinato l'assenza di crescita microbica su piastra.

La sperimentazione è stata ripetuta utilizzando delle piastre multiwell con 12 pozzetti (Figura 2.14), nelle quali sono state testate, però, solamente le concentrazioni di olio essenziale prossime al valore di MIC. A differenza della precedente prova sperimentale, gli oli sono stati testati separatamente per ciascun microrganismo.

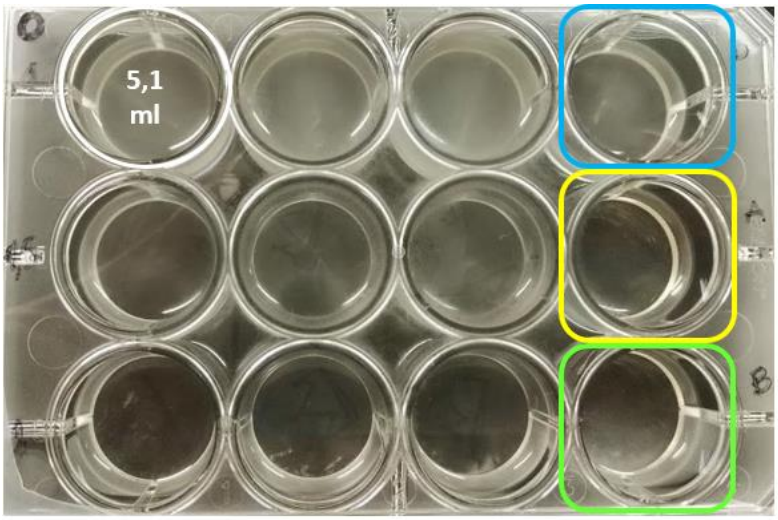

Figura 2.14: multiwell da 12 pozzetti utilizzata per la prova preliminare sugli oli essenziali.

Come si può osservare nella Figura 2.14, l'ultima colonna è riservata ai controlli:

- in alto, evidenziato con il colore blu, si ha il controllo abiotico, perciò il pozzetto è stato riempito con:
  - 1.7 ml di terreno liquido alla concentrazione 2X,
  - 1.7 ml di acqua sterile,
  - 1.7 m di olio essenziale alla concentrazione maggiore riportata in Tabella 2.3;
- in centro, in giallo, vi è il controllo biotico, contenente:
  - 3.4 ml di terreno liquido,
  - 1.7 ml di inoculo;
- in basso, nel pozzetto circondato in verde, si verifica l'effetto inibitorio della soluzione di TEGO SML 20, per cui, si ha:
  - 1.7 ml di terreno liquido alla concentrazione 2X,
  - 1.7 ml di inoculo,
  - 1.7 ml di TEGO SML 20 alla concentrazione 1.5%.

I rimanenti nove pozzetti sono stati utilizzati per testare, in triplicato, tre concentrazioni di olio essenziale. Quindi, oltre a 1.7 ml di terreno liquido alla concentrazione 2X e 1.7 ml di inoculo, vi sono 1.7 ml di olio essenziale alle concentrazioni riportate in Tabella 2.3, in ordine crescente, dall'alto verso il basso dei pozzetti della piastra multiwell.

Tabella 2.3: concentrazioni di olio essenziale in piastra multiwell da 12 pozzetti.

N. riga	Concentrazione OE [%]
1	0.750
2	0.563
3	0.375

In seguito, dopo aver lasciato le piastre multiwell in incubazione per 24 ore alla temperatura ottimale di crescita di ciascun microrganismo, vengono prelevati, da ogni pozzetto, 100 µL di sospensione e piastrati sull'opportuno terreno agarizzato all'interno di capsule Petri. Ogni pozzetto è stato testato in triplicato. Come nella sperimentazione precedente, le piastre chiuse con il Parafilm e avvolte nella pellicola trasparente, vengono lasciate all'interno dell'incubatore per 24 ore e poi viene effettuata la conta delle colonie. Il risultato conseguito viene confrontato con quello ottenuto a seguito degli esperimenti con la piastra multiwell da 96 pozzetti.

L'efficacia delle tre concentrazioni di olio essenziale riportate nella Tabella 2.3, è stata ulteriormente testata con un sistema dinamico, di seguito descritto. Per ogni olio essenziale e per ciascuno dei due microrganismi unicellulari sono state preparate delle provette in vetro con capacità massima pari a 10 ml. Sono stati allestiti un controllo biotico, un controllo abiotico, un controllo per verificare l'effetto inibitorio della soluzione di TEGO SML 20 e i campioni per ciascuna delle tre concentrazioni di olio essenziale. I controlli ed i campioni sono stati allestiti secondo la stessa modalità e gli stessi volumi indicati per la prova in multiwell da 12 pozzetti. Le provette sono poste su un agitatore rotante ad una velocità di 20 rpm (Figura 2.15).

Figura 2.15: provette in agitazione.

Trascorse 24 ore, da ogni provetta sono prelevati 100 µL di soluzione che poi vengono piastrati su terreno solido. Ogni provetta è stata testata in triplicato. Lasciate le piastre in incubazione per 24 ore alla temperatura di crescita di ciascuno dei due microrganismi, vengono contate le colonie cresciute e i risultati di questa prova sono confrontati con quelli delle sperimentazioni precedenti.

Grazie a queste prime prove preliminari si è individuato quale tra i due oli essenziali testati, l'olio di timo e quello di origano, sia quello che maggiormente inibisce la crescita del batterio *S. epidermidis* e del lievito *R. mucilaginosa*.

2.4.2.b. Studio dell'effetto dell'olio essenziale su microrganismi cresciuti su supporto cartaceo

L'effetto dell'olio essenziale risultato maggiormente inibente nelle prove in liquido (*sezione 2.4.2.a*) è stato poi testato direttamente sui microrganismi cresciuti su un terreno solido e su carta.

Più precisamente, sono state effettuate delle prove in cui *S. epidermidis* e *R. mucilaginosa,* cresciuti in colonie separate e distinte sia su terreno solido che su carta (*sezioni 2.2.1 e 2.2.2*.), vengono messi in contatto con l'olio essenziale. Quest'ultimo, diluito con la soluzione al 1.5% di TEGO SML 20, è stato distribuito in maniera sufficientemente uniforme tramite nebulizzazione.

Le piastre allestite sono state:

- 20 per il batterio, di cui 10 su carta e 10 su terreno solido;
- 20 per il lievito, di cui 10 su carta e 10 su terreno solido.

Ogni tipologia di piastre ha subito il seguente trattamento:

- 3 sono messe a contatto con l'olio essenziale subito dopo aver effettuato l'inoculo e poi lasciate in incubatore alla temperatura di crescita del microrganismo per il periodo di osservazione (7 giorni);
- 3 vengono fatte crescere per 24 ore e, trascorso questo periodo di tempo, sono messe a contatto con lo stesso olio essenziale, per poi essere nuovamente lasciate in incubazione;
- 4 sono utilizzate come controllo.

La dispersione è stata effettuata sotto cappa chimica utilizzando un flacone dotato di tappo con erogatore a spruzzo, posizionando la capsula Petri all'interno di un contenitore di plastica, dalle dimensioni di 15cm x 15cm di base e 10 cm di altezza, per limitare la dispersione dell'olio essenziale nell'ambiente limitrofo (Figura 2.16).

Figura 2.16: posizionamento della capsula Petri prima della messa a contatto con l'olio essenziale (a sinistra) e dispositivo utilizzato per disperdere l'olio (a destra).

Durante questa fase di sperimentazione si è messa a punto la tecnica da utilizzare per mettere a contatto con l'olio i campioni che hanno subito la liofilizzazione. Infatti, sono state condotte delle prove per investigare:

1. la distanza da cui nebulizzare l'olio essenziale;
2. il numero di nebulizzazioni da eseguire.

Per quanto riguarda il primo punto, si sono effettuate una serie di dispersioni a distanze diverse e si è misurato il corrispondente diametro dell'alone lasciato sulla carta: per realizzare ciò è stata utilizzata una soluzione acquosa colorata nebulizzata su fogli di carta bianca. Il numero migliore di nebulizzazioni per il caso di studio in esame, invece, è stato scelto prendendo in considerazione due aspetti: la quantità in peso di olio essenziale presente in ciascuno dei pozzetti della piastra multiwell da 12 pozzetti (*sezione 1.2.1.a*) e l'assorbimento di quest'ultimo da parte del foglio posizionato sulla capsula Petri.

2.4.3 Trattamento dei campioni post-congelamento e post-liofilizzazione

Dopo il processo di liofilizzazione o di congelamento, i campioni vengono spostati sotto cappa biologica: in condizioni di sterilità si recuperano da essi i fogli contaminati con *S. epidermidis, R. mucilaginosa, A.alternata* e con l'inoculo misto (*sezione 2.2.2*) e si depositano all'interno di capsule Petri, contenenti l'apposito terreno solido di coltura (Figura 2.17).

Figura 2.17: blocchetto di carta contaminato da *A. alternata* sporificata in seguito al trattamento di liofilizzazione (a destra foglio contaminato, a sinistra foglio superiore a quello contaminato).

Per ogni microrganismo:

- 3 fogli sono trattati con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% al tempo zero, ossia subito dopo averli fatti aderire al terreno; in seguito vengono chiusi e incubati alla temperatura ideale per ciascun microrganismo;
- 3 fogli sono trattati con l'olio essenziale dopo 24 ore dalla deposizione sul terreno solido e poi rimessi in incubazione;
- 4 fogli sono utilizzati come controllo e, quindi, vengono chiusi all'interno della capsula Petri senza subire il trattamento dell'olio essenziale.

Tutte le capsule, come precedentemente indicato nella *sezione 1.2.1.a*, sono state chiuse con Parafilm e avvolte con uno strato di pellicola trasparente, onde evitare l'evaporazione dell'olio essenziale (Figura 2.18).

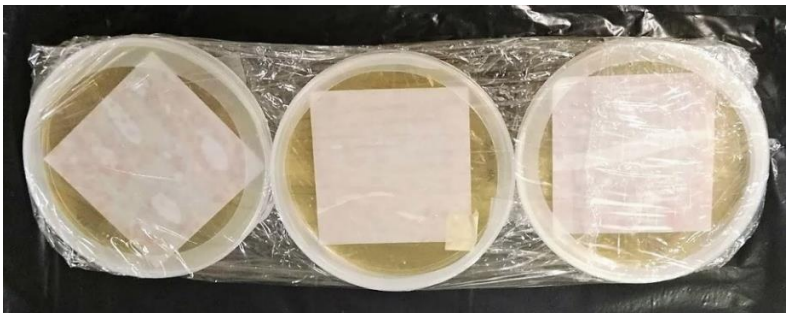

Figura 2.18: piastre con fogli contaminati da *R. mucilaginosa* trattati al tempo zero, avvolte nella pellicola trasparente, prima di essere incubate.

2.5 Analisi microbiologiche dei campioni

La crescita dei microrganismi viene valutata visivamente, ad occhio nudo, ogni 24 ore a partire dal tempo zero, corrispondente al momento in cui i fogli contaminati e liofilizzati sono posizionati all'interno delle capsule Petri.

Per quanto riguarda la crescita di *A. alternata*, poiché il suo micelio è caratterizzato da uno sviluppo di tipo radiale, si è valutato l'aumento nel tempo del diametro della colonia in due direzioni perpendicolari, mentre per i microrganismi unicellulari l'analisi è stata di carattere visivo, valutando qualitativamente l'eventuale aumento delle colonie microbiche.

Poiché, però, il batterio *S. epidermidis* non è pigmentato è risultato difficoltoso osservare la sua crescita su carta; si è allora deciso di effettuare, dopo 72 h di incubazione, la tecnica del "replica-plating" dei fogli su terreno agarizzato. Quindi, in condizioni di sterilità, si sono estratti i fogli trattati e si sono appoggiati, per circa un'ora, all'interno di capsule Petri contenenti Nutrient Agar. Dopo di che i fogli sono stati rimossi e le piastre sono state messe in incubazione per 24 ore: in questo modo si è potuto osservare con maggiore facilità l'eventuale sviluppo delle colonie a valle del trattamento con oli essenziali.

Come precedentemente indicato, la crescita di tutti i microrganismi che hanno subito sia il trattamento di congelamento-liofilizzazione che quello con oli essenziali è stato confrontato con il corrispondente controllo, caratterizzato da piastre contenenti fogli inoculati che hanno subito la stessa fase di congelamento ed essiccamento, ma che non sono stati messi a contatto con l'olio essenziale.

Per quanto concerne, invece, i fogli contaminati con l'inoculo misto, oltre alle analisi suddette, si è valutato visivamente la crescita microbica a seguito del solo congelamento e trattamento con olio essenziale, confrontandola con quella avvenuta a valle del trattamento completo (liofilizzazione e utilizzo di oli essenziali).

2.6 Trattamento con olio essenziale di un volume cartaceo contaminato

Come ultima prova si è deciso di trattare con l'olio essenziale di timo (0.75% v/v) un volume contaminato. Il libro in questione (Figura 2.19) presenta, in particolar modo sulla copertina, un elevato numero di colonie microbiche, dovuto, con ogni probabilità, al fatto che infiltrazioni di acqua nel locale in cui era conservato hanno creato un ambiente favorevole allo sviluppo dei microrganismi biodeteriogeni presenti sulla copertina.

Figura 2.19: libro contaminato utilizzato per convalidare l'efficacia del trattamento con oli essenziali.

Per prima cosa, si è proceduto a verificare che i microrganismi contaminanti fossero vitali e coltivabili, a tale fine è stata applicata la tecnica del "replica-plating" (*Sezione 2.2.2*), appoggiando lo stampo prima sulla copertina del libro e poi su una capsula Petri contenente Malt Extract Agar. La piastra è stata mantenuta per 72 ore in incubazione alla temperatura di 30°C, ed al termine di questo periodo i microrganismi sono stati isolati e osservati al microscopio ottico. Infine, si è nebulizzato l'olio di timo (0.75%), con le stesse modalità esposte nella *Sezione 2.4.3*, sulla capsula Petri contenente i microrganismi, per verificare l'eventuale effetto di inibizione sulla crescita microbica.

In seguito, si è posizionato il libro contaminato all'interno di un contenitore ricoperto con pellicola trasparente e questo è stato trattato con l'olio essenziale in tre modalità differenti. In una zona l'olio è stato nebulizzato e, per limitarne la dispersione, si è utilizzato una mascherina con luce di dimensioni 6 cm x 3 cm. In altri due punti, invece, l'olio è stato messo a contatto con il libro tramite la deposizione di due foglietti di carta sterile (6 cm x 3 cm) precedentemente imbevuti di olio essenziale. Uno di questi, dopo 2 ore, è stato rimosso, mentre l'altro è rimasto a contatto per 24 ore. Il libro è stato quindi avvolto nella pellicola trasparente (Figura 2.20) e messo in incubazione alla temperatura di 30°C.

Dopo 24 ore, si è ripetuta l'operazione: si sono imbevuti altri due foglietti sterili (delle stesse dimensioni dei precedenti) nell'olio di timo e poi li si è nuovamente appoggiati sul libro nelle medesime zone di interesse. Anche questa volta, dopo due ore uno è stato rimosso, mentre l'altro è stato lasciato a contatto per 72 ore. Poiché, invece, nel punto in

cui l'olio di timo è stato nebulizzato non si è ancora completamente assorbito, non è stata ripetuta questa operazione.
A valle di queste operazioni il volume è stato nuovamente avvolto nella pellicola trasparente (Figura 2.20) e messo in incubazione alla temperatura di 30°C.

Figura 2.20: libro trattato con l'olio essenziale nelle tre modalità differenti, posizionato all'interno di un contenitore e avvolto con pellicola trasparente.

Trascorse 72 ore si è valutato l'effetto dell'olio essenziale sui microrganismi presenti sul libro.

3 Analisi dei risultati

3.1 Investigazione preliminare dell'effetto degli oli essenziali

Gli esperimenti condotti da Lucchese (2019) al fine di studiare l'effetto della liofilizzazione sui microrganismi *S. epidermidis, R. mucilaginosa* e *A. alternata* su supporto cartaceo hanno messo in luce che la crescita del batterio e del lievito non è inibita da questo processo. Per tale ragione, le investigazioni preliminari sull'efficacia degli oli essenziali si sono concentrate solamente su questi due microrganismi unicellulari.

3.1.1 Studio dell'effetto degli oli essenziali in terreno liquido

L'obiettivo di queste prime prove sperimentali è stato quello di identificare quale sia, tra l'olio essenziale di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e di origano spagna (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375), quello con il maggior effetto inibente sulla crescita del lievito *R. mucilaginosa* e del batterio *S. epidermidis.* Gli esperimenti sono stati effettuati seguendo il *broth dilution method* e utilizzando piastre multiwell sterili da 96 e 12 pozzetti e un sistema di coltura dinamico. I risultati sono stati analizzati con il metodo della conta vitale su piastra.

Dalle prove, condotte con le piastre multiwell da 96 pozzetti, è emerso che l'olio essenziale di timo inibisce maggiormente la crescita in liquido di entrambe le specie microbiche.

Per quanto riguarda il lievito, il metodo della conta su piastra ha permesso di ottenere i risultati riportati in Tabella 3.1, contenente il numero medio delle colonie cresciute.

Tabella 3.1: Effetto degli oli essenziali su *R. mucilaginosa.*

CONCENTRAZIONE olio essenziale (v/v)	**TIMO** cfu/ml	**ORIGANO** cfu/ml
0,750%	0	$2 \cdot 10^3 \pm 5 \cdot 10^2$
0,375%	$6 \cdot 10^2 \pm 1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^4 \pm 1 \cdot 10^3$
0,188%	$2 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^4 \pm 6 \cdot 10^3$
0,094%	$4 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	nc*
0,047%	nc*	nc*

nc* = non contabile

Per quanto riguarda, invece, il batterio il numero medio di colonie cresciute è presentato in Tabella 3.2.

Tabella 3.2: Effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis*

CONCENTRAZIONE olio essenziale (v/v)	**TIMO** cfu/ml	**ORIGANO** cfu/ml
0,750%	0	$7 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^2$
0,375%	$6 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^4 \pm 1 \cdot 10^3$
0,188%	$2 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$
0,094%	$3 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$	nc*
0,047%	nc*	nc*

nc* = non contabile

Osservando i valori riportati in Tabella 3.1 e 3.2, si può giungere alla conclusione che, tra le concentrazioni testate degli oli essenziali, solo quelle più alte (0.75%, 0.375% e 0.188%) rallentano la crescita microbica. In particolare, la concentrazione maggiore (0.75%) dell'olio essenziale di timo è in grado di inibire la crescita di entrambi i microrganismi unicellulari. Invece, quando l'olio essenziale di timo è usato con concentrazione uguale o inferiore allo 0.047% e l'olio di origano uguale o inferiore allo 0.094%, non si osserva inibizione, in quanto il numero di colonie cresciute su piastra non è contabile e risulta paragonabile, visivamente, a quello di una piastra di controllo biotico. Infatti, osservando la Figura 3.1, è possibile affermare che il numero di colonie che si formano su una piastra a partire da un pozzetto contenente l'olio essenziale di origano a bassa concentrazione (0.047%) è paragonabile a quello di una piastra su cui è stato piastrato il contenuto di un pozzetto contenente il controllo biotico. A basse concentrazioni, quindi gli oli essenziali non influenzano la crescita dei microrganismi.

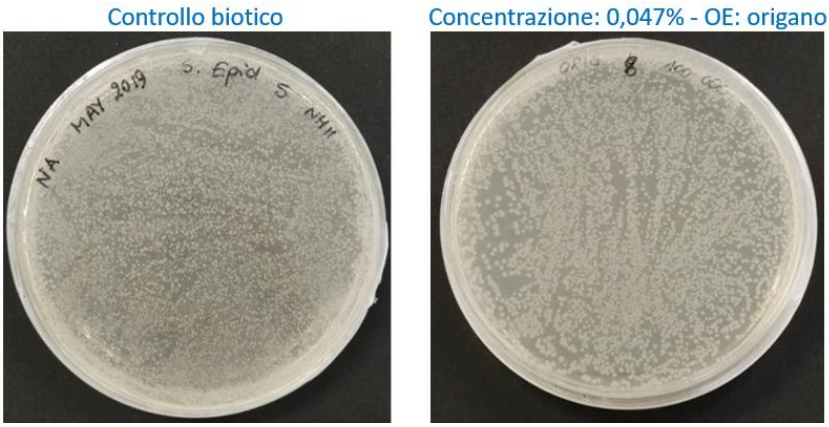

Figura 3.1: confronto della crescita di *S. epidermidis* in una piastra di NA a partire da un pozzetto contenente il controllo biotico (a sinistra) e in una piastra a partire da un pozzetto contenente l'olio essenziale di origano alla concentrazione di 0.047% (a destra).

Confrontando i risultati riportati nelle Tabelle 3.1 e 3.2 si evince che gli oli essenziali, in particolare l'olio di timo, esplicano una maggiore attività inibitoria nei confronti di *R. mucilaginosa* piuttosto che di *S. epidermidis*: i valori di cfu/ml riferiti al lievito sono infatti inferiori di un ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti per il batterio. Se, per esempio, si prende in considerazione la concentrazione pari a 0.188%, il numero di cfu/ml per *R. mucilaginosa* sono dell'ordine di 10^3 per il timo e di 10^4 per l'origano, mentre quelle di *S. epidermidis* sono rispettivamente 10^4 e 10^5.

Le immagini riportate in Figura 3.2 e 3.3, relative alla crescita dei due microrganismi trattati con la stessa concentrazione di olio essenziale, evidenziano quanto sopra riportato.

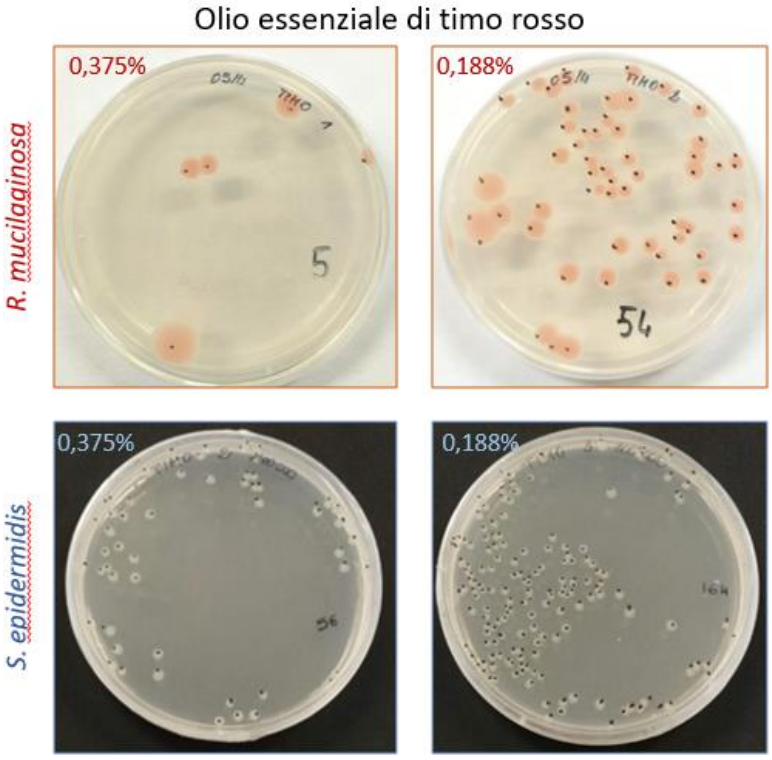

Figura 3.2: confronto della crescita di *R. mucilaginosa* e di *S. epidermidis*, trattati con l'olio essenziale di timo rosso alle concentrazioni di 0.375% e 0.188%

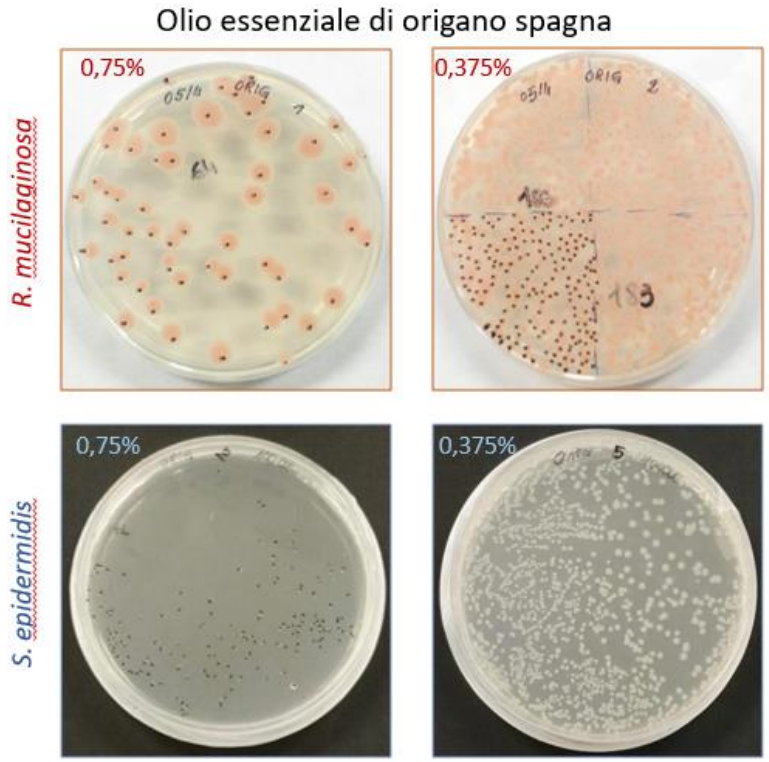

Figura 3.3: confronto della crescita di *R. mucilaginosa* e di *S. epidermidis*, trattati con l'olio essenziale di origano spagna alle concentrazioni di 0.75% e 0.375%.

Nella piastra multiwell da 96 pozzetti una colonna è dedicata al controllo dell'effetto dell'emulsionante (TEGO SML 20) sulla crescita dei microrganismi testati (colonna C di Figura 2.12). Come si può osservare dalle immagini riportate in Figura 3.4, non vi è differenza nella crescita microbica tra le piastre ottenute piastrando 100 µL a partire dai pozzetti di questa colonna e quelle ottenute dai pozzetti contenenti il controllo biotico. Si può quindi escludere l'inibizione della crescita microbica da parte delle soluzioni utilizzate di TEGO SML 20.

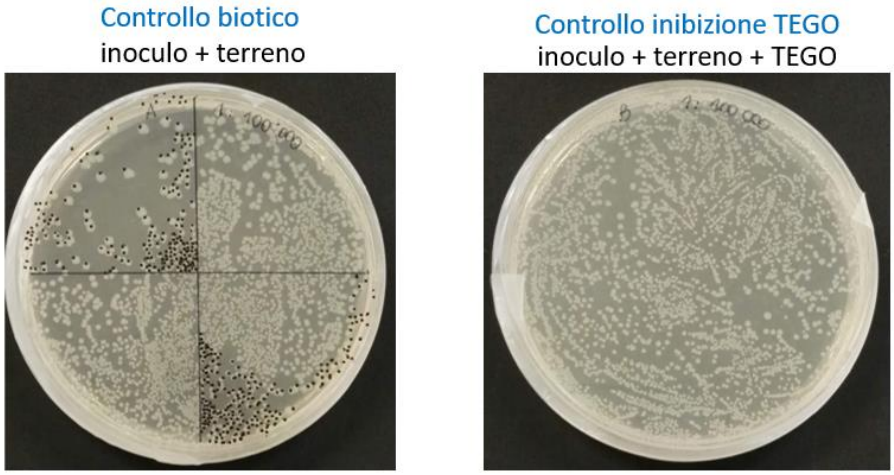

Figura 3.4: confronto tra la crescita di *S. epidermidis* nella piastra (NA) di controllo biotico e nella piastra di controllo inibizione TEGO SML 20.

In seguito a queste prime osservazioni, si è deciso di ripetere le prove sperimentali in piastre multiwell da 12 pozzetti, le quali permettono di utilizzare un volume di coltura superiore. In questo caso, sono state testate le due concentrazioni più alte utilizzate nella piastra multiwell da 96 pozzetti, 0.75% e 0.375%, e la concentrazione tra loro intermedia, 0.563%.

I valori medi di crescita microbica ottenuti con questo sistema sperimentale sono riportati in Tabella 3.3 per il lievito e in Tabella 3.4 per il batterio.

Tabella 3.3: Effetto degli oli essenziali su *R. mucilaginosa*.

CONCENTRAZIONE olio essenziale (v/v)	**TIMO** cfu/ml	**ORIGANO** cfu/ml
0,750%	0	0
0,563%	0	0
0,375%	$2 \cdot 10 \pm 1 \cdot 10$	$3 \cdot 10 \pm 1 \cdot 10$

Tabella 3.4: Effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis*.

CONCENTRAZIONE olio essenziale (v/v)	**TIMO** cfu/ml	**ORIGANO** cfu/ml
0,750%	0	0
0,563%	0	0
0,375%	$2 \cdot 10^2 \pm 2 \cdot 10$	$2 \cdot 10^3 \pm 3 \cdot 10^2$

A differenza di quanto ottenuto nelle prove condotte con le piastre multiwell da 96 pozzetti, la crescita dei due microrganismi testati non è inibita solamente dalla concentrazione maggiore di olio essenziale di timo, bensì anche dalla medesima concentrazione di olio di origano. Inoltre, come si può osservare dai valori riportati nelle Tabelle 3.3 e 3.4, la crescita microbica è inibita anche quando gli oli essenziali sono utilizzati alla concentrazione di 0.563%. Per quanto riguarda la concentrazione pari a 0.375%, invece, si nota che l'effetto inibitorio sulla crescita microbica è maggiore rispetto al caso delle piastre multiwell da 96 pozzetti: il numero di colonie cresciute infatti è minore di almeno due ordini di grandezza.

Questa discordanza tra i risultati potrebbe essere dovuta al fatto che il volume contenuto all'interno di uno singolo pozzetto (5.1 ml) è 170 volte maggiore rispetto al caso delle piastre multiwell da 96 pozzetti (300 µl) e, perciò, prelevando e piastrando 100 µl della sospensione, tale quantità può non essere rappresentativa a causa della non omogeneità dovuta alla sedimentazione dei microrganismi. Al contrario, nel caso delle piastre multiwell da 96 pozzetti, nonostante sia stata osservata la sedimentazione dei microrganismi, la modalità di sospensione ha portato a una completa omogeneità e quindi ad un prelievo rappresentativo.

Inoltre, poiché il sistema considerato è statico e a causa del fatto che i pozzetti delle piastre multiwell da 12 pozzetti sono più profondi (3 cm) di quelli della piastra multiwell da 96 pozzetti (1 cm), l'assenza di crescita microbica ottenuta potrebbe non essere dovuta all'efficienza degli oli essenziali, ma provocata da un insufficiente trasferimento di ossigeno all'interno del volume del pozzetto.

Per verificare tali ipotesi, si è deciso di condurre un'ulteriore prova sperimentale utilizzando un agitatore rotante, per avere un sistema dinamico che permetta una migliore miscelazione della sospensione e eviti la sedimentazione dei microrganismi. Il volume di coltura utilizzato è lo stesso delle piastre multiwell da 12 pozzetti. I valori di crescita microbica ottenuti con questo metodo sperimentale sono riportati in Tabella 3.5 e 3.6.

Tabella 3.5: Effetto degli oli essenziali su *R. muculaginosa.*

CONCENTRAZIONE olio essenziale (v/v)	**TIMO** cfu/ml	**ORIGANO** cfu/ml
0,750%	0	0
0,563%	0	$2 \cdot 10^2 \pm 2 \cdot 10$
0,375%	$2 \cdot 10^3 \pm 1 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^3$

Tabella 3.6: Effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis.*

CONCENTRAZIONE olio essenziale (v/v)	**TIMO** cfu/ml	**ORIGANO** cfu/ml
0,750%	0	$3 \cdot 10^2 \pm 1 \cdot 10$
0,563%	$1 \cdot 10^3 \pm 1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$
0,375%	$2 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^5 \pm 8 \cdot 10^4$

I valori riportata in Tabella 3.5 e 3.6 si discostano da quelli ottenuti nelle prove con le piastre multiwell a 12 pozzetti (Tabella 3.3 e 3.4): infatti, in questo caso, solo l'olio di timo alla concentrazione maggiore inibisce la crescita di entrambi i microrganismi, mentre l'olio di origano è meno efficiente. Il fatto che il sistema sia in agitazione ha permesso di ottenere una sospensione più omogenea e migliorare il trasferimento di ossigeno.

I dati ottenuti sono, invece, molto simili ai risultati della piastra multiwell da 96 pozzetti: i valori di crescita microbica infatti hanno lo stesso ordine di grandezza. Questo ci ha permesso di concludere che solo l'olio essenziale di timo, alla maggiore concentrazione testata (0.75%) riesce a inibire la crescita di *R. mucilaginosa* e di *S. epidermidis*, mentre le concentrazioni inferiori (0.563% e 0.375%) determinano un rallentamento della crescita. Utilizzando il sistema di coltura dinamico, quindi, visti i risultati molto simili a quelli ottenuti con la piastra multiwell da 96 pozzetti, l'assenza di crescita microbica ottenuta per l'olio di timo al 0.75% potrebbe essere dovuta all'azione dei suoi componenti fenolici e non, come ipotizzato, alla limitazione di ossigeno.

Alla fine di queste sperimentazioni si è concluso che l'olio essenziale con maggiore effetto inibente è quello di timo e la MIC è pari a 7.5 µg/ml. Questo valore è in accordo con i risultati trovati in alcuni studi precedenti, come riportato in Tabella 3.7.

Tabella 3.7: valori di MIC riportati in letteratura.

Microrganismo	Olio essenziale	MIC	Riferimento bibliografico
R. mucilaginosa	*Thymus vulgaris* OE	6,5 - 25 µg/ml	Ahmed et al., 2014
S. epidermidis	*Thymus algeriensis* OE	20-80 µg/ml	Salehi *et al.*, 2017
	Thymus vulgaris OE	80-160 µg/ml	
	Thymus serpyllum OE	2,5-5 µg/ml	
	Thymus longicaulis OE	7,5 µg/ml	Kalemba e Kunicka, 2003

3.1.2 Studio degli effetti dell'olio essenziale su microrganismi cresciuti su supporto cartaceo

Durante queste prove preliminari, si è studiato l'effetto inibitorio dell'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% sui microrganismi unicellulari cresciuti su terreno solido agarizzato e su carta.

Poiché il trattamento con l'olio essenziale avviene tramite nebulizzazione dello stesso, per prima cosa sono condotte delle prove per determinare la distanza da cui disperdere l'olio essenziale e il numero di dispersioni da effettuare.

Per quanto riguarda il primo punto, i risultati delle prove sono riportati nel grafico di Figura 3.5, che rappresenta il diametro della porzione di foglio che rimane bagnata in funzione della distanza da cui viene dispersa la soluzione. Poiché i foglietti utilizzati

durante tutto il lavoro di Tesi hanno forma quadrata, con lato di 6 cm, si determina che la distanza ottimale da cui nebulizzare l'olio essenziale è di circa 12 cm: in questo modo si ottiene un diametro della zona bagnata compreso tra 7.9 cm e 8.6 cm ($6\sqrt{2} = 8.48$).

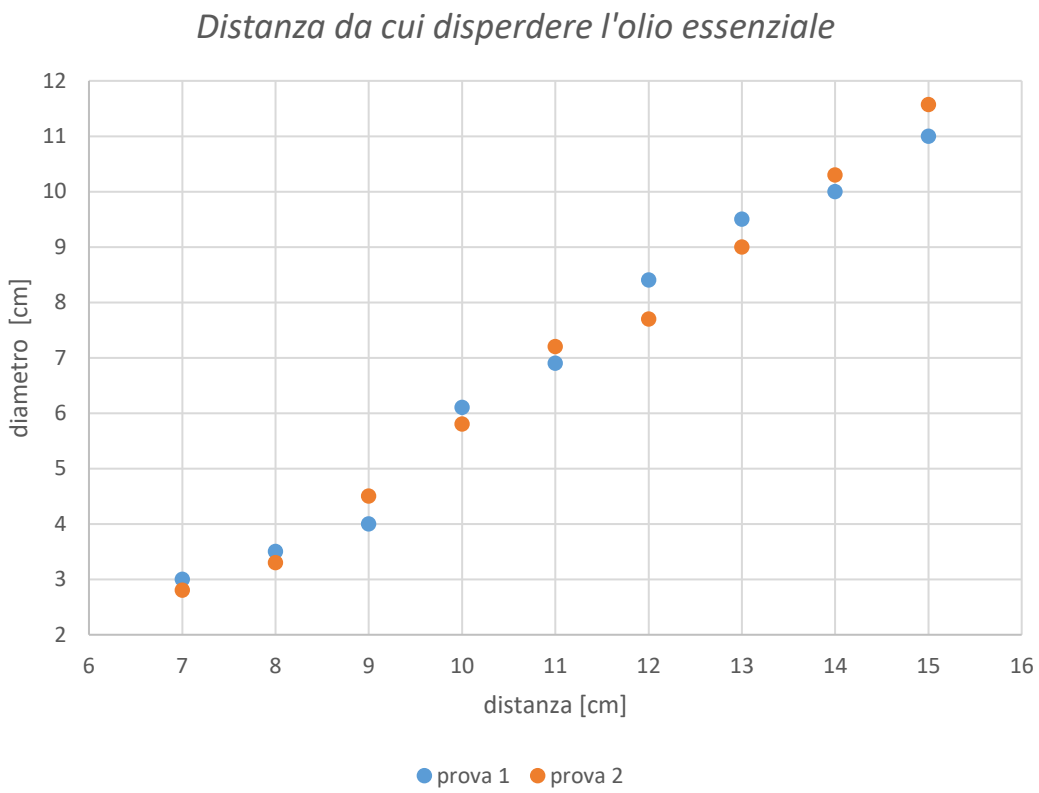

Figura 3.5: diametro della porzione di foglio bagnata al variare della distanza tra foglio e flacone dotato di tappo con erogatore a spruzzo.

Il numero di nebulizzazioni da effettuare, invece, è scelto considerando sia la quantità in peso di olio essenziale che viene dispersa sia l'assorbimento di quest'ultimo da parte del foglio posizionato sulla capsula Petri.

Quindi, per prima cosa, si è pesato, con una bilancia di precisione, la quantità di olio che è stata dispersa con una nebulizzazione: il peso medio di un singolo spruzzo è pari a 0.129 ± 0.008 g (Figura 3.6).

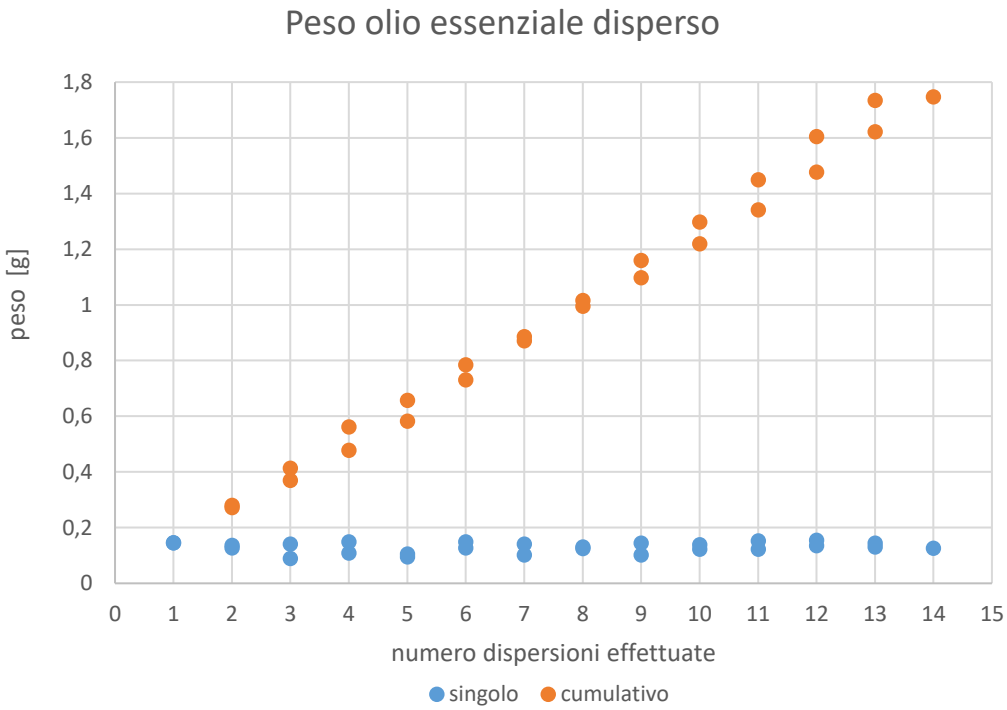

Figura 3.6: peso di ogni singola dispersione e peso cumulativo.

Dai valori cumulativi (somma dei pesi dei singoli spruzzi) riportati nel grafico in Figura 3.6 si deduce che il numero ottimale di spruzzi potrebbe essere 13 o 14, in quanto in questo modo si raggiunge la stessa quantità di olio essenziale presente in ciascuno dei pozzetti della piastra multiwell da 12, pari a 1.7 ml (*sezione 2.4.2.a*).

Effettuando, però, 14 spruzzi su un foglietto di carta (6x6 cm^2) depositato all'interno di una capsula Petri, si nota che la soluzione di l'olio essenziale non riesce ad essere completamente assorbita dal foglio, ma rimane in parte galleggiante su di esso. Si sceglie, quindi, un numero di nebulizzazioni pari a 10, che permette di rilasciare una quantità di olio che la carta riesce ad assorbire.

Posto quindi il numero di nebulizzazioni pari a 10 e la distanza da cui effettuarli pari a 12 cm, si è studiato l'effetto dell'olio sui microrganismi cresciuti su carta e su agar (*sezione 2.2.2*) e si sono confrontati i risultati. I microrganismi sono stati trattati con l'olio essenziale al tempo zero, ossia subito dopo aver effettuato l'inoculo, e dopo 24 ore. A partire dalle 48 ore, si sono osservate e confrontate le crescite ottenute nei diversi casi.

Per quanto riguarda i microrganismi cresciuti su carta, si è osservato che le piastre trattate con l'olio di timo mostrano un rallentamento della crescita microbica rispetto al relativo controllo. Come si può notare dalla Figura 3.7, questo effetto è maggiormente evidente quando l'olio essenziale è disperso al tempo zero. Dalla Figura 3.7, inoltre, è possibile notare che il contatto con l'olio di timo ha fatto sì che il lievito perdesse in parte la pigmentazione rosata. Probabilmente i terpenoidi contenuti nell'olio essenziale sono riusciti a penetrare all'interno della cellula e, conseguentemente, a influenzare la produzione del pigmento.

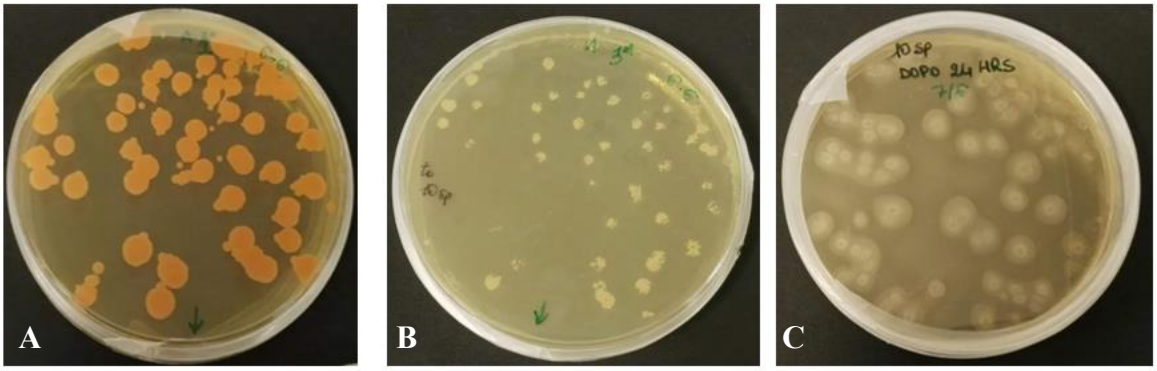

Figura 3.7: crescita di *R. mucilaginosa* su terreno solido, A: nella piastra di controllo, B: nella piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: nella piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

In Figura 3.8, sono riportate le immagini relative a *S. epidermidis*. Dal confronto con la Figura 3.7, è evidente, osservando la crescita microbica nelle piastre, che l'olio essenziale di timo ha una maggiore efficacia sul lievito rispetto al batterio, così come ottenuto dalle prove sperimentali in coltura liquida.

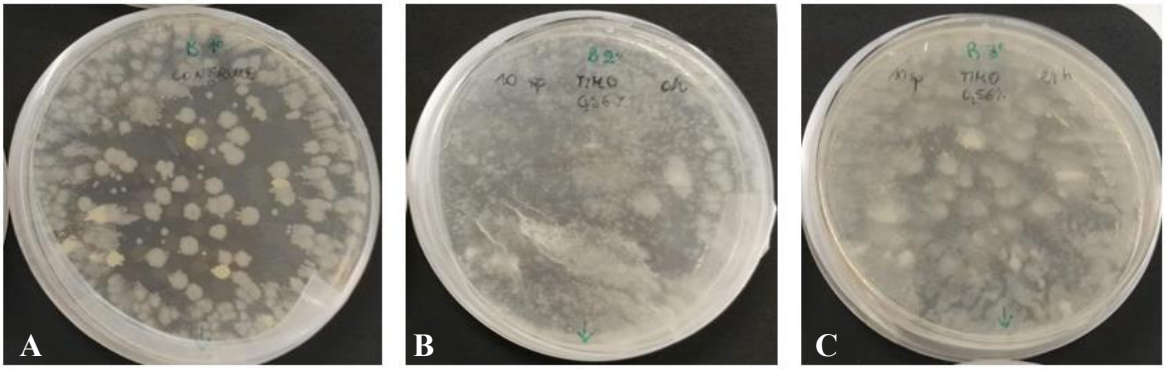

Figura 3.8: crescita di *S. epidermidis* su terreno solido, A: nella piastra di controllo, B: nella piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: nella piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

L'effetto dell'olio essenziale di timo (0.75%) sui microrganismi cresciuti su carta è simile a quello ottenuto sugli stessi cresciuti su terreno solido (Figura 3.9 e 3.10). Tuttavia, si nota che l'inibizione da parte dell'olio essenziale risulta, in questo caso, essere leggermente maggiore. Questo maggior effetto può essere spiegato dal fatto che il foglietto di carta è in grado di assorbire l'olio con maggiore facilità rispetto all'agar, garantendo così un prolungamento del suo tempo di contatto e di azione sui microrganismi.

Inoltre, per i microrganismi cresciuti su carta si nota una minor dispersione delle colonie nel momento in cui queste vengono messe in contatto con la soluzione acquosa di olio; infatti, poiché l'olio viene assorbito dal foglio, non si disperde su tutta la superficie dell'agar. Seppure le differenze sulla crescita microbica siano più facili da dedurre osservando le piastre contenenti *R. mucilaginosa* (Figura 3.9), essendo questo un microrganismo pigmentato, si può giungere alle stesse conclusioni per il batterio.

Le immagini relative alle prove sperimentali condotte su *S. epidermidis* sono riportate in Figura 3.10.

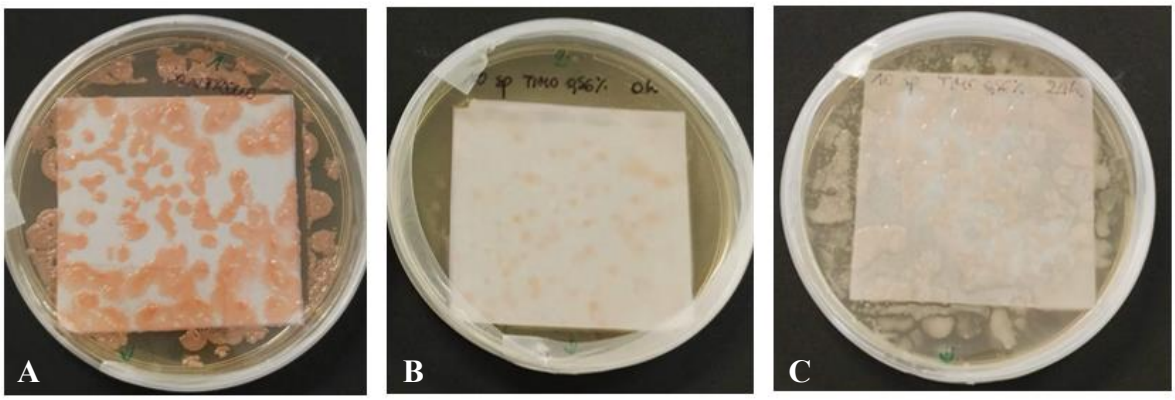

Figura 3.9: crescita di *R. mucilaginosa* su carta, A: nella piastra di controllo, B: nella piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: nella piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

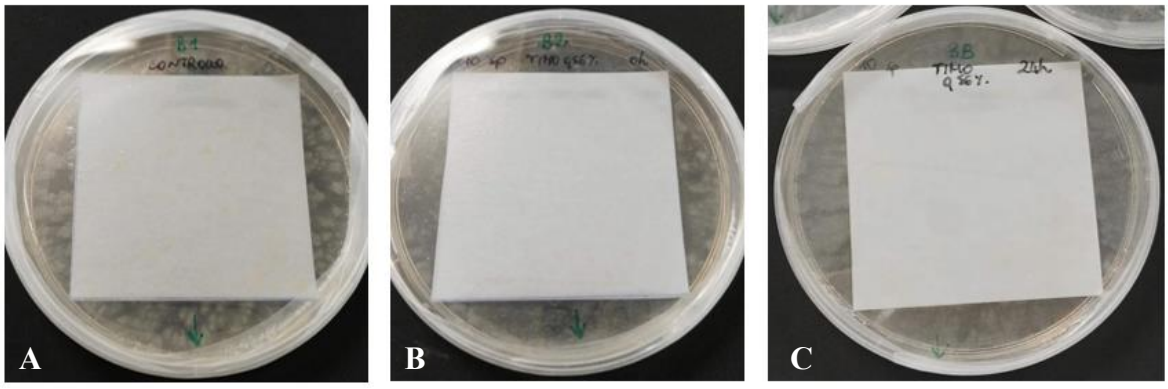

Figura 3.10: crescita di *S. epidermidis* su carta, A: nella piastra di controllo, B: nella piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: nella piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

3.2 Effetto della liofilizzazione sui campioni cartacei

Nel caso di studio in esame, sono stati utilizzati campioni cartacei costituiti da fogli di carta bianca dalle dimensioni di 6 cm x 6 cm, altezza di circa 1 cm e peso iniziale di 26.41 ± 0.68 g.

A valle dell'immersione in acqua distillata, i campioni hanno assorbito 23.21 ± 0.98 g di acqua, registrando quindi un aumento di peso, rispetto al peso secco inziale, pari all' 87.91%. Il peso medio dei campioni post-immersione è di 49.62 ± 1.35 g (Figura 3.11).

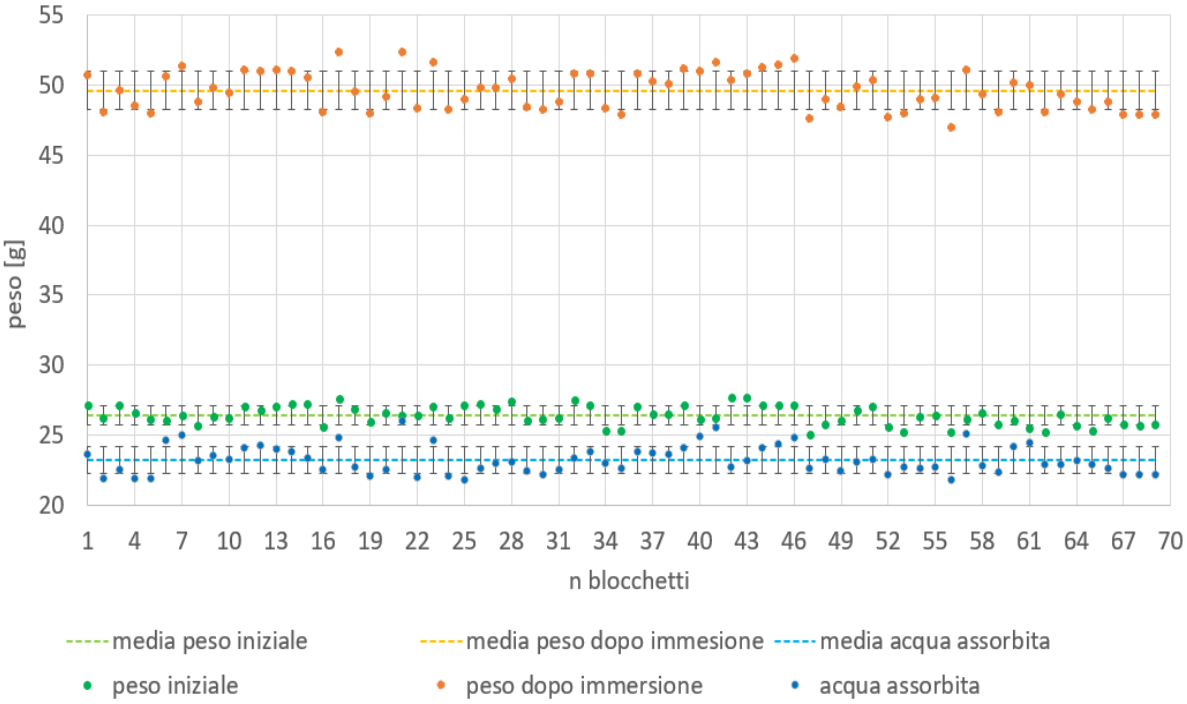

Figura 3.11: variazione del peso dei blocchetti e quantità di acqua assorbita nella fase di immersione dei blocchetti cartacei.

Dal grafico riportato in Figura 3.11 è possibile osservare che la deviazione standard riferita ai pesi dei campioni post-immersione è abbastanza alta: la maggiore variabilità di questo valore può essere associata alla possibile presenza di piccole bolle d'aria, le quali rappresentano un ostacolo all'assorbimento dell'acqua da parte dei campioni.

I valori ottenuti di acqua assorbita sono in linea con i risultati presenti nella Tesi di Lucchese (2019), i quali sono dello stesso ordine di grandezza.

A seguito del congelamento, i campioni sono sottoposti all'essicamento tramite liofilizzazione. Durante le prove condotte nel liofilizzatore per far avvenire l'essiccamento del materiale cartaceo processato sono stati utilizzati i valori di temperatura dei ripiani e di pressione in camera consigliati nel lavoro di Lucchese (2019).

Impostando quindi $T_{ripiano}$ = 0°C e P_{camera} = 200 µbar, l'essicamento primario si conclude dopo 35 ± 2 ore. Questo valore è riscontrabile osservando i grafici riportati in Figura 3.12 e 3.13: quando, infatti, non vi è più vapore acqueo in camera di liofilizzazione le due sonde di pressione (tipo Pirani e tipo Baratron) registrano lo stesso valore di pressione, indicando la fine dell'essiccamento primario.

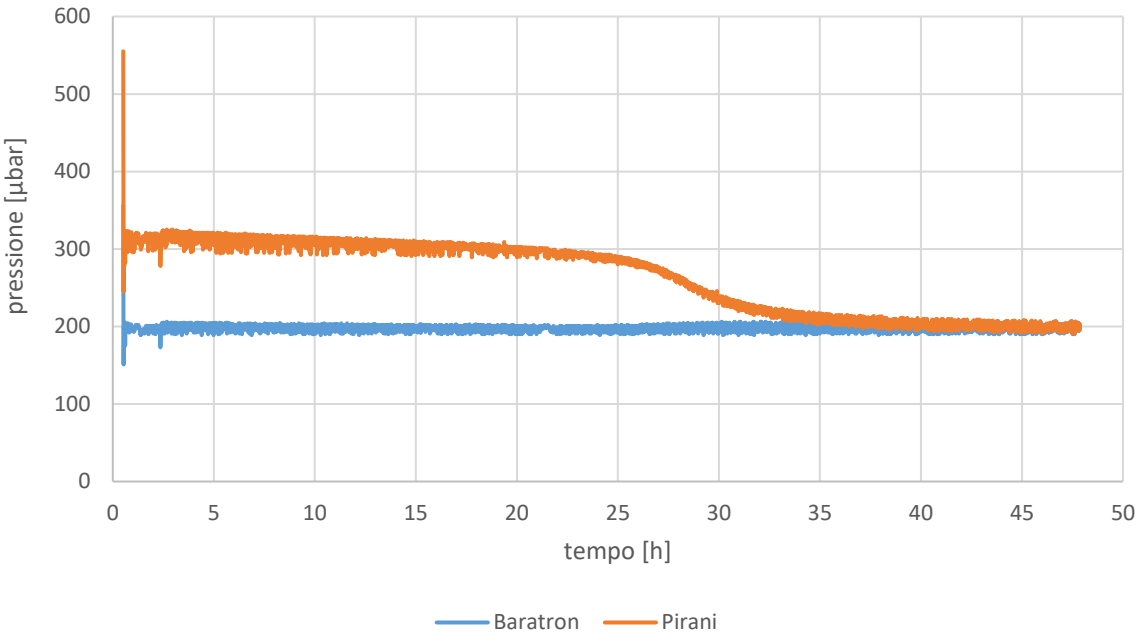

Figura 3.12: andamenti della pressione in camera misurati tramite il sensore termoconduttivo, tipo Pirani, e quello capacitivo, tipo Baratron.

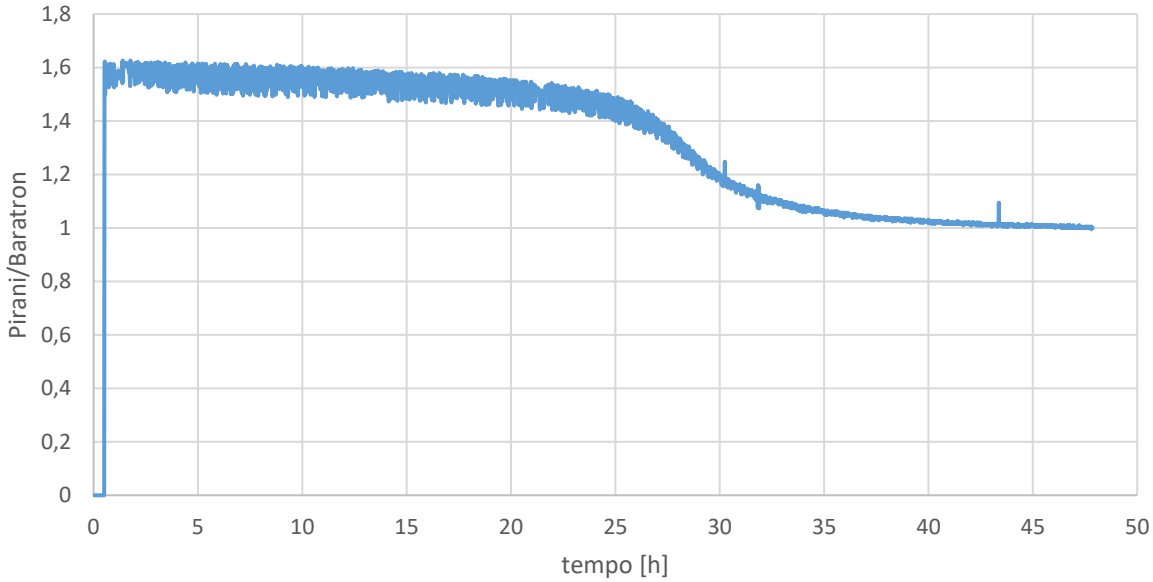

Figura 3.13: rapporto tra i valori registrati dai due sensori di pressione.

A valle del processo di liofilizzazione si verifica come l'acqua assorbita durante la fase di immersione sia stata completamente rimossa. La quantità di acqua che durante l'essiccamento primario è passata dallo stato solido a quello vapore è di 23.16 ± 1.08 g; i campioni cartacei, quindi, mostrano un contenuto di umidità residua pari allo 0.67% (Figura 3.14). Il valore di umidità residua risulta essere leggermente inferiore rispetto a quelli tipici di prodotti liofilizzati con essiccamento primario; questo è presumibilmente dovuto alla permanenza dei campioni cartacei in camera di liofilizzazione anche dopo la

fine dell'essicamento primario per un tempo elevato, cosa che ha comportato una rimozione anche di parte dell'acqua legata.

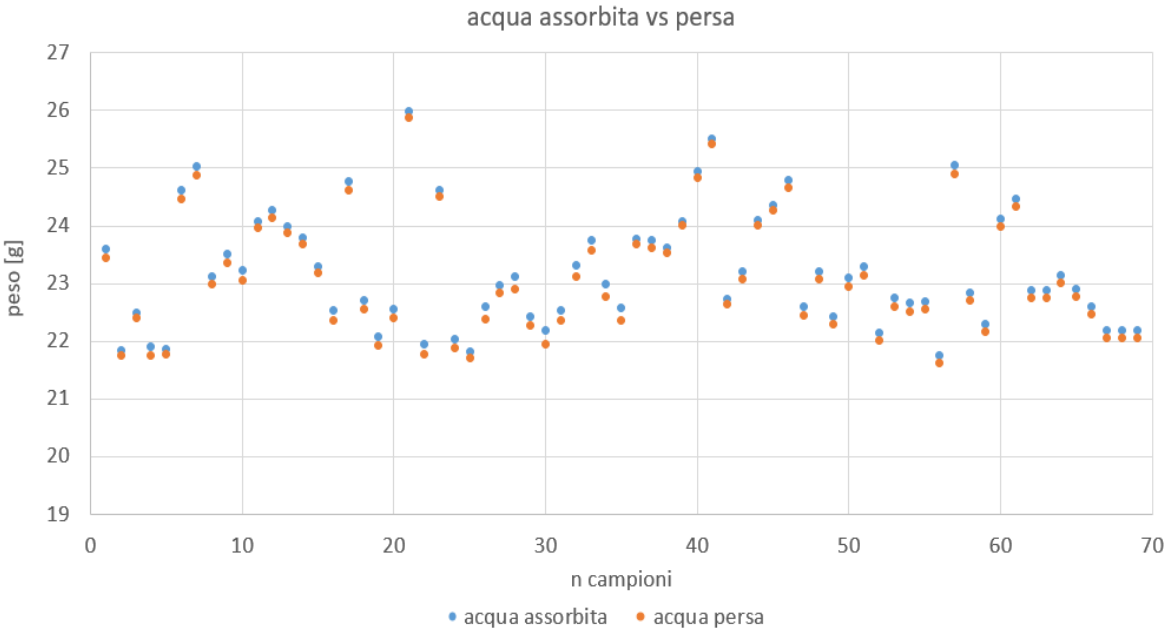

Figura 3.14: confronto tra l'acqua assorbita durante la fase di immersione e quella rimossa con il processo di liofilizzazione.

Osservando la Figura 3.15, che mostra un campione estratto dal liofilizzatore a seguito dell'essiccamento, si nota che le caratteristiche qualitative dei campioni cartacei sono state preservate, evidenziando come la liofilizzazione abbia consentito di riportare il campione in condizioni prossime a quelle precedenti l'allagamento.

Figura 3.15: campione cartaceo prima e dopo il processo di liofilizzazione.

Il maggiore cambiamento rilevabile è la variazione dell'altezza dei blocchetti e, di conseguenza, del loro volume: l'altezza dei blocchetti è aumentata del 66%. Questo cambiamento è dovuto al contatto prolungato dei campioni con l'acqua liquida, piuttosto che al processo di liofilizzazione.
Occorre puntualizzare, infatti, che l'obiettivo dell'essiccamento condotto con la liofilizzazione è il contenimento di un danno già subito e quindi, per limitare i

cambiamenti che l'acqua può provocare, occorre procedere al congelamento del materiale nel minor tempo possibile. Inoltre, nonostante la carta mostri una maggiore rigidezza, non sono stati osservati stati di degradazione, nemmeno sui fogli a diretto contatto con la piastra riscaldante, e i blocchetti di carta essiccati non presentano il nucleo centrale di ghiaccio, indicando così l'efficacia del processo nel ripristinare lo stato iniziale dei prodotti.

3.3 Studio dell'effetto dell'olio essenziale sui microrganismi liofilizzati

3.3.1 Effetto su *Rhodotorula mucilaginosa*

A valle della liofilizzazione, i fogli contaminati da *R. mucilaginosa* sono stati estratti dai blocchetti, depositati all'interno di capsule Petri contenenti il terreno Malt Extract Agar e trattati con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v. Tre di essi sono stati messi in contatto con l'olio essenziale al tempo zero, tre dopo 24 ore, mentre i restanti sono stati utilizzati come controllo. L'osservazione della crescita microbica è durata cinque giorni, a partire dal momento in cui i fogli sono stati depositati su terreno solido. A valle del periodo di osservazione, la crescita del lievito che si è osservata è mostrata in Figura 3.16.

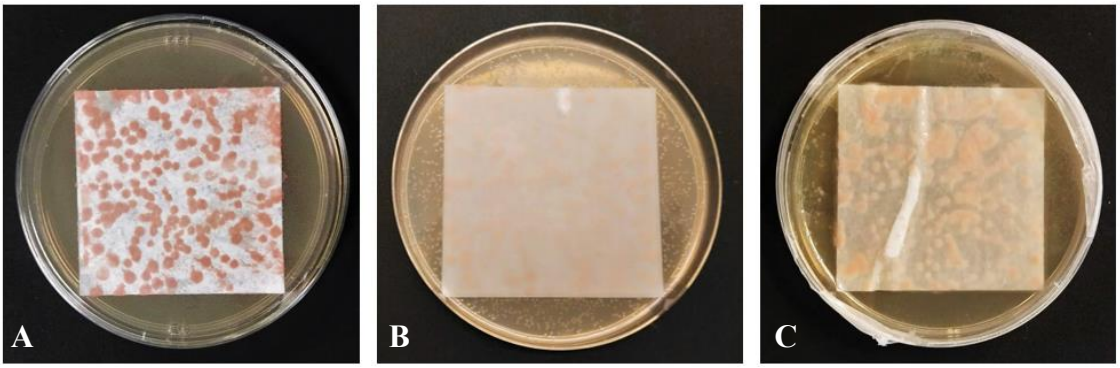

Figura 3.16: *R. mucilaginosa* dopo cinque giorni di incubazione. A: piastra di controllo, B: piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

Per quanto riguarda le piastre di controllo, la crescita del lievito non pare essere stata influenzata dal processo di liofilizzazione subito; infatti, dopo 24 ore di incubazione, i fogli che non hanno subito il trattamento con l'olio essenziale (Figura 3.16 A) presentano una crescita microbica confrontabile con i campioni non sottoposti a liofilizzazione (Figura 3.9 A). Questo evidenzia che il processo di liofilizzazione non inibisce la crescita di *R. mucilaginosa*, in accordo con i risultati ottenuti da Lucchese (2019).

Il trattamento di nebulizzazione con l'olio essenziale di timo al tempo zero (Figura 3.16 B) ha provocato una dispersione dei microrganismi sulla piastra, tuttavia non è stato osservato lo sviluppo di nuove colonie sulla superficie dell'agar. In generale, i fogli presentano una crescita microbica inibita. Le colonie del lievito, infatti, non hanno aumentato il loro diametro e hanno in parte perso la pigmentazione, apparendo di color rosa molto tenue.

La dispersione delle colonie è minore nel caso in cui i fogli contaminati vengono trattati dopo 24 ore di incubazione (Figura 3.16 C): in questo caso la crescita microbica è maggiore rispetto a quella ottenuta per i fogli trattati al tempo zero. Ciò è dovuto al fatto che le colonie sono cresciute durante le 24 ore trascorse tra la deposizione del foglio sul terreno solido e il trattamento con l'olio e non alla minor efficacia dell'olio essenziale che, anche in questo caso, riesce a bloccare la crescita del lievito.

Le prove condotte hanno dimostrato come l'olio essenziale di timo (0.75% v/v) sia in grado di rallentare o inibire la crescita di *R. mucilaginosa*, in particolar modo se utilizzato subito a valle della liofilizzazione, prima che i microrganismi riprendano a crescere. Paragonando questi risultati con quelli ottenuti durante le prove preliminari sui fogli contaminati non liofilizzati (*Sezione 3.1.2,* Figura 3.9), si nota che la crescita del lievito non è influenzata dal processo di liofilizzazione, ma solo dal trattamento con olio essenziale.

3.3.2 Effetto su *Staphylococcus epidermidis*

A valle della liofilizzazione, i fogli contaminati da *S. epidermidis* sono stati estratti dai blocchetti, depositati all'interno di capsule Petri contenenti il terreno Nutrien Agar e trattati con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v. Tre di essi sono stati messi in contatto con l'olio essenziale al tempo zero, tre dopo 24 ore, mentre i restanti sono stati utilizzati come controllo. L'osservazione della crescita microbica si è protratta per 72 ore, a partire da quando i fogli vengono depositati su terreno solido. A valle del periodo di osservazione, la crescita del batterio che si è osservata è mostrata in Figura 3.17.

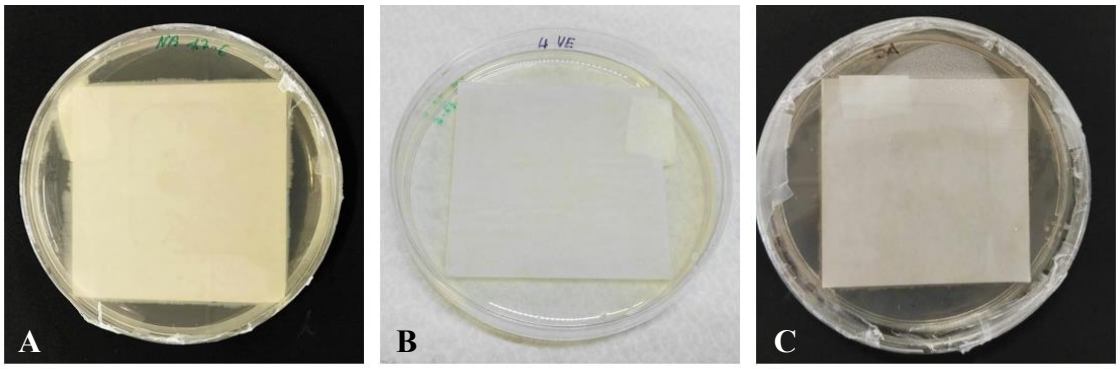

Figura 3.17 *S. epidermidis* dopo 72 ore di incubazione. A: piastra di controllo, B: piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

Per quanto riguarda le piastre di controllo, la crescita del batterio non è inibita dal processo di liofilizzazione subito; infatti, dopo 24 ore di incubazione i fogli presentano una crescita microbica confrontabile con i campioni non sottoposti a liofilizzazione (Figura 3.17 A). Sulle piastre trattate al tempo zero (Figura 3.17 B), invece, la crescita del batterio appare molto rallentata, quasi inibita, e, come per *R. mucilaginosa*, la nebulizzazione con l'olio essenziale causa la dispersione del microrganismo al di fuori del foglio sulla superficie dell'agar, come si nota nell'immagine di Figura 3.18.

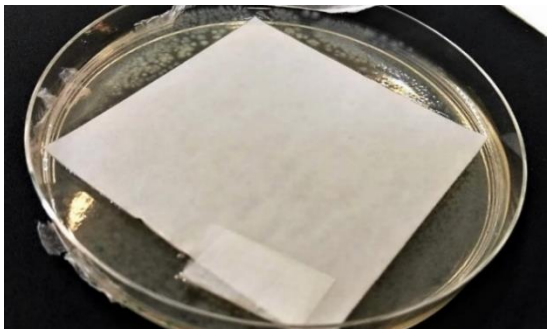

Figura 3.18: piastra di *S. epidermidis* trattata con l'olio di timo al tempo zero.

Nelle piastre trattate dopo 24 ore (Figura 3.17 C) si nota che, a partire dal momento in cui l'olio essenziale viene nebulizzato, la crescita del batterio risulta rallentata. Confrontando l'immagine C e A di Figura 3.17, si può infatti notare, ai bordi dei lati del foglio, che a parità di tempo (72 ore) il microrganismo trattato dopo 24 ore è cresciuto in maniera inferiore rispetto al controllo, in quanto la crescita avvenuta nelle prime 24 ore di incubazione viene bloccata dal trattamento con l'olio essenziale.

Come si può notare dalle immagini riportate in Figura 3.17, poiché il batterio *S. epidermidis* non è pigmentato risulta difficoltoso rilevare la sua crescita su carta. Per confermare l'avvenuta crescita, dopo 72 h di incubazione, è stata effettuata la tecnica del "replica-plating" dei fogli, appoggiandoli, per circa un'ora, all'interno di capsule Petri contenenti Nutrient Agar. Dopo di che, i fogli sono stati rimossi e le piastre sono state incubate per 24 ore. In questo modo, si è potuto osservare con maggiore facilità lo sviluppo delle colonie a valle del trattamento con oli essenziali, come illustrato in Figura 3.19.

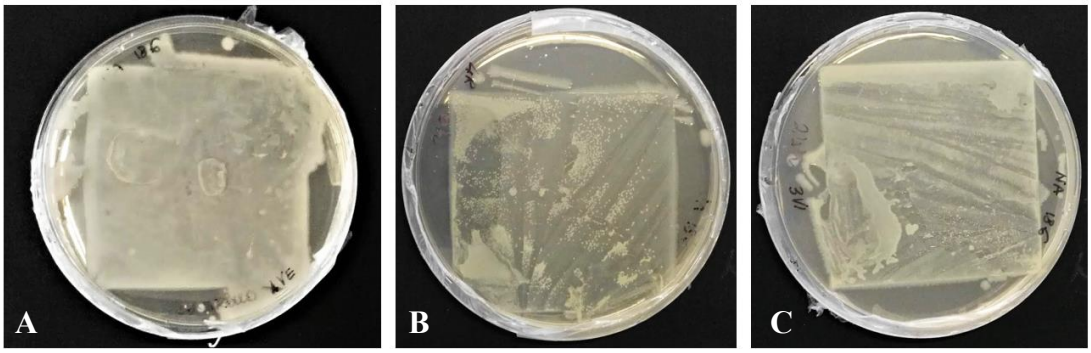

Figura 3.19: *S. epidermidis,* "replica-plating" dei fogli liofilizzati. A: piastra di controllo, B: piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

La tecnica del "replica-plating" sui fogli trattati ha permesso di confermare quanto esposto in precedenza. Si nota, infatti, che il maggior effetto di rallentamento o inibizione della crescita microbica si ha quando il foglio contaminato è trattato con l'olio essenziale di timo subito dopo il processo di liofilizzazione. Per quanto riguarda, invece, la crescita del batterio avvenuta sui fogli trattati dopo 24 ore, si nota che essa risulta essere inferiore a quella avvenuta sul foglio non trattato con l'olio essenziale, ma maggiore di quella avvenuta sul foglio trattato al tempo zero. Infine, la crescita ottenuta sulla piastra di controllo conferma che il processo di liofilizzazione non ha alcun effetto sulla vitalità del batterio, così come riportato nel lavoro di Lucchese (2019).

Si può concludere, quindi, che l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v risulta efficace per rallentare la crescita di *S. epidermidis*, in particolar modo se utilizzato subito a valle della liofilizzazione. Infine, paragonando i risultati ottenuti con quelli delle prove preliminari sui fogli contaminati e non liofilizzati (*Sezione 3.1.2,* Figura 3.10), si nota che la crescita del batterio è inibita solo dal trattamento con olio essenziale e non dal processo di liofilizzazione.

3.3.3 Effetto su *Alternaria alternata*

A valle della liofilizzazione, si è testato l'utilizzo dell'olio essenziale sul fungo *A. alternata*, microrganismo non analizzato durante la sperimentazione preliminare. L'efficacia dell'olio di timo sull'inibizione della crescita fungina di *A. alternata* è riportata in letteratura nei lavori di Tullio *et al*. (2006), Soylu e Kose (2015), Salehi *et al*. (2016).

I fogli contaminati da *A. alternata* non sporificata e sporificata sono stati estratti dai blocchetti, depositati all'interno di capsule Petri contenenti il terreno Czapeck Dox Agar e trattati con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v. Tre di essi sono stati messi in contatto con l'olio essenziale al tempo zero, tre dopo 24 ore, mentre i restanti sono stati utilizzati come controllo. L'osservazione della crescita fungina si è protratta per due settimane, a partire da quando i fogli sono stati depositati su terreno solido. Giornalmente è stato misurato il diametro della colonia in due direzioni perpendicolari e si è valutata la morfologia del fungo.

In Figura 3.20 sono riportate le curve relative alla crescita di *A. alternata* non sporificata. Dal grafico è possibile osservare che il trattamento con gli oli essenziali influenza in modo significativo la velocità di crescita del fungo.

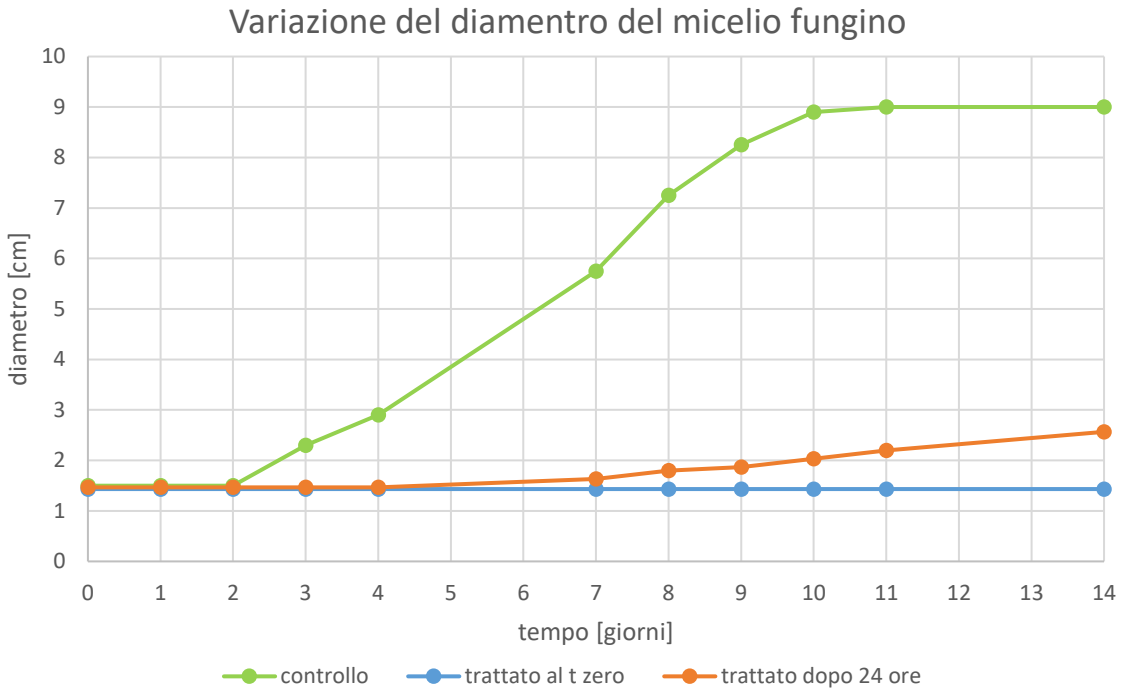

Figura 3.20: andamento del diametro di *A. alternata* non sporificata.

Il fungo trattato con l'olio essenziale, al tempo zero, presenta una totale inibizione della crescita; infatti, il suo diametro è rimasto invariato per tutta la durata dell'osservazione, dimostrando l'efficacia dell'olio di timo anche su questo microrganismo.

L'effetto dell'olio di timo è stato osservato anche quando il fungo viene trattato dopo 24 ore, nel corso delle quali non si è verificata crescita. L'inibizione dovuta all'azione dell'olio di timo, in questo caso, è durata una settimana, dopo di che il fungo ha iniziato a crescere con una velocità inferiore rispetto al controllo. Alla fine del periodo di osservazione (14 giorni) le colonie hanno raggiunto un diametro medio di 2.57 cm, paragonabile a quello ottenuto nel controllo dopo 72 ore (2.48 cm). La crescita del fungo è avvenuta con una scarsa produzione di micelio aereo e una cospicua sporificazione, come si può osservare dall'immagine di Figura 3.21, raffigurante il fungo trattato dopo 14 giorni di incubazione.

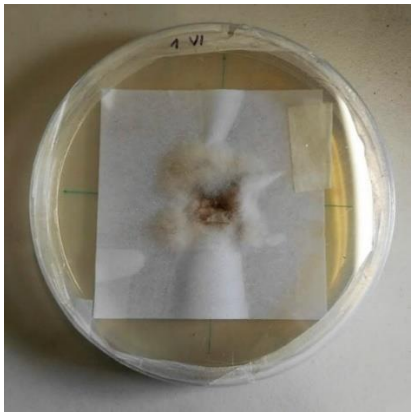

Figura 3.21: *A. alternata* non sporificata, a seguito del trattamento con l'olio di timo avvenuto dopo 24 ore dal tempo zero.

Queste osservazioni evidenziano come l'olio essenziale di timo sia in grado di rallentare la crescita del fungo non sporificato in maniera più efficace rispetto al solo processo di liofilizzazione. Come si può osservare dalla curva relativa al controllo del grafico di Figura 3.20, la liofilizzazione è in grado, comunque, di inibire la crescita del fungo non sporificato per 48 ore. I valori ottenuti per la crescita di *A. alternata* non sporificata a seguito del solo processo di liofilizzazione confermano quelli ottenuti nel precedente lavoro di Lucchese (2019).

Di seguito, in Figura 3.22, sono riportate delle immagini raffiguranti la crescita nel tempo di *A. alternata* non sporificata in una piastra di controllo e in una trattata con l'olio essenziale dopo 24 ore. Confrontando le fotografie si nota che l'olio essenziale di timo, anche dopo 24 ore, risulta essere efficace sul controllo della crescita del fungo.

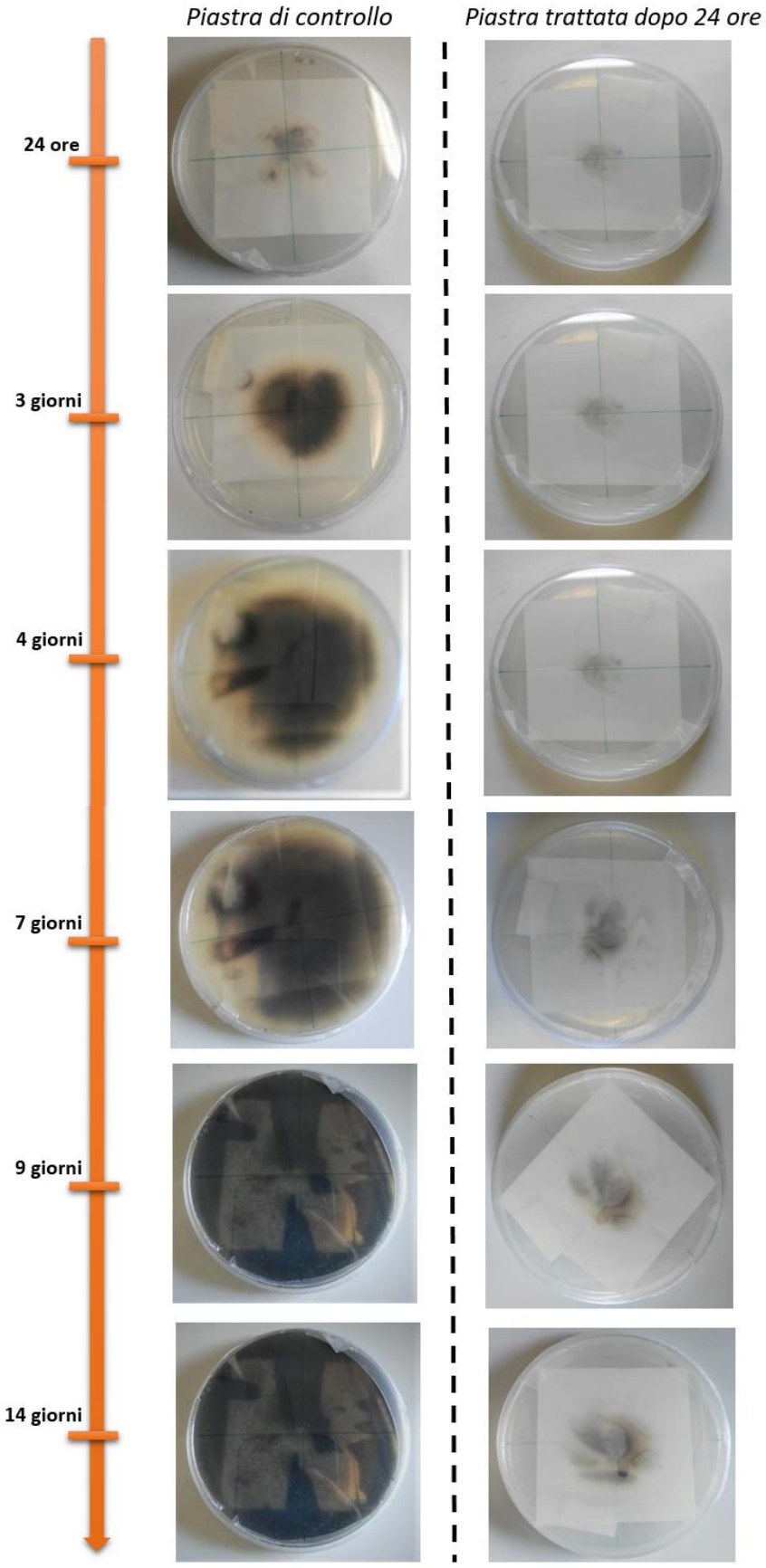

Figura 3.22: confronto della crescita di *A. alternata* non sporificata nella piastra di controllo e in quella trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

Il confronto della crescita fungina nelle piastre trattate rispetto al controllo viene espresso in numerosi lavori bibliografici (Soylu e Kose, 2015; Ozcan *et al.*, 2009; Kalenba e Kumicka, 2003) tramite la percentuale di inibizione di crescita del micelio (MGI = *inhibition percentage of mycelial growth*). Essa è definita nel seguente modo:

$$MGI\ (\%) = {}^{d_c - d_t}/_{d_c} \cdot 100$$

dove d_c è il diametro del micelio nella piastra di controllo e d_t è il diametro del micelio nella piastra trattata.

I valori di MGI per la crescita fungina ottenuta durante la sperimentazione con *A. alternata* non sporificata sono riportati in Tabella 3.8.

Tabella 3.8: valori di MGI per *A. alternata* non sporificata.

tempo [giorni]	MGI [%]	
	A.alternata trattata a t zero	*A.alternata* trattata dopo 24 ore
1	4,4	4,4
2	4,4	4,4
3	37,7	37,7
4	50,6	50,6
7	75,1	75,1
8	80,2	76,2
9	82,6	77,4
10	83,9	77,2
11	84,1	75,6
14	84,1	71,5

Per i primi sette giorni, i valori di percentuale di inibizione calcolati sono uguali sia per il fungo trattato al tempo zero che per quello trattato dopo 24 ore, in quanto in questo periodo di tempo non vi è crescita fungina per entrambi i casi. A partire dall'ottavo giorno, i valori di MGI% sono differenti nei due casi. In generale, si vede che per il fungo trattato al tempo zero l'inibizione percentuale aumenta nel tempo (a causa del solo aumento di diametro del micelio fungino nella piastra di controllo), raggiungendo dopo 14 giorni il valore massimo di percentuale di inibizione pari all'84%. Per quanto riguarda, invece, il fungo trattato dopo 24 ore, si nota che il valore di percentuale di inibizione inizialmente cresce fino al nono giorno, quando raggiunge il valore massimo di percentuale di inibizione pari al 77%, e poi diminuisce; alla fine dell'osservazione il valore di percentuale di inibizione è del 72%.

Per quanto riguarda le prove condotte su *A. alternata* sporificata, i risultati ottenuti evidenziano, anche in questo caso, l'efficienza del trattamento con l'olio essenziale di timo al 0.75% v/v sull'inibizione della sua crescita. Nel grafico riportato in Figura 3.23, è possibile osservare gli andamenti del diametro del micelio fungino a seguito dei diversi trattamenti subiti.

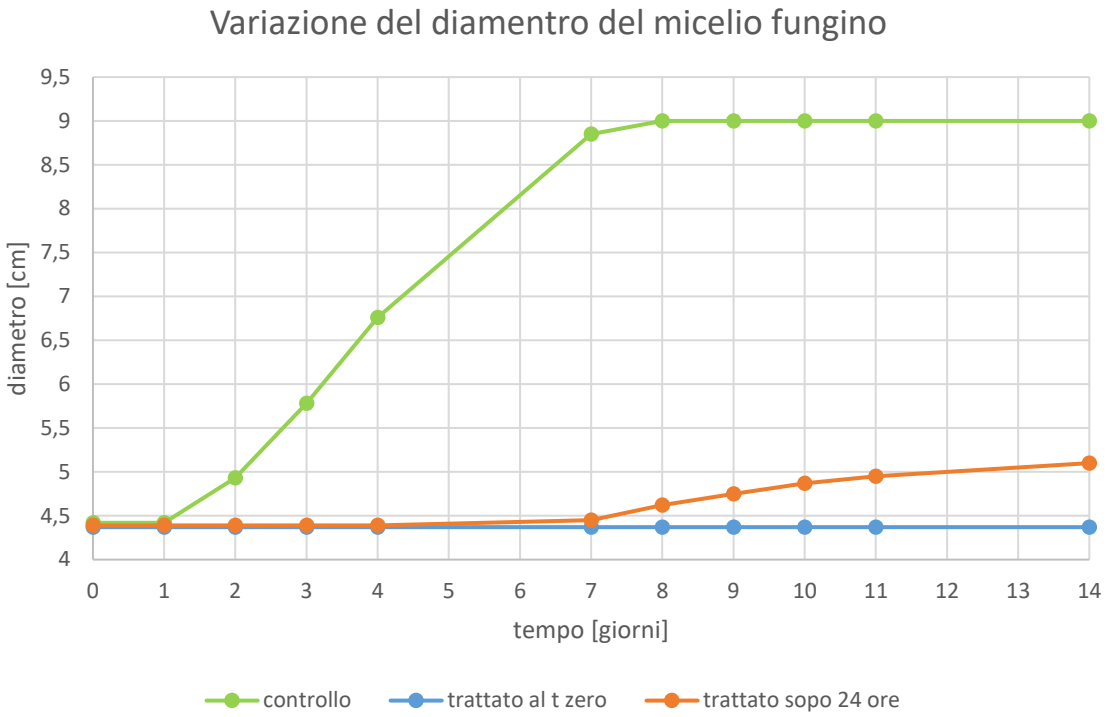

Figura 3.23: andamento del diametro di *A. alternata* sporificata, a seguito dei diversi trattamenti subiti.

La crescita del fungo presente sui fogli trattati con l'olio al tempo zero è completamente inibita, in quanto durante il periodo di osservazione il diametro del micelio è rimasto invariato, così come per il caso di *A. alternata* non sporificata. Sui fogli, invece, trattati dopo 24 ore di incubazione, il fungo presenta una fase di latenza di una settimana, dopo la quale incomincia a sporificare e a crescere con una velocità nettamente più lenta rispetto al controllo. Come si può, infatti, osservare nel grafico riportato in Figura 3.23 il diametro delle colonie è di molto inferiore a quello del controllo, raggiungendo dopo 14 giorni di incubazione un diametro medio (5.12 cm) minore di quello del controllo al terzo giorno di osservazione (5.82 cm). La crescita del fungo è avvenuta con una scarsa produzione di micelio aereo e una cospicua sporificazione.
La crescita di *A. alternata* nelle piastre di controllo è caratterizzata da una fase di latenza di 24 ore; dopo di che si osserva la presenza di un abbondante micelio aereo che ricopre quello precedentemente sporificato. I valori ottenuti per la crescita del fungo sporificato a seguito del solo processo di liofilizzazione confermano quanto riportato da Lucchese (2019).

In seguito, in Figura 3.24, sono riportate delle immagini raffiguranti la crescita nel tempo di *A. alternata* sporificata in una piastra di controllo e in una trattata con l'olio essenziale dopo 24 ore. Confrontando le fotografie si nota che l'olio essenziale di timo, anche se applicato dopo 24 ore, risulta essere efficace nell'inibizione della crescita fungina.

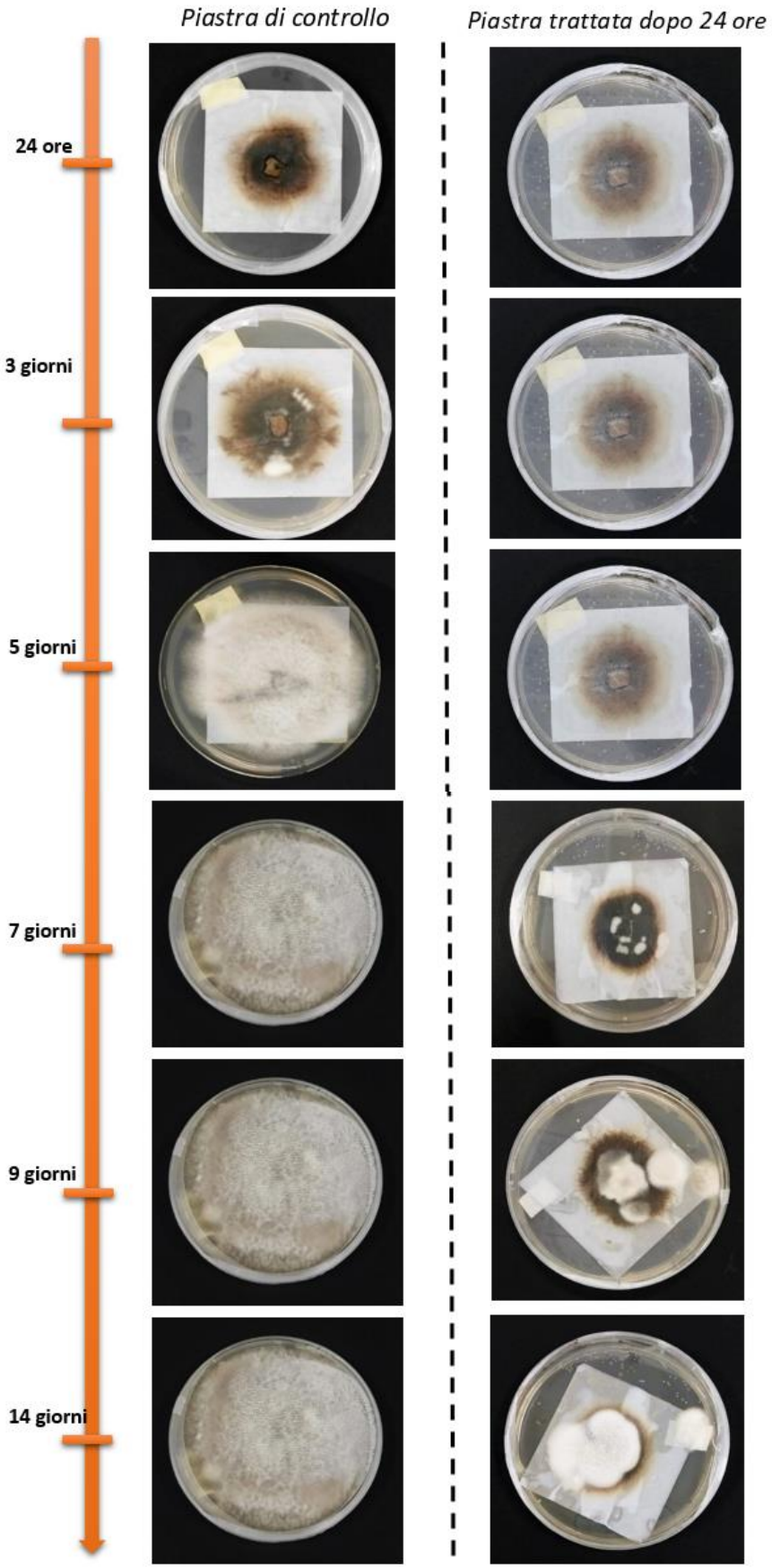

Figura 3.24: confronto della crescita di *A. alternata* sporificata nella piastra di controllo e in quella trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

I valori di percentuale di inibizione del micelio per questo caso di studio sono riportati in Tabella 3.9.

Tabella 3.9: valori di MGI per *A. alternata* sporificata.

tempo [giorni]	MGI [%]	
	A.alternata trattata a t zero	*A.alternata* trattata dopo 24 ore
1	1.1	1.1
2	1.1	1.1
3	11.4	11.4
4	24.4	24.4
7	35.4	35.4
8	50.6	50.4
9	51.4	49.7
10	51.4	48.7
11	51.4	45.9
14	51.4	44.2

Come per le prove condotte su *A. alternata* non sporificata, anche in questo caso, per i primi sette giorni i valori di percentuale di inibizione calcolati sono uguali sia per il fungo trattato al tempo zero che per quello trattato dopo 24 ore. Per il fungo trattato al tempo zero il valore di inibizione percentuale continua ad aumentare nel tempo, raggiungendo il valore massimo di 51%. Per quanto riguarda, invece, il fungo trattato dopo 24 ore, si nota che il valore di inibizione cresce fino all'ottavo giorno, mostrando il valore massimo di inibizione pari al 50%, e poi diminuisce, raggiugendo dopo 14 giorni il valore di 44% di inibizione.

Infine, paragonando il periodo di incubazione e la velocità di crescita del fungo sporificato e non sporificato delle piastre di controllo (Tabella 3.10) si nota che il processo di liofilizzazione è maggiormente efficace sull'inibizione del micelio vegetativo rispetto a quella delle spore, notoriamente più resistenti a shock termici e a bassi valori di acqua libera (Lucchese, 2019; Troiano *et al.*, 2012). Questo vale anche per l'effetto degli oli essenziali sulla crescita del fungo. Infatti, paragonando i valori massimi di percentuale di inibizione (Tabella 3.10), si nota che sono maggiori nel caso in cui a essere trattati sono i funghi caratterizzati dal micelio non sporificato.

Tabella 3.10: valori a confronto per *A.alternata* sporificata e non sporificata.

		A.alternata non sporificata	*A.alternata* sporificata
liofilizzazione	tempo di inibizione [ore]	48	24
	velocità di crescita [cm/ giorno]	0,615	0,655
trattamento con olio di timo al tempo zero	MGI [%]	81,4	51,4
trattamento con olio di timo dopo 24 ore	MGI [%]	77,4	50,4

3.4 Confronto dell'effetto degli oli essenziali post-congelamento e post-liofilizzazione

I campioni contaminati con l'inoculo misto, composto dai tre microrganismi inoculati contemporaneamente sullo stesso foglio di carta (*Sezione 2.2.2*), sono stati utilizzati per confrontare l'effetto del trattamento con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v sui microrganismi che hanno subito il processo di liofilizzazione con quelli che, invece, hanno subito solo la fase di congelamento in freezer seguita dallo scongelamento. Lo scopo della prova, inoltre, è stato quello di verificare se, in presenza di biomassa mista, situazione più simile alla realtà, il trattamento con l'olio essenziale sia efficace come sui singoli microrganismi.

L'osservazione della crescita microbica è durata due settimane, a partire da quando i fogli sono stati recuperati dal blocchetto e depositati sul terreno solido (MEA). Per *A. alternata* è stato valutato l'aumento nel tempo del diametro della colonia fungina in due direzioni perpendicolari, mentre la crescita del batterio *S. epidermidis* e del lievito *R. mucilaginosa* è stata valutata visivamente.

Per quanto riguarda i fogli inoculati che hanno subito solo il processo di congelamento seguito dallo scongelamento si osserva che l'utilizzo dell'olio essenziale risulta essere efficace nell'inibizione della crescita dei microrganismi. A valle del periodo di osservazione (14 giorni), la crescita dei microrganismi che si osserva è mostrata in Figura 3.25.

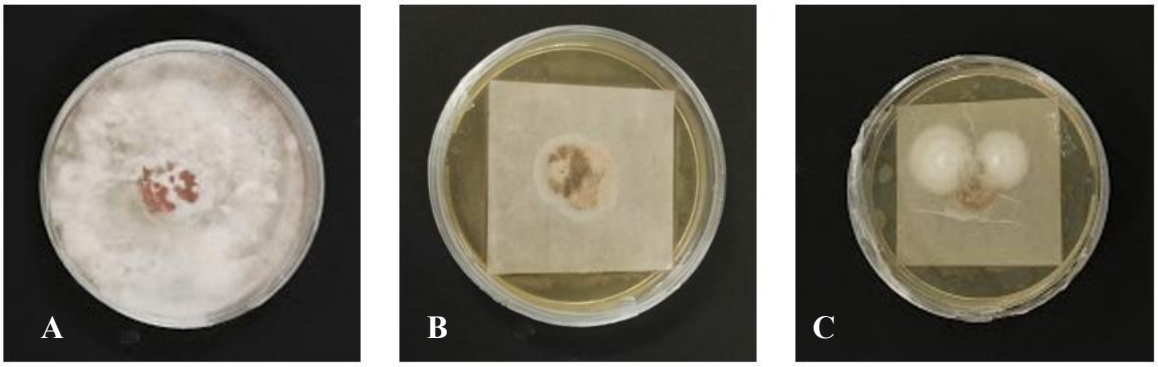

Figura 3.25: inoculo misto dopo 14 giorni di incubazione. A: piastra di controllo, B: piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

I fogli trattati al tempo zero (Figura 3.25 B) presentano una totale inibizione della crescita dei tre microrganismi. Anche sui fogli trattati dopo 24 ore l'olio essenziale è in grado di esplicare la sua funzione inibente. Durante le 24 ore trascorse tra la deposizione dei fogli sul terreno solido e il trattamento con gli oli i microrganismi sono cresciuti, in particolare, il diametro di *A. alternata* è aumentato, passando da 2.7 cm (Figura 3.26 A) a 3.1 cm (Figura 3.26 B). A seguito, però, del trattamento con olio essenziale, la crescita del fungo rimane inibita per 9 giorni (Figura 3.26 C). Al nono giorno, su una delle tre repliche, appaiono due colonie fungine (Figura 3.26 D) che dopo 14 giorni di osservazione hanno un diametro rispettivamente di 2.2 cm e 2.6 cm (Figura 3.25 B).

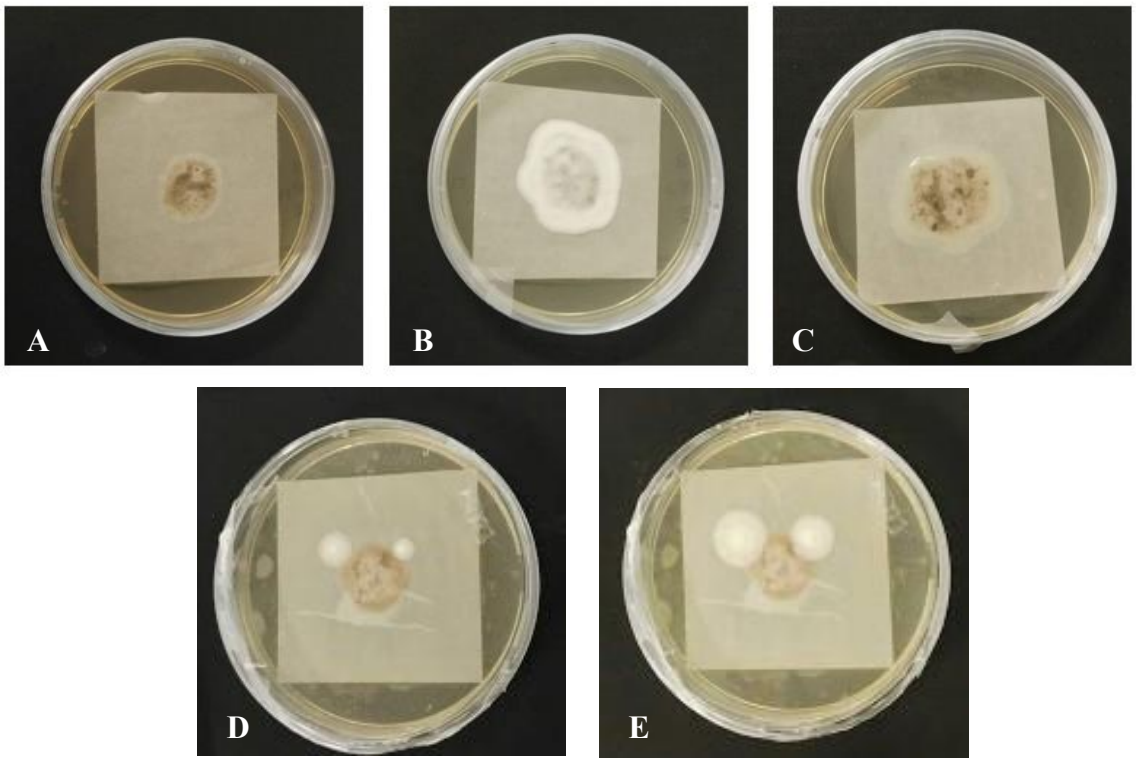

Figura 3.26: inoculo misto trattato dopo 24 ore dallo scongelamento con l'olio di timo. A: al tempo zero, B: dopo 24 ore di incubazione prima del trattamento con l'olio essenziale, C: dopo 7 giorni dal trattamento con l'olio essenziale, D: dopo 9 giorni di incubazione, E: dopo 11 giorni di incubazione.

I microrganismi, invece, presenti sui fogli di carta che non hanno subito il trattamento con l'olio di timo, non presentano alcuna inibizione. Come si può osservare in Figura 3.27, infatti, dopo 24 ore vi è una cospicua crescita microbica, dall'immagine è possibile osservare che dopo 4 giorni di incubazione la colonia fungina ha ricoperto completamente le colonie di microrganismi unicellulari. Tale crescita continua per tutta la durata dell'osservazione e, a partire dal settimo giorno, si nota un'abbondante presenza di micelio aereo. Pertanto, il congelamento non ha un effetto inibente sulla crescita dei microrganismi testati, così come riportato nel lavoro di Lucchese (2019).

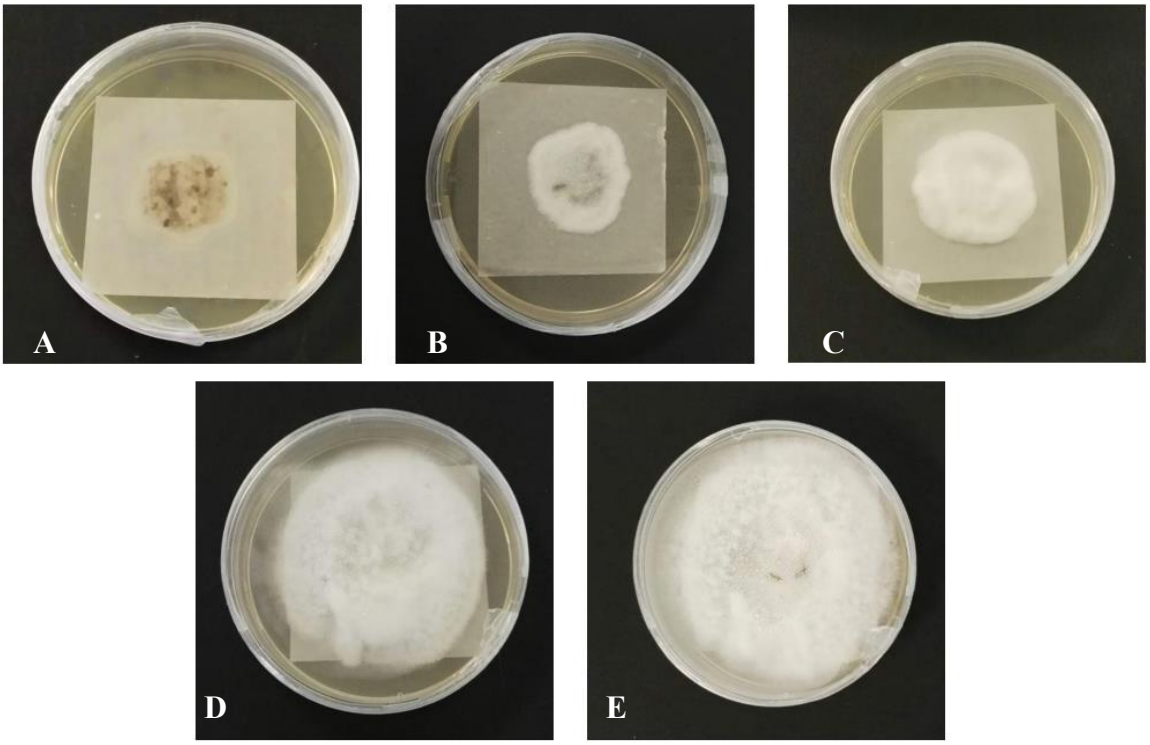

Figura 3.27: crescita dell'inoculo misto nel tempo in una piastra di controllo a seguito del solo congelamento e scongelamento. A: al tempo zero, B: dopo 24 ore di incubazione, C: dopo 4 giorni di incubazione, D: dopo 7 giorni di incubazione, E: dopo 11 giorni di incubazione.

Quanto osservato e discusso fin ora è confermato dalle curve di crescita riportate in Figura 3.28. Le curve di crescita sono relative alla sola crescita di *A. alternata,* all'interno dell'inoculo misto.

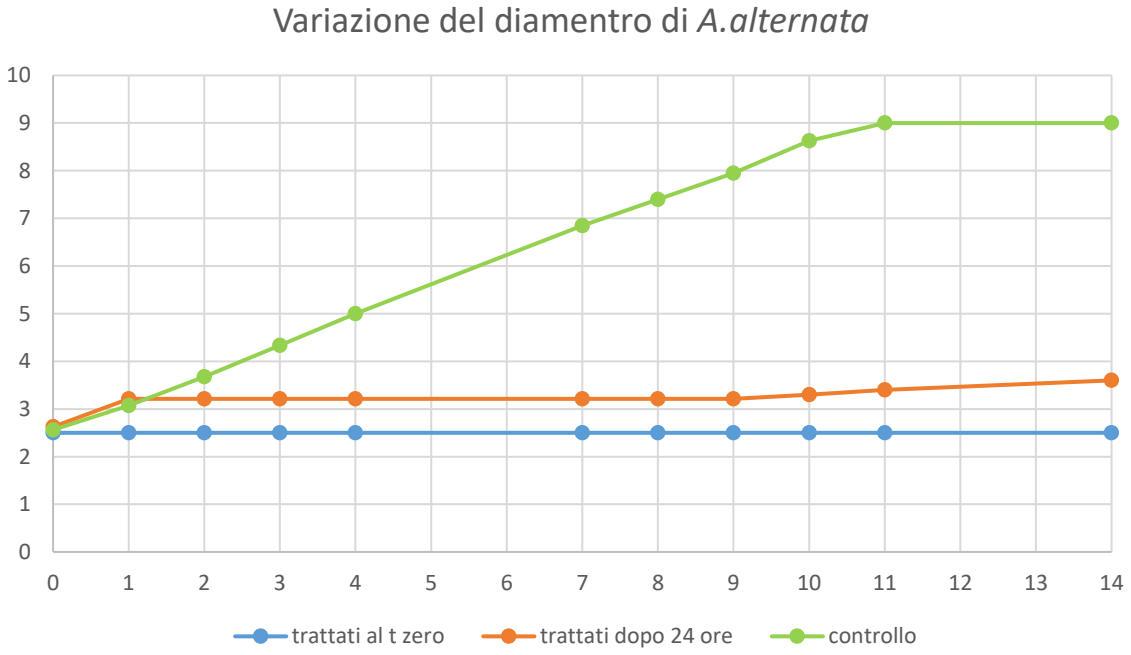

Figura 3.28: andamento del diametro di *A. alternata* all'interno dell'inoculo misto, a seguito dei diversi trattamenti subiti, post-congelamento.

Come si può osservare dall'andamento di queste curve, l'olio essenziale di timo al 0.75% v/v è in grado di inibire la crescita dei microrganismi, con maggiore efficacia quando è utilizzato subito a valle dello scongelamento. L'effetto inibitorio è ridotto quando l'olio viene applicato dopo 24 ore: in questo caso, l'inibizione permane per 10 giorni, anche se la velocità di crescita è inferiore a quella del controllo.

Per quanto riguarda i campioni che hanno subito il processo di liofilizzazione, a valle del periodo di osservazione (14 giorni), la crescita dei microrganismi che si osserva è riportata in Figura 3.29.

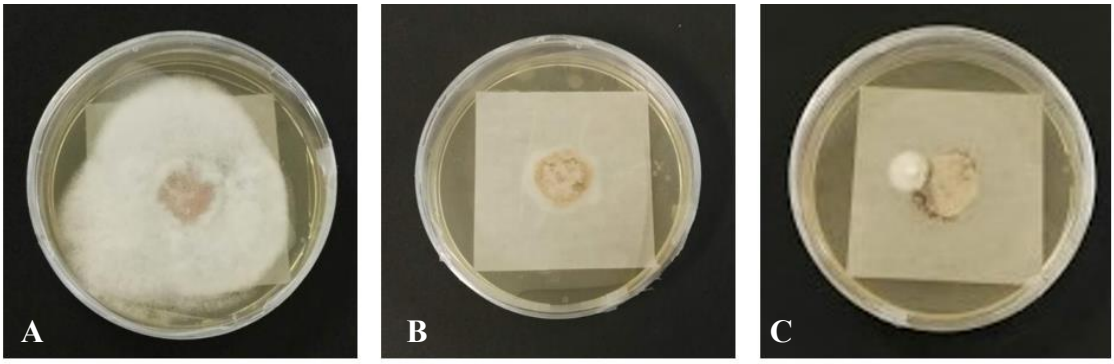

Figura 3.29: inoculo misto dopo 14 giorni di incubazione. A: piastra di controllo, B: piastra trattata con l'olio essenziale di timo al tempo zero, C: piastra trattata con l'olio di timo dopo 24 ore.

Si nota che, a valle della liofilizzazione, l'olio essenziale risulta essere efficace anche quando utilizzato su campioni che presentano una contaminazione mista. Infatti, i fogli trattati al tempo zero (Figura 3.29 B) non hanno mostrato crescita: non si è osservato l'aumento di diametro della colonia del fungo e le colonie del batterio e del lievito non hanno presentato una ripresa della crescita. I fogli liofilizzati e trattati con l'olio essenziale di timo dopo 24 ore di incubazione presentano un'inibizione della crescita di tutti e tre i microrganismi per 10 giorni. A partire dall'undicesimo giorno di incubazione, come si può osservare in Figura 3.30, su una delle tre repliche inizia a crescere una piccola colonia fungina che alla fine del periodo di osservazione si presenta con un diametro pari a 1.2 cm (Figura 3.29 C).

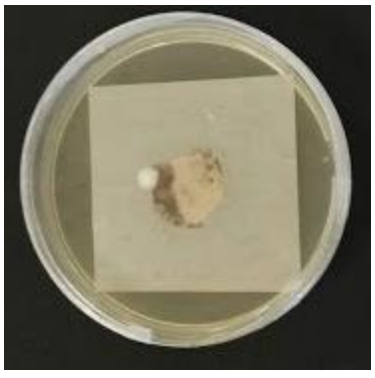

Figura 3.30: inoculo misto trattato dopo 24 ore con l'olio di timo, dopo 11 giorni di incubazione.

I microrganismi presenti sui fogli di carta che hanno subito solo il processo di liofilizzazione (Figura 3.31) presentano una fase di latenza della crescita di 24 ore. Dopo di che, a partire dalle 48 ore, si vede una cospicua crescita da parte del lievito che assume una colorazione rosa molto intensa. Dopo 7 giorni (Figura 3.31 D), si osserva la crescita del fungo filamentoso, il quale si sviluppa attorno al lievito, fino a raggiungere un diametro medio del micelio di 7.4 cm dopo 14 giorni (Figura 3.29 A). Il fatto che *A. alternaria* non sia cresciuta durante la prima settimana può essere dovuto al fatto che la sua crescita è inibita dal processo di liofilizzazione e influenzata dalla presenza del lievito.

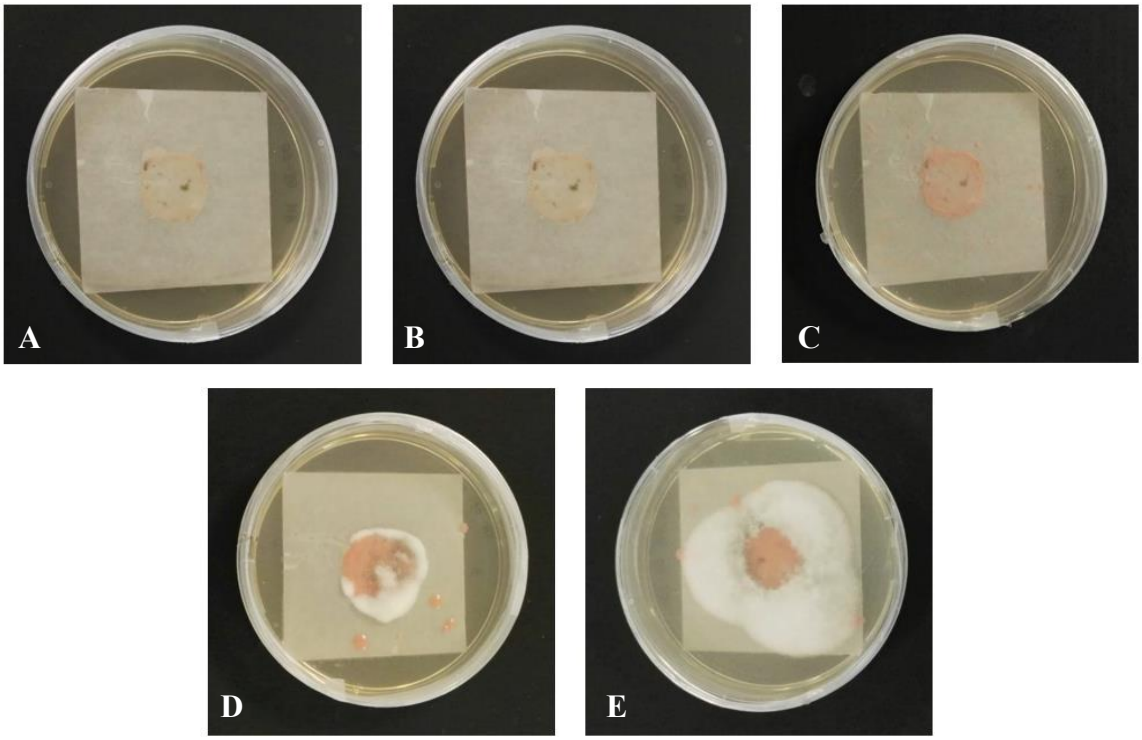

Figura 3.31: crescita dell'inoculo misto nel tempo in una piastra di controllo a seguito del processo di liofilizzazione. A: al tempo zero, B: dopo 24 ore di incubazione, C: dopo 2 giorni di incubazione, D: dopo 7 giorni di incubazione, E: dopo 11 giorni di incubazione.

Quanto osservato e discusso fin ora è confermato dalle curve di crescita, relative alla sola crescita di *A. alternata* presente all'interno dell'inoculo misto, riportate nel grafico di Figura 3.32.

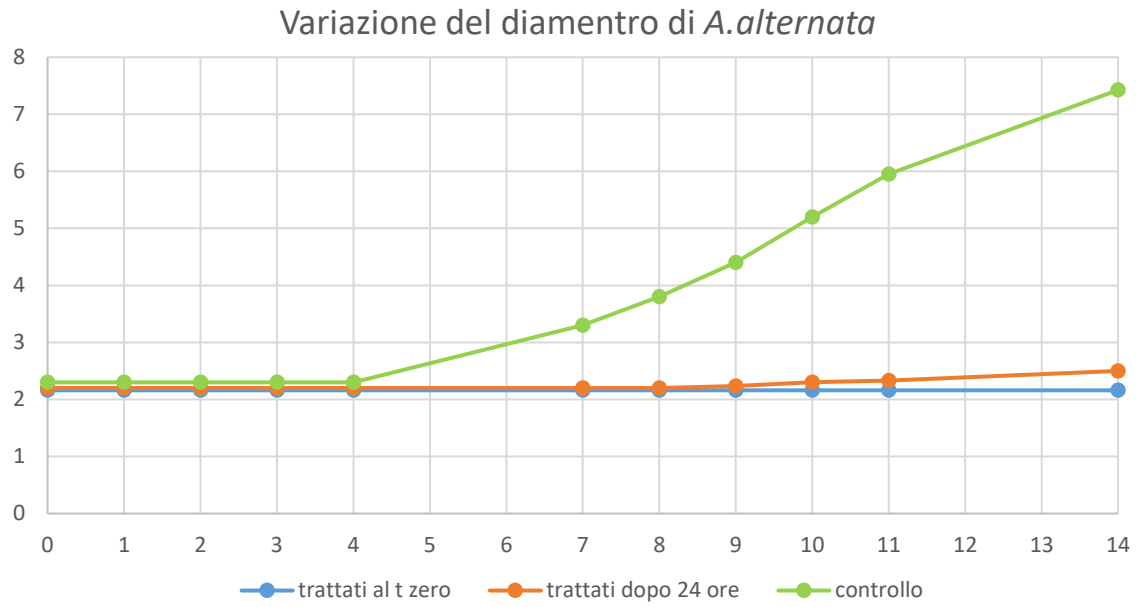

Figura 3.32: andamento del diametro di *A. alternata* all'interno dell'inoculo misto, a seguito dei diversi trattamenti subiti post-liofilizzazione.

Osservando l'andamento delle curve relative alle piastre trattate con l'olio essenziale, si può dedurre che l'olio di timo è in grado di inibire la crescita dei microrganismi anche quando sono presenti contemporaneamente. Questa efficacia è particolarmente evidente quando l'olio è utilizzato subito a valle del processo di liofilizzazione ed è leggermente ridotta quando l'olio viene applicato dopo 24 ore: in questo caso, l'inibizione non permane per tutta la durata dell'osservazione, anche se la velocità di crescita è inferiore a quella del controllo. Per quanto riguarda, invece, i microrganismi presenti nelle piastre di controllo si nota che la crescita di *A. alternata* avviene solo dopo 7 giorni di incubazione, durante i quali, però, il lievito ha già iniziato a crescere.

Sulla base dei risultati ottenuti, si può concludere che il trattamento con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v è in grado di inibire la crescita microbica a prescindere dal trattamento subito in precedenza dai microrganismi. Infatti, non si notano differenze tra l'effetto dell'olio essenziale usato sull'inoculo misto post-congelamento e post-liofilizzazione. Questa osservazione è valida sia nel caso in cui il trattamento con l'olio di timo avviene subito dopo il trattamento fisico, sia dopo 24 ore di incubazione. Per quanto riguarda, invece, i microrganismi utilizzati come controllo, si evidenziano delle differenze. I microrganismi che hanno subito il processo di liofilizzazione presentano una fase di latenza di 24 ore, dopo la quale si nota che il microrganismo più attivo è il lievito, seguito dal fungo. I microrganismi, invece, che hanno subito il solo congelamento, presentano una crescita attiva fin da subito e in particolare si nota una crescita simultanea del lievito e del fungo, dimostrando che come processo il congelamento è meno efficace della liofilizzazione. In entrambi i casi non è stato possibile verificare la crescita di *S. epidermidis* a causa del colore bianco delle colonie, difficilmente distinguibili dalla carta.

3.5 *Effetto dell'olio essenziale su un caso reale*

Come ultima prova si è trattato con l'olio essenziale di timo (0.75% v/v) un volume cartaceo che sulla copertina presenta un elevato numero di colonie microbiche.
Grazie alla tecnica del "replica-plating" i microrganismi presenti sul libro sono stati trasferiti all'interno di una capsula Petri contenente terreno solido (MEA). Dopo 72 ore di incubazione a 30°C, si sono individuate almeno quattro differenti tipi di colonie, morfologicamente distinte, come si può osservare in Figura 3.33.

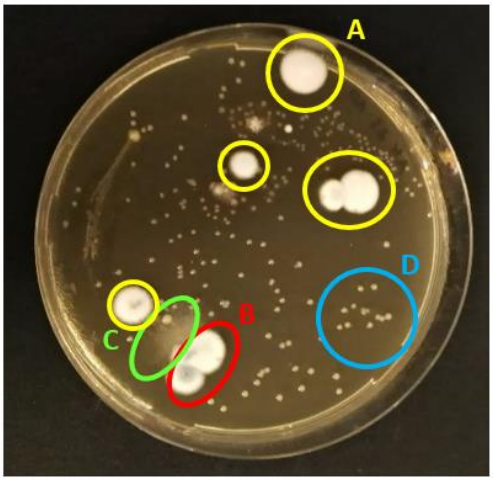

Figura 3.33: piastra contenente i microrganismi cresciuti dopo 72 ore di incubazione.

Dopo l'isolamento di ciascuno dei microrganismi si sono ottenute le piastre raffigurate in Figura 3.34, e, mediante osservazione al microscopio ottico (600x), si è confermata la presenza di quattro differenti microrganismi.

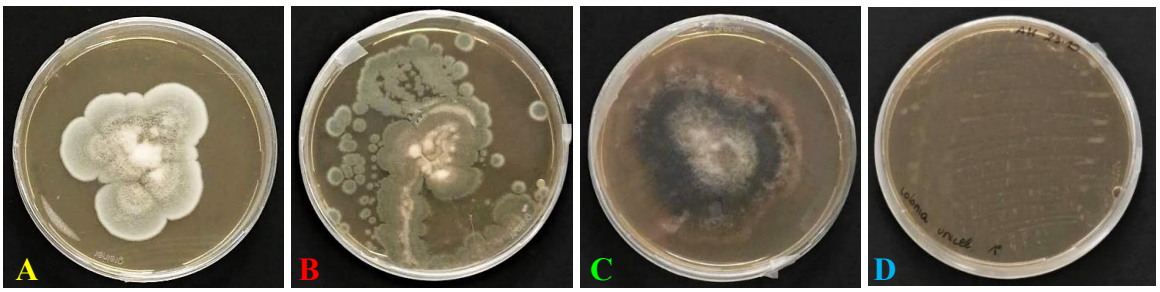

Figura 3.34: piastre contenente i microrganismi isolati, identificati come in Figura 3.33.

- Il microrganismo mostrato in Figura 3.34 A è un fungo filamentoso del genere *Aspergillus*, in quanto si osservano delle ife che terminano con teste conidiofore globose;
- il microrganismo mostrato in Figura 3.34 B è un fungo filamentoso del genere *Penicillium*, in quanto si osservano delle ife ramificate che all'estremità terminano in una sorta di pennello;
- il microrganismo mostrato in Figura 3.34 C presenta ife sottili non settate riconducibili ad un batterio filamentoso;

- il microrganismo mostrato in Figura 3.34 D è un microrganismo unicellulare di tipo batterico.

La piastra ottenuta con la tecnica del "replica-plating" (Figura 3.33) è stata sottoposta al trattamento che aveva dimostrato maggiore efficacia nelle prove di contaminazione controllata su carta (olio essenziale di timo 0.75%). Dopo 72 ore di incubazione alla temperatura di 30°C, si può affermare che l'olio è risultato efficace nell'inibizione della crescita dei microrganismi, come si può notare dal confronto tra la replica pre-trattamento (Figura 3.35 A) e post-trattamento (Figura 3.35B): il numero e il diametro delle colonie microbiche osservabili non presentano variazioni.

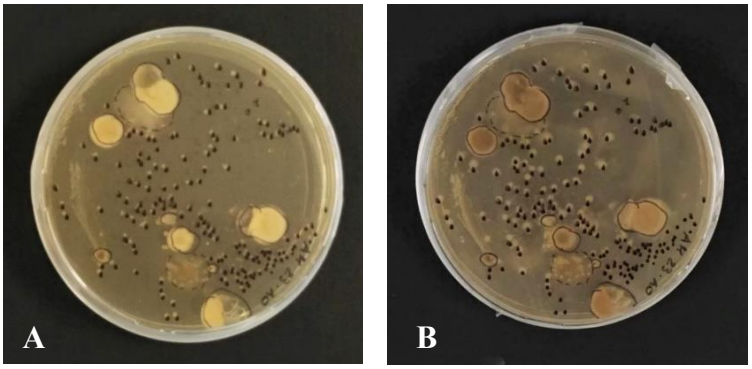

Figura 3.35: piastra ottenuta con la tecnica del "replica-plating", A: prima del trattamento con l'olio essenziale, B: dopo 72 ore dal trattamento con l'olio essenziale.

Verificata l'efficacia dell'olio essenziale di timo (0.75% v/v) sui microrganismi isolati, lo stesso trattamento è stato effettuato sul libro contaminato. Dopo 72 ore di incubazione, è possibile osservare che, anche in questo caso, l'olio di timo è in grado di rallentare o inibire la crescita microbica. In particolare, l'efficacia maggiore si ha quando l'olio è stato applicato tramite la doppia applicazione dei foglietti imbevuti: sembra, infatti, che la crescita dei microrganismi sia completamente inibita e non si notano differenze tra la zona in cui il foglietto è stato rimosso dopo 2 ore da quella in cui è stato rimosso dopo 24/72 ore (Figura 3.36 B).

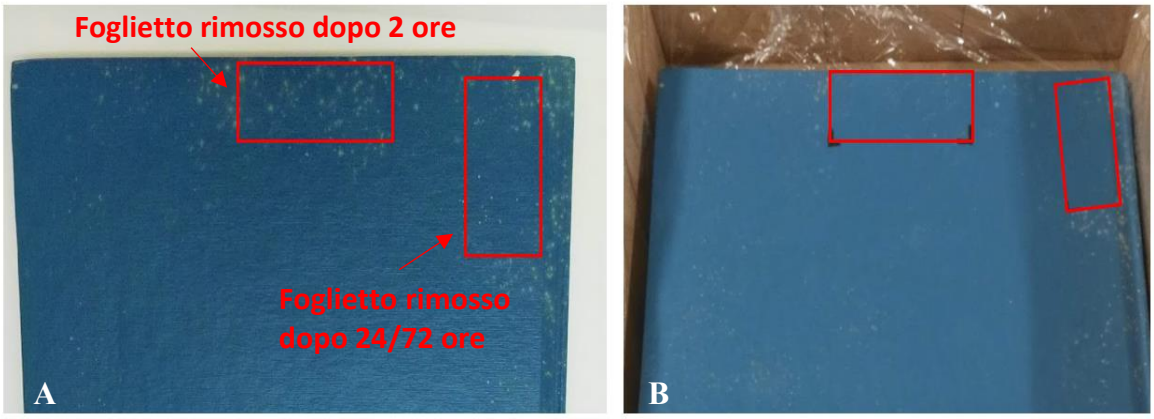

Figura 3.36: A: libro prima del trattamento con l'olio essenziale, B: libro dopo 72 ore dal trattamento tramite deposizione di fogli imbevuti nell'olio.

L’azione inibente dell’olio essenziale risulta essere meno efficace nella parte di copertina in cui è stato nebulizzato. Infatti, in questa zona i microrganismi hanno continuato a crescere, seppur più lentamente rispetto a quelli presenti nelle zone limitrofe non trattate (Figura 3.37 B).

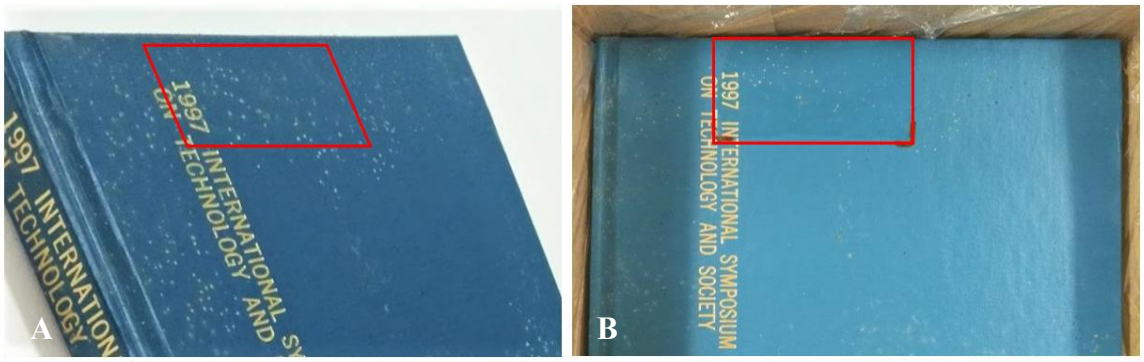

Figura 3.37: A: libro trattato con l’olio essenziale tramite nebulizzazione, B: libro dopo 24 ore dal trattamento.

Il maggior effetto dell’olio essenziale nelle zone in cui è stato applicato tramite i foglietti imbevuti può essere dovuto proprio alla presenza della carta. Si pensa infatti che essa impedisca in parte l’evaporazione dei componenti volatili dell’olio che in questo modo inibiscono maggiormente la crescita dei microrganismi con cui sono venuti direttamente a contatto. Nelle zone della copertina non trattate con l’olio essenziale si nota un aumento delle dimensioni delle colonie microbiche già presenti sulla copertina.

Questo risultato suggerisce che la componente volatile dell’olio essenziale ha un’importanza notevole sull’inibizione della crescita microbica, in quanto nella zona trattata tramite la nebulizzazione, in cui i componenti volatili sono evaporati più velocemente l’effetto inibente è risultato inferiore. Si dovrebbe quindi, in futuro, trovare un modo per valutare l’attività antimicrobica degli oli essenziali in fase vapore, a partire dai modelli messi a punto da Bueno (2015) e descritti nel suo lavoro, come per esempio l’utilizzo di scatole a tenuta stagna o di sistemi a bioluminescenza dell’ATP.

4 Conclusioni

Nel presente lavoro di Tesi si è studiato l'effetto dell'utilizzo degli oli essenziali come trattamento successivo alla liofilizzazione al fine di inibire o rallentare la crescita dei microrganismi responsabili del biodeterioramento della carta alluvionata. Gli oli essenziali testati sono stati l'olio essenziale di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e quello di origano spagna (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375) e i microrganismi contaminanti presi in esame sono stati *Alternaria alternata* ceppo BNR, *Staphylococcus epidermidis* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Inizialmente sono stati eseguiti dei test per verificare quale sia, tra i due oli essenziali scelti, quello con il maggior effetto inibente sulla crescita del batterio e dello lievito. Questi esperimenti sono stati effettuati seguendo il *broth dilution method*. Alla fine di queste sperimentazioni si è concluso che l'olio essenziale con maggiore effetto inibente è quello di timo rosso e la MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) trovata corrisponde alla concentrazione di 0.75% v/v. Con queste prove si è riusciti a dimostrare che:

- tra le concentrazioni testate degli oli essenziali, solo quelle più alte (0.75% v/v, 0.375% v/v e 0.188% v/v) hanno rallentato la crescita microbica, mentre a basse concentrazioni (minori di 0.047% v/v) gli oli essenziali non hanno influenzato la crescita dei microrganismi;
- gli oli essenziali testati hanno esplicato una maggiore attività inibitoria nei confronti di *R. mucilaginosa* piuttosto che di *S. epidermidis*;
- l'inibizione della crescita microbica da parte delle soluzioni di TEGO SML 20, utilizzato nella preparazione delle diluizioni degli oli essenziali, può essere esclusa.

Si sono svolte altre prove preliminari nelle quali si è studiato l'effetto inibitorio dell'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v quando viene nebulizzato, al tempo zero e dopo 24 ore, sui microrganismi unicellulari cresciuti su terreno solido agarizzato e su fogli di carta bianca moderna (6 x 6 cm). Le piastre trattate hanno mostrato un rallentamento della crescita microbica e questo effetto è stato maggiormente evidente:

- quando il trattamento è avvenuto al tempo zero, ossia subito dopo aver effettuato l'inoculo;
- sui microrganismi cresciuti su supporto cartaceo, in quanto il foglietto di carta è stato in grado di assorbire l'olio con maggiore facilità rispetto all'agar, garantendo così un prolungamento del suo tempo di contatto.

In seguito, è stato valutato l'effetto dell'olio essenziale di timo sui microrganismi cresciuti su materiale cartaceo allagato e trattato mediante liofilizzazione per rimuovere l'acqua. I campioni da sottoporre alle prove di liofilizzazione sono costituiti da blocchetti di carta (dimensione 6 x 6 cm, altezza 10 ± 3 mm), nei quali sono stati inseriti a metà spessore i fogli precedentemente contaminati. I campioni hanno subito, a seguito dell'allagamento, un aumento di peso pari all'87.91% rispetto al peso secco iniziale. L'acqua assorbita è stata quasi totalmente rimossa a valle dell'essiccamento primario, con un contenuto di umidità residua pari a 0.97%. La durata dell'essiccamento primario è stata di 35 ore ± 2 ore.

A valle della liofilizzazione i blocchetti di carta non hanno presentato segni di degradazione, nemmeno i fogli posti a diretto contatto con la piastra riscaldante; sono apparsi però più rigidi e voluminosi, probabilmente a seguito del contatto prolungato della carta con l'acqua. I risultati ottenuti hanno confermato la già nota efficacia, la non invasività e la rapidità del processo di liofilizzazione applicato al recupero di materiale cartaceo allagato.

Dopo il processo di liofilizzazione, si sono recuperati dai blocchetti i fogli contaminati e sono stati trattati con l'olio essenziale di timo alla concentrazione di 0.75% v/v al tempo zero e dopo 24 ore. Le prove condotte hanno dimostrato l'efficacia dell'olio di timo nel rallentare e inibire la crescita del lievito *R. mucilaginosa* e del batterio *S. epidermidis,* in particolar modo se utilizzato subito a valle della liofilizzazione, prima che i microrganismi riprendano a crescere. Paragonando questi risultati con quelli ottenuti durante le prove preliminari sui fogli contaminati non liofilizzati, si è notato che la crescita dei questi due microrganismi non è influenzata dal processo di liofilizzazione, ma solo dal trattamento con olio essenziale, in quanto i risultati ottenuti sono stati molto simili.

L'efficacia dell'olio di timo si è verificata anche su *A. alternata*: la crescita del fungo presente sui fogli trattati al tempo zero è stata completamente inibita e, su quelli trattati dopo 24 ore di incubazione, il fungo ha presentato una fase di latenza di una settimana, dopo la quale ha cominciato a crescere con una velocità inferiore rispetto al controllo. Queste osservazioni sono valide sia per *A. alternata* sporificata che per *A. alternata* non sporificata. Tuttavia, l'inibizione attenuta sul micelio vegetativo è maggiore rispetto a quella ottenuta sulle spore, notoriamente più resistenti.

Per verificare se in presenza di biomassa mista, situazione più simile alla realtà, il trattamento con l'olio essenziale di timo (0.75% v/v) sia efficace come sui singoli microrganismi si sono utilizzati dei campioni contaminati dai tre microrganismi contemporaneamente e si è confrontato l'effetto del trattamento sui microrganismi post-liofilizzazione con quello post-congelamento. Il trattamento con l'olio essenziale di timo è in grado di inibire la crescita microbica in presenza di contaminazione mista a prescindere dal trattamento subito in precedenza dai microrganismi. Dai risultati ottenuti, infatti, non si sono notate differenze tra l'effetto dell'olio essenziale usato sull'inoculo misto post-liofilizzazione e post-congelamento.

Infine, si è valutato l'effetto dell'olio essenziale di timo (0.75% v/v) su di un caso reale, ovvero un volume che presentava contaminazione microbica. Si è notato, anche in questo caso, che l'olio di timo è in grado di rallentare la crescita microbica, e in particolare l'efficacia maggiore si è ottenuta quando l'olio è stato applicato tramite dei foglietti di carta imbevuti. La presenza del foglio infatti impedisce in parte l'evaporazione dei componenti volatili dell'olio che in questo modo inibiscono maggiormente la crescita dei microrganismi con cui sono venuti direttamente a contatto.

5 Bibliografia

Ahmed M., Aissat S., Meslem A. and Djebli N., 2014, Preliminary investigation on antimycotic synergism of raw honey and essential oil of thyme (Thymus vulgaris L.), *Medicinal & Aromatic Plants,* **3**.

Allsopp D., Seal K. J., Gaylarde C. C., 2004. Introduction to Biodeterioration, second ed. Cambridge University Pres: Cambridge.

Arendrup M. C., Guinea J., Cuenca-Estrella M., Meletiadis J., Mouton J. W., Lagrou K., Howard S. J., 2015, EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3, Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming mould, 1-23.

Bellardi M. G., 2018, Gli oli essenziali e gli idrolati. Un mondo meraviglioso da scoprire e valorizzare, Atti del convegno "Gli oli essenziali: una nuova frontiera nella disinfezione e conservazione di opere su carta", Roma, 4 maggio 2018.

Bicchieri M., Monti M., Livi P., 2006, La liofilizzazione quale intervento di recupero di volume danneggiati da catastrofi naturali. *Atti del convegno dell'Associazione Italiana di Archeometria*, Pisa, 1-3 febbraio 2006, pp 671-678.

Bueno J, 2005, Models of evaluation of antimicrobial activity of essential oils in vapour phase: a promising use in healthcare decontamination, *Natural Volatiles & Essential Oils,* **2**, 16-29.

Carlsen S., 1999, Effects of freeze-drying on paper. *Proceedings of 9th International Congress of IADA*, Copenhagen, 15-21 August, pp 115-120.

Crespi E, Capolongo A., Fissore D., Barresi A. A., 2008, Experimental investigation of the recovery of soaked paper using evaporative freeze drying, *Drying Technology*, **26**, 349–356.

Fissore D., Mussini P., Sassi L., Barresi A. A., 2017, La liofilizzazione: una tecnica efficace per il recupero di materiale archivistico a seguito di allagamento, *Archivi, XII/2*, 28-46.

Florian M. L., 1990, The effects of freezing and freeze-drying on natural history specimens, *Collection Forum* **6**, 45-52.

Florian, M. E., 2002. Fungal facts - Solving fungal problems in heritage collections. *Archetype Publications Ltd*, London.

Gallo F., 1961, Biological agents which damage paper materials in libraries and archives. *Studies in conservation* **6**, 55-61.

Gallo, F., Pasquariello, G., Rocchetti, F., 1998. Biological investigation on sizings for permanent papers. *Restaurator* **19**, 61-84.

Hudaib M., Speroni E., A. M., V., 2002, GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29**, 691-700

Inouye S., Tsuruoka T., Watanabe M., Takeo K., Akao M., Nishiyama Y., Yamaguchi H., 2000, Inhibitory effect of essential oils on apical growth of Aspergillus fumigatus by vapour contact., *Mycoses,* **43**, 17–23.

Janssen A. M., Scheffer J. J. C., Baerheim Svendsen A., 1987, Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the Test Methods, *Planta Medica*, **53**, 395-398.

Kalemba D., Kunicka A., 2003, Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils, *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 813-829.

Kalodera Z., Pepeljnak S., Blazevic N., Petrak T., 1997, Chemical composition and antimicrobical activity of *Tanacetum parthenium* essential oil, *Pharmazie*, **52**, 885-892.

Karbowska-Berent J., Gorny R. L., Strzelczyk A. B., Wlazlo A., 2011, Airborne and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives. *Building and Environment* **46**, 1872-1879.

Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N. J., 1989, Antibacterial and antifungal properties of essential oil components, *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 119-128.

Lucchese M., 2019, Effetto della liofilizzazione sul biodeterioramento della carta alluvionata. Tesi di Laurea. Politecnico di Torino, Torino.

Mussini P., Sassi L., 2016, Piano di conoscenza per la sicurezza di archivi e biblioteche. *Soprintendenza archivistica e bibliografica della Lombardia*, 60-68.

Pagano D., 2005, Restauro e conservazione delle opere su carta, Materiali e tecniche. Tesi di Dottorato. Università degli Studi di Napoli Federico II.

Pinzari F., Montanari M., Michaelsen A., Pinar G., 2010, Analytical protocols for the assessment of biological damage in historical documents. *Coalition* **19**, 6-13.

Pittino H., 2015, La liofilizzazione come metodo per il salvataggio di beni cartacei. *Archeomatica*, 32-34.

Rakotonirainy M. S., Juchauld F., Gillet M., Othman-Choulak M., Lavedrine B., 2005, Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration & Biodegradation,* **55**, 141-147.

Rakotonirainy M. S., Juchauld F., Gillet M., Othman-Choulak M., Lavedrine B., 2007, The effect of linalool vapour on silver-gelatine photographs and bookbinding leathers. *Restaurator*, **28**, 95-111.

Rodriguez-Tudela J. L., Arendrup M. C., Barchiesi F., Bille J., Chryssanthou E., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Denning D. W., Donnelly J. P., Dromer F., Fegeler W., Lass-Flörl C., Moore C., Richardson M., Sandven P., Velegraki A., Verweij P., 2008, EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14**, 398-405.

Saglam C., Özcan M. M., Boyraz N., 2009, Fungal inhibition by some spice essential oils, *Journal of Essential Oil Bearing Plants***, 12**, 742 – 750.

Salehi B., Mishra A., Shukla I., Sharifi M., Contreras M. d. M., Carretero A. S., Fathi H., Nasrabadi N. N., Kobarfard F., Sharifi J., 2018, Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses, *Phytotherapy Research,* **32**, 1688–1706.

Sequeira S., Cabrita E. J., Macedo M. F., 2012, Antifungals on paper conservation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* **74**, 67-86.

Soylu E. M., Kose F., 2015, Antifungal Activities of Essential Oils Against Citrus Black Rot Disease Agent *Alternaria alternate*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **18**, 894 – 903.

Troiano F., Barbabietola N., Colaizzi P., Montanari M., Pinzari F., 2012, La liofilizzazione quale intervento di recupero di volumi alluvionati ed attaccati da microfunghi. *Atti del Conveno "Colore e conservazione: materiali e metodi nel restauro delle opere policrome mobile"Parma*, 16-17 novembre.

Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli M. A., Cuffini A. M., Alonzo V., Carlone N. A., 2007, Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods, *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 1544-1550

Zyska B., 1997, Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **40**, 43-51.

Ringraziamenti

Questo lavoro di tesi rappresenta la conclusione di un percorso di studi durato cinque anni, durante i quali ho avuto la possibilità di arricchirmi culturalmente e di fare nuove fantastiche esperienze e amicizie.

Ringrazio i miei relatori, Davide Fissore e Francesca Bosco, per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto di tesi, per la loro competenza, pazienza e disponibilità. Ringrazio Chiara Mollea che con la sua disponibilità e la sua gentilezza mi ha aiutato nella pratica di laboratorio.

Un pensiero speciale va alla mia famiglia, a mamma, papà, Arianna e ai nonni, per il loro aiuto e sostegno e per non avermi mai fatto mancare affetto e conforto.

Voglio ringraziare le mie amiche Nicole e Marcella e i miei compagni di corso Agnese, Lorenzo, Virginia, Chiara, Eleonora, Federica e Silvia, che hanno allietato le mie giornate anche nei momenti di difficoltà.

Ultimo ma non per importanza ringrazio Marco, perché mi è sempre stato vicino e mi ha sopportato e supportato a scegliere il meglio per me.