

# 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

## **Biodegradazione della gomma naturale: messa a punto e monitoraggio di un microcosmo con suolo**



### **Relatori**

prof. Bosco Francesca  
prof. Malucelli Giulio

### **Candidato**

Drago Francesco

Dicembre 2017



# Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>3</b>
1.1 Struttura chimica della gomma naturale	3
1.2 Fattori degradativi abiotici	5
1.3 Caratteristiche della biodegradazione	7
1.3.1 Microrganismi ed enzimi coinvolti nella biodegradazione	7
1.3.2 Metodi di valutazione della biodegradazione	9
<b>2. Scopo della Tesi</b>	<b>10</b>
<b>3. Materiali e Metodi</b>	<b>11</b>
3.1 Allestimento microcosmi	11
3.2 Analisi microbiologiche sul suolo	13
3.2.1 Metodo delle diluizioni successive – Inoculo di superficie	13
3.2.2 Metodo delle diluizioni successive – Inoculo per inclusione	13
3.2.3 Metodo delle capsule di suolo	14
3.3 Analisi respirometriche	14
3.4 Analisi sul suolo	15
3.5 Analisi sui campioni di NR	15
3.5.1 Lavaggio campioni di NR	15
3.5.2 Determinazione peso secco	16
3.5.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	16
<b>4. Risultati e Discussione</b>	<b>17</b>
4.1 Analisi microbiologiche sul suolo	17
4.1.1 Metodo delle diluizioni successive – Suolo non incubato	17
4.1.2 Metodo delle diluizioni successive – Suolo incubato	18
4.2 Analisi respirometriche	21
4.2.1 Ripristino quantità iniziali di suolo	22
4.2.2 Movimentazione del suolo	22
4.3 Analisi dei campioni di NR	23
4.3.1 Perdita di peso secco dei campioni di NR	23
4.3.2 Analisi morfologiche al SEM	25
4.4 Diversificazione microcosmi della linea del controllo biotico	29

4.4.1 Analisi respirometriche	29
4.4.2 Perdita di peso secco dei campioni di NR	31
4.5 Confronto con precedente sperimentazione	31
<b>5. Ipotesi di Applicazione</b>	<b>32</b>
<b>6. Conclusioni</b>	<b>34</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>35</b>
<b>8. Appendice</b>	<b>37</b>

# 1.Introduzione

In una economia di produzione di massa sempre più in crescita, il problema della gestione dei rifiuti è diventato una questione di vitale importanza, attirando l'attenzione non solo delle associazioni ambientaliste ma anche delle istituzioni nazionali ed internazionali.

Uno dei casi più problematici da gestire è certamente quello della gomma naturale (NR), prodotto largamente diffuso in molti settori produttivi: pneumatici, guarnizioni, isolamenti, adesivi, componentistica anti-vibrazioni, settore alimentare. Ad esempio, nel solo settore dei pneumatici, il volume di NR richiesta è elevatissimo (la sua frazione nella miscela degli pneumatici di ultima generazione è di circa il 10%) e l'impatto sullo smaltimento lo è altrettanto: ogni anno circa 1 miliardo di pneumatici raggiunge la fine del proprio ciclo vita (300 milioni negli USA e 260 milioni nella Unione Europea)<sup>1</sup>.

## 1.1 Struttura chimica della gomma naturale

La gomma naturale è un materiale di origine vegetale estratto principalmente da *Hevea brasiliensis*, pianta subtropicale che cresce nella regione della foresta Amazzonica. La sua composizione chimica massica è: 25-35% poliisoprene, 1-1,8% proteine, 1-2% carboidrati, 0,4-1,1% lipidi apolari, 0,5-0,6% lipidi polari, 0,4-0,6 composti inorganici, 50-70% acqua<sup>2</sup>. Considerando solamente la frazione secca si nota come il poliisoprene sia circa il 90% del peso. La gomma così estratta ha però scarsissime proprietà meccaniche: è troppo viscosa e tende a sciogliersi a temperature inferiori ai 100°C; questo impedisce qualsiasi impiego tecnologico. Questi svantaggi sono dovuti principalmente alla struttura del poliisoprene (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) e dalla sua disposizione nello spazio (Fig. 1.1).

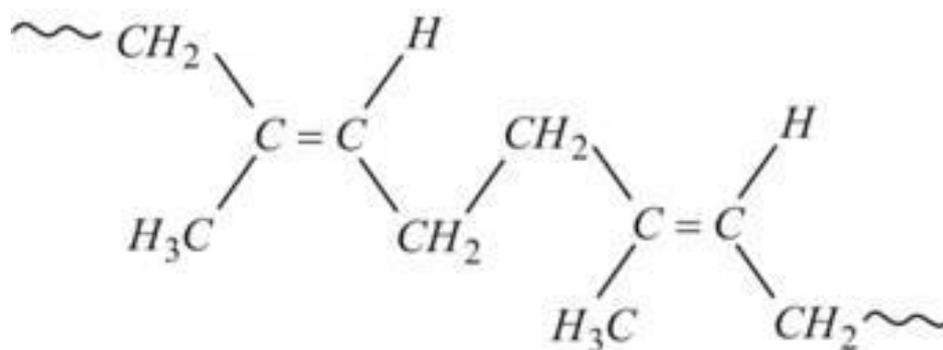


Figura 1.1 Struttura del poliisoprene

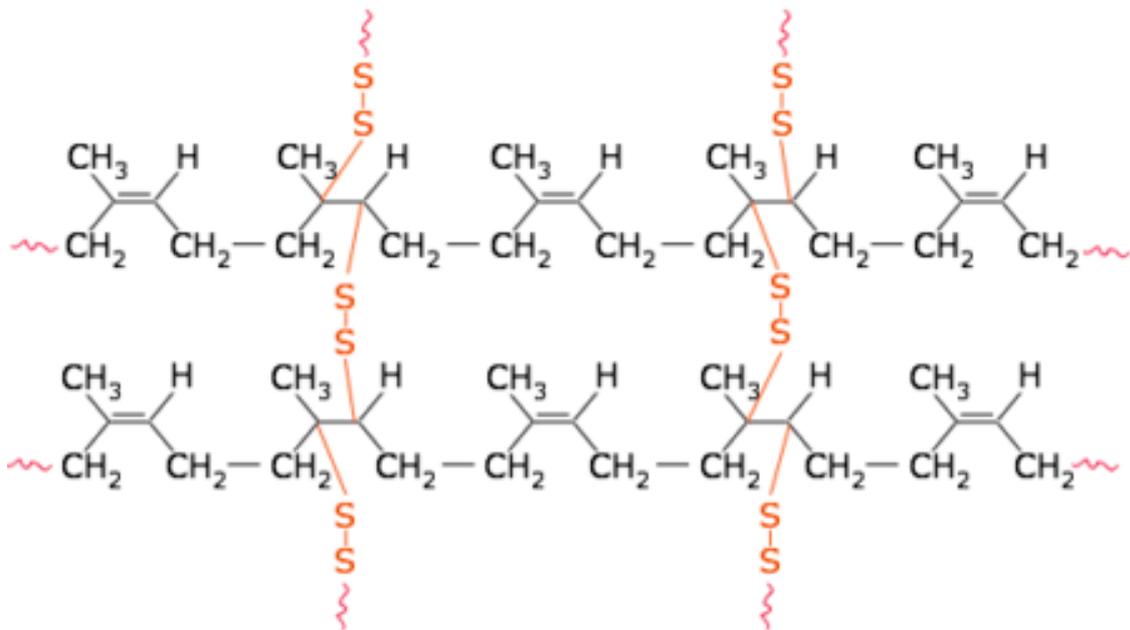
Fra gli atomi di C della stessa catena vi sono forti legami che conferiscono elasticità a tutta la struttura ma, fra le molecole, sussistono solamente legami deboli che non sono in grado di fornire rigidità e mobilità termica.

<sup>1</sup> S.Singh, W.Nimmo, B.M.Gibbs, P.T.Williams, December 2009, *Waste tyre rubber as a secondary fuel for power plants*, Science Direct, Volume 88, Issue 12, Pages 2473-2480. [doi.org/10.1016/j.fuel.2009.02.026]

<sup>2</sup> Aamer Ali Shah, Fariha Hasan, Ziaullah Shah, Nida Kanwal, Samia Zeb, 2013, *Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review*, International Biodeterioration & Biodegradation 83 (2013) 145e157. [https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.004]

A causa di queste sue caratteristiche la NR permette solamente due applicazioni: come *additivo* in miscele polimeriche (per aumentarne l'elasticità) o come elastomero se sottoposta a *vulcanizzazione*.

La vulcanizzazione è una reazione chimica in cui lo zolfo, sotto forma di  $S_2Cl_2$ , viene aggiunto alla NR sotto pressione e a temperature nel range 140-180 °C<sup>3</sup>: gli atomi di S addizionati creano legami tioeterei R-S-R tra i gruppi -CH<sub>2</sub>- adiacenti al doppio legame e legati ai gruppi metilici (Fig. 1.2).



**Figura 1.2** Struttura del poliisoprene vulcanizzato

La vulcanizzazione dona alla gomma maggiore resistenza alla trazione lungo la direzione dei legami tioeterei e un innalzamento del range di temperatura operativo, dato che quest'ultimi ostacolano l'agitazione termica delle molecole.

Di contro, l'ottenimento di tutti questi vantaggi porta la gomma ad essere difficilmente degradabile, generando un grave problema riguardo lo smaltimento una volta divenuta un rifiuto, poiché i tempi naturali per la sua degradazione sono nell'ordine delle centinaia di anni. Detto ciò, è evidente che l'approccio della discarica a questa tipologia di rifiuto è del tutto inadeguato e insostenibile dal punto di vista ambientale: ad oggi l'unica via di smaltimento alternativa alla discarica è la *termovalorizzazione*.

In passato, condotta negli altiforni dei cementifici che, a regime, raggiungono i 1000-1100 °C, questa pratica aveva il pregio di abbassare il costo energetico del processo di produzione del cemento e allo stesso tempo smaltire rifiuti; dal punto di vista ambientale però ha determinato un inquinamento su larga scala dovuto all'emissione al camino di centinaia di composti benzenici, NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub>. Tutti i composti citati sono prodotti che si generano a causa di una cattiva combustione e della presenza di numerosi metalli pesanti introdotti in fase di vulcanizzazione che, alle alte temperature delle camere di combustione, si trasformano in catalizzatori (ad esempio ZnO viene addizionato per il fissaggio dello zolfo per evitare che passi in fase gassosa sotto forma di H<sub>2</sub>S)<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Nayanashree.G, September 2013, *Natural rubber degradation by Aspergillus niger and Penicillium sp*, International Journal of Recent Scientific Research, Vol. 4, Issue, 9, pp.1337- 1341.

<b>Materiale</b>	<b>Applicazione</b>	<b>Impatto ambientale</b>
Gomma Naturale	30-40 % di tutta la gomma utilizzata	Deforestazione
Gomma Sintetica	60-70 % di tutta la gomma utilizzata	Esaurimento risorse petrolifere
Ossido di Zn	Resistenza alle radiazioni UV Stabilità della vulcanizzazione	Inibisce la fotodegradazione
Zolfo	Vulcanizzazione	Produzione SO <sub>x</sub> durante la combustione

*Tabella 1.1 Principali composti degli elastomeri e relativi applicazioni e impatti ambientali <sup>4</sup>*

## 1.2 Fattori degradativi abiotici

Esistono fattori degradativi abiotici che possono indebolire la struttura della NR compromettendone l'integrità ma offrendo possibili soluzioni di smaltimento. Questi fattori abiotici sono essenzialmente quattro<sup>5</sup>:

- **Degradazione meccanica:** si verifica a causa di sforzi meccanici (compressione, torsione, taglio) applicati durante l'impiego, il trasporto o lo smaltimento.
- **Fotodegradazione:** l'energia trasportata dai fotoni può indurre fenomeni ossidativi in grado di compromettere l'integrità strutturale delle molecole polimeriche.
- **Degradazione termica:** si ottiene una volta oltrepassata la temperatura di fusione (T<sub>f</sub>); nel caso di macromolecole che presentino una temperatura di transizione (T<sub>g</sub>) è noto che porre il materiale a temperature superiore alla T<sub>g</sub> favorisca la degradazione poiché viene incentivata la mobilità strutturale. Perciò è ovvio che una corretta progettazione nell'uso di additivi per modificare T<sub>g</sub> e T<sub>f</sub> in un polimero abbiano anche una ricaduta sulla possibilità di una sua degradazione.
- **Degradazione chimica:** le macromolecole possono subire l'attacco chimico da parte di sostanze inorganiche altamente reattive: una è l'acqua (e in questo caso si usa il termine *idrolisi*) ma la principale è certamente l'ossigeno, che con la capacità di generare radicali liberi è in grado di interagire con i legami covalenti C-C, C-H e C-O modificando così irreversibilmente la struttura<sup>6</sup>.

Considerando che la degradazione meccanica mostra efficienze quasi nulle e che quelle termica e chimica presentano problemi legati all'inquinamento, la fotodegradazione risulta

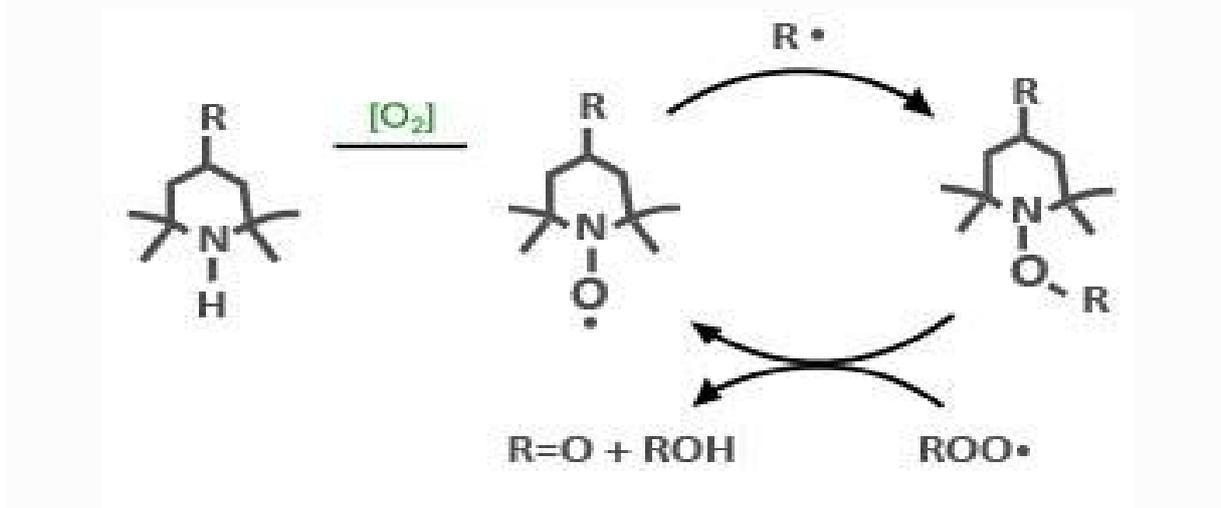
<sup>4</sup> A. Ali Shah et al, 2013, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 145-157.

<sup>5</sup> Nathalie Lucas, Christophe Bienaime, Christian Belloy, Michèle Queneudec, Françoise Silvestre, José-Edmundo Nava-Saucedo, September 2008, *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques*, Chemosphere Volume 73, Issue 4, September 2008, Pages 429-442. [doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064]

<sup>6</sup> Briassoulis D., 2005, *The effects of tensile stress and the agrochemicals Vapam on the ageing of low density polyethylene (LDPE) agricultural film*. Part I. Mechanical behavior, *Polymer Degradation and Stability*, 88(3), 489-503.

essere il migliore fenomeno degradativo abiotico. Inoltre è sicuramente la più efficace sugli elastomeri, poiché a causa della loro struttura chimica (presenza di cromofori, gruppi funzionali sensibili, legami multipli) assorbono le radiazioni UV<sup>5</sup>.

Tuttavia, questa via degradativa non è praticabile per attuare lo smaltimento dei rifiuti di NR poiché in fase di produzione, per evitare che una prolungata esposizione alla luce comprometta l'integrità del manufatto, viene utilizzato un largo spettro di additivi classificabile in due categorie: *UVA* (*Ultraviolet Light Absorbers*) e *HALS* (*Hindered Amine Light Stabilizers*). Gli *UVA* proteggono il materiale assorbendo direttamente le radiazioni UV dissipandole poi sotto forma di energia termica. Nota la legge di Lambert-Beer è chiaro come questa tipologia di additivi non sia adatta a proteggere quei materiali che presentano spessori fini o grandi superfici. Per questa tipologia di materiali trovano impiego gli *HALS*: invece di assorbire direttamente le radiazioni UV reagiscono con il polimero inibendone la degradazione, avendo in più il vantaggio di essere ciclicamente riutilizzati e non consumati durante il processo (Fig. 1.3). Talvolta viene usata una miscela di entrambe le tipologie di additivi per ottenere una sinergia utile a combattere anche altre problematiche tipiche degli elastomeri, come la volatilità di alcuni additivi o la migrazione di essi dal materiale alle sostanze in contatto con lo stesso.



**Figura 1.3** Schema di reazione degli HALS

### 1.3 Caratteristiche della biodegradazione

Viste le problematiche legate all'impiego dei metodi abiotici per la degradazione della NR è necessario spostare l'attenzione su un'altra via di smaltimento e una probabile soluzione è offerta dalla **biodegradazione**: un complesso insieme di fenomeni biologici che portano alla degradazione di materia organica fino all'ottenimento di semplici composti inorganici come acqua, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub><sup>5</sup>.

La biodegradazione è composta da numerosi passaggi<sup>7</sup>:

- **Biodeterioramento** (*biodeterioration*): l'azione combinata di microrganismi e fattori abiotici porta la rottura delle macromolecole organiche<sup>8</sup>.
- **Depolimerizzazione** (*depolymerisation*): i microrganismi producono enzimi in grado di scindere le macromolecole in molecole a minor peso molecolare.
- **Assimilazione** (*assimilation*): alcune molecole prodotte nel precedente passaggio sono riconosciute dai microrganismi ed entrano nel citoplasma per essere utilizzate nelle vie metaboliche di produzione di energia e di metaboliti primari e/o secondari.
- **Mineralizzazione** (*mineralisation*): in concomitanza con l'assimilazione i microrganismi secernono nell'ambiente esterno molecole semplici come CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, acqua, sali inorganici.

#### 1.3.1 Microrganismi ed enzimi coinvolti nella biodegradazione

Nel corso degli anni, la ricerca ha testimoniato come il suolo sia una fonte ricca sia di batteri che di funghi in grado di biodegradare la NR e utilizzarla come fonte di carbonio<sup>9</sup>.

Fra i batteri possiamo distinguere due categorie: quelli che per crescere devono essere a contatto diretto con la NR, poiché la sfruttano come superficie di adesione, e quelli che invece non necessitano di crescere sulla NR dato che sono in grado di produrre enzimi idrolitici extracellulari. Dalle prove sperimentali si è visto come la prima tipologia sia la più efficace nel compiere la biodegradazione<sup>10</sup>.

I generi che appartengono alla prima categoria sono principalmente: *Nocardia*, *Mycobacterium* e *Corynebacterium*. I generi invece più diffusi appartenenti alla seconda tipologia sono *Streptomyces* e *Actinomyces*.

I funghi, essendo organismi eterotrofi, non hanno la possibilità di sintetizzare le sostanze nutritive di cui necessitano ma sono costretti ad assumerle dall'ambiente circostante mediante la degradazione di molecole organiche complesse. Questo aspetto, unito al fatto che sono

---

<sup>7</sup> Jean Pelmont, December 1995, *Enzymes: Catalyseurs du monde vivant* (2° ed.), EDP Sciences.

<sup>8</sup> Eggins, H.O.W., Oxley, T.A., 2001. *Biodeterioration and biodegradation*. Int. Biodeter. Biodegr. 48, 12–15.

<sup>9</sup> Imai, S., Ichikawa, K., Muramatsu, Y., Kasai, D., Masai, E., Fukuda, M., 2011, *Isolation and characterization of Streptomyces, Actinoplanes, and Methylibium strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(cis-1,4-isoprene)*, Enzyme and Microbiol Technology, 49, 526e531.

<sup>10</sup> Dieter Jendrossek, Gianpaolo Tomasi, Reiner M. Kroppenstedt, February 1997, *Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes?*, FEMS Microbiology Letters, 150, p. 179-188.

molto diffusi nel suolo, li rende molto interessanti riguardo alla biodegradazione della NR: sono loro infatti i principali responsabili della mineralizzazione del carbonio organico utile al ciclo vitale di tutti i vegetali. Per ricavare le molecole nutritive, i funghi generalmente producono enzimi extracellulari in grado di degradare il substrato complesso in molecole a minor peso molecolare e, per questo, maggiormente biodisponibili.

I generi *Penicillium* e *Aspergillus* sono quelli che hanno mostrato i migliori risultati sperimentali<sup>4</sup>.

Gli enzimi extracellulari sono sintetizzati dai funghi a seguito di una carenza di fonti di azoto e carbonio nel suolo<sup>11</sup>.

I risultati sperimentali indicano che l'azione enzimatica favorisce la biodegradazione poiché provoca la rottura del legame C=C del monomero del poliisoprene<sup>11</sup>.

La tipologia di enzima in grado di effettuare questa reazione è la medesima di quelli che i microrganismi, prevalentemente funghi, secernono per la degradazione della lignina, una macromolecola di origine naturale.

Le tipologie di enzimi che agiscono durante la biodegradazione sono due: idrolitici nella fase di biodeterioramento e ossidoreduttasici in quella di depolimerizzazione<sup>12</sup>.

Le ossidoreduttasi, che agiscono tramite reazione redox (trasferimento di elettroni da specie riducente a specie ossidante), hanno il pregio di essere aspecifiche: possono degradare una grande varietà di substrati organici xenobiotici<sup>13</sup>.

Al gruppo delle ossidoreduttasi appartengono numerosi sottogruppi a seconda della natura chimica del donatore e dell'accettore degli elettroni.

Gli enzimi del gruppo delle ossidoreduttasi più comunemente diffusi nel suolo e in grado di reagire con il poliisoprene sono *laccasi*, *manganese perossidasi* (MnP) e *lignino perossidasi* (LiP).

Le **laccasi** appartengono alla famiglia delle glicoproteine a bassa specificità: la reazione avviene per trasporto di elettroni che nel passaggio finale provocano la riduzione di ossigeno ad acqua.

È stato dimostrato sperimentalmente che l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), tipico substrato della laccasi, può agire da mediatore radicalico incentivando l'ossidazione di substrati teoricamente non degradabili<sup>14</sup>, ad esempio proprio il poliisoprene.

Le laccasi sono sintetizzate dai funghi ligninolitici, da alcuni batteri e in misura molto inferiore anche da alcune specie di insetti che vivono nel sottosuolo<sup>15</sup>.

Le **LiP** sono enzimi con cofattore il gruppo eme che catalizza la scissione ossidativa dei legami C-C e C-O-C in molte molecole chimicamente simili alla lignina.

L'enzima riduce il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ad acqua liberando due elettroni che vengono consumati nell'ossidazione del substrato.<sup>16</sup>

---

<sup>11</sup> Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A, 1995, *Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants in wood decay*, Journal of Biotechnology, 41, 1-7.

<sup>12</sup> Alexander Fainleib, 2013, *Degradation of Non-vulcanized Natural Rubber – Renewable Resource for Fine Chemicals Used in Polymer Synthesis*, Polimeros, vol. 23, n. 4, p. 441-450. [http://dx.doi.org/10.4322/polimeros.2013.070]

<sup>13</sup> Raffaella Morelli, Antonella Leone, Anna Alfani, 2015, *Degradazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in suoli contaminati*, Università degli Studi di Salerno. [http://hdl.handle.net/10556/1758]

<sup>14</sup> Li K.C., Xu F., Eriksson K.E.L, 1999, *Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of nonphenolic lignin model compound*, Applied and Environmental Microbiology, 65: 2654-2660.

<sup>15</sup> Miessner M., Crescenzi O., Napoletano A., Porta G., Andersen S.O., Peter M.G., 1991, *Biphenyl-tetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinol with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization*, Helvetica Chimica Acta, 74: 1205-1212.

Anche le **MnP** sono perossidasi che necessitano del perossido di idrogeno per i loro meccanismi reattivi. Sebbene le MnP abbiano un ciclo di reazione molto simile alle LiP tendono però a reagire maggiormente con i composti fenolici, sfruttando la coppia redox Mn(II)/Mn(III) come coenzima. È ormai ampiamente dimostrato<sup>17</sup> che la MnP sono in grado di ossidare composti non fenolici, anche se con minore efficienza della LiP, purché posseggano un potenziale redox sufficientemente alto.

### 1.3.2 Metodi di valutazione della biodegradazione

La valutazione della biodegradazione può essere effettuata con metodi differenti:<sup>4</sup>

- **Colorazione di Schiff:** la presenza degli oligomeri aldeidici, tipicamente prodotti dalla biodegradazione dell'isoprene, è rilevata dalla comparsa di una colorazione violacea causata dalla reazione del reagente di Schiff con i gruppi aldeidici.
- **Scanning Electron Microscope (SEM):** osservando la superficie della NR si verifica l'azione biodegradativa causata dai microrganismi.
- **Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR):** analisi *in-situ*, non distruttiva che permette di rilevare cambiamenti chimici della superficie della NR. Analizzando i picchi di assorbanza è possibile identificare quali gruppi funzionali siano stati coinvolti nel processo biodegradativo.
- **Produzione di CO<sub>2</sub>:** la CO<sub>2</sub>, essendo un prodotto del metabolismo della biomassa, può essere correlata alla crescita dei microrganismi e quindi all'utilizzo della NR in qualità di substrato carbonioso.
- **Determinazione peso secco:** valutando la variazione di peso secco della NR è possibile quantificare l'efficacia della biodegradazione.

---

<sup>16</sup> Tien M., Kirk K., 1988, *Lignin Peroxidase of Phanerochete chrysosporium*, Method in enzymology, pp. 238-249.

<sup>17</sup> D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Di Mattia E., Giovannozzi Sermanni G., 1996, *Substrate specificity and properties of laccase from Lentinus edodes*, Acta Biotechnologica, 16: 257-270.

## **2.Scopo della Tesi**

Lo scopo della tesi è stato quello di verificare e quantificare la biodegradazione della NR ad opera di un consorzio microbico originario del suolo.

I principali parametri chimico-fisici controllanti il processo sono stati determinati mediante:

- Analisi microbiologiche sul suolo
- Valutazione della produzione di CO<sub>2</sub> nel tempo

Per esaminare invece le interazioni fra microrganismi e NR si sono analizzate le modifiche macroscopiche e microscopiche subite dai campioni:

- Variazione peso secco
- Analisi morfologiche al SEM

Successivamente sulla base dei dati sperimentali ottenuti sono state formulate delle ipotesi per un'applicazione su scala industriale.

### 3. Materiali e Metodi

#### 3.1 Allestimento microcosmi

Lo studio della biodegradazione della gomma naturale ad opera dei microrganismi del suolo è stato effettuato all'interno di microcosmi contenenti suolo e frammenti di gomma naturale (*Natural Rubber* - NR).

#### Gomma naturale

La NR usata per questa sperimentazione è stata preparata mediante stampaggio in *Pressa Collin* a 190°C di temperatura delle piastre e 100 bar di pressione applicata per 4 minuti; successivamente la NR è stata riportata a temperatura ambiente con un processo di raffreddamento della durata di 6 minuti.

I campioni di NR sono stati preparati tagliando da un foglio di gomma stampata tondini da 2,54 cm di diametro mediante una lama circolare.



*Figura 3.1 Campione di NR*

#### Preparazione del suolo

Il suolo è stato prelevato da un deposito di pneumatici abbandonati situato in una zona rurale. Successivamente è stato pulito dai frammenti grossolani, setacciato (fori 2 mm), ne è stata valutata l'umidità (Par. 3.4) e il pH (Par. 3.4); il suolo è stato conservato in frigorifero sino all'utilizzo.

#### Allestimento dei microcosmi

I microcosmi sono stati allestiti in vasi di vetro da 1 L con chiusura ermetica mediante l'applicazione di una guarnizione al tappo (Fig. 3.2). In ogni vaso sono stati posti 200 g di suolo ed è stata aggiunta acqua distillata per portare l'umidità al 40%. Sulla superficie del suolo sono stati posizionati dei supporti in plastica con piedini (diametro 8 cm, altezza 3 cm) per sostenere i contenitori di plastica (volume 100 ml) della soluzione di NaOH 1,5 N usata per la cattura della CO<sub>2</sub> (Par. 3.3).

In totale sono stati allestiti 9 microcosmi suddivisi in 3 linee:

	N° microcosmi	N° campioni di NR	Campioni NR sterili	Suolo sterile
<b>Linea controllo abiotico</b>	3	4	SI'	SI'
<b>Linea controllo biotico</b>	3	NO	NO	NO
<b>Linea di biodegradazione</b>	3	4	NO	NO

*Tabella 3.1 Caratteristiche delle 3 linee di microcosmi*

Per la sterilizzazione dei componenti del microcosmo (vaso, supporto, contenitore per la NaOH, suolo, acqua per la correzione dell'umidità, suolo e campioni di NR) è stato utilizzato un trattamento in autoclave (121°C, 2 atm, 20 min).

Durante l'intera sperimentazione i microcosmi sono stati conservati a temperatura ambiente e alla naturale alternanza luce/buio.



*Figura 3.2 Esempio di microcosmo contenente i campioni di gomma*

Periodicamente è stato aggiunto al suolo del terreno Czapek (CZ) (con o senza glucosio) con il fine di fornire nutrienti ai microrganismi.

La composizione del terreno CZ completo utilizzato è la seguente:

- 30g/l glucosio
- 3 g/l NaNO<sub>3</sub>
- 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>
- 0,5 g/l KCl
- 0,01 g/l FeSO<sub>4</sub>

## 3.2 *Analisi microbiologiche sul suolo*

Sul suolo scelto per allestire i microcosmi sono state svolte analisi microbiologiche per effettuare una conta microbica in relazione alla massa di suolo (UFC/g) e discernere il contributo batterico da quello fungino, operando a due differenti valori di pH: pH 4 al quale è favorita la crescita fungina e pH 5 più adatto per la crescita dei batteri.

Le analisi sono state svolte sia su suolo prima dell'incubazione per verificare la carica microbiologica originaria e sia su suolo incubato per stimare le eventuali variazioni avvenute durante la permanenza in microcosmo.

Per svolgere le analisi sono stati utilizzati 2 metodi: *diluizioni successive* e *capsule di suolo*. A sua volta il metodo delle diluizioni successive è stato realizzato con due diverse modalità di inoculo: di *superficie* e ad *inclusione*.

### 3.2.1 *Metodo delle diluizioni successive – Inoculo di superficie*

Per effettuare la caratterizzazione sono stati sospesi suolo e acqua sterile in proporzioni 1:2 (peso-volume), addizionate biglie di vetro e successivamente mantenuto il tutto in agitazione (125 rpm) per 1 ora.

Dalla sospensione ottenuta sono state ricavate 3 diluizioni:

- 1 : 100
- 1 : 1000
- 1 : 10000

Le diluizioni ottenute sono state inoculate in capsule Petri sterili (diametro 9 cm) dove sono stati versati 20 ml di terreno *Agar-Malto* (AM) (pH 4 o pH 5) e successivamente dispensati omogeneamente, mediante un'ansa, 0,5 ml di una delle tre diluizioni sulla superficie del terreno una volta solidificato.

La composizione del terreno AM è la seguente:

- 20 g/l estratto di malto
- 20 g/l glucosio
- 2 g/l peptone
- 20 g/l agar (30 g/l a pH 4)

Sul suolo non incubato per ciascuna delle tre diluizioni (1:100 , 1:1000 , 1:10000) sono state effettuate 3 repliche valutando la crescita sia a pH 4 che a pH 5.

Sul suolo incubato invece si è realizzato un set di prove analogo ma con una singola replica di ogni microcosmo della linea biotica e della linea di biodegradazione.

Tutte le capsule sono state tenute a temperatura ambiente e al buio.

Dopo 96 ore è stata effettuata una conta delle colonie cresciute sulla superficie del terreno.

### 3.2.2 *Metodo delle diluizioni successive – Inoculo per inclusione*

Si utilizzano le diluizioni ottenute in modo eguale per quanto fatto per l'inoculo di superficie sia per il suolo incubato che per quello non incubato (Par. 3.2.1).

In questo procedimento nelle capsule Petri prima sono stati versati gli 0,5 ml della soluzione diluita e successivamente i 20 ml di terreno AM non ancora solidificato (pH 4 o pH 5), assicurando così una miscelazione fra le due parti.

Anche in questo approccio sono state effettuate 3 repliche con la combinazione pH-diluizione per il suolo non incubato ottenendo così un set di prove confrontabile con quello dell'altra tipologia di inoculo.

Analogamente a quanto fatto per l'altro metodo sul suolo incubato si è realizzato un set di prove con una sola replica sul suolo di ogni microcosmo della linea biotica e di quella di biodegradazione.

Anche queste capsule sono state tenute a temperatura ambiente, al buio e si è compiuta la conta delle colonie dopo 96 ore.

### 3.2.3 Metodo delle capsule di suolo

Anche questo metodo è stato applicato sia per il suolo non incubato che per quello dei microcosmi.

Il suolo è stato posizionato al centro delle capsule Petri in porzioni da 50 o 100 mg; successivamente sono stati versati 0,5 ml di acqua distillata sterile sul suolo e il tutto è stato miscelato con un'ansa per ottenere una sospensione omogenea.

Quindi in ogni capsula sono stati addizionati 20 ml di terreno AM (pH 4 o pH 5) ancora liquido.

Per il suolo non incubato di ciascuna delle tre diluizioni (1:100 , 1:1000 , 1:10000) sono state effettuate 3 repliche valutando la crescita sia a pH 4 che a pH 5.

Sul suolo incubato invece si è realizzato un set di prove analogo ma con una sola replica per ogni microcosmo della linea biotica e di quella di biodegradazione.

Le piastre sono state conservate al buio e a temperatura ambiente e la conta delle colonie è stata effettuata dopo 48 ore.

### 3.3 Analisi respirometriche

Per monitorare la crescita della biomassa presente all'interno dei microcosmi si è valutata la produzione di CO<sub>2</sub>. Per effettuare questa analisi si è utilizzata la capacità di una soluzione di NaOH di catturare la CO<sub>2</sub> che diffonde dalla fase gassosa (aria) alla fase liquida (soluzione). Per evitare che le misure venissero falsate dalla cattura di CO<sub>2</sub> già presente nell'aria, e quindi non correlabile alla biomassa, i microcosmi sono stati mantenuti chiusi ermeticamente; inoltre anche il contributo di CO<sub>2</sub> presente nell'acqua usata per la preparazione della soluzione di NaOH è stato eliminato decarbonatando l'acqua mediante bollitura in condizioni di agitazione per 1 ora.

Periodicamente la soluzione di NaOH 1,5 N (25 ml) è stata titolata mediante HCl 1,5 N (titolante), fenolftaleina (indicatore) e BaCl<sub>2</sub> (stabilizzante). Dopo ogni titolazione è stata introdotta nel microcosmo una nuova soluzione di NaOH 1,5 N. Sfruttando il fatto che una molecola di NaOH legata ad una molecola di CO<sub>2</sub> non è più in grado di reagire con il titolante è stato possibile, mediante una formula empirica, correlare il volume di HCl utilizzato per portare la soluzione al viraggio con la quantità di CO<sub>2</sub> presente nella fase gassosa.

$$mg (CO_2) = (V_0 - V) * f$$

V<sub>0</sub> = ml di HCl necessari a titolare la soluzione presente nei microcosmi abiotici;

V = ml di HCl necessari a titolare la soluzione presente nei microcosmi biotici;

f = fattore di conversione [mg/ml] che si ricava da  $f = 22 * M$ ;

M = molarità della soluzione titolante (HCl).

### 3.4 *Analisi sul suolo*

Sia in fase di allestimento che durante la sperimentazione sono state svolte periodicamente analisi sul suolo per misurarne l'umidità e il pH; inoltre il suolo è stato periodicamente rivoltato per incrementarne l'ossigenazione.

Occasionalmente ne è stata anche ripristinata la quantità al valore iniziale (200 g).

#### **Determinazione dell'umidità del suolo**

L'umidità del suolo è stata determinata valutando la variazione di peso di un campione di suolo (5 g) disidratato in stufa a 105° C per 24 ore.

#### **Determinazione del pH**

Il pH del suolo è stato valutato misurando il pH di una sospensione di suolo e acqua distillata in rapporto 1:2,5 (peso/volume) posta in agitazione per 30 minuti a 125 rpm.

#### **Rivoltamento del suolo**

Il suolo è stato rivoltato manualmente mediante un utensile metallico, previa rimozione del contenitore della soluzione di NaOH, del supporto in plastica e dei campioni di NR. Il rivoltamento è stato anche svolto successivamente ad ogni aggiunta di liquido per favorirne la distribuzione all'interno del suolo.

#### **Ripristino del suolo alle quantità iniziali**

Per riportare il peso del suolo contenuto nei microcosmi al valore iniziale di 200 g è stata effettuata un'aggiunta di suolo proveniente dal stesso sito, pretrattato nelle medesime condizioni e conservato in frigorifero (4° C). Dopo l'aggiunta di suolo è stata corretta l'umidità mediante l'aggiunta di acqua distillata.

### 3.5 *Analisi sui campioni di NR*

Per stimare la biodegradazione è stata misurata la perdita di peso secco dei campioni e per vederne gli effetti a livello microscopico sono state effettuate delle foto al SEM (*Scanning Electron Microscope*).

#### 3.5.1 *Lavaggio campioni di NR*

Per poter effettuare le analisi sui campioni di NR si è reso necessario l'utilizzo di una procedura di lavaggio con lo scopo di rimuovere residui di suolo e biomassa adesi alla superficie.

La procedura prevede 4 fasi:

- 1)Sonicazione:** i campioni sono immersi in 40 ml di acqua distillata in provette *Falcon*. Le provette vengono poi sottoposte a 3 passaggi al sonicatore (potenza 550 W). Ogni passaggio prevede 5 minuti di trattamento e 5 minuti di pausa in ghiaccio per evitare il surriscaldamento.

- 2) **Centrifugazione:** i campioni sono immersi in acqua distillata e sottoposti a centrifugazione per 15 minuti a 10000 rpm e a temperatura ambiente.
- 3) **Vortex:** effettuato alla massima potenza (51 W) in provette *Falcon* contenenti acqua distillata pulita.
- 4) **Idropulsore:** vengono rimossi gli ultimi residui di suolo e biomassa con acqua distillata mediante un idropulsore manuale.

### 3.5.2 Determinazione peso secco

I campioni sono stati essiccati in stufa a 55°C per 24 ore e successivamente è stato valutato il peso su una bilancia di precisione.

### 3.5.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Per rendere possibile l'analisi al SEM dei campioni di gomma incubati si sono resi necessari i seguenti trattamenti:

- Disidratazione dei campioni in stufa a 55°C per 24h
- Fissazione in glutaraldeide (5%) con successivo riposo per 8 ore
- Disidratazione dei campioni fissati in stufa a 55°C per 8 ore per rendere completa la fissazione in glutaraldeide
- *Coating* mediante cromo: metallizzazione della superficie del campione con un sottile film metallico con il fine di riflettere gli elettroni prodotti dal filamento del microscopio. Per realizzarlo si adopera una camera cilindrica avente al centro un supporto per i campioni e un elettrodo del metallo che si desidera depositare. Il deposito delle particelle metalliche sul campione è indotto da un flusso di argon (inviato all'interno della camera da una bombola esterna) che, a contatto con l'elettrodo in tensione, ne provoca il distacco di alcune particelle.

Le analisi sono state svolte con un microscopio SEM *Supra 40 Zeiss* (EHT = 5 KV; VP Vacuum = 100 Pa).

## 4. Risultati e Discussione

### 4.1 Analisi microbiologiche sul suolo

Il suolo utilizzato per l'allestimento dei microcosmi è un suolo prelevato da un deposito di pneumatici abbandonato, situato in una zona rurale. Per caratterizzare microbiologicamente il suolo sono state effettuate analisi che, oltre a fornire un dato sul numero dei microrganismi in relazione alla massa di suolo (UFC/g), permettono di discernere batteri e funghi.

Le analisi sono state svolte su suolo non ancora incubato per verificare la carica microbica originaria e su suolo al 97esimo giorno di incubazione per stimare eventuali modifiche qualitative e quantitative avvenute durante l'incubazione di NR in suolo.

Per svolgere le analisi è stato utilizzato il metodo delle diluizioni successive con due diverse modalità di inoculo: di *superficie* e per *inclusione* (Par. 3.2).

#### 4.1.1 Metodo delle diluizioni successive – Suolo non incubato

Entrambi le modalità di inoculo sono state condotte su terreno AM a due differenti valori di pH: 4 per selezionare le colonie fungine, 5 per quelle batteriche.

I risultati sono stati ottenuti dalla conta macroscopica delle colonie presenti su piastra dopo 96 ore di incubazione.

pH	Diluizione	UFC/g	Media
4	100	1,4E+05	5,1E+05
	1000	3,9E+05	
	10000	1,0E+06	
5	100	5,9E+05	3,9E+06
	1000	1,7E+06	
	10000	9,5E+06	

*Tabella 4.1* Inoculo di superficie della sospensione di suolo non incubato

pH	Diluizione	UFC/g	Media
4	100	1,3E+04	1,2E+04
	1000	2,4E+04	
	10000	0,0E+00	
5	100	3,9E+04	1,6E+06
	1000	1,5E+05	
	10000	3,0E+05	

*Tabella 4.2* Inoculo per inclusione della sospensione di suolo non incubato

I valori ottenuti con le due modalità di inoculo sono molto diversi a pH 4, mentre a pH 5 la differenza è molto ridotta (Tab 4.1 e 4.2): questo è spiegabile dal fatto che includere nel terreno colturale o spargere sulla superficie batteri del suolo che solitamente sono anaerobi o aerobi facoltativi non condiziona la loro crescita, mentre per i funghi che sono aerobi ciò ha un peso significativo.

In generale possiamo dire che il suolo originariamente fosse ricco di microrganismi, sia di tipo batterico ( $3,9E+06$  UFC/g) che fungino ( $5,1E+05$  UFC/g).

#### 4.1.2 Metodo delle diluizioni successive – Suolo incubato

Sul suolo al 97esimo giorno di incubazione le analisi sono state condotte con due diverse modalità di inoculo e due diversi valori di pH (4 e 5) analogamente a quanto riportato per il suolo non incubato. Il suolo è stato prelevato da ogni microcosmo delle linee di controllo biotico e di biodegradazione e i risultati sono stati calcolati facendo la media fra quelli ottenuti con l'inoculo di superficie con quelli dell'inoculo per inclusione. Ciò è stato fatto per poter ottenere un unico valore di UFC/g per ogni combinazione “microcosmo-valore di pH” (Tab. 4.3).

	<b>UFC/g</b>
CB 1 pH 4	2,1E+05
CB 2 pH 4	4,6E+04
CB 3 pH 4	2,7E+04
CB 1 pH 5	3,6E+05
CB 2 pH 5	1,6E+06
CB 3 pH 5	4,3E+05
BIOD 1 pH 4	1,9E+05
BIOD 2 pH 4	8,3E+05
BIOD 3 pH 4	1,3E+05
BIOD 1 pH 5	1,2E+06
BIOD 2 pH 5	1,6E+06
BIOD 3 pH 5	6,8E+05

**Tabella 4.3** UFC/g al 97° giorno di incubazione

I valori relativi alle singole modalità di inoculo sono riportate in appendice (Tab. 8.6 e 8.7). Per ogni accoppiamento “tipologia di linea-valore di pH” è stato calcolato un valore medio di UFC/g (Tab 4.4):

	<b>UFC/g</b>
CB pH 4	9,3E+04
CB pH 5	8,0E+05
BIOD pH 4	3,8E+05
BIOD pH 5	1,1E+06

**Tabella 4.4** Valori medi UFC/g di ogni linea

I risultati riportati in tabella 4.4 sono stati confrontati fra di loro mediante rapporti:

	<b>(UFC/g) / (UFC/g)</b>
BIOD pH 4 / CB pH 4	1,9
BIOD pH 5 / CB pH 5	3,2
BIOD pH 5 / BIOD pH 4	3,0

**Tabella 4.5** Rapporti fra le medie delle UFC/g delle due linee ai due diversi pH

I rapporti (Tab 4.5) indicano che nelle prove di biodegradazione sia le colonie batteriche che quelle fungine sono più numerose rispetto a quelle presenti nei controlli biotici: ciò è

attribuibile al fatto che nei microcosmi di biodegradazione i campioni di NR rappresentano una fonte di carbonio aggiuntiva e disponibile sin dai primi giorni di incubazione (Par. 4.3.1 e 4.4.1).

Inoltre, il fatto che il rapporto fra le UFC/g a pH 5 e quelle a pH 4 nei microcosmi di biodegradazione sia circa 3 indica solamente che le colonie batteriche sono più numerose di quelle fungine senza però dire nulla sul ruolo che queste hanno nei confronti della NR.

Analizzando invece i rapporti fra le UFC/g del suolo incubato con quello non incubato si può ottenere una stima di massima sull'andamento della crescita dei microrganismi (Tab. 4.6):

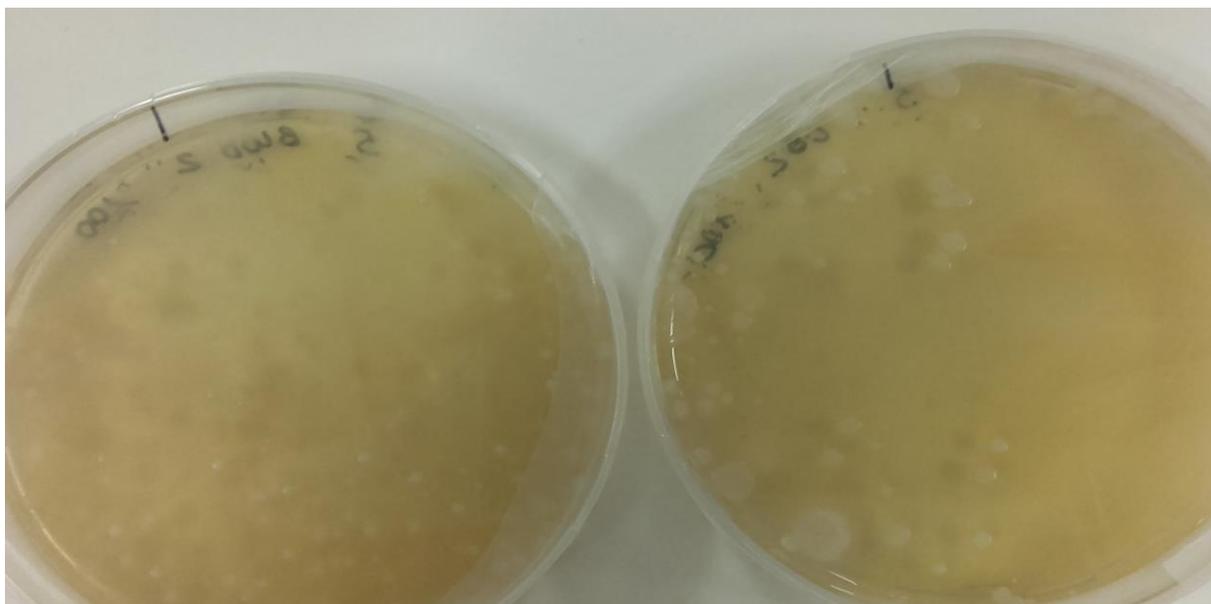
pH	Suolo non incubato		Suolo incubato		± %
	UFC/g	Linea	UFC/g		
4	2,60E+05	CB	9,3E+04	-64%	
		BIOD	3,8E+05	+47%	
5	1,36E+06	CB	8,0E+05	-61%	
		BIOD	1,1E+06	-16%	

**Tabella 4.6** Confronto fra il suolo non incubato e quello incubato al 97° giorno

Nella linea di controllo biotico vi è stata una forte diminuzione sia delle colonie batteriche (-64%) che di quelle fungine (-61%) rispetto a quelle presenti originariamente nel suolo non incubato (Fig. 4.1). Al contrario, nella linea di biodegradazione le colonie batteriche sono rimaste stabili (-16%) mentre si è verificato un deciso incremento di quelle fungine (+47%). Questo è dovuto, molto probabilmente, al fatto che i campioni di NR, situati nella parte superficiale del suolo dove lo scambio di O<sub>2</sub> con l'aria risulta meno ostacolato, hanno svolto la funzione di fonte di C permettendo alla biomassa fungina di crescere sulla superficie della NR e nel suolo limitrofo.



**Figura 4.1** Piastre diluizione 1:100 - Biodegradazione (sinistra) e Controllo biotico (destra) a pH 4 - giorno 97



**Figura 4.2** Piastre diluizione 1:100 - Biodegradazione (sinistra) e Controllo biotico (destra) a pH 5 - giorno 97

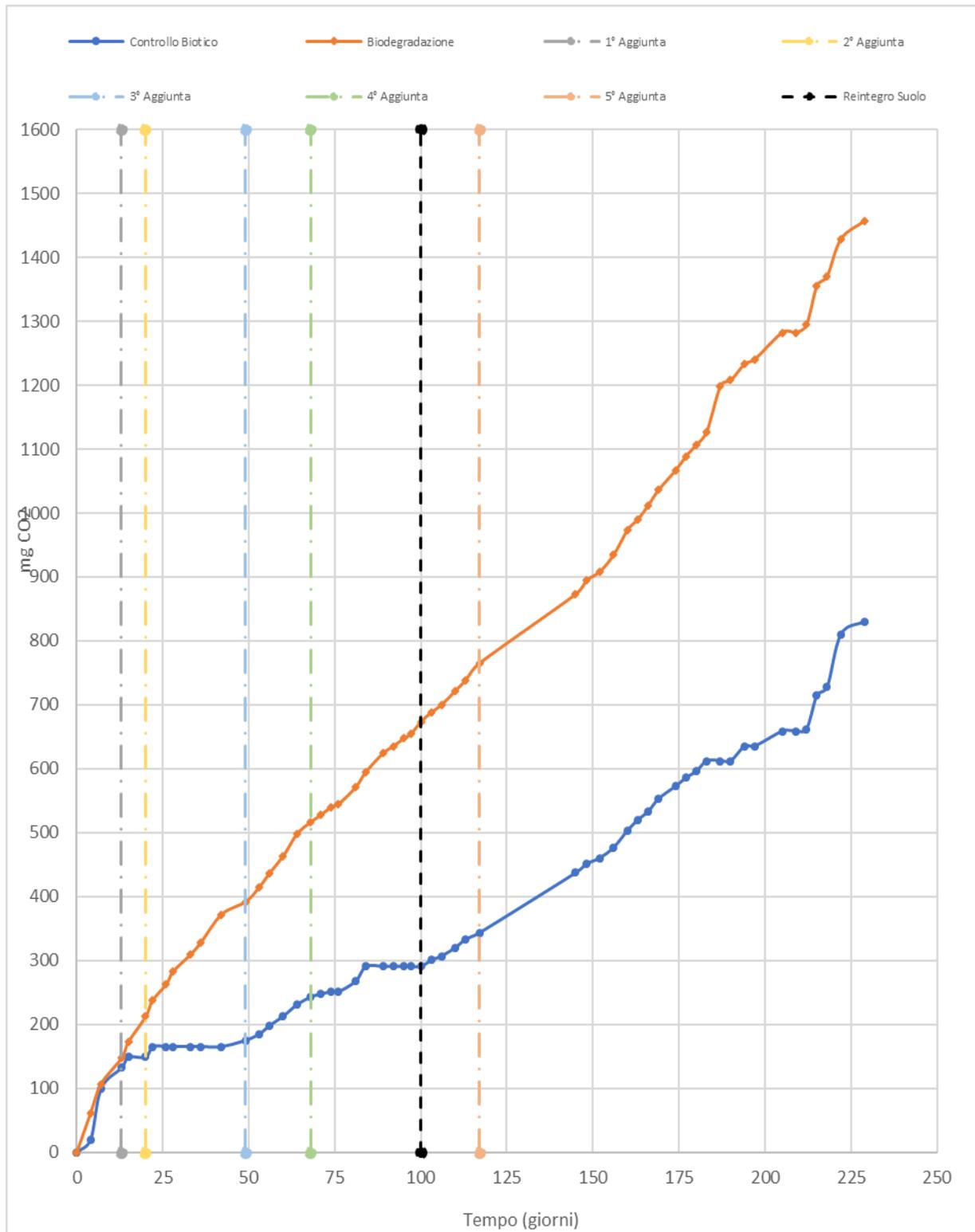
Osservando direttamente le piastre si può notare come a pH 4 (Fig. 4.1), valore che favorisce i funghi rispetto ai batteri, sia notevole la differenza di numero di colonie presenti fra la piastra con il suolo del microcosmo della linea di biodegradazione (a sinistra) con quella del microcosmo del controllo biotico (a destra).

Invece, nelle piastre a pH 5 (Fig. 4.2), valore che favorisce i batteri rispetto ai funghi, non vi è una netta differenza di numero di colonie fra il suolo proveniente dalle due tipologie di microcosmo.

Queste osservazioni avvalorano i risultati numerici ottenuti per le UFC/g dei microcosmi di biodegradazione i quali mostrano una crescita delle colonie fungine e una diminuzione di quelle batteriche; nei controlli biotici invece si ha una diminuzione di entrambe le tipologie di microrganismi.

## 4.2 Analisi respirometriche

Per valutare l'andamento della crescita della biomassa ed evidenziarne le differenze fra la linea biotica e quella di biodegradazione è stata monitorata la produzione di CO<sub>2</sub> attraverso analisi respirometriche (Par. 3.3), poiché la CO<sub>2</sub> totale prodotta in microcosmo è un parametro direttamente correlato alla crescita di tutti i microrganismi.



**Figura 4.3** Produzione di CO<sub>2</sub> delle linee di biodegradazione e del controllo biotico nel tempo

Ogni punto delle curve è stato calcolato sommando la misura respirometrica effettuata in quel giorno con il valore relativo al punto precedente.

Durante l'allestimento dei microcosmi il suolo è stato portato al 40% di umidità con l'aggiunta di sola acqua distillata. Ogniqualvolta le analisi sui microcosmi di biodegradazione e dei controlli biotici hanno mostrato un rallentamento della produzione di CO<sub>2</sub> sono stati addizionati 10 ml di terreno CZ (senza glucosio e con i sali a concentrazioni doppie): ciò è stato fatto con il fine di impedire l'arresto della crescita dei microrganismi.

Osservando l'andamento delle due curve (Fig. 4.3) alle aggiunte di terreno CZ possiamo affermare che la NR sia un substrato carbonioso disponibile ai microrganismi del suolo. Questo è dimostrato dal fatto che nella linea di biodegradazione (curva rossa) la produzione di CO<sub>2</sub> si mantiene alta più a lungo, successivamente ad un'aggiunta di nutrienti, rispetto a quanto avviene nella linea del controllo biotico (curva blu).

Inoltre, è evidente come la differenza di produzione di CO<sub>2</sub> relativa alle due linee diventi sempre più marcata col passare dei giorni tanto che intorno al giorno 100 i mg di CO<sub>2</sub> prodotti dai microcosmi di biodegradazione sono circa il doppio (674 mg) di quelli prodotti dai controlli biotici (290 mg). L'andamento iniziale pressochè uguale nelle due curve è imputabile molto probabilmente a nutrienti facilmente assimilabili originariamente presenti nel suolo.

#### *4.2.1 Ripristino quantità iniziali di suolo*

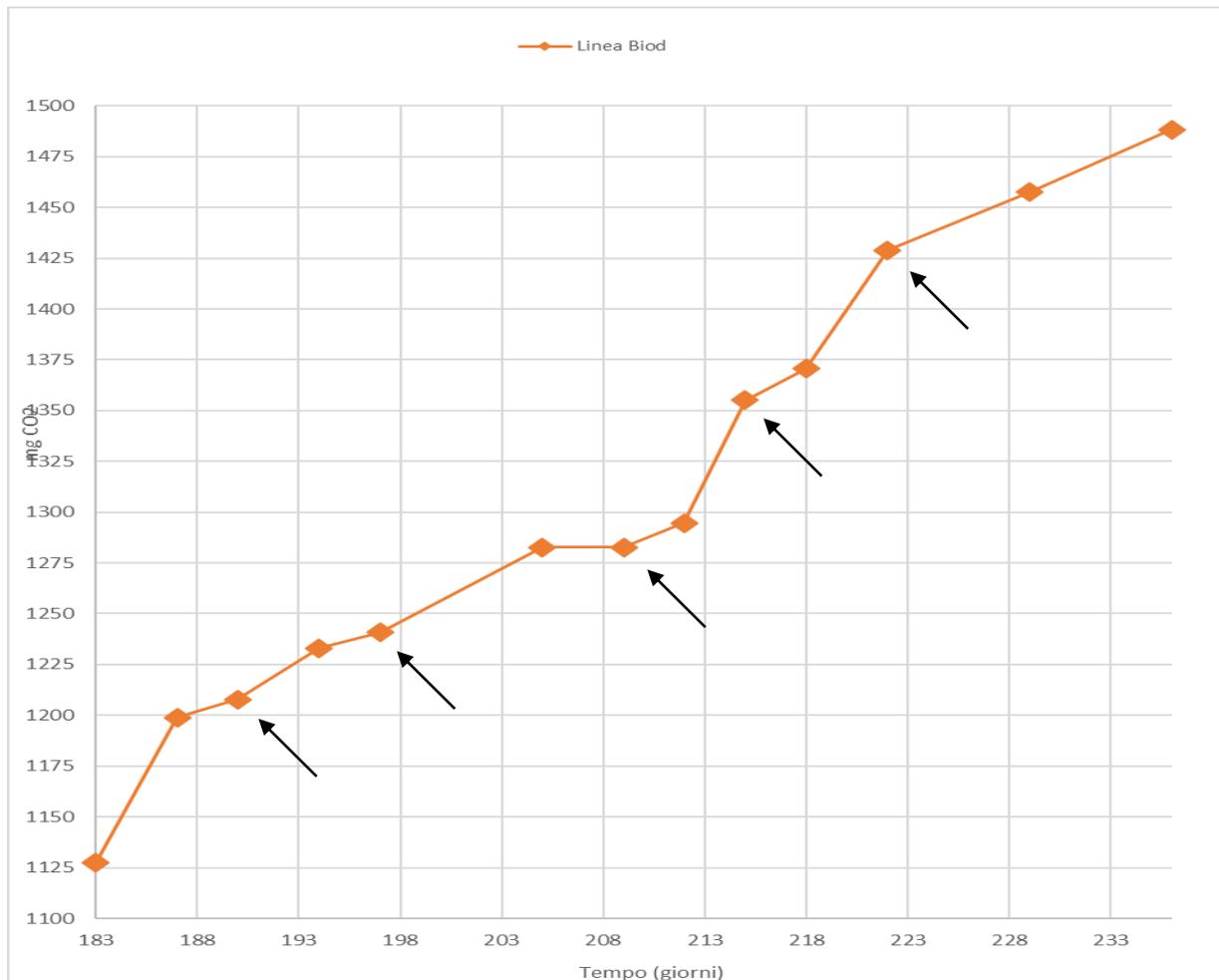
Al 99esimo giorno di incubazione il quantitativo di suolo presente nei microcosmi era pressochè dimezzato a causa dei prelievi effettuati per: il monitoraggio dell'umidità e del pH, le analisi microbiologiche, la determinazione del peso secco dei campioni di NR e il periodico rivoltamento del suolo.

Per riportare la quantità di suolo ai 200g della fase di allestimento è stato addizionato altro suolo proveniente dal medesimo deposito e l'umidità è stata riportata al 40% mediante l'aggiunta di acqua distillata (Par. 3.4). Questa aggiunta di suolo, effettuata in tutti i microcosmi delle linee di biodegradazione e del controllo biotico, ha provocato una forte crescita della biomassa, maggiore rispetto a quella registrata dopo i precedenti reintegri di nutrienti (terreno CZ privo di glucosio): ciò è da imputare, molto probabilmente, al fatto che tramite il suolo è stata introdotta nuova biomassa ma soprattutto nuovi nutrienti di natura salina od organica.

#### *4.2.2 Movimentazione del suolo*

La natura argillosa del suolo utilizzato tende a far stratificare l'acqua in superficie: lo strato di acqua in superficie crea un impedimento allo scambio di O<sub>2</sub> con l'aria inibendo così il metabolismo della biomassa aerobia che, dalle prove microbiologiche (Par. 4.1), si è visto essere la parte preponderante all'interno dei microcosmi. A dimostrazione di questo fenomeno, a partire dal 183esimo giorno di incubazione, si è resa necessaria una movimentazione periodica del suolo (ogni 4 giorni) per evitare rallentamenti della produzione di CO<sub>2</sub> (Fig. 4.4).

Perciò si può affermare che, in fase avanzata di incubazione, un'adeguata ossigenazione del suolo diventi un fattore determinante per la crescita della biomassa e quindi, di conseguenza, per il processo di biodegradazione.



**Figura 4.4** Andamento della produzione di CO<sub>2</sub> influenzato dalla carenza di O<sub>2</sub> nel suolo

### 4.3 Analisi dei campioni di NR

Per quantificare l'entità della biodegradazione della NR è stata misurata la perdita di peso secco dei campioni e per comprenderne gli effetti sulla struttura macroscopica sono state effettuate delle analisi morfologiche al SEM (*Scanning Electron Microscope*) (Par. 3.5.3).

#### 4.3.1 Perdita di peso secco dei campioni di NR

Durante l'allestimento dei microcosmi è stato misurato il peso secco di tutti i campioni di NR ponendoli in stufa per 24 ore a 55°C prima di essere pesati. Nel corso dell'incubazione è stato periodicamente estratto un campione da ogni microcosmo e, dopo esser stato lavato per rimuovere tracce di suolo e biomassa (Par. 3.5.1), ne è stato valutato il peso secco con il medesimo procedimento usato in allestimento.

I prelievi dei campioni di NR sono stati i seguenti:

- Prelievo 1 : 42esimo giorno di incubazione
- Prelievo 2 : 76esimo giorno di incubazione
- Prelievo 3 : 163esimo giorno di incubazione
- Prelievo 4 : 197esimo giorno di incubazione
- Prelievo 5 : 236esimo giorno di incubazione

t (giorni)	Biodegradazione	Abiotico
42	<b>5,5 ± 1,8</b>	<b>1,4 ± 0,3</b>
76	<b>15,5 ± 0,5</b>	<b>1,9 ± 0,3</b>
163	<b>12,3 ± 1,2</b>	<b>2,2 ± 0,3</b>
197	<b>12,9 ± 1,4</b>	<b>3,1 ± 0,0</b>
236	<b>15,6 ± 2,5</b>	<b>3,7 ± 0,0</b>

*Tabella 4.7 Valori medi di perdita di peso secco dei campioni di NR*

Confrontando i risultati relativi alla linea di biodegradazione con quelli della linea abiotica (Tab. 4.7) è possibile affermare che la perdita di peso delle NR è causata principalmente dall'azione degradativa della biomassa e che i valori di CO<sub>2</sub> misurati nelle prove respirometriche siano effettivamente il risultato dell'utilizzo della NR come substrato da parte dei microrganismi.

I valori ottenuti a 163,197 e 236 giorni di incubazione sono probabilmente sottostimati poiché il metodo di lavaggio, efficace sui campioni dei precedenti prelievi (46 e 76 giorni), è risultato invece inadeguato per rimuovere tutti i residui di suolo e biomassa e quindi ottenere un peso secco corretto. L'inefficacia della procedura di lavaggio è probabilmente dovuta al fatto che, con il passare del tempo, sia la biomassa che il suolo sono penetrati all'interno della struttura della NR: nei prelievi precedenti invece questi erano solamente adesi alla sua superficie, e conseguentemente più facili da rimuovere.

### 4.3.2 Analisi morfologiche al SEM

Per poter verificare ed osservare l'azione biodegradativa dei microrganismi sulla superficie della NR è stata effettuata un'analisi SEM (*Scanning Electron Microscope*) sui campioni di NR.

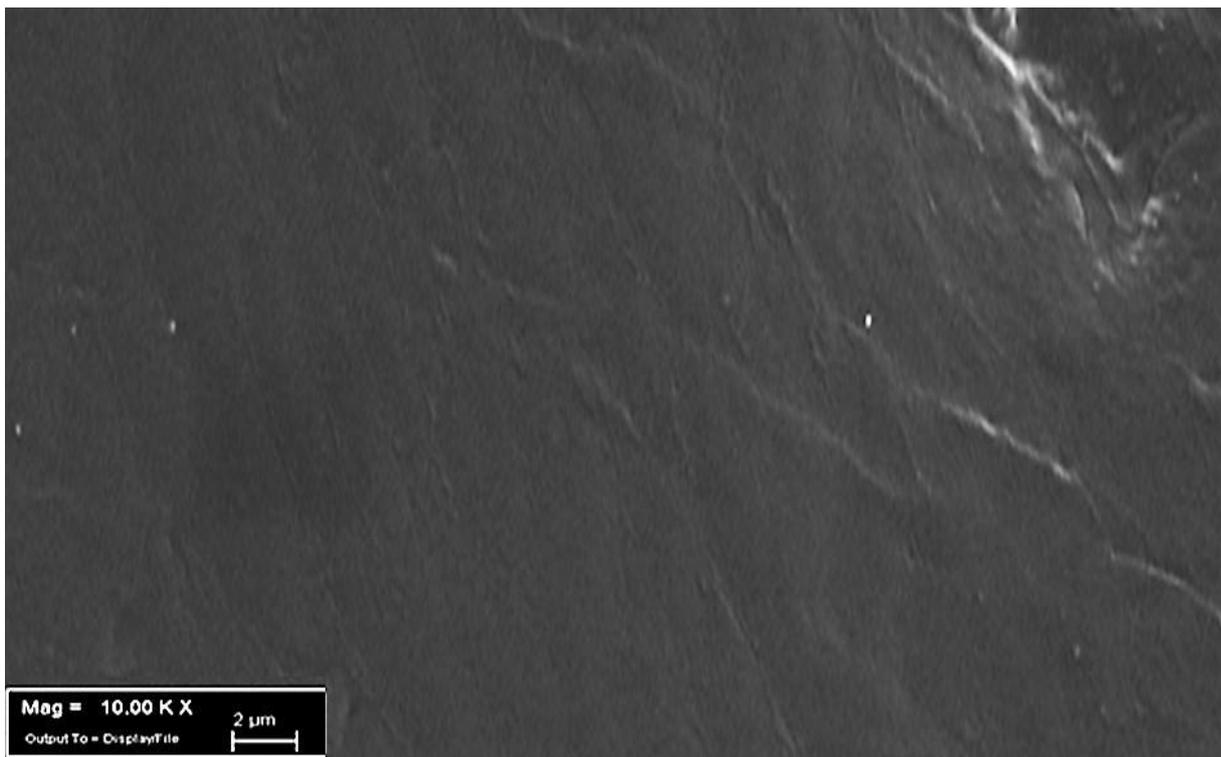
I campioni di NR analizzati sono stati fissati in glutaraldeide e metallizzati mediante cromo (Par. 3.5.3).

In totale sono stati analizzati 4 campioni di NR:

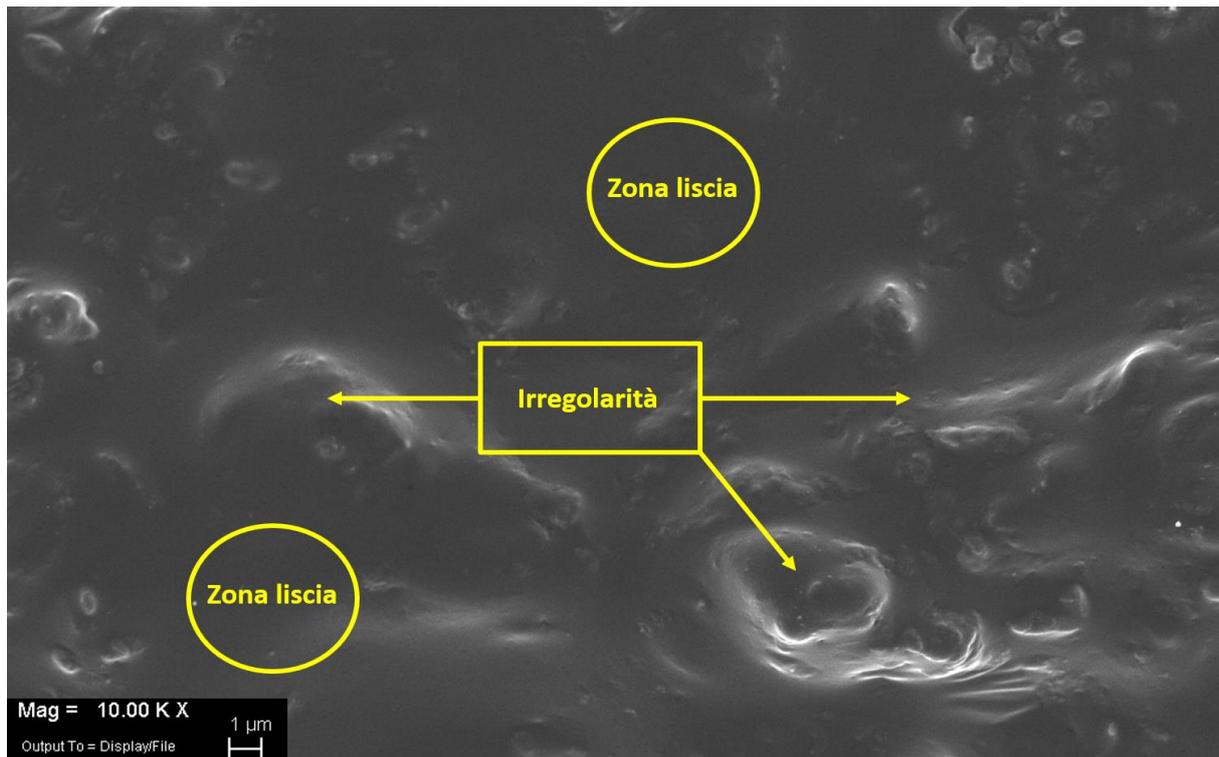
- 1 campione non incubato e sterilizzato in autoclave (122°C per 15 minuti)
- 2 campioni incubati in BIOD1 e BIOD3, rispettivamente i microcosmi della linea di biodegradazione che hanno avuto la più alta e la più bassa produzione di CO<sub>2</sub> (Fig.8.1)
- 1 campione incubato in CB+NR

I campioni di NR sono stati analizzati al 197esimo giorno di incubazione.

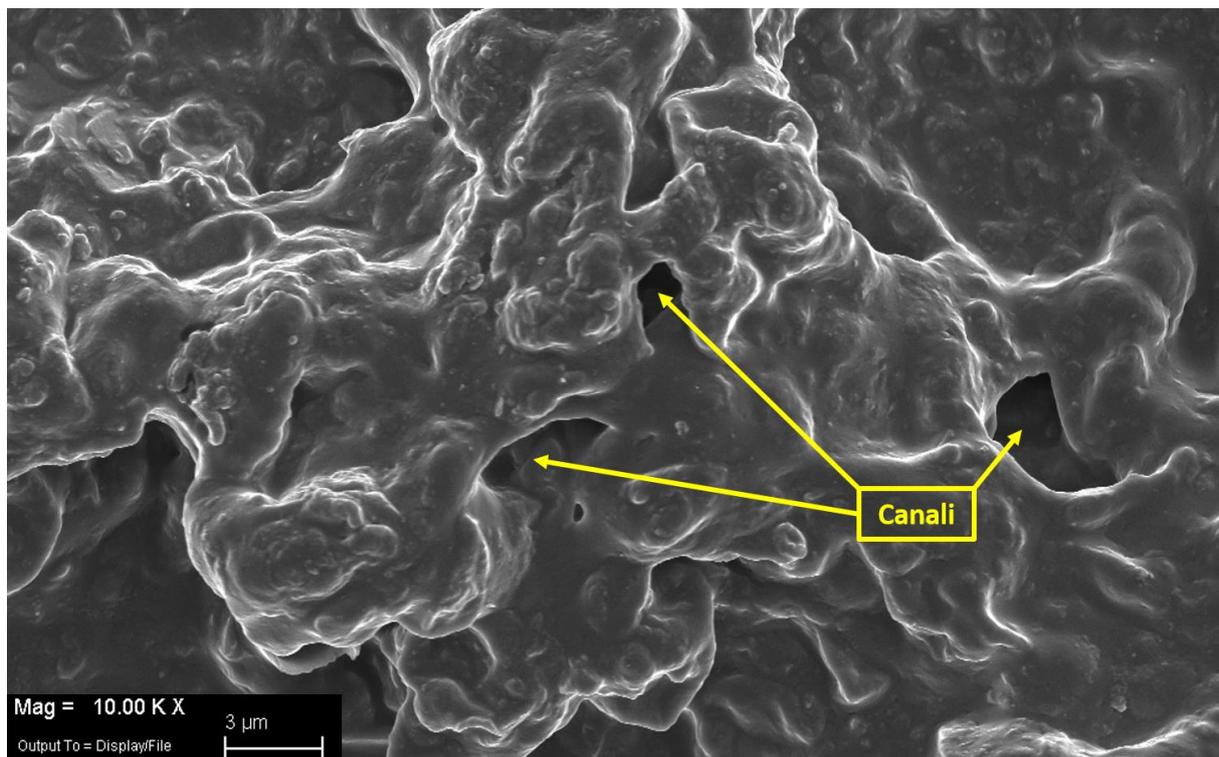
La prima immagine (Fig. 4.5) mostra come la superficie della NR non incubata sia liscia e regolare anche ad elevati ingrandimenti (10.000).



*Figura 4.5 NR non incubata e sterilizzata (10.000 ingrandimenti)*



**Figura 4.6** NR incubata in microcosmo del controllo abiotico (10.000 ingrandimenti)



**Figura 4.7** NR incubata in microcosmo di biodegradazione (10.000 ingrandimenti)

Dalla terza immagine (Fig. 4.7) si vede chiaramente come la NR incubata nel microcosmo di biodegradazione abbia subito un'azione biodegradativa importante: ciò si evince dalla elevata irregolarità della superficie e dalla comparsa di canali che penetrano verso l'interno della struttura: quest'ultimi sono causati dalla modalità di crescita delle ife fungine, che

inizialmente aderiscono alla superficie del campione e successivamente penetrano all'interno dello stesso. Questa osservazione è in accordo con le ipotesi avanzate in precedenti studi<sup>18</sup>, i quali affermano che in una superficie rugosa si generano zone ad alta concentrazione di nutrienti ed acqua, favorendo di fatto l'adesione e la crescita della biomassa fungina.

Nella NR incubata nel microcosmo abiotico (suolo e campioni sterili) invece la struttura è rimasta pressoché identica tranne qualche lieve irregolarità creatasi presumibilmente in fase di essiccamento del campione in stufa (Fig. 4.6).

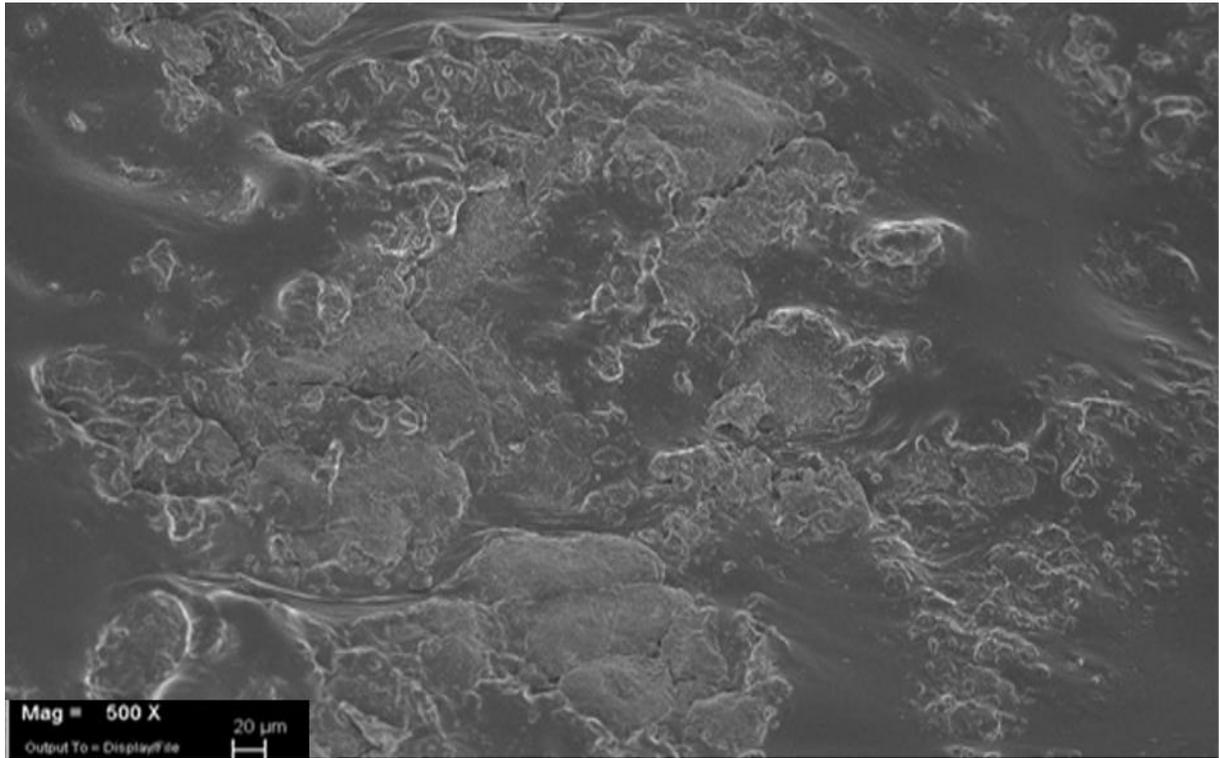
Queste immagini, oltre a testimoniare gli effetti dell'azione dei microrganismi sulla struttura della NR, sono in linea con i risultati delle analisi microbiologiche sul suolo (Par. 4.1) e con le analisi respirometriche (Par. 4.2), che indicano i funghi, e in generale i microrganismi aerobi, come i microrganismi maggiormente in grado di sfruttare la NR come fonte di C e perciò identificabili come i principali responsabili della biodegradazione.

Osservando le immagini effettuate a 500 ingrandimenti (Fig. 4.8 e 4.9) possiamo invece correlare le modifiche morfologiche dei campioni di NR con le loro perdite di peso secco (Par. 4.3.1). Nella Fig. 4.10 è mostrata la superficie di un campione di NR incubato nel microcosmo CB+NR (Controllo biotico diversificato con aggiunta di NR, Par. 4.4) mentre nella seconda quella di un campione proveniente da un microcosmo della linea di biodegradazione: si può notare che nel primo caso sono presenti zone degradate (macchie irregolari in grigio chiaro) e zone ancora intatte (lisce e regolari in grigio scuro) mentre nella seconda (Fig. 4.9) si osserva solamente una superficie irregolare e porosa, completamente priva delle zone lisce, ad indicare come lo strato superficiale della NR sia stato interamente biodegradato.

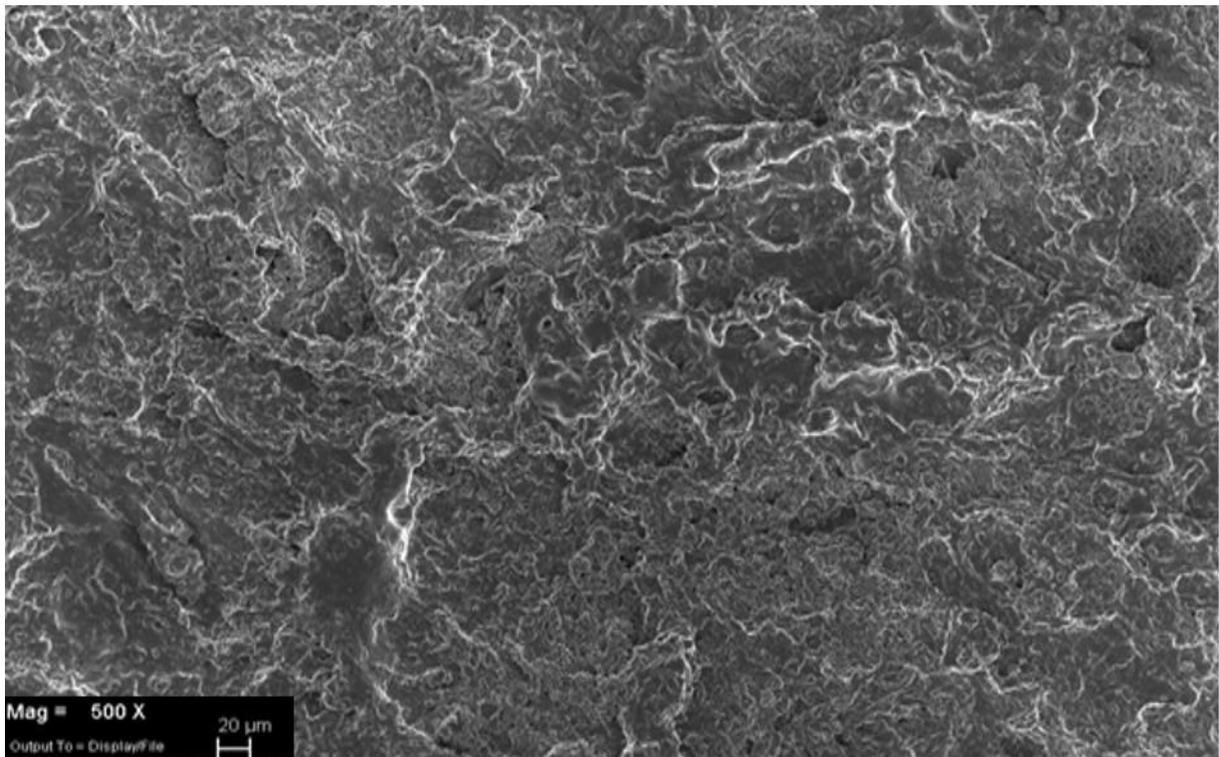
Queste osservazioni trovano riscontro nella differenza delle perdite di peso secco: a 168 giorni di incubazione i campioni di CB+NR hanno registrato una perdita di peso secco del 3,9% contro il 12,3% dei campioni incubati nei microcosmi della linea di biodegradazione (163° giorno).

---

<sup>18</sup> Jenings, D.H., Lysek, G., 1996, *Fungal Biology: Understanding the Fungal Lifestyle*, BIOS Scientific Publisher, Oxford, p. 63-65.



*Figura 4.8 NR incubata in CB+NR (500 ingrandimenti)*



*Figura 4.9 NR incubata in microcosmo di biodegradazione (500 ingrandimenti)*

#### *4.4 Diversificazione microcosmi della linea del controllo biotico*

Al 68esimo giorno di incubazione, giorno della quarta aggiunta di terreno CZ, è stata effettuata una diversificazione fra i 3 microcosmi della linea biotica per ottenere nuovi dati sperimentali:

- **Controllo Biotico 1** : lasciato tal quale
- **Controllo Biotico 2** : aggiunto un terreno CZ completo (sali inorganici e glucosio)
- **Controllo Biotico 3** : aggiunto un terreno CZ senza glucosio e 4 campioni di NR.

La modifica al controllo biotico 2 (**CB+G**) è stata realizzata con lo scopo di confrontare la produzione di CO<sub>2</sub> della biomassa avente una fonte di C facilmente metabolizzabile (glucosio) rispetto alla stessa biomassa avente solamente la NR come unica fonte di C (microcosmi della linea di biodegradazione).

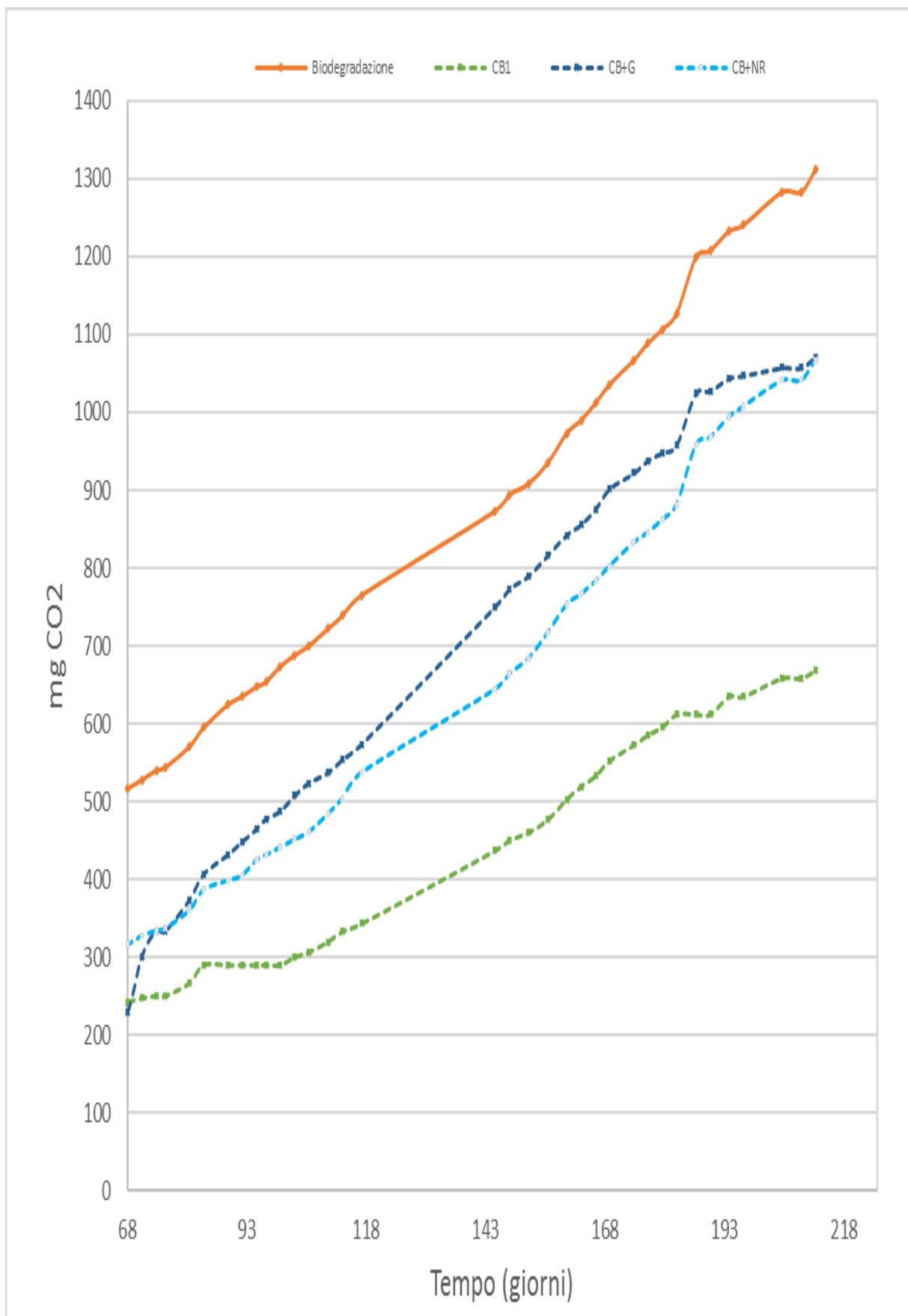
La modifica al controllo biotico 3 (**CB+NR**) invece ha avuto il fine di verificare se l'entità della biodegradazione sia correlabile alla quantità di biomassa presente nel suolo: dalle analisi microbiologiche (Par. 4.1) è risultato che nei microcosmi della linea del controllo biotico la quantità di microrganismi presenti nel suolo è diminuita nel tempo, mentre nei microcosmi della linea di biodegradazione è aumentata: in modo particolare sono aumentati i microrganismi di tipo fungino (+47 %).

##### *4.4.1 Analisi respirometriche*

Dal punto di vista della produzione di CO<sub>2</sub> CB+G e CB+NR hanno evidenziato differenze sostanziali sin dai primi giorni.

Dal grafico (Fig.4.10) si può osservare che il microcosmo CB+NR (curva azzurra) sin dall'inizio ha presentato un andamento di produzione di CO<sub>2</sub> analogo ai microcosmi della linea di biodegradazione. Il microcosmo CB+G (curva blu) invece ha inizialmente avuto un prevedibile incremento della produzione della CO<sub>2</sub>, dovuto principalmente all'aggiunta del glucosio, mostrando un andamento molto maggiore rispetto a quello di ogni microcosmo.

Il comportamento di CB+NR ci porta ad affermare che la NR rappresenta per la biomassa del suolo una fonte di C sempre disponibile, anche se non facilmente metabolizzabile. Il fatto che la produzione di CO<sub>2</sub> di una biomassa che effettua la biodegradazione sia comparabile con quella di una biomassa in carenza di glucosio e priva di NR da biodegradare (CB+G) è la prova che la biodegradazione è un fenomeno continuo ma molto lento.



**Figura 4.10** Andamento della produzione di CO2 dei microcosmi diversificati rispetto alla media dei tre della linea di biodegradazione

#### 4.4.2 Perdita di peso secco dei campioni di NR

Osservando l'andamento confrontabile delle respirometrie di CB+NR rispetto a quelle dei microcosmi della biodegradazione ci si aspetterebbe che gli effetti sul peso dei campioni incubati sia il medesimo ma ciò invece non avviene.

Il microcosmo CB+NR ha un valore di perdita di peso secco dei campioni di NR del 3,8% dopo 100 giorni, molto inferiore a quello ottenuto nel medesimo periodo nei microcosmi della linea di biodegradazione (15,5 %). Questo risultato conferma ciò che si è affermato nelle osservazioni delle immagini SEM relative ai campioni di NR del microcosmo CB+NR (Par. 4.3.2).

#### 4.5 Confronto con precedente sperimentazione

Per valutare i risultati ottenuti è utile confrontarli con quelli di una precedente sperimentazione<sup>19</sup>, nella quale sono state condotte prove analoghe in microcosmo (medesima tipologia di microcosmo, di NR e di analisi eseguite) ma con un suolo prelevato da un sito non rurale e non a contatto diretto con rifiuti contenenti gomma naturale (pneumatici).

I risultati presi in esame e messi a confronto sono quelli relativi alle analisi microbiologiche sul suolo, alle analisi respirometriche e alla variazione di peso secco dei campioni di NR.

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche il suolo utilizzato nella precedente sperimentazione ha mostrato valori di UFC/g molto inferiori rispetto a quelli del suolo usato in questo lavoro (Par. 4.1) (Tab. 4.8).

	Suolo rif. 19	Suolo presente lavoro
	UFC/g	
pH 4	1,67E+04	2,60E+05
pH 5	9,52E+04	1,40E+06

*Tabella 4.8 Valori di UFC/g relativi al suolo utilizzato nelle due sperimentazioni*

Nel presente lavoro, al 53esimo giorno di incubazione, i mg di CO<sub>2</sub> prodotta sono 415 (Par. 4.2 ; Tab. 8.8), contro i soli 234 della precedente esperienza. L'incremento risulta quindi del 77% ed è spiegabile dalla maggior presenza di microrganismi nel suolo.

In questa sperimentazione, già dal 42esimo giorno di incubazione i campioni di NR hanno mostrato una variazione di peso secco apprezzabile e quantificabile (5,5 % al 42° giorno) (Par. 4.3.1). Al contrario, nel lavoro precedente la variazione di peso secco dei campioni di NR non è stato possibile quantificarla, a causa dell'inadeguato metodo di lavaggio dei campioni per la rimozione dei residui di biomassa e suolo adesi ad essi. Questo fatto è indice di una variazione di peso molto bassa, dato che la stessa problematica si è presentata anche durante questa esperienza (Par. 4.3.1), dove però si sono sempre ottenuti risultati apprezzabili. Questo confronto permette quindi di affermare che l'utilizzo di un suolo avente un consorzio microbico numeroso, e selezionato nel tempo dal contatto con rifiuti contenenti NR, incrementa l'efficacia della biodegradazione della NR in suolo.

<sup>19</sup> Marco Barbalini, Roberto Mazzoli, Francesca Bosco, Giulio Malucelli, 2016, *Biodegradazione della gomma naturale ad opera di isolati fungini*, Università degli Studi di Torino.

## 5. Ipotesi di applicazione

Partendo dai dati ottenuti nella sperimentazione in microcosmo è possibile iniziare a ragionare su alcune ipotesi applicative che possano sfruttare il consorzio del suolo per effettuare la biodegradazione della NR.

Le considerazioni emerse di cui bisognerà tenere conto sono:

- La biodegradazione viene svolta prevalentemente dalla biomassa aerobia, specialmente funghi, perciò è indispensabile movimentare periodicamente il suolo per garantire un'omogenea distribuzione dell'O<sub>2</sub>
- Per i microrganismi la NR risulta essere una fonte di C da subito disponibile ma di difficile utilizzo, rendendo di fatto la biodegradazione un fenomeno continuo ma molto lento (ordine dei mesi).

Essendo la superficie specifica una delle principali variabili che controllano la resa di ogni fenomeno che coinvolga una fase solida granulosa, è necessario predisporre un sistema di pretrattamento della NR per ridurne la pezzatura. Per ridurre la pezzatura dei rifiuti di NR, i macchinari idonei a questo tipo di pretrattamento possono essere un *frantumatore a lame* o un *frantumatore a coltelli* per una prima diminuzione di dimensione; eventualmente se la pezzatura desiderata è molto piccola può essere impiegato un *molino a biglie*. In tutti questi passaggi la NR dovrà essere essiccata per diminuirne la viscosità e le proprietà abrasive.

Per effettuare lo scale-up dalla fase di laboratorio in microcosmo a una fase di sperimentazione più vicina alla realtà industriale si è scelto come modello di riferimento quello del *compostaggio industriale*, viste le numerose analogie fra i due sistemi:

- Fase solida statica e movimentabile meccanicamente
- Sono entrambi sistemi bioattivi il cui fine è la biodegradazione di macromolecole carboniose presenti nella fase solida
- In entrambi una buona aerazione è fondamentale per una crescita continua dei microrganismi responsabili della biodegradazione

Il compostaggio industriale è un processo che converte, tramite bioossidazione, i rifiuti umidi provenienti dalla raccolta differenziata in ammendante biologico destinato al settore agricolo; a volte questo processo può trattare in aggiunta ai rifiuti umidi anche fanghi provenienti dai sistemi di depurazione delle acque e dai digestori anaerobici. I rifiuti vengono ammassati in mucchi trapezoidali, chiamati *andane* (base 70x10 m; altezza 2 m); l'ossigenazione è forzata e viene garantita da delle bocchette poste su una canalina che attraversa tutto il basamento su cui poggiano i mucchi. Le andane inizialmente entrano in una prima fase mesofila (45 giorni) in cui avviene la degradazione dei composti più fermentescibili (proteine, carboidrati, lipidi) ad opera di batteri aerobi mesofili (18-25 °C) con la produzione di calore e CO<sub>2</sub>; il calore generato porta la temperatura intorno ai 50-70°C provocando l'abbassamento dell'umidità e ad una crescita di funghi termofili a discapito dei batteri mesofili. In queste condizioni inizia una seconda fase (150 giorni), detta termofila, in cui avviene il completamento dell'umificazione e della biodegradazione dei composti più complessi (ligno-cellulosici) ad opera di enzimi fungini appartenenti alla famiglia delle ossidoreduttasi (laccasi, lignino perossidasi). Durante tutta il processo il materiale solido viene movimentato meccanicamente con frequenza settimanale.

Sfruttando la grande versatilità di alimentazione e la comparsa durante il compostaggio di enzimi idrolitici in grado di agire sulle molecole di poliisoprene è possibile ipotizzare di aggiungere il suolo e la NR pretrattata alla consueta alimentazione del compostaggio avendo

come risultato sia l'ottenimento del compost che la biodegradazione della NR. Con questa procedura si avrebbero numerosi vantaggi non solo ambientali ma anche economici, dato che si abbinerebbero in un solo processo lo smaltimento di due tipologie di rifiuti. Tuttavia nel realizzarlo si andrebbe incontro a due problematiche che dovranno essere considerate:

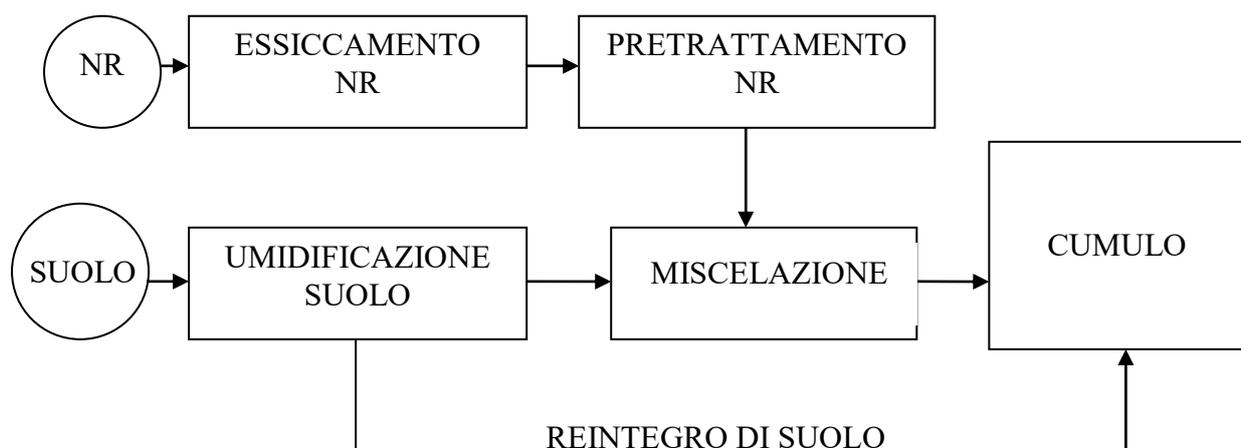
- la tossicità dei residui di NR non biodegradata che rimarrebbero nel compost che potrebbero comprometterne l'idoneità di utilizzo nella filiera agro-alimentare
- la possibile presenza nel compost di sostanze inquinanti e/o tossiche rilasciate dai microrganismi durante il processo di biodegradazione

Data l'esistenza di queste problematiche da approfondire è doveroso adottare una soluzione che non entri in nessun processo inerente alla filiera agro-alimentare.

Per realizzare ciò è necessario riadattare la tecnologia del compostaggio industriale rendendola il più simile possibile a ciò che è stato sperimentato in microcosmo: invece che con i rifiuti organici, il suolo viene umidificato, miscelato con NR pretrattata e incubato; il fine del processo non è più quello di ottenere un prodotto biocompatibile e commercializzabile ma solamente lo smaltimento della NR.

Dalle analisi respirometriche svolte sui microcosmi si è notato che per mantenere elevata la produzione di CO<sub>2</sub>, e di conseguenza la crescita della biomassa, non è sufficiente aggiungere nutrienti (vedere composizione terreno CZ al Par. 3.1) ma, dopo circa 3 mesi, si rende necessario reintegrare nuovo suolo con lo scopo di fornire nuova biomassa e nuove sostanze nutritive al consorzio microbico (Par. 4.2.1). In aggiunta a ciò la movimentazione del suolo sarà da eseguire più frequentemente (almeno ogni 4 giorni; Par. 4.2.2) rispetto a quanto avviene nel compostaggio dei rifiuti umidi (ogni 7-10 giorni) poiché la fase solida composta da quest'ultimi, avendo una maggior porosità rispetto al suolo, offre minor resistenza allo scambio di O<sub>2</sub> con l'aria.

Fissati questi accorgimenti è possibile tracciare un'ipotesi di schema di processo:



## 6. Conclusioni

Per verificare la possibilità di biodegradare NR in suolo è stata allestita una sperimentazione mediante l'incubazione di campioni di NR all'interno di microcosmi e monitoraggio dei parametri chimico-fisici controllanti la biodegradazione.

Dalle misure respirometriche si è constatato che la biomassa originaria del suolo utilizzato nel presente lavoro è in grado di sfruttare come fonte di C le macromolecole costituenti la NR, poiché la produzione di CO<sub>2</sub> dei microcosmi contenenti i campioni di NR è stata notevolmente superiore rispetto a quelli privi di essi.

Da analisi microbiologiche svolte sul suolo, a diversi tempi di incubazione, è risultato che è la biomassa aerobia, in particolare i funghi, quella in grado di compiere la via biodegradativa per sfruttare la NR come fonte di C. Il fatto che la biomassa del suolo che svolge la biodegradazione sia aerobia è testimoniato dal fatto che si è reso necessario frequentemente la movimentazione del suolo con lo scopo di ossigenarlo.

La determinazione della perdita di peso secco dei campioni incubati è stata un'ulteriore prova dell'azione biodegradativa ai danni della NR da parte del consorzio microbico del suolo: al 236esimo giorno di incubazione i campioni dei microcosmi della linea di biodegradazione hanno registrato una perdita di peso secco del 15,6 %, contro il 3,7 % di quelli appartenenti alla linea del controllo abiotico.

Le analisi al SEM hanno evidenziato le modifiche morfologiche subite dalla struttura dei campioni e si è potuto osservare che la biomassa fungina è in grado di penetrare nella gomma mediante la creazione di canali e ripiegamenti.

I risultati ottenuti hanno permesso di ipotizzare un'applicazione che, dalla scala di laboratorio, si avvicinasse il più possibile alla realtà industriale. Il sistema che permette di poter utilizzare il suolo tal quale, di movimentarlo facilmente, di garantirne una continua aerazione e di poter evitare l'uso di pretrattamenti chimici sulla NR è il *compostaggio industriale*, il quale è stato rivisto sostituendo l'alimentazione composta dai rifiuti umidi con rifiuti di NR essiccati e pretrattati meccanicamente per diminuirne la pezzatura.

## 7. Bibliografia

Marco Barbalini, Roberto Mazzoli, Francesca Bosco, Giulio Malucelli, 2016, *Biodegradazione della gomma naturale ad opera di isolati fungini*, Università degli Studi di Torino.

Robert Bourbonnais, Michael G. Paice, 1990, *Oxidation of non-phenolic substrates An expanded role for laccase in lignin biodegradation*, FEBS 08563, July 1990, Vol. 267, No 1, p. 99-102.

Briassoulis D., 2005, *The effects of tensile stress and the agrochemicals Vapam on the ageing of low density polyethylene (LDPE) agricultural film*. Part I. Mechanical behavior, *Polymer Degradation and Stability*, 88(3), 489-503.

Cai D., Tien M., 1991, *Lignin Peroxidase of Phanerochete chrysosporium*, *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 14464-14469.

D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Di Mattia E., Giovannozzi Sermanni G., 1996, *Substrate specificity and properties of laccase from *Lentinus edodes**, *Acta Biotechnologica*, 16: 257-270.

Eggs, H.O.W., Oxley, T.A., 2001. *Biodeterioration and biodegradation*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 48, 12–15.

Ivana Eichlerová, Jaroslav Šnajdr, Petr Baldrian, 2012, *Laccase activity in soils: Considerations for the measurement of enzyme activity*, *Chemosphere* 88 (2012) 1154–1160.

Alexander Fainleib, 2013, *Degradation of Non-vulcanized Natural Rubber – Renewable Resource for Fine Chemicals Used in Polymer Synthesis*, *Polímeros*, vol. 23, n. 4, p. 441-450. [<http://dx.doi.org/10.4322/polimeros.2013.070>]

Rod M. Heisey, Spiro Papadatos, 1995, *Isolation of Microorganisms Able To Metabolize Purified Natural Rubber*, *Applied and Environmental Microbiology*, August 1995, Vol. 61, No 8, p. 3092–3097.

Dieter Jendrossek, Gianpaolo Tomasi, Reiner M. Kroppenstedt, February 1997, *Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes?*, *FEMS Microbiology Letters*, 150, p. 179-188.

Abid Ali Khan, Nafees Bacha, Bashir Ahmad, Ghosia Lutfullah, Umar Farooq, Russell John Cox, 2014, *Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites*, *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(11): 859-870. [doi: 10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230]

Li K.C., Xu F., Eriksson K.E.L., 1999, *Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of nonphenolic lignin model compound*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2654-2660.

Alexandros Linos, Mahmoud M. Berekaa, Rudolf Reichelt, Ulrike Keller, Jurgen Schmitt, Hans-Curt Flemming, Reiner M. Kroppenstedt, Alexander Steinbuchel, April 2000, *Biodegradation of cis-1,4-Polyisoprene Rubbers by Distinct Actinomycetes: Microbial Strategies and Detailed Surface Analysis*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No 4, p. 1639-1645.

Nathalie Lucas, Christophe Bienaime, Christian Belloy, Michèle Queneudec, Françoise Silvestre, José-Edmundo Nava-Saucedo, September 2008, *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques*, Chemosphere Volume 73, Issue 4, September 2008, Pages 429-442. [doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064]

Miessner M., Crescenzi O., Napoletano A., Porta G., Andersen S.O., Peter M.G., 1991, *Biphenyl-tetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinol with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticole sclerotization*, Helvetica Chimica Acta, 74: 1205-1212.

Raffaella Morelli, Antonella Leone, Anna Alfani, 2015, *Degradazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in suoli contaminati*, Università degli Studi di Salerno. [http://hdl.handle.net/10556/1758]

Nayanashree.G, September 2013, *Natural rubber degradation by Aspergillus niger and Penicillium sp*, International Journal of Recent Scientific Research, Vol. 4, Issue, 9, pp.1337-1341.

Jean Pelmont, December 1995, *Enzymes: Catalyseurs du monde vivant* (2° ed.), EDP Sciences.

Aamer Ali Shah, Fariha Hasan, Ziaullah Shah, Nida Kanwal, Samia Zeb, 2013, *Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review*, International Biodeterioration & Biodegradation 83 (2013) 145e157. [https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.004]

S.Singh, W.Nimmo, B.M.Gibbs, P.T.Williams, December 2009, *Waste tyre rubber as a secondary fuel for power plants*, Science Direct, Volume 88, Issue 12, Pages 2473-2480. [doi.org/10.1016/j.fuel.2009.02.026]

D. Slomczynski, J. P. Nakas, S. W. Tanenbaum, 1995, *Production and Characterization of Laccase from Botrytis cinerea* 61-34, Applied and Environmental Microbiology, Mar. 1995, Vol 61, No 3, p. 907–912.

Yue Wu, Ying Jiang, Jiaguo Jiao, Manqiang Liu, Feng Hu, Bryan S. Griffith, Huixin Li, 2014, *Adsorption of Trametes versicolor laccase to soil iron and aluminum minerals: Enzyme activity, kinetics and stability studies*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 114 (2014) 342-348.

Meral Yikmis, Alexander Steinbüchel, July 2012, *Historical and Recent Achievements in the Field of Microbial Degradation of Natural and Synthetic Rubber*, Applied and Environmental Microbiology, Volume 78, No 13, p. 4543–4551.

## 8. Appendice

**Tabella 8.1** Risultati prove microbiologiche metodo diluizioni successive con inoculo di superficie - suolo non incubato

pH	Diluizione	UFC	UFC/mL	UFC/50g	UFC/g	Media
pH 5	100	118	59000	29500000	5,9E+05	<b>3,9E+06</b>
	1000	34	167500	83750000	1,7E+06	
	10000	19	950000	475000000	9,5E+06	
pH 4	100	28	13850	6925000	1,4E+05	<b>5,1E+05</b>
	1000	8	38500	19250000	3,9E+05	
	10000	2	100000	50000000	1,0E+06	

**Tabella 8.2** Risultati prove microbiologiche metodo diluizioni successive con inoculo ad inclusione - suolo non incubato

pH	Diluizione	UFC	UFC/mL	UFC/50g	UFC/g	Media
pH 5	100	49	9860	1972000	3,9E+04	<b>1,6E+05</b>
	1000	18	36600	7320000	1,5E+05	
	10000	4	74000	14800000	3,0E+05	
pH 4	100	17	3320	664000	1,3E+04	<b>1,2E+04</b>
	1000	3	6000	1200000	2,4E+04	
	10000	0	0	0	0,0E+00	

**Tabella 8.3** Risultati prove microbiologiche metodo capsule di suolo - suolo non incubato

pH	mg suolo	UFC	UFC/g	UFC/g
pH 4	50	104	106	2,10E+03
	100	140	153	1,47E+03
pH 5	50	54	44	9,80E+02
	100	100	110	1,05E+03

**Tabella 8.4** Risultati prove microbiologiche metodo diluizioni successive con inoculo di superficie - suolo incubato 97 giorni - linea di controllo biotico

Microcosmo	pH	Diluizione	UFC	UFC/mL	UFC/8g	UFC/g	Media		
CB 1	pH 4	100	2	1000	125000	1,6E+04	<b>4,0E+05</b>		
		1000	0	0	0	0,0E+00			
		5000	0	0	0	0,0E+00			
		10000	1	50000	6250000	7,8E+05			
	pH 5	100	71	35500	4437500	5,5E+05	<b>4,7E+05</b>		
		1000	5	25000	3125000	3,9E+05			
		5000	0	0	0	0,0E+00			
		10000	0	0	0	0,0E+00			
		<hr/>							
		100	5	2500	312500	3,9E+04		<b>5,9E+04</b>	
pH 4	1000	1	5000	625000	7,8E+04				
	5000	0	0	0	0,0E+00				
	10000	0	0	0	0,0E+00				
pH 5	100	107	53500	6687500	8,4E+05	<b>2,3E+06</b>			
	1000	24	120000	15000000	1,9E+06				
	5000	7	175000	21875000	2,7E+06				
	10000	5	250000	31250000	3,9E+06				
<hr/>									
CB 3	pH 4	100	4	2000	250000	3,1E+04	<b>5,5E+04</b>		
		1000	1	5000	625000	7,8E+04			
		5000	0	0	0	0,0E+00			
		10000	0	0	0	0,0E+00			
	pH 5	100	104	52000	6500000	8,1E+05	<b>5,8E+05</b>		
		1000	7	35000	4375000	5,5E+05			
		5000	1	25000	3125000	3,9E+05			
		10000	0	0	0	0,0E+00			

**Tabella 8.5** Risultati prove microbiologiche metodo diluizioni successive con inoculo di superficie - suolo incubato 97 giorni - linea di biodegradazione

Microcosmo	pH	Diluizione	UFC	UFC/mL	UFC/8g	UFC/g	Media
BIOD 1	pH 4	100	24	12000	1500000	1,9E+05	<b>3,4E+05</b>
		1000	5	25000	3125000	3,9E+05	
		5000	0	0	0	0,0E+00	
		10000	1	50000	6250000	7,8E+05	
	pH 5	100	154	77000	9625000	1,2E+06	<b>1,7E+06</b>
		1000	28	140000	17500000	2,2E+06	
		5000	7	175000	21875000	2,7E+06	
		10000	1	50000	6250000	7,8E+05	
BIOD 2	pH 4	100	94	47000	5875000	7,3E+05	<b>1,0E+06</b>
		1000	4	20000	2500000	3,1E+05	
		5000	2	50000	6250000	7,8E+05	
		10000	3	150000	18750000	2,3E+06	
	pH 5	100	187	93500	11687500	1,5E+06	<b>2,0E+06</b>
		1000	32	160000	20000000	2,5E+06	
		5000	4	100000	12500000	1,6E+06	
		10000	3	150000	18750000	2,3E+06	
BIOD 3	pH 4	100	15	7500	937500	1,2E+05	<b>2,4E+05</b>
		1000	1	5000	625000	7,8E+04	
		5000	0	0	0	0,0E+00	
		10000	1	50000	6250000	7,8E+05	
	pH 5	100	112	56000	7000000	8,8E+05	<b>1,1E+06</b>
		1000	12	60000	7500000	9,4E+05	
		5000	4	100000	12500000	1,6E+06	
		10000	0	0	0	0,0E+00	

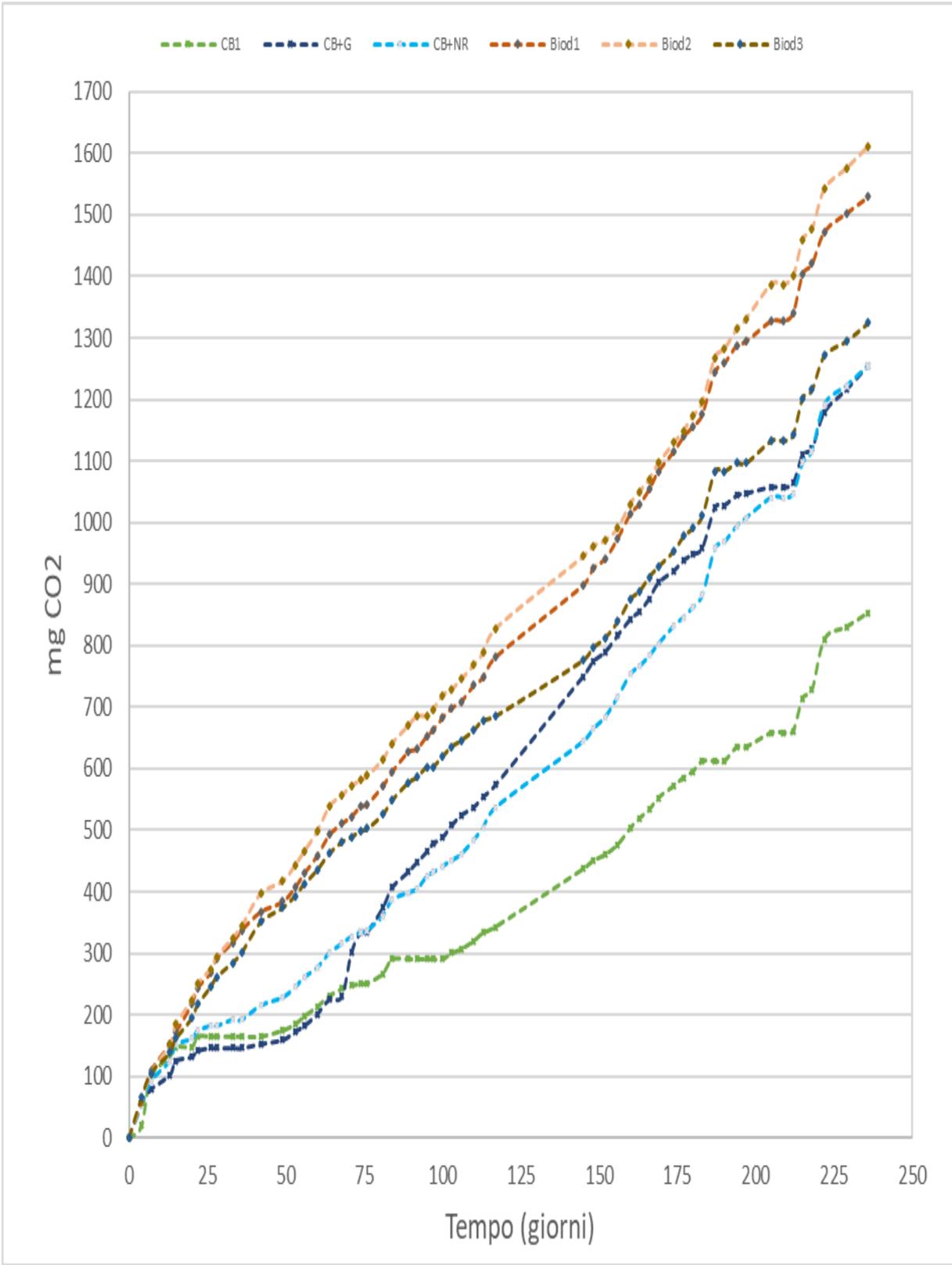
**Tabella 8.6** Risultati prove microbiologiche metodo diluizioni successive con inoculo ad inclusione - suolo incubato 97 giorni - linea di controllo biotico

Microcosmo	pH	Diluizione	UFC	UFC/mL	UFC/8g	UFC/g	Media		
CB 1	pH 4	100	4	800	100000	1,3E+04	<b>1,3E+04</b>		
		1000	0	0	0	0,0E+00			
		5000	0	0	0	0,0E+00			
		10000	0	0	0	0,0E+00			
	pH 5	100	90	18000	2250000	2,8E+05	<b>2,5E+05</b>		
		1000	10	20000	2500000	3,1E+05			
		5000	1	10000	1250000	1,6E+05			
		10000	0	0	0	0,0E+00			
		<hr/>							
		CB 2	pH 4	100	11	2200		275000	3,4E+04
1000	0			0	0	0,0E+00			
5000	0			0	0	0,0E+00			
10000	0			0	0	0,0E+00			
pH 5	100		228	45600	5700000	7,1E+05	<b>8,9E+05</b>		
	1000		41	82000	10250000	1,3E+06			
	5000		6	60000	7500000	9,4E+05			
	10000		2	40000	5000000	6,3E+05			
	<hr/>								
	CB 3		pH 4	100	0	0		0	0,0E+00
1000		0		0	0	0,0E+00			
5000		0		0	0	0,0E+00			
10000		0		0	0	0,0E+00			
pH 5		100	85	17000	2125000	2,7E+05	<b>2,7E+05</b>		
		1000	9	18000	2250000	2,8E+05			
		5000	0	0	0	0,0E+00			
		10000	0	0	0	0,0E+00			

**Tabella 8.7** Risultati prove microbiologiche metodo diluizioni successive con inoculo ad inclusione - suolo incubato 97 giorni - linea di biodegradazione

Microcosmo	pH	Diluizione	UFC	UFC/mL	UFC/8g	UFC/g	Media		
BIOD 1	pH 4	100	14	2800	350000	4,4E+04	<b>4,4E+04</b>		
		1000	0	0	0	0,0E+00			
		5000	0	0	0	0,0E+00			
		10000	0	0	0	0,0E+00			
	pH 5	100	304	60800	7600000	9,5E+05	<b>6,3E+05</b>		
		1000	15	30000	3750000	4,7E+05			
		5000	5	50000	6250000	7,8E+05			
		10000	1	20000	2500000	3,1E+05			
		<hr/>							
		BIOD 2	pH 4	100	198	39600		4950000	6,2E+05
1000	0			0	0	0,0E+00			
5000	0			0	0	0,0E+00			
10000	0			0	0	0,0E+00			
pH 5	100		288	57600	7200000	9,0E+05	<b>1,1E+06</b>		
	1000		38	76000	9500000	1,2E+06			
	5000		6	60000	7500000	9,4E+05			
	10000		5	100000	12500000	1,6E+06			
	<hr/>								
	BIOD 3		pH 4	100	4	800		100000	1,3E+04
1000		0		0	0	0,0E+00			
5000		0		0	0	0,0E+00			
10000		0		0	0	0,0E+00			
pH 5		100	103	20600	2575000	3,2E+05	<b>2,4E+05</b>		
		1000	6	12000	1500000	1,9E+05			
		5000	1	10000	1250000	1,6E+05			
		10000	1	20000	2500000	3,1E+05			

**Figura 8.1** *Andamento della produzione di CO2 per ogni microcosmo*



**Tabella 8.8** Risultati analisi respirometriche di ogni microcosmo

Tempo (giorni)	CB 1	CB+G	CB+NR	BIOD 1	BIOD 2	BIOD 3
0	0	0	0	0	0	0
4	19,8	56,1	52,8	59,4	59,4	66,0
7	99,0	79,2	92,4	108,9	105,6	105,6
13	132,0	102,3	125,4	151,8	151,8	138,6
15	148,5	125,4	151,8	171,6	184,8	161,7
20	148,5	132,0	161,7	217,8	224,4	194,7
22	165,0	141,9	174,9	244,2	250,8	217,8
26	165,0	146,3	182,6	268,4	275,0	245,3
28	165,0	146,3	182,6	291,5	294,8	261,8
33	165,0	146,3	192,5	317,9	324,5	284,9
36	165,0	146,3	192,5	337,7	344,3	301,4
42	165,0	152,9	215,6	367,4	397,1	350,9
49	174,9	159,5	228,8	383,9	416,9	374,0
53	184,8	172,7	245,3	407,0	443,3	393,8
56	198,0	182,6	261,8	430,1	466,4	413,6
60	212,9	200,8	276,7	458,2	497,8	435,0
64	231,0	225,5	301,4	492,8	539,0	463,1
68*	242,6	230,5	316,3	511,0	557,2	481,3
71	247,5	301,4	327,8	522,5	572,0	489,5
74	250,8	334,4	334,4	539,0	581,9	499,4
76	250,8	334,4	337,7	542,3	588,5	502,7
81	267,3	374,0	360,8	572,0	614,9	525,8
84	290,4	407,0	387,2	595,1	641,3	548,9
89	290,4	431,8	398,8	626,5	669,4	577,0
92	290,4	448,3	405,4	633,0	685,9	586,9
95	290,4	464,8	425,2	652,9	685,9	603,4
97	290,4	478,0	431,8	662,8	695,8	603,4
100	290,4	487,9	441,7	682,6	718,9	619,9
103	300,3	507,7	451,6	699,0	728,8	636,4
106	306,9	524,2	461,5	709,0	745,3	646,3
110	320,1	537,4	484,6	735,4	768,4	662,8
113	333,3	553,9	504,4	748,6	788,2	679,3
117	343,2	573,7	537,4	781,6	827,8	685,9
145	437,3	750,2	644,6	898,7	944,9	776,6
148	450,5	773,3	664,4	925,1	961,4	796,4
152	460,4	789,8	684,2	941,6	971,3	812,9
156	476,9	816,2	717,2	974,6	991,1	839,3
160	503,3	842,6	753,5	1014,2	1030,7	875,6
163	519,8	855,8	766,7	1030,7	1050,5	888,8
166	533,0	875,6	783,2	1053,8	1070,3	911,9
169	552,8	902,0	803,0	1083,5	1096,7	928,4
174	572,6	921,8	832,7	1116,5	1129,7	954,8

177	585,8	938,3	845,9	1139,6	1149,5	977,9
180	595,7	948,2	862,4	1156,1	1172,6	991,1
183	612,2	958,1	882,2	1175,9	1195,7	1010,9
187	612,2	1024,1	958,1	1245,2	1268,3	1083,5
190	612,2	1027,4	968,0	1258,4	1281,5	1083,5
194	635,3	1043,9	994,4	1288,1	1314,5	1096,7
197	635,3	1047,2	1007,6	1294,7	1331,0	1096,7
205	658,4	1057,1	1040,6	1327,7	1387,1	1133,0
209	658,4	1057,1	1040,6	1327,7	1387,1	1133,0
212	661,7	1063,7	1047,2	1340,9	1400,3	1142,9
215	714,5	1109,9	1096,7	1403,6	1459,7	1202,3
218	727,7	1119,8	1116,5	1420,1	1476,2	1215,5
222	810,2	1179,2	1192,4	1472,9	1542,2	1271,6
236	853,1	1255,1	1255,1	1529,0	1611,5	1324,4

\*giorno in cui è stata effettuata la diversificazione (Par. 4.4)