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

Effetto della liofilizzazione sul biodeterioramento della carta alluvionata

Relatori

prof. Davide Fissore
prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Maddalena Lucchese

Marzo 2019

Indice

1. Introduzione....3
1.1 La liofilizzazione....3
1.2 La liofilizzazione applicata a materiale cartaceo allagato....6
1.3 Contaminazione microbica....9
1.4 La liofilizzazione come tecnica per il controllo della crescita microbica....14
1.5 Scopo del lavoro....16
2.Materiali e metodologie sperimentali....17
2.1 Caso di studio....17
2.2 Preparazione dei campioni....17
2.2.1 Coltura dei microrganismi....17
2.2.2 Inoculo dei microrganismi sulla carta....18
2.2.3 Immersione dei blocchetti di carta....20
2.2.4 Composizione dei campioni....22
2.3 Modalità di conduzione delle prove....24
2.3.1 Congelamento in freezer....24
2.3.2 Congelamento nel liofilizzatore....25
2.2.3 Scongelamento dei campioni....25
2.2.4 La liofilizzazione....25
2.4 Analisi microbiologiche dei campioni....26
3.Risultati e commenti....27
3.1 Messa a punto delle metodologie sperimentali....27
3.1.1 Prove preliminari di inoculo sulla carta....27
3.1.2 Prove preliminari di immersione....29
3.1.3 Prove preliminari di composizione dei campioni....30
3.1.4 Prove preliminari di liofilizzazione....31
3.2 Pesi dei campioni post-immersione e post-essiccamento....36
3.2.1 Immersione....36
3.2.2 Essiccamento....37
3.3 Durata dell'essiccamento primario....38
3.4 Effetto del congelamento sulla crescita microbica....40
3.4.1 Congelamento in freezer....40
3.4.2 Congelamento in liofilizzatore a -40°C....45
3.4.3 Congelamento in liofilizzatore a -20°C....48

3.4.4 Confronto tra le due modalità di congelamento in liofilizzatore.....51
3.4.5 Confronto tra il congelamento a -20°C in freezer e in liofilizzatore.....52
3.5 Effetto della velocità di sublimazione.....53
3.5.1 Essiccamento a bassa velocità di sublimazione.....53
3.5.2 Essiccamento ad alta velocità di sublimazione.....56
3.5.3 Confronto tra le diverse velocità di sublimazione.....59
3.5.4 Confronto dell'essiccamento a bassa velocità di sublimazione con il congelamento 60
3.6 Effetto della liofilizzazione.....60
3.6.1 Liofilizzazione con congelamento a -40°C.....60
3.6.2 Liofilizzazione con congelamento a -20°C.....64
3.6.3 Confronto tra liofilizzazione e congelamento a -40°C.....67
3.6.4 Confrontro tra liofilizzazione e congelamento a -20°C.....68
4. Conclusioni.....69
5. Bibliografia.....71
6. Ringraziamenti.....73

1. Introduzione

1.1 La liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo di essiccamento nel quale un liquido, generalmente acqua, viene allontanato da un prodotto tramite sublimazione.

Alla base del processo vi è quindi il passaggio dell'acqua dallo stato solido allo stato vapore, senza passare per lo stato liquido. Questo è reso possibile dal connubio di due condizioni operative: la pressione e la temperatura.

Questo aspetto può essere compreso analizzando il diagramma di stato dell'acqua che riporta, in funzione della pressione e della temperatura, lo stato fisico corrispondente (Figura 1.1).

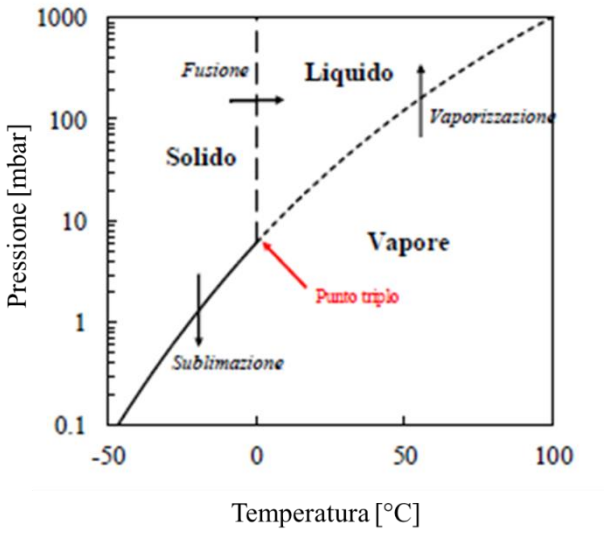

Figura 1. 1: Diagramma di stato dell'acqua (figura tratta da Fissore et al., 2017, con modifiche)

Il punto in cui coesistono i tre stati fisici, detto anche punto triplo, si trova a 0°C e 6.117 mbar. Rimanendo al di sotto di questo punto si ha il passaggio dallo stato solido a quello vapore, senza possibilità di formazione di acqua allo stato liquido.

Il processo di liofilizzazione prevede tre fasi distinte: una prima fase di congelamento, un essiccamento primario e, infine, qualora necessario, un essiccamento secondario. Durante la prima fase il prodotto viene fatto congelare a pressione atmosferica; successivamente, la pressione viene abbassata per permettere la sublimazione del ghiaccio.

Il prodotto viene caricato nella camera di essiccamento sopra dei ripiani, all'interno dei quali scorre un fluido tecnologico che abbassa la temperatura al di sotto del punto di

congelamento. In realtà non tutta l'acqua congela: una piccola frazione, detta acqua legata, rimane adsorbita allo stato liquido nel prodotto.

Il congelamento è una fase molto importante perché le sue modalità vanno a determinare la durata delle fasi successive. Queste dipendono, infatti, dalle dimensioni dei cristalli di ghiaccio: l'ottenimento di cristalli grandi fa diminuire la durata dell'essicamento primario, in quanto diminuisce la resistenza al flusso di vapore offerta dallo strato essiccato. Ciò accade perché i pori dello strato essiccato, attraverso i quali il vapore fluisce, corrispondono ai cristalli di ghiaccio che scompaiono col procedere dell'essiccamento. Cristalli di ghiaccio di grandi dimensioni possono essere ottenuti con una bassa velocità di congelamento; al contrario, cristalli di dimensioni minori si ottengono con alte velocità di congelamento.

Durante l'essicamento primario la pressione viene ridotta al fine di permettere la sublimazione del ghiaccio. Questo è un processo endotermico, che richiede quindi energia, la quale viene fornita dal fluido tecnologico che scorre all'interno dei ripiani e, in parte, anche dall'irraggiamento dalle pareti della camera. In questa fase si forma una superficie di separazione tra il prodotto congelato e quello essiccato: il ghiaccio sublima a partire da questa interfaccia, detta appunto interfaccia di sublimazione. A mano a mano che il processo continua lo spessore del prodotto congelato diminuisce, mentre aumenta quello del prodotto essiccato (Figura 1.2).

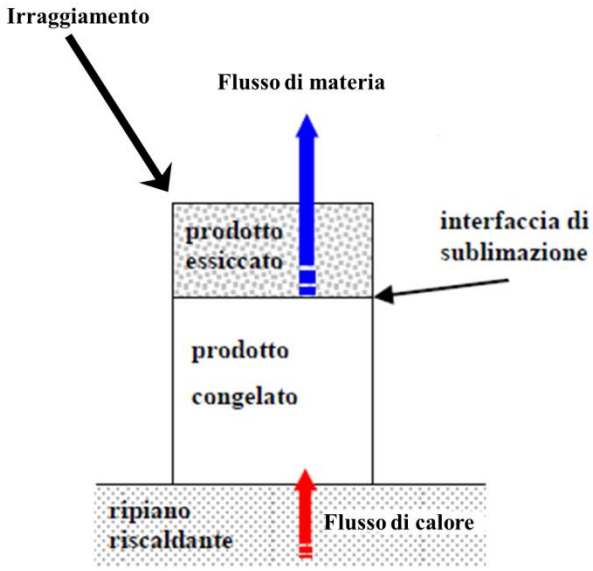

Figura 1. 2: Schema del prodotto nella fase di essiccamento (figura tratta da Fissore et al., 2017, con modifiche)

Durante l'essiccamento primario la pressione e la temperatura non possono assumere valori qualsiasi al di sotto del punto triplo. Questo perché, per avere sufficiente "forza spingente" per il flusso di materia all'ambiente esterno, è necessario che la pressione all'interfaccia di sublimazione sia superiore alla pressione nell'ambiente. Se quest'ultima

assumesse un valore pari a quella del punto triplo, all'interfaccia di sublimazione si avrebbe una pressione maggiore, per cui il ghiaccio potrebbe fondere. È necessario, quindi, operare a una pressione inferiore a 6.117 mbar.

Il flusso di materia è influenzato da vari fattori ed è descrivibile attraverso l'equazione 1.1:

$$J_w = \frac{1}{R_p} (p_{w,i} - p_{w,c}) \quad (1.1)$$

dove J_w è il flusso di sublimazione dell'acqua, R_p è la resistenza dello strato secco, $p_{w,i}$ è la tensione di vapore del ghiaccio all'interfaccia di sublimazione e $p_{w,c}$ è il valore di pressione parziale del vapore in camera, in genere assunto pari al valore di pressione in camera, essendo l'atmosfera contenuta in camera pressoché completamente costituita da vapore d'acqua. Il termine $p_{w,i}$ dipende dalla temperatura dell'interfaccia di sublimazione e aumenta all'aumentare di questa. Il termine R_p, invece, è funzione dello spessore dello strato secco. Dall'equazione 1.1 si evince che il flusso di sublimazione aumenta all'aumentare della temperatura del prodotto e, di conseguenza, diminuisce la durata dell'essiccamento primario.

Una volta eliminata l'acqua libera inizia l'essiccamento secondario, ovvero l'ultima fase del processo, che vede la rimozione dell'acqua legata. La temperatura viene ulteriormente aumentata al fine di rimuovere questa piccola frazione di acqua non congelata e di ottenere l'umidità residua del prodotto desiderata.

La pressione all'interno della camera di essiccamento viene mantenuta al valore desiderato mediante una pompa da vuoto.

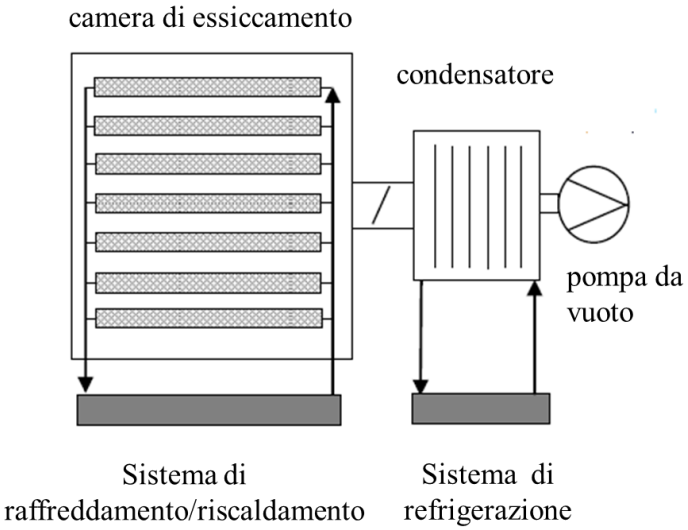

Figura 1. 3: schema di un'apparecchiatura per il processo di liofilizzazione (figura tratta da Fissore et al., 2017, con modifiche)

Tra la camera di essiccamento e la pompa si trova un condensatore che raccoglie il vapore acqueo prodotto durante la sublimazione, dove viene fatto brinare per contatto con una

superficie fredda. In questo modo il condensatore riduce la portata volumetrica di gas che la pompa da vuoto deve aspirare (Figura 1.3).

L'apparecchiatura è anche in genere dotata di due sensori che valutano la pressione in camera: un manometro capacitivo e una sonda termoconduttiva. Il primo permette di misurare la pressione totale, mentre il secondo misura un valore di pressione influenzato dalla composizione dell'atmosfera in camera.

La fine dell'essiccamento primario può essere quindi valutata attraverso il rapporto dei valori forniti da questi due sensori. Il valore misurato dalla sonda termoconduttiva avrà un andamento iniziale costante, per poi scendere, fino al raggiungimento di un asintoto orizzontale. Quando questo accade le due sonde registrano lo stesso valore di pressione, e ciò sta ad indicare l'assenza di vapore acqueo in camera. Un altro metodo per determinare la fine dell'essiccamento è quello di monitorare la temperatura del prodotto attraverso le misure ottenute con le termocoppie messe all'interno del prodotto. L'essiccamento primario sarà concluso quando la temperatura del prodotto eguaglia quella dei ripiani.

1.2 La liofilizzazione applicata a materiale cartaceo allagato

La problematica del recupero dei beni culturali cartacei danneggiati dall'acqua è stata portata alla luce a seguito di disastri ambientali quali alluvioni, piogge torrenziali o allagamenti dovuti a rotture idrauliche. In tutti i casi i danni possono essere notevoli.

La carta è fortemente igroscopica: la carta prodotta prima della metà del diciannovesimo secolo è in grado di assorbire più dell'80% del suo peso originale. La carta moderna, quella cioè prodotta dopo la metà del diciannovesimo secolo, essendo trattata con della colla resistente all'acqua, riesce ad assorbire una media del 60% del suo peso (McCleary, 1987).

I danni subiti dal materiale cartaceo allagato consistono principalmente in rigonfiamento, adesione delle pagine, migrazione dell'inchiostro, e contaminazione microbiologica (Capolongo e Barresi, 2004).

Le prime tecniche di asciugatura di beni librari prevedevano l'uso di ambienti ventilati e di fogli assorbenti, posizionati tra una pagina e la successiva. In alternativa, vi erano a disposizione armadi essiccatori a circolazione forzata d'aria, con la conseguente necessità di spazi molto ampi, numerosa manodopera, molti fogli assorbenti e tempi molto lunghi di recupero (Fissore et al., 2017).

Il tempo è, infatti, uno dei principali fattori da considerare nell'affrontare questo tipo di problematiche, in quanto maggiore è il tempo di contatto della carta con l'acqua, maggiore sarà la probabilità di contaminazione e crescita microbica.

A partire da questo, tecniche alternative sono quindi state prese in considerazione per il recupero di beni cartacei e archivistici allagati, tra le quali spicca la liofilizzazione. Questa tecnica, oltre a permettere il recupero di grandi quantitativi di materiale in tempi più brevi, consente anche la completa rimozione dell'acqua assorbita senza provocare ulteriori danni alla carta.

I beni archivistici e librari sono costituiti da più materiali che coesistono, quali carta, pergamena, pelle, cuoio ed altri, che possiedono caratteristiche diverse. Per questo motivo i processi utilizzati per la sola carta potrebbero non essere corretti per gli altri materiali. Bisogna inoltre ricordare che il materiale da recuperare necessita solo di un'asciugatura e non di una completa disidratazione, per cui l'essiccamento si ferma generalmente alla rimozione della sola acqua libera. Potrebbe inoltre rendersi necessario, al termine dell'essiccamento primario, un mantenimento del prodotto liofilizzato in un ambiente a temperatura e umidità controllata, in modo da riportare il materiale al valore di umidità desiderato (Fissore et al., 2017).

Nel corso della storia recente numerosi sono stati i casi di recupero di grossi quantitativi di materiale cartaceo alluvionato, a seguito di incendi o allagamenti, per mezzo della liofilizzazione. I primi casi di utilizzo di questa tecnica si ritrovano, a partire dagli anni '70, in America, a seguito di uragani, incendi e allagamenti di librerie e archivi. McCleary (1987) riporta che già nel 1972, a seguito di un uragano nella zona di New York, si decise di recuperare una parte del materiale alluvionato attraverso la liofilizzazione, salvandone il 95%. Sempre nel 1972 in Pennsylvania circa 150000 volumi furono danneggiati dall'acqua utilizzata per spegnere l'incendio divampato in una biblioteca. Si decise di congelare 30000 volumi a -30°C, per poi essiccarli in una camera di essiccamento per 5 giorni. Nel 1973 a St. Louis in un archivio divampò un incendio che richiese l'apporto di circa 272400 litri al minuto di acqua. Si utilizzò la liofilizzazione per recuperare circa 1960 m^3 di materiale, per un totale di 7200 kg di acqua rimossa per ogni carico effettuato in camera di essiccamento. Un altro caso riportato è quello dell'allagamento della libreria della Stanford University (California) nel 1978, che coinvolse più di 50000 volumi. Questi furono subito congelati a -28.9°C, poi liofilizzati in svariate camere di essiccamento disponibili in zona. Al termine dell'anno le operazioni furono concluse con il recupero e il restauro, quando necessario, del materiale e con la perdita di solo 34 volumi, irrimediabilmente danneggiati dall'acqua.

La liofilizzazione come tecnica per il recupero di beni archivistici e librari allagati è quindi stata oggetto di numerosi studi riportati in letteratura. Lo scopo di questi è stato, in genere, quello di valutarne sia l'efficacia sia gli eventuali danni che potrebbe provocare alla carta.

Fissore et al. (2017) ha incentrato lo studio sull'effetto del processo di liofilizzazione su campioni di varie epoche. I campioni testati sono stati precedentemente bagnati e poi introdotti in camera di essiccamento a pressione e temperatura dei ripiani controllata. I risultati ottenuti hanno mostrato che alla fine del processo i volumi si sono riportati alle condizioni che hanno preceduto l'allagamento, senza riportare cambi di forma significativi. I minimi cambiamenti riscontrati a valle del processo, quali l'aumento del volume e la migrazione di colori, sono attribuibili al contatto prolungato del campione di materiale con l'acqua. Per questo motivo si rende necessario congelare i beni alluvionati il prima possibile. Al termine del processo alcuni campioni estratti mostravano un nucleo di ghiaccio centrale, che successivamente si è sciolto a temperatura ambiente, senza provocare ulteriori danni. La formazione di questo nucleo centrale è dovuta al riscaldamento del prodotto (durante l'essiccamento primario) che avviene anche per irraggiamento delle pareti, facendo procedere la liofilizzazione anche dalle superfici laterali del campione e non solamente dalla superficie superiore. Col procedere del processo la velocità di allontanamento dell'acqua diminuisce significativamente, andando ad aumentare lo spessore del materiale essiccato attraverso il quale il vapore ha da fluire, e può essere quindi ammissibile lasciare un piccolo quantitativo di ghiaccio al centro del

campione, verificato che la sua fusione, a processo completato, non vada a compromettere la qualità del prodotto finale.

Figura 1. 4: Effetto della liofilizzazione sul materiale cartaceo (figura tratta da Fissore et al., 2017, con modifiche)

Capolongo e Barresi (2004) hanno applicato la liofilizzazione su campioni di carta bianca moderna, precedentemente immersa in acqua distillata per 18 ore e congelata in freezer per 24 ore. La temperatura dei campioni e la pressione in camera sono state monitorate, rispettivamente, tramite termocoppie, poste superiormente e a metà dei campioni, e tramite un sensore di pressione di tipo termoconduttivo. I campioni sono stati pesati al termine della liofilizzazione e sono risultati totalmente essiccati dopo 18 ore. I campioni sono stati valutati visivamente e in modo tattile, non riscontrando danni significativi, a meno dei fogli immediatamente a contatto con la piastra riscaldante, che hanno riportato comunque danni superficiali minimi. Il contenuto residuo di umidità a valle dell'essiccamento primario è risultato essere del 1.0 ± 0.5%, indicando così la necessità, soprattutto per documenti antichi, di ricondizionare il materiale essiccato, riportandolo a un valore di umidità maggiore, per evitare rigidità e fragilità nella carta.

Il lavoro di Bicchieri et al. (2006) si è focalizzato su indagini chimiche e ottiche sul materiale cartaceo sottoposto a liofilizzazione. Le prove ottiche e chimiche riguardano il contenuto in carbonili (funzioni ossidate), per valutare l'eventuale ingiallimento della carta, il pH, il grado di polimerizzazione medio viscosimetrico (DP_v), metodo sperimentale che prevede la misura della viscosità di una soluzione polimerica a sua volta funzione del peso molecolare, per valutare l'eventuale rottura delle catene di cellulosa e, quindi, una diminuzione della resistenza meccanica dei fogli, e la misura delle coordinate di colore, ovvero le coordinate di cromaticità nello spazio. I risultati hanno dimostrato

come il processo di liofilizzazione non modifichi le caratteristiche chimico-fisiche dei campioni e non danneggi la cellulosa. Il foglio a diretto contatto con la piastra riscaldante mostra minimi segni di danneggiamento.

Pittino (2015) recupera materiali librari e archivistici allagati mediante liofilizzazione: i documenti vengono innanzitutto inseriti in buste di plastica e congelati in container, il prima possibile, al fine di evitare la proliferazione di microrganismi. Successivamente, il materiale viene caricato all'interno del liofilizzatore per un minimo di 12 ore fino a un massimo di 60 ore, dove viene asciugato; al termine del processo si procede, se necessario, ad una pulitura sotto cappe aspiranti da parte di restauratori. Prima di poter riutilizzare il materiale cartaceo si rende necessaria la conservazione per almeno un anno in ambiente controllato, al fine di raggiungere il valore di umidità residua iniziale.

Carlsen (1999) si è proposto di valutare l'effetto della liofilizzazione sulla resistenza meccanica e sulla stabilità all'invecchiamento di tre tipi differenti di carta. Vari indicatori sono stati utilizzati, quali il contenuto di umidità, la riserva alcalina, la resistenza meccanica e la resistenza allo strappo. I risultati dimostrano che la liofilizzazione influenza particolarmente il contenuto di umidità, la resistenza meccanica e la resitenza allo strappo, in modo diverso a seconda dei campioni analizzati. La resistenza meccanica diminuisce in tutti i tipi di carta, indicando come causa una possibile idrolisi della cellulosa. La resistenza allo strappo viene aumentata in tutti i casi, probabilmente effetto di un rafforzamento dei legami tra le fibre, dovuto al contatto del materiale con l'acqua.

1.3 Contaminazione microbica

Il materiale cartaceo sotto forma di libri e documenti rimane fin dai tempi più antichi il mezzo più efficace e comune per registrare la nostra Storia. Le librerie e gli archivi hanno sempre avuto lo scopo di collezionare per secoli questi beni molto preziosi.

Conseguentemente, si è reso necessario preservare nel migliore dei modi questo materiale. Il deterioramento della carta è quindi diventato un argomento di fondamentale importanza, dato anche l'immenso quantitativo raccolto in librerie e archivi in tutto il mondo.

Il deterioramento del materiale cartaceo è un processo inevitabile, ma è accelerato sia da fattori endogeni quali acidità, ioni metallici, lignina o prodotti di degradazione, sia da fattori esogeni come per esempio calore, umidità relativa (RH), ossigeno, temperatura, luce UV, inquinanti e microrganismi biodeteriogeni (Sequeira et al., 2012). Le condizioni climatiche con cui vengono mantenuti i documenti cartacei svolgono, quindi, un ruolo di primaria importanza.

La carta è caratterizzata da una "biorecettività" molto alta: la biorecettività è definita come l'abilità di un materiale di essere colonizzato da microrganismi (Sequeira et al., 2012). Questo aspetto viene compreso considerando la sua composizione e la sua igroscopicità.

Tra i componenti della carta troviamo la cellulosa, un polisaccaride del glucosio (da 300 a 3000 unità circa) che si trova nei vegetali.

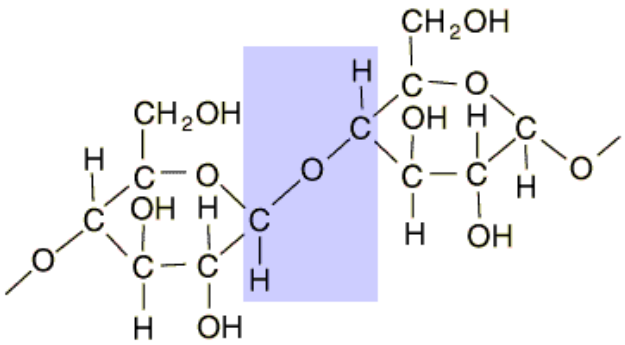

Figura 1. 5: la cellulosa naturale (figura tratta da http://omodeo.anisn.it/omodeo/glucidi.htm, con modifiche, ultimo accesso 07/02/19)

Rispetto alla cellulosa naturale, principalmente cristallina con qualche sito amorfo, quella contenuta nella carta ha molti più siti amorfi, creati a seguito dei processi chimici e fisici a cui viene sottoposta per la sua produzione. Questi siti amorfi sono più suscettibili al biodeterioramento, il quale viene definito come "qualsiasi alterazione, non voluta, in un materiale causato dall'attività metabolica di microrganismi biodeteriogeni". I biodeteriogeni sono "organismi caratterizzati dalla loro abilità ad usare un substrato per sostenere la loro crescita e riproduzione" (Sequeira et al., 2012).

La lignina è un componente del legno che ha, in natura, il ruolo di aumentare la resistenza della cellulosa all'attacco microbico: essa viene rimossa nel processo di produzione della carta, rendendola così un materiale molto biorecettivo. La biorecettività risulta essere più elevata nei confronti dei funghi filamentosi rispetto ai batteri e lieviti, in quanto essi crescono a valori inferiori (0,6-0,7) di attività dell'acqua (a_w), ovvero la quantità di acqua "libera" in un prodotto, definita come il rapporto tra la pressione di vapore nell'acqua in un materiale e la pressione di vapore dell'acqua pura alle stesse condizioni, e, grazie alla produzione di enzimi extracellulari, utilizzano la cellulosa come fonte di carbonio (Sequeira et al., 2012). La suscettività della carta nei confronti dell'attacco fungino dipende dalla sua composizione chimica, dal pH e dal tipo di colle, animali o vegetali, aggiunte durante il processo produttivo per ridurre l'assorbimento dell'inchiostro che altrimenti spanderebbe (Gallo, 1961).

Gli altri componenti della carta sono, oltre alla cellulosa, amido, gelatina, composti organici e inorganici.

Tutte le sostanze sopra citate possono fungere da nutrienti per la crescita di microrganismi quali funghi e batteri. Altri fattori che influenzano la crescita microbica sono umidità relativa (RH), temperatura, composizione del gas e il livello di contaminazione iniziale (Canhoto et al., 2004). L'umidità relativa è un parametro determinante per la crescita di microrganismi: se nell'ambiente eccede il 65%, e il contenuto di umidità nella carta è maggiore del 8-10%, alcuni microrganismi crescono. La crescita dei batteri sulla carta, sebbene sia presente, è meno preponderante rispetto a quella fungina; il rischio di una contaminazione batterica aumenta significativamente a seguito di allagamenti nelle librerie o archivi (Karbowska-Berent, 2011).

Per la crescita e riproduzione il fungo, una volta che attacca la carta, necessita di nutrienti, tra i quali il carbonio. Per questo motivo produce e secerne enzimi extracellulari che idrolizzano la macromolecola della cellulosa in zuccheri solubili, a basso peso molecolare,

che possono entrare nella cellula. La carta, di conseguenza, perde resistenza meccanica, anche per effetto della modalità di crescita fungina: le ife sono in grado di penetrare tra le fibre della carta (Gallo, 1961). Durante la crescita fungina, alcuni prodotti metabolici vengono secreti e continuano il deterioramento della carta, anche dopo la morte del fungo. Tra questi prodotti extracellulari troviamo, per esempio, la glicerina, che fa aumentare il contenuto di umidità e agisce come attivatore di spore con conseguente diffusione della contaminazione. Altri prodotti metabolici secreti dal fungo sono i lipidi, che vanno incontro ad autossidazione, formando radicali liberi e perossidi che contribuiscono alla comparsa di colorazioni marroni sulla carta (Sequeira et al., 2012).

Se un eccesso di acqua rimane negli archivi per un lungo periodo, per esempio a seguito di allagamenti, i microrganismi presenti iniziano a riprodursi e si propagano nell'ambiente circostante, andando così a contaminare il materiale adiacente (Karbowska-Berent, 2011).

Gallo (1961) ha analizzato l'azione cromatica delle specie fungine sulla carta, come risultato della degradazione della cellulosa. Le varie colorazioni che appaiono, con diverse intensità, sono dovute sia alle ife pigmentate che penetrano tra le fibre della carta, sia ai pigmenti colorati prodotti e rilasciati dal micelio. Questi pigmenti sono per lo più composti da carotenoidi e antrachinoni. I colori assunti dalla carta, a seguito della crescita microbica, non consentono di stabilire la natura del microrganismo biodeteriogeno: per fare questo è necessario una identificazione basata su tecniche colturali e molecolari.

La problematica della contaminazione microbica del materiale cartaceo ha un duplice aspetto: da una parte vi è il danneggiamento di un grande quantitativo di materiale che poi deve essere ripristinato e restaurato, e dall'altra un alto fattore di rischio per la salute umana. A questo proposito, i funghi biodeteriogeni, talvolta patogeni, possono produrre composti tossici e allergenici per l'uomo. Tra i composti volatili prodotti troviamo: alcoli, aldeidi, chetoni, composti aromatici, ammine, terpeni, composti solfurici e micotossine (Canhoto et al., 2004).

Alcuni funghi possono essere fonte di allergeni, come per esempio *Alternaria alternata* e *Cladosporium herbarum*, mentre funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium* sono considerati i maggiori responsabili della produzione di micotossine (Karbowska-Berent, 2011). Le micotossine sono composti tossici prodotti da alcune tipologie di funghi in condizioni favorevoli di umidità, temperatura e luce. Queste tossine sono contenute nel micelio e nelle spore e possono causare tossicità acuta e cronica nell'uomo.

Vista l'importanza della problematica della contaminazione microbiologica del materiale cartaceo, gli studi si sono concentrati fin da subito sull'isolamento e l'identificazione dei microrganismi presenti nelle librerie e archivi e sul materiale cartaceo in essi presente. Questo si è rilevato un processo lungo e complesso, basti pensare alla vastissima collezione di documenti in tutto il mondo e, soprattutto, ai differenti materiali che vi possono essere contenuti. In una libreria, infatti, possono essere raccolti una serie di documenti e libri che spaziano nelle diverse epoche storiche, da quelle più antiche a quelle più moderne. Di conseguenza, nella collezione di una moderna libreria è possibile trovare libri centenari e moderni, giornali e periodici, mappe, atlanti, oltre a materiale audiovisivo come fotografie e dischi (Zyska, 1997).

Gli studi microbiologici si sono nel tempo focalizzati sull'individuazione di quei microrganismi, quali funghi filamentosi, batteri e lieviti, che più frequentemente hanno contaminato le librerie e i documenti ivi contenuti.

Gallo (1961) riporta che le specie fungine più frequenti nel materiale librario appartengono ai generi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Stemphilium*. Questi microrganismi mostrano una elevata capacità di degradazione della cellulosa.

Zyska (1997) individua i ceppi fungini isolati dai differenti materiali presenti nelle librerie, quali carta, pergamena, tessuto, cere, pelle, colla e inchiostro. Sono stati isolati un totale di 234 specie di funghi appartenenti a 84 generi, tra i più frequenti *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhodotorula*, isolati da tutti i materiali sopra citati.

Uno studio più dettagliato è stato condotto da Karbowska-Berent (2011), relativo all'individuazione qualitativa e quantitativa di funghi e batteri presenti nell'aria e nella polvere sedimentata in stanze presenti in alcune librerie polacche. Sono state selezionate cinque librerie, caratterizzate da differenti collezioni di documenti e differenti metodi di ventilazione (aria condizionata, riscaldamento, circolazione naturale, ventilazione meccanica). Tra queste, è stata posta maggiore attenzione a quella colpita da un forte acquazzone, con conseguente danneggiamento alla copertura dell'edificio. In totale sono state individuate 36 specie di batteri appartenenti a 18 generi e 17 specie di funghi appartenenti a 13 diversi generi. I risultati hanno evidenziato nell'aria una maggiore presenza di batteri (85,8%) rispetto ai funghi (14,2%); tra i batteri, il gruppo dominante è quello dei Gram-positivi con i generi *Micrococcus* e *Staphylococcus* (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*). Tra i funghi prevale il genere *Penicillium*, che costituisce il 30-40% e, a seguire, *Trichothecium* (13,02%) e *Alternaria* (12,08%); viene anche individuato il genere *Aspergillus* con minor frequenza. Risultati molto simili sono stati ottenuti nello studio della polvere sedimentata sui documenti, stando ciò ad indicare che la microflora presente sulla polvere sedimentata riflette la composizione microbica dell'aria nelle stanze. La principale differenza tra le due composizioni è riferibile alla biodiversità: per la maggior parte dei microrganismi l'aria è l'ambiente più favorevole alla loro dispersione, conseguentemente nella polvere sedimentata la biodiversità è decisamente inferiore. Un altro risultato d'interesse è quello relativo alla libreria danneggiata dall'acquazzone: qui la concentrazione fungina è decisamente superiore a quella delle altre stanze e, inoltre, superiore alla concentrazione dei batteri, risultato probabilmente della penetrazione di acqua nelle pareti della stanza, fornendo così un ambiente più umido per le specie colonizzanti.

Nella maggioranza dei casi i beni cartacei e archivistici da recuperare sono documenti molto antichi, danneggiati da fattori ambientali e, di conseguenza, molto delicati. Anche un semplice processo di isolamento e identificazione del microrganismo responsabile del danno potrebbe peggiorare il deterioramento del documento in esame. È quindi necessario utilizzare tecniche e metodologie adeguate per l'isolamento e l'identificazione dei microrganismi biodeteriogeni.

In accordo con Pinzari et al. (2010) è di fondamentale importanza la scelta di un metodo non invasivo di campionamento; i metodi distruttivi possono essere applicati solo su frammenti di carta che non possono essere conservati e riassemblati, come, per esempio, parti che verranno sicuramente eliminate durante il restauro. Tra i metodi non invasivi, troviamo i tamponi, preferibimente di cotone (al fine di evitare materiale elettricamente carico), utilizzati per asportare i microrganismi presenti sulle superfici e trasferirsli su un terreno di coltura agarizzato. Un'altra tecnica non invasiva riguarda l'utilizzo di nastro adesivo, con il quale si possono raccogliere le strutture del fungo (micelio e spore) per poi osservarle al microscopio. Tra le tecniche invasive troviamo l'utilizzo di lame per grattare la superficie della carta quando è visibile la crescita del microrganismo. Con lo stesso strumento si possono ritagliare dei piccoli frammenti, ai bordi del foglio, per una

successiva analisi in microscopica elettronica a scansione (SEM). Le tecniche più in uso sono quelle colturali, nonostante siano applicabili solo a quei microrganismi "coltivabili". Le tecniche colturali prevedono la conoscenza delle specifiche richieste metaboliche e fisiologiche del microrganismo isolato dalla carta. La tecnica colturale più usata è la cosiddetta tecnica "dei 25 punti", in cui dei frammenti di carta vengono lavati in acqua sterile e successivamente tagliati in 25 o più frammenti più piccoli. Questi vengono poi posizionati in un terreno nutritivo agarizzato all'interno di una struttura geometrica ordinata (griglia) (Figura 1.6). La crescita dello stesso organismo nella maggior parte dei nodi porta all'attribuzione statistica del danno a quel microrganismo.

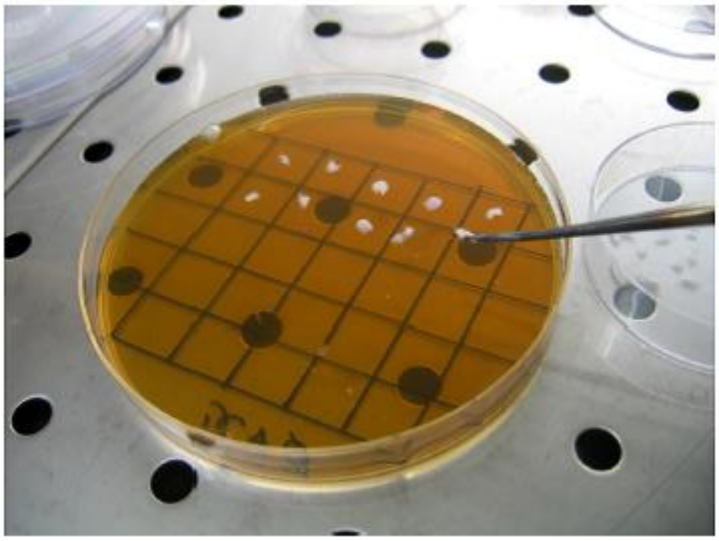

Figura 1. 6: il metodo dei 25 punti (figura tratta da Pinzari et al., 2010)

Negli ultimi anni, grazie ai progressi della biologia molecolare, si è indagata la possibilità di applicare le tecniche molecolari all'identificazione dei microrganismi biodeteriogeni; in questo modo è possibile individuare anche la presenza dei microrganismi vitali, ma non coltivabili (Viable But Not Culturable, VBNC). Nonostante i risultati ottenibili con le tecniche di biologia molecolare, a livello diagnostico rimane fondamentale l'utilizzo di tecniche poco costose e che diano risultati esaustivi nell'identificazione del microrganismo che causa il deterioramento (Pinzari et al., 2010).

Come è già stato anticipato, la contaminazione microbica dei beni cartacei, e il loro conseguente recupero, è un problema a cui si è cercata una soluzione già dai tempi più antichi.

Nell'epoca dell'antica Roma emergono i testi di Plinio il Vecchio, il quale scrisse dell'utilizzo dell'olio di cedro e dell'estratto di limone per prevenire l'attacco di insetti ai papiri. Solo con l'avanzare dei secoli l'attenzione fu posta sulla contaminazione da microrganismi del materiale librario, e questo avvenne con le scoperte di Ludwig Pasteur e Robert Koch. Le prime discussioni scientifiche al riguardo iniziarono così nei primi anni del ventesimo secolo in Francia (Zyska, 1997).

Le tecniche di controllo della crescita di biodeteriogeni per la preservazione della carta col passare del tempo sono aumentate e si sono evolute, fino ad ottenerne una vasta gamma tra cui poter scegliere a seconda dei loro vantaggi e svantaggi.

Questi metodi prevedono la diminuzione del valore di a_w, l'applicazione di prodotti chimici gassosi o liquidi, oppure metodi fisici come le alte o le basse temperature, le radiazioni e correnti elettriche. Diminuire a_w ad un valore inferiore allo 0.60 sembrerebbe essere il metodo più efficace a lungo termine, oltre ad essere semplice e innocuo. I metodi fisici, invece, rispetto a quelli chimici hanno la forte limitazione di avere un'efficacia istantanea e non a lungo termine; i metodi chimici, infatti, rilasciano delle sostanze che inibiscono la crescita del microrganismo (Sequeira et al., 2012).

Le tecniche di controllo della crescita di biodeteriogeni, sia applicate su un singolo oggetto sia su collezioni, oltre a dover essere a basso costo, non devono ovviamente essere tossiche per l'uomo e non devono avere effetti negativi sul materiale da trattare.

Sequeira et al. (2012) illustra le tecniche chimiche e fisiche attualmente disponibili, mettendone in luce i principali vantaggi e svantaggi. Dai vari confronti si conclude che le tecniche chimiche più soddisfacenti sono l'utilizzo del propionato di calcio e di etanolo. Per quanto riguarda i metodi fisici la migliore soluzione sembrerebbe essere la disidratazione, che porta ad ottenere la combinazione di buoni risultati con le minori alterazioni sul materiale trattato.

1.4 La liofilizzazione come tecnica per il controllo della crescita microbica

La liofilizzazione, come metodo di recupero del materiale cartaceo allagato, è una tecnica che è stata ampliamente studiata. La letteratura ha dato molto spazio alla verifica della sua efficacia nel salvaguardare i beni librari, nonchè della sua caratteristica di essere non invasiva nei confronti della carta. Per questi motivi, la liofilizzazione è attualmente molto usata per questo tipo di applicazione, con risultati molto soddisfacenti.

Non sono molti in letteratura i casi di studio legati, invece, alla valutazione di quale sia l'effetto della liofilizzazione sui microrganismi che contaminano la carta a seguito dell'allagamento. Nonostante questo sia un problema noto, la valutazione della vitalità dei microrganismi a valle dell'essiccamento è ancora un aspetto poco studiato. L'unica accortezza che si cerca di seguire quando sussistono problemi di allagamento di librerie o archivi è quella di congelare i documenti il prima possibile, al fine di bloccare e/o stabilizzare la crescita dei microrganismi presenti sul materiale (Fissore et al., 2017; Mussini e Sassi, 2016; McCleary, 1987; Bicchieri, 2006; Pittino, 2015). Inoltre, il processo di liofilizzazione non viene considerato come metodo di prevenzione per successivi attacchi di microrganismi (Pittino, 2015).

Come già spiegato in precedenza, la liofilizzazione prevede una prima fase di congelamento, seguita dall'essiccamento del prodotto. Nella prima fase l'acqua viene congelata, mentre nella seconda fase viene rimossa; essendo quindi due processi fisicamente diversi, questi potrebbero avere delle conseguenze differenti sulla sopravvivenza e vitalità dei microrganismi. Volendo analizzare i due fenomeni separatamente, il primo a dover essere valutato è l'effetto del solo congelamento.

I cristalli di ghiaccio che si formano durante il congelamento sono di forma esagonale e la loro dimensione dipende dalla velocità dello stesso. Una bassa velocità di congelamento porta alla formazione di grandi cristalli di ghiaccio; al contrario, un'alta velocità di congelamento porta alla formazione di cristalli piccoli. Sia che essi siano grandi o piccoli, durante il congelamento si espandono di circa un 8,5%, provocando così danni cellulari (Florian, 1990).

Bisogna inoltre tenere in considerazione che quando la temperatura oscilla tra 0°C e -4°C la piccola frazione di acqua che si trova nei capillari del materiale rimane allo stato liquido (Florian, 1990; Sequeira et al., 2012). L'acqua non congelata può essere, quindi, fonte di nutrienti per i microrganismi; solo mantenendo la temperatura ad un valore di almeno -20°C la crescita microbica può essere fermata (Sequeira et al., 2012).

Un parametro fondamentale in questo tipo di analisi è dato dall'attività dell'acqua. a_w governa l'isteresi igrometrica, ovvero la velocità di adsorbimento e desorbimento dell'acqua, l'attività chimica e la crescita microbica. È infatti noto che la maggior parte dei microrganismi è in grado di crescere se il valore di attività dell'acqua supera 0,75 (Florian, 1990). a_w è strettamente collegata alla temperatura e, in particolare, a_w diminuisce al diminuire della temperatura. Di conseguenza, la crescita dei microrganismi durante il congelamento è rallentata (Sequeira et al., 2012).

Un altro fondamentale aspetto da tenere in considerazione è la velocità di congelamento: secondo Florian (1990) al diminuire di questo parametro, aumenta il numero di microrganismi morti. La velocità di congelamento ottimale, al fine di preservare la vitalità dei microrganismi, oscilla tra 1°C/min e 10°C/min (Berny e Hennebert, 1991). Per una velocità inferiore a questo range si ha la formazione di ghiaccio extracellulare, con una conseguente concentrazione di soluti. Per equilibrare la pressione osmotica, l'acqua intracellulare si trasferisce all'esterno della cellula, concentrando così i soluti intracellulari e, quindi, provocando dei danni. Diversamente, per una velocità maggiore rispetto al range ottimale, la cellula non è in grado di perdere acqua in modo sufficientemente veloce al fine di mantenere l'equilibrio osmotico tra l'acqua intracellulare e quella extracellulare. La conseguenza è la formazione di ghiaccio all'interno della cellula (Berny e Hennebert, 1991; Sequeira et al., 2012).

Ci sono poi altri fattori che influenzano la vitalità dei microrganismi, uno di questi è il tempo di congelamento: aumentandolo, diminuisce il numero di microrganismi vivi. Inoltre, quelle cellule che sopravvivono ad un primo congelamento, potrebbero non sopravvivere ad un secondo congelamento. L'altro aspetto che potrebbe influenzare la vitalità a seguito di uno shock termico è l'età della popolazione: maggiore è l'età, maggiore è la sopravvivenza. Per quanto rigurarda nello specifico i funghi filamentosi, è noto che la resistenza agli shock è diversa per il micelio e perle spore. Queste ultime, infatti, risultano essere molto più resistenti, soprattutto se idratate (Florian, 1990).

Come già anticipato precedentemente, i casi di studio in letteratura effettuati sulla valutazione degli effetti della liofilizzazione sulla vitalità dei microrganismi sono scarsi.

Uno dei primi ad aver studiato questo aspetto è Mazur (1968): secondo il suo studio l'intero processo di liofilizzazione (congelamento e successivo essiccamento) risulta essere più dannoso per i microrganismi rispetto al solo congelamento. Questo è dovuto sia alle variazioni della temperatura, sia alla perdita dell'acqua a seguito dell'essiccamento, cosa che non avviene con il solo congelamento. I risultati del suo studio hanno anche confermato che le ife dei funghi filamentosi, insieme ai lieviti, sono più sensibili alla liofilizzazione, in quanto ha portato ad una riduzione della dimensione della popolazione.

Uno studio più recente (Troiano et al., 2012) ha riportato gli effetti della liofilizzazione sui funghi che attaccano la carta bagnata, valutati sia attraverso un test colturale sia tramite il contenuto in ATP. Il lavoro di ricerca è stato effettuato con l'utilizzo di due tipi di carta differente (Whatman e Mezzofino), inoculati con 3 ceppi fungini: *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Trichoderma viride*. Tutti i funghi sono stati incubati a 26°C e al 100% di umidità relativa. Durante il processo di liofilizzazione sono state inserite due sonde di temperatura, una a contatto con il primo strato, l'altra a contatto con l'ultimo strato, rispettivamente a 2 cm e a 3.2 cm dalla piastra riscaldante. Il test colturale utilizzato è stato il metodo dei 25 punti, su terreno agarizzato MEA (Malt Extract Agar Oxoid). La misura dell'ATP è utilizzata come indicatore del contenuto di cellule vitali presenti in una determinata matrice: in questo caso ATP è stato estratto dal citoplasma e dai mitocondri delle ife e delle spore.

I risultati di Troiano et al. (2012) hanno evidenziato la congruenza dei due metodi di analisi, il test colturale e il contenuto in ATP. È stato rilevato un effetto inibitorio della liofilizzazione su tutti i funghi di entrambe le carte. A valle del processo di liofilizzazione il contenuto in ATP è diminuito in tutti i funghi, in maniera meno elevata per *C. globosum*. Per quanto riguarda il test colturale, *C. cladosporioides* non ha sviluppato colonie, mentre *T. viride* ha mostrato una ridotta capacità di formare colonie. Al contrario, l'effetto della liofilizzazione su *C. globosum* è stato quello di stimolare la crescita del fungo. I diversi comportamenti dei microrganismi sono stati spiegati dal fatto che i primi due funghi (*C. cladosporioides* e *T. Viride*) sulla carta hanno sviluppato solo conidi, mentre *C. globosum* ha prodotto ascospore, le quali sono stimolate a germinare a seguito di shock termici. I risultati hanno quindi dimostrato che la liofilizzazione uccide o inibisce il micelio dei funghi filamentosi e, a seconda della specie, in parte, anche i conidi.

1.5 Scopo del lavoro

Lo scopo del lavoro di Tesi è quello di valutare la vitalità di *Alternaria alternata* BNR, *Staphylococcus epidermidis* e *Rhodotorula mucilaginosa* a valle del congelamento e del processo di liofilizzazione. In questo ambito si vuole valutare, inoltre, l'effetto di due differenti velocità di congelamento, una più lenta e una più veloce, sugli stessi microrganismi selezionati. Al fine di valutare l'effetto della temperatura nella fase del congelamento, si considerano due diverse temperature operative, -20°C e -40°C. Si valuta, infine, l'attività microbica a seguito di differenti velocità di sublimazione del ghiaccio durante la fase di essiccamento del prodotto.

2.Materiali e metodologie sperimentali

2.1 Caso di studio

Con lo scopo di valutare la vitalità dei microrganismi a valle del congelamento e del processo di liofilizzazione si utilizza della carta bianca moderna (80 g/cm^2). Le risme vengono tagliate ottenendo fogli di dimensioni 60 mm x 60 mm. Si preparano blocchetti di carta di spessore costante pari a 10 ± 1 mm e con peso di 27 ± 0.05 g.

Si considerano i seguenti microrganismi: *Alternaria alternata* ceppo BNR, *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474, *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 2.1). *S. epidermidis* e *R. mucilaginosa* sono stati acquistati, mentre *A. alternata* BNR è stata isolata in laboratorio dalla gomma naturale. Questi microrganismi sono stati selezionati in quanto contaminano frequentemente il materiale cartaceo, come riscontrato in letteratura (Gallo, 1961; Zyska, 1997; Karbowska-Berent et al., 2011).

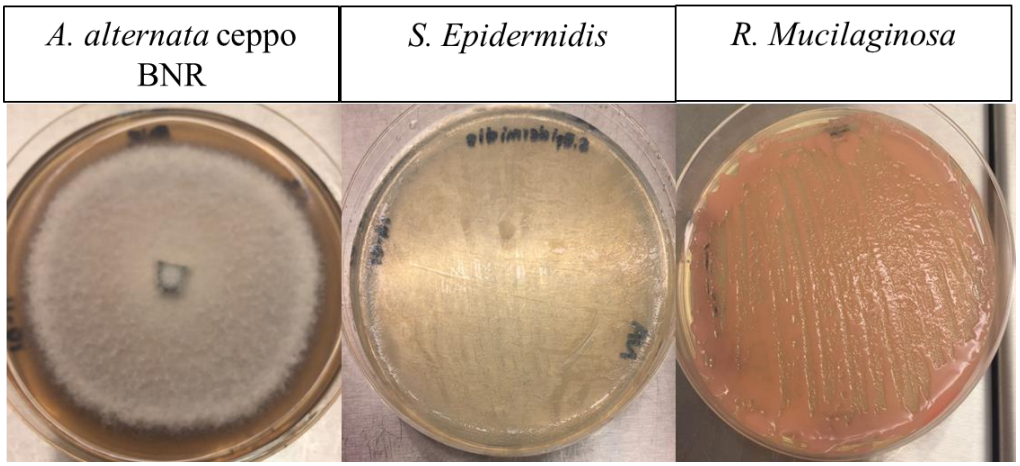

Figura 2. 1: microrganismi testati nel caso di studio

2.2 Preparazione dei campioni

2.2.1 Coltura dei microrganismi

Il fungo *A. alternata* viene coltivato su terreno solido Czapeck Dox Agar (CZ) per un tempo pari a 7 giorni.

Il lievito *R. mucilaginosa* viene fatto crescere su terreno solido Malt Extract Agar (AM) per 24 ore.

Infine, *S. epidermidis* viene coltivato su terreno solido Nutrient Agar Oxoid (NA) per 24 ore.

I terreni CZ e MEA contengono entrambi glucosio come fonte di carbonio, come è possibile riscontrare dalle rispettive composizioni qui di seguito riportate.

Terreno CZ:

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

Terreno MEA:

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

Terreno NA:

- 1 g/L Lab-Lemco' Powder
- 2 g/L estratto di lievito
- 5 g/L peptone
- 5 g/L cloruro di sodio
- 15 g/L agar

Il terreno NA è disponibile sotto forma di preparato in polvere da disperdere in acqua distillata, mentre i terreni CZ e MEA sono preparati in laboratorio.

Tutti i microrganismi vengono inoculati in triplicato e incubati in capsule di Petri (9 cm di diametro) contenenti 20 ml di terreno agarizzato, alla loro temperatura ottimale di crescita, rispettivamente 30°C per *A. alternata* e *R. mucilaginosa*, 37°C per *S. epidermidis*.

2.2.2 Inoculo dei microrganismi sulla carta

Vengono eseguite inizialmente delle prove preliminari per valutare le condizioni migliori di crescita dei seguenti funghi filamentosi: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* sp. e *Alternaria alternata* BNR, riportati in letteratura come potenziali biodeteriogeni. Si predispongono, quindi, delle prove di inoculo dei funghi su fogli di carta bianca moderna (6 x 6 cm) precedentemente sterilizzati in autoclave (T=121°C, P=2 atm, 20 minuti) in 10 ml di terreno liquido Malt Extract Broth (MEB) e Czapeck (CZ). Le piastre vengono incubate a 30°C per 72 ore. Gli stessi funghi vengono inoculati anche su fogli di carta sterili in terreno solido CZ e AM; le condizioni di incubazione sono le medesime.

Il terreno MEB è prodotto in laboratorio e la sua composizione è uguale a quella del terreno MEA, a meno dell'aggiunta di agar.

La crescita di *A. alternata* BNR e *P. chrysogenum* è stata successivamente testata su terreno agarizzato CZ, con e senza glucosio: l'obiettivo è stato quello di verificare se i funghi, in assenza di glucosio, sono in grado di utilizzare la cellulosa come unica fonte di carbonio. Le piastre vengono incubate a 30°C per 120 ore.

È stata infine eseguita un'ultima prova preliminare allo scopo di valutare differenze evidenti di crescita di *A. alternata* BNR (su terreno solido CZ) in presenza e in assenza di luce. Tutte le piastre vengono incubate a 30°C per 96 ore.

Nel caso di studio, *A. alternata* BNR viene inoculato sulla carta: con un'ansa da 4 mm, viene tagliato un quadrato di circa 5 mm del micelio fungino, precedentemente cresciuto per 7 giorni, dal bordo delle colonie. Il quadrato viene poi trasferito sul foglio di carta sterile, in posizione centrata rispetto al foglio (Figura 2.2).

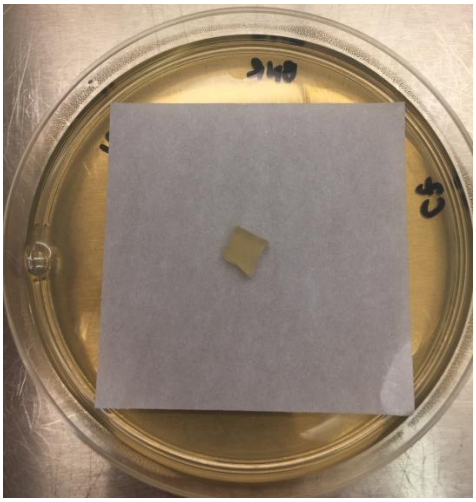

Figura 2.2: Inoculo di *A. alternata* BNR sul foglio di carta sterile

Le piastre vengono prima chiuse con Parafilm e, successivamente, incubate a temperatura controllata di 30°C per 120 ore e per 48 ore, per ottenere rispettivamente una colonia con micelio sporificato e una colonia con micelio non sporificato (Figura 2.3).

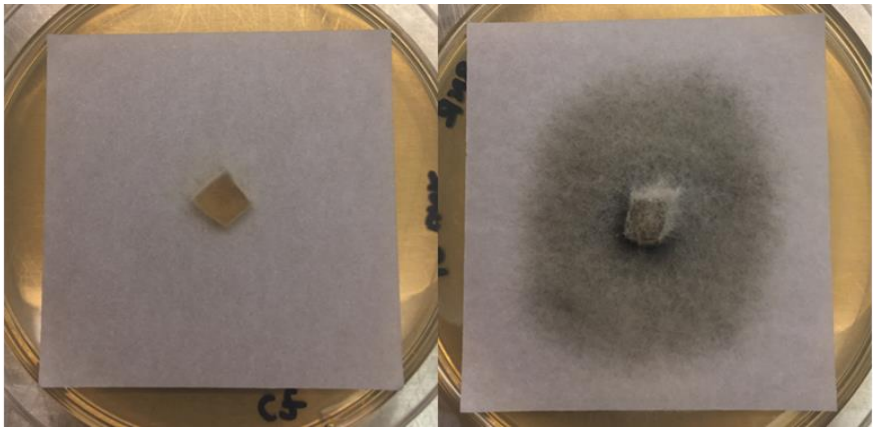

Figura 2. 3: A sinistra *A. alternata* BNR non sporificato e a destra *A. alternata* BNR sporificato

Per quanto riguarda gli inoculi di *S. epidermidis* e *R. mucilaginosa* viene prelevata una sospensione a densità ottica (OD620) nota di inoculo con un'ansa da 4 mm una sola volta. Si effettuano 3 strisce parrallele di circa 4 cm, distanziate 1 cm da sinistra verso destra, procedendo dall'alto verso il basso. In questo modo si ottengono bande a diversa concentrazione di inoculo: la concentrazione maggiore, infatti, si avrà in alto a sinistra. Le piastre vengono infine chiuse con Parafilm e incubate per 24 ore a temperatura controllata di 37°C e 30°C rispettivamente (Figura 2.4).

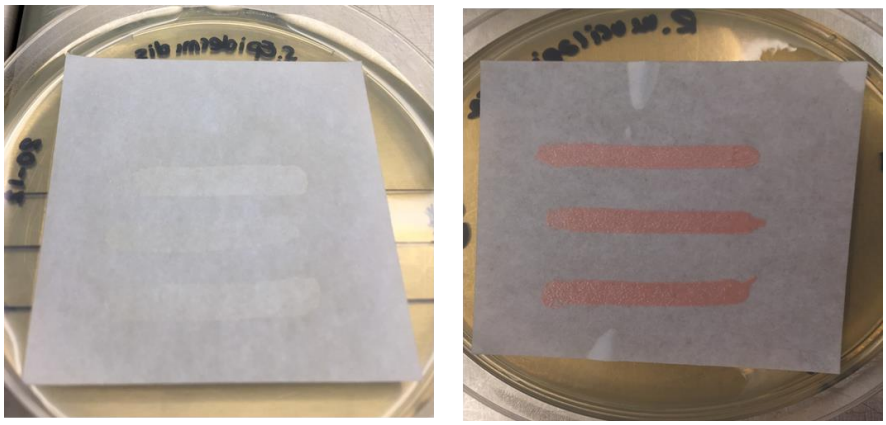

Figura 2. 4: A sinistra inoculo di *S. epidermidis,* a destra inoculo di *R. mucilaginosa* sul foglio di carta sterile

2.2.3 Immersione dei blocchetti di carta

Sono state inizialmente eseguite delle prove preliminari al fine di determinare la procedura ottimale per immergere i blocchetti di carta, simulando l'allagamento di materiale cartaceo.

Inizialmente i campioni di carta sono stati posti tra griglie di plastica, inserite in appositi contenitori. Questi vengono immersi orizzontalmente in acqua distillata per 16 ore, all'interno di un recipiente chiuso con cellophane. Al termine delle 16 ore, i campioni vengono lasciati a scolare per 1 minuto e successivamente pesati.

Volendo simulare l'immersione di un libro, le stesse griglie di plastica della prova precedente vengono immerse, in acqua distillata, in posizione verticale per 18 ore. I campioni vengono infine scolati per 1 minuto e successivamente pesati. Si decide quindi di utilizzare dei vasi ermetici in vetro in cui è possibile isolare dall'umidità esterna i 4 campioni inseriti. I campioni vengono immersi in acqua distillata e mantenuti fermi da dei vetrini per microscopio per mezzo di elastici (Figura 2.5).

Figura 2. 5: vasi ermetici utilizzati per la prova di immersione e relativo campione

I campioni vengono prima scolati per 1 minuto, girando sotto sopra il vaso ermetico, poi pesati dopo 18, 24 e 26 ore di immersione.

Nel caso di studio, i vetrini per microscopio usati per fissare ogni singolo blocchetto sono stati sostituiti da una rete di plastica forata con passo 1 cm, precedentemente tagliata di dimensioni pari a 6 x 6 cm (Figura 2.6).

Al fine di mantenere i campioni verticali anche durante la fase di sgocciolamento, all'interno del vaso ermetico, in posizione centrale, si inserisce un beacher da 150 ml.

Il peso secco del blocchetto di carta (25.97 g) è stato valutato attraverso un'analisi gravimetrica su 12 campioni, riscaldandoli a 105°C per 24 ore.

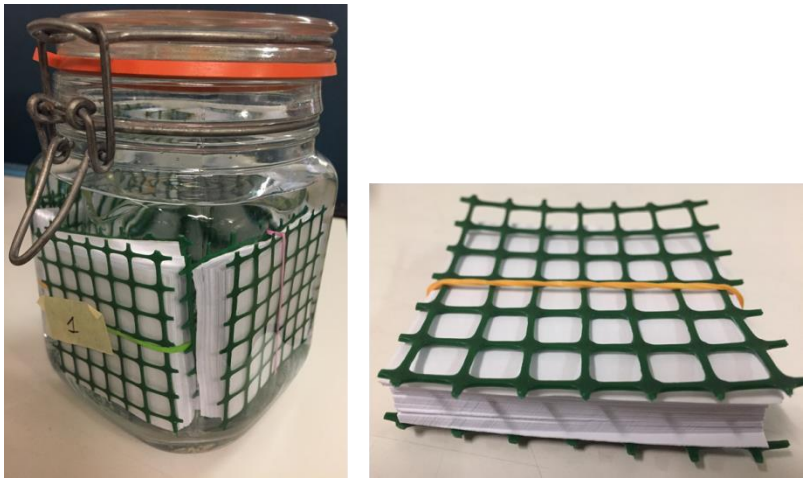

Figura 2. 2: vaso ermetico contenente i campioni da immergere e campione preparato per l'immersione

2.2.4 Composizione dei campioni

Una volta terminate le 18 ore di immersione i blocchetti di carta vengono scolati per 1 minuto capovolgendo il recipiente ermetico e, successivamente, pesati.

Contemporaneamente, i fogli di carta sterili precedentemente inoculati sono rimossi, in sterilità, dalle piastre per mezzo di un'ansa da 4 mm e una pinzetta, e posizionati sia sopra il blocchetto sia a metà spessore. Questa operazione viene eseguita con lo scopo di valutare eventuali differenze, a valle della liofilizzazione, nella vitalità dei microrganismi (Figura 2.7).

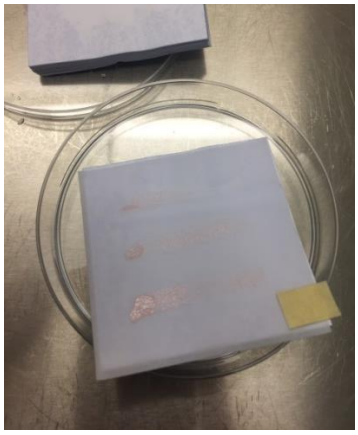

Figura 2. 7: foglio inoculato con *R. mucilaginosa* posto a metà spessore del blocchetto di carta

Prima di comporre i campioni contaminati con *A. alternata* BNR, viene rimosso il quadrato di agar utilizzato come inoculo, al fine di mantenere la planarità del campione da liofilizzare (Figura 2.8).

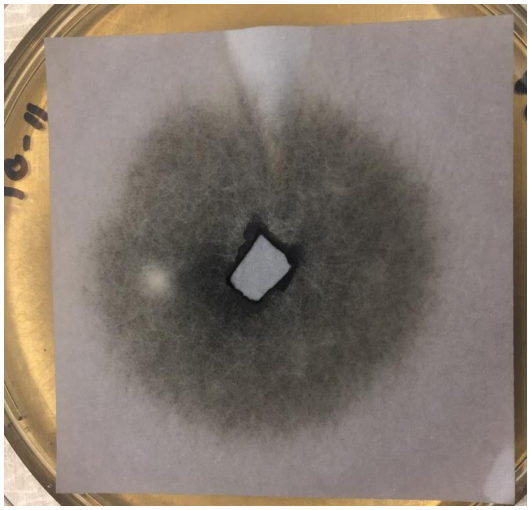

Figura 2. 8: *A. alternata* BNR inoculato su foglio di carta sterile a cui è stato rimosso il quadrato

Inoltre, al di sopra del foglio inoculato posizionato nella parte superiore del blocchetto si pone un ulteriore foglio di carta non sterile, con lo scopo di contenere la dispersione dei microrganismi all'interno della camera di essiccamento.

Si è presa infatti in considerazione l'eventuale contaminazione del liofilizzatore: il problema si presenta solo nel caso dell'utilizzo di un'apparecchiatura da laboratorio, dove non è possibile effettuare una sterilizzazione mediante vapore acqueo a valle della liofilizzazione. A livello industriale, dove invece la sterilizzazione dell'apparecchiatura viene effettuata, questo problema non si pone.

Nel caso di studio, quindi, sono state effettuate delle prove preliminari al fine di valutare una soluzione per avvolgere i campioni contaminati in un materiale che contenesse la dispersione dei microrganismi e, allo stesso tempo, permettesse la fuoriuscita del vapore acqueo durante l'essiccamento primario.

A questo scopo sono stati utilizzati dei blocchetti di carta non contaminati, precedentemente immersi in acqua distillata e congelati per 24 ore, all'interno del liofilizzatore. Per questa prova sono stati testati 3 campioni: un primo campione è stato posto all'interno di una busta autosigillante per sterilizzazione, un secondo campione è stato posto sottovuoto all'interno di una busta di plastica e, infine, il terzo campione è stato avvolto da tessuto-non-tessuto. In quest'ultimo caso, sono stati testati 4 campioni, non contaminati, avvolti con un numero variabile di strati di tessuto (da 1 a 4). La prova di essiccamento primario è stata condotta per una durata di 4 ore, al termine delle quali i campioni sono stati pesati.

La scelta del numero di strati da adottare è stata fatta attraverso una valutazione della capacità di questi nel trattenere i conidi e le spore. A questo scopo è stata prelevata una sospensione conidica di *A. niger*; un'aliquota di questa è stata inizialmente filtrata attraverso 4 strati di tessuto-non-tessuto e, successivamente, sono state eseguite delle letture di assorbanza a OD650. Una seconda aliquota è stata filtrata con uno strato di tessuto-non-tessuto. Confrontando i valori di assorbanza, pre-filtrazione e post-filtrazione, della sospensione conidica è stato possibile apprezzare la capacità del tessuto di trattenere le spore e/o i conidi.

Nel caso di studio i campioni sono coperti da 4 strati di tessuto non tessuto, precedentemente tagliato con dimensioni pari a 210 x 297 mm circa, sigillato con scotch di carta. Una volta chiusi, i campioni vengono posti in sacchetti di plastica per la successiva fase di congelamento (Figura 2.9).

Figura 2. 9: campione chiuso in 4 strati di tessuto-non-tessuto tramite scotch di carta

2.3 Modalità di conduzione delle prove

2.3.1 Congelamento in freezer

Una volta composti e chiusi in 4 strati di tessuto non tessuto i campioni vengono posti, all'interno di buste di plastica, in un congelatore domestico alla temperatura di -20°C per un totale di 13 giorni. Per quanto riguarda i campioni preparati per la conduzione di varie prove preliminari di liofilizzazione, a seconda dei casi, la fase del congelamento in freezer è durata 72 ore, 24 ore e 18 giorni (vedi 2.2.4).

2.3.2 Congelamento nel liofilizzatore

Terminata la fase di preparazione dei campioni, questi vengono posti all'interno di buste di plastica e caricati all'interno della camera di essiccamento, dove vengono sottoposti alla fase di congelamento. Questo viene condotto alla temperatura di -40°C o di -20°C, con una velocità di congelamento pari a circa -0.6°C/min. Questo è reso possibile andando a controllare la velocità di diminuzione della temperatura del mezzo refrigerante che scorre all'interno dei ripiani della camera di essiccamento.

2.2.3 Scongelamento dei campioni

Terminata la fase di congelamento i campioni vengono recuperati dal freezer o dal liofilizzatore, si rimuove la busta di plastica che li contiene e, successivamente, si collocano all'interno di vasi ermetici per permettere un completo scongelamento. Questo è stato condotto a temperatura controllata di 25°C, per una durata pari a 3 ore.

2.2.4 La liofilizzazione

L'essiccamento primario è stato condotto in un liofilizzatore Millrock, modello Revo. L'apparecchiatura è dotata di termocoppie per il monitoraggio della temperatura del prodotto all'interno della camera di essiccamento. Per quanto riguarda i sensori di pressione, il liofilizzatore è dotato di un sensore di tipo termoconduttivo (tipo Pirani) e di uno di tipo capacitivo (tipo Baratron).

La fine dell'essiccamento primario, come illustrato nel capitolo introduttivo, è valutata tramite il rapporto dei valori forniti dai due sensori di pressione: quando non vi è più vapore acqueo in camera i due sensori forniscono lo stesso valore e, quindi, il loro rapporto raggiunge il valore unitario.

Per verificare l'effettiva perdita dell'acqua inizialmente assorbita nella fase di immersione, i campioni sono pesati al termine dell'essiccamento primario.

Prima di applicare il processo di liofilizzazione al caso di studio sono state eseguite delle prove preliminari di essiccamento su campioni contaminati dai 3 microrganismi selezionati, al fine di stimare la durata del processo, l'andamento della temperatura dei prodotti e la quantità di acqua persa a valle del processo. La prima prova preliminare è stata condotta con campioni contaminati solo dal fungo *A. alternata* e precedentemente congelati in freezer per 72 ore. La seconda prova preliminare è stata condotta su campioni precedentemente inoculati con *S. epidermidis* e posti in congelatore per 24 ore. In questa prova sono state utilizzate, inoltre, delle termocoppie posizionate a metà spessore dei campioni, in posizione centrale, al fine di identificare in una seconda maniera il termine dell'essiccamento primario. Nell'ultima prova preliminare sono stati analizzati tutti i microrganismi selezionati su campioni che sono stati congelati nel freezer per 18 giorni. L'essiccamento primario di tutte le prove preliminari è stato condotto ad una temperatura dei ripiani pari a 0°C e ad una pressione di 200 μbar.

A valle dei risultati ottenuti dalle prove preliminari così descritte, le liofilizzazioni successive sono state condotte ad una pressione in camera di 200 μbar. Si sono testate due condizioni operative differenti per quanto concerne la temperatura dei ripiani durante la

fase di essiccamento primario. Al fine di valutare l'effetto di due differenti velocità di sublimazione del ghiaccio, la temperatura dei ripiani è stata impostata in un primo caso ad un valore di 0°C e, in un secondo caso, ad un valore di 20°C. A seguito dell'analisi dei risultati ottenuti da queste due condizioni operative, le liofilizzazioni successive sono state condotte ad una temperatura dei ripiani di 0°C durante la fase di essiccamento primario.

2.4 Analisi microbiologiche dei campioni

Per valutare la vitalità dei microrganismi selezionati a valle dello scongelamento e/o dell'essiccamento, ai campioni viene rimosso innanzitutto il tessuto-non-tessuto che li avvolge. Successivamente, sotto cappa biologica, si recuperano i fogli contaminati dal blocchetto di carta tramite pinzetta sterile, e si riposizionano sull'appropriato terreno di coltura solido.

Si procede poi con la chiusura delle Petri tramite Parafilm e, infine, le piastre vengono incubate alla temperatura ottimale di crescita per ogni microrganismo.

La crescita viene valutata visivamente ad occhio nudo ogni 24 ore, a partire dal tempo zero, corrispondente al momento in cui i fogli vengono riposizionati all'interno delle piastre di Petri.

Per quanto riguarda il fungo filamentoso, il cui micelio è caratterizzato da uno sviluppo di tipo radiale, si valuta l'aumento nel tempo del diametro della colonia, misurato ogni 24 ore in due direzioni perpendicolari.

Lo sviluppo delle colonie di tutti i microrganismi testati sulla carta è confrontato con il corrispondente sviluppo delle colonie del controllo. Questo è eseguito a pari condizioni di inoculo sulla carta spiegate in precedenza (stesso tempo di coltura del microrganismo su terreno solido e stesse modalità di contaminazione del foglio di carta sterile), ma non è sottoposto alle fasi di congelamento e liofilizzazione. Le piastre di controllo, quindi, una volta inoculate vengono chiuse con Parafilm, incubate a temperatura ottimale di crescita del microrganismo, e il loro sviluppo viene valutato con le stesse modalità sopra citate.

3.Risultati e commenti

3.1 Messa a punto delle metodologie sperimentali

3.1.1 Prove preliminari di inoculo sulla carta

A seguito delle prove preliminari di crescita di *A. niger*, *P. chrysogenum, Penicillium* sp. e *A. alternata* BNR, sia su terreno liquido MEB e CZ sia su terreno solido MEA e CZ, il fungo *A. niger*, uno tra i più comuni nella contaminazione del materiale cartaceo, viene escluso dal caso in esame, in quanto caratterizzato da conidi molto voluminosi e in numero molto elevato, che andrebbero a creare difficoltà nella preparazione dei campioni. Allo stesso modo, *Penicillium* sp. viene escluso perchè, producendo delle spore molto leggere e quindi facilmente aereodisperse, risulterebbe difficile evitare una contaminazione delle apparecchiature utilizzate, come la camera di essiccamento.

È stata esclusa, dal caso in esame, la crescita in terreno liquido MEB e CZ poichè, nonostante fosse stata osservata crescita fungina per tutti i ceppi elencati, questa non era regolare (Figura 3.1). Inoltre, al termine dell'incubazione, i fogli di carta inoculati risultavano danneggiati per la prolungata immersione nel liquido. Si è scelta, quindi, la crescita su terreno solido, optando per il CZ. Nonostante i funghi risultassero cresciuti su entrambi i terreni, si è scelto il CZ in quanto è un terreno sintetico dal quale si può eventualmente togliere la fonte di carbonio.

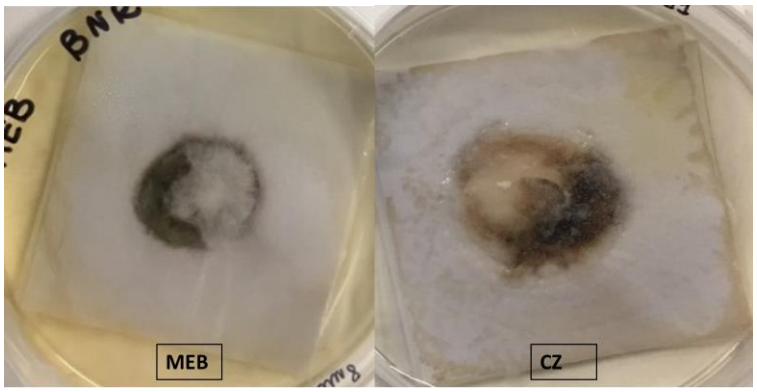

Figura 3. 1: *A. alternata* BNR dopo 72 ore di coltura sul foglio di carta sterile in terreno liquido MEB e CZ

A seguito delle 120 ore di incubazione di *A. alternata* BNR e *P. chrysogenum* su terreno solido CZ, con e senza glucosio, è possibile osservare la crescita di *A. alternata* BNR su entrambi i terreni. Poiché in assenza di glucosio la crescita è inferiore, si decide di mantenere il glucosio nel terreno CZ (Figura 3.2).

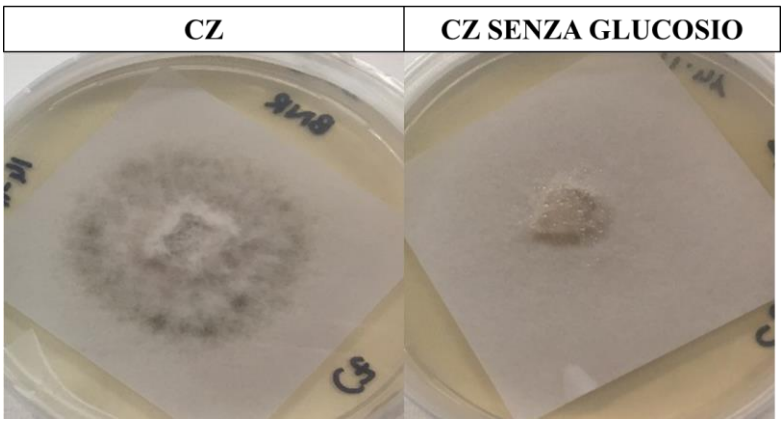

Figura 3. 2: *A. alternata* BNR coltivato 120 ore su terreno solido CZ con e senza glucosio

Il fungo *P. chrysogenum* viene escluso in quanto la sua crescita sul foglio di carta sterile risulta essere lenta e poco evidente, anche dopo 120 ore di incubazione a temperatura controllata.

Dopo l'incubazione di *A. alternata* BNR, in assenza di luce e alla naturale alternanza luce/buio, non si notano particolari differenze nella modalità e nella velocità di crescita. Per questo motivo, si sceglie di effettuare l'incubazione del fungo alla naturale illuminazione (Figura 3.3).

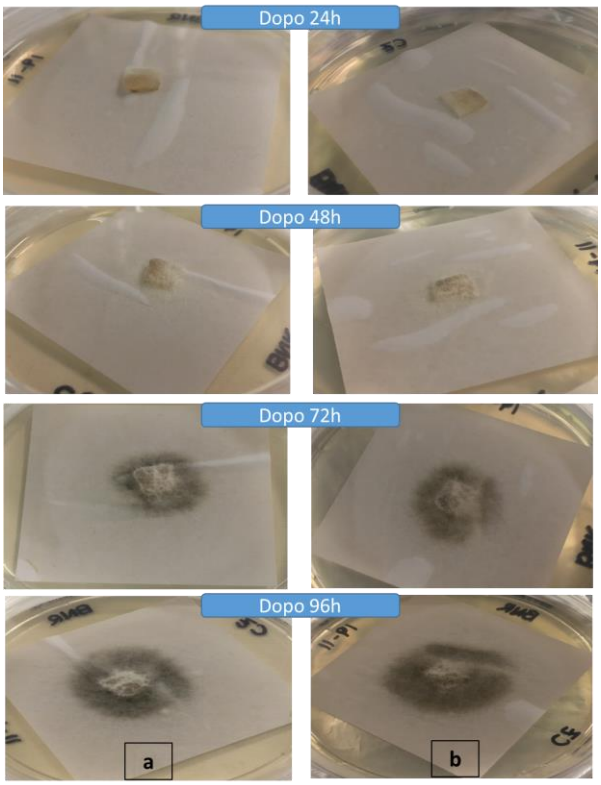

Figura 3. 3: *A. alternata* BNR coltivato su terreno solido CZ a) naturale alternanza luce/buio b) assenza di luce

3.1.2 Prove preliminari di immersione

Nella prima prova preliminare eseguita i campioni sono stati immersi in posizione orizzontale in un recipiente con acqua distillata per 16 ore, al termine delle quali i campioni hanno registrato un aumento di peso, rispetto al peso secco iniziale, pari al 74.7%.

Ciò che è emerso nella prova preliminare successiva è un aumento dell'assorbimento di acqua, rispetto alla prova precedente, da parte della carta, dovuto a un aumento della durata di immersione. I pesi rilevati, a seguito di una scolatura dei campioni, mostrano un aumento di peso, rispetto al peso secco, di 91.78%.

Nella prova di immersione condotta all'interno di vasi ermetici la differenza di assorbimento di acqua dopo 18 e 26 ore è risultata minima (Figura 3.4); tuttavia, dopo 24 ore, i campioni sono apparsi molto degradati. Si è deciso, quindi, di adottare un tempo di immersione pari a 18 ore, risultando sufficiente per una completa bagnatura dei campioni.

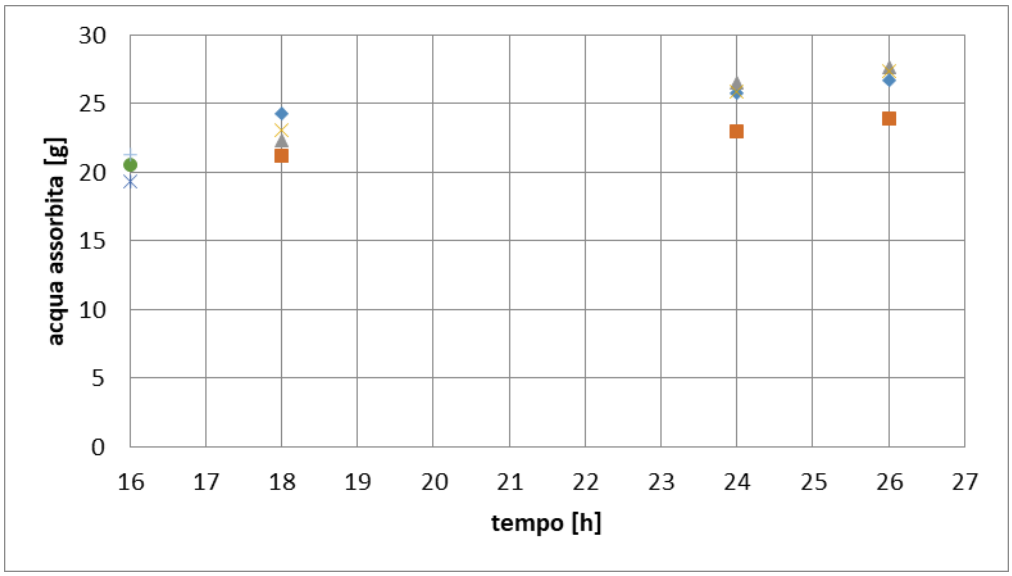

Figura 3. 4: grammi di acqua assorbita dai campioni dopo 16, 18, 24, 26 ore di immersione

3.1.3 Prove preliminari di composizione dei campioni

Ciò che è emerso dalla prova di essiccamento di 3 blocchetti di carta non contaminati e chiusi con 3 tipologie di involucro differente, è che entrambe le tipologie di sacchetto (busta autosigillante per sterilizzazione e busta di plastica in sottovuoto) non permettono la fuoriuscita dell'aria contenuta, provocando quindi dei rigonfiamenti; si è scelto, quindi, di avvogere il campione in un tessuto-non-tessuto.

Nella prova preliminare in cui i campioni sono stati avvolti con un numero differente (1-4) di strati di tessuto-non-tessuto non sono stati riscontrati problemi di rigonfiamento. Ciò che ne è emerso è che la stratificazione del tessuto non ha avuto nessuna influenza sull'essiccamento dei campioni (Tabella 3.1).

Tabella 3. 1: variazione di peso dei campioni a valle della prova di essiccamento in funzione del numero di strati di tessuto

#	numero strati	peso iniziale [g]	peso finale [g]	variazione [g]
1	4	53,1	44,08	9,02
2	1	45,35	35,06	10,29
3	2	51,95	41,31	10,643
4	3	53,35	43,81	9,538

È stata preparata una sospensione conidica di *A. niger* caratterizzata da un valore di assorbanza a 650 nm pari a 0.9. Un'aliquota di questa sospensione è stata filtrata con uno strato di tessuto-non-tessuto ottenendo una diminuzione del valore di assorbanza sino a 0.7; l'altra aliquota è stata, invece, filtrata con 4 strati ottenendo una diminuzione di

assorbanza leggermente superiore, sino a 0.6. È emerso, quindi, che anche 4 strati di tessuto-non-tessuto non sono sufficienti a trattenere la maggior parte dei conidi. Al fine di ridurre al minimo la contaminazione fungina all'interno della camera di essiccamento, si è scelto di avvolgere ciascun blocchetto di carta con 4 strati di tessuto-non-tessuto e di coprire il foglio inoculato, posto in cima al blocchetto, con un foglio di carta non sterile.

3.1.4 Prove preliminari di liofilizzazione

A seguito dell'immersione all'interno di vasi ermetici, i campioni hanno registrato un aumento di peso, rispetto al peso secco iniziale, pari al 59%, assorbendo 15.3235 ± 5.3568 g di acqua (Figura 3.5).

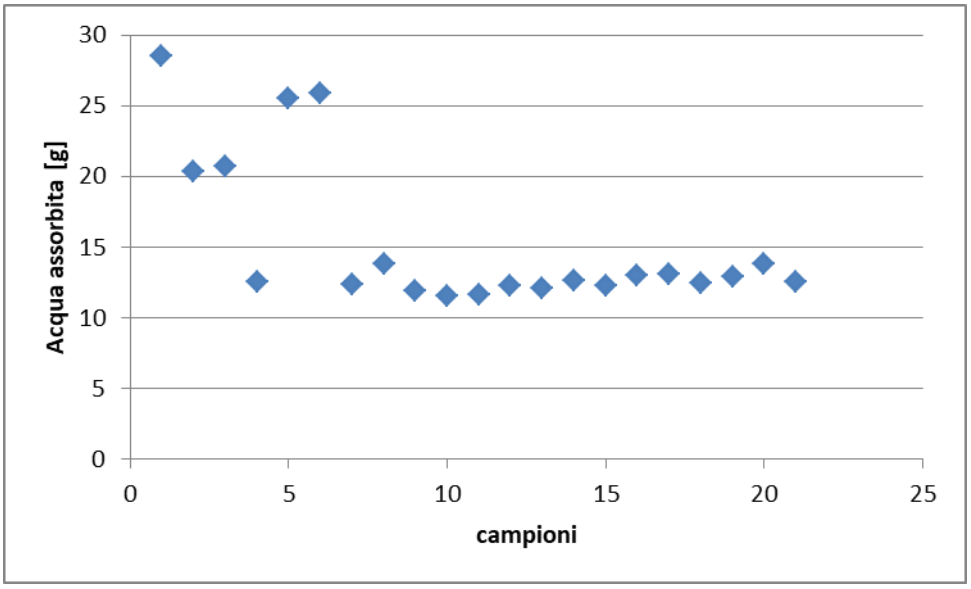

Figura 3. 5: grammi di acqua assorbiti a valle dell'immersione

La liofilizzazione dei campioni ha permesso la quasi totale rimozione dell'acqua inizialmente assorbita, ottenendo così dei prodotti essiccati (Figura 3.6). I campioni hanno perso infatti 15.0929 ± 5.3637 g di acqua, con umidità residua pari a circa 0.888%.

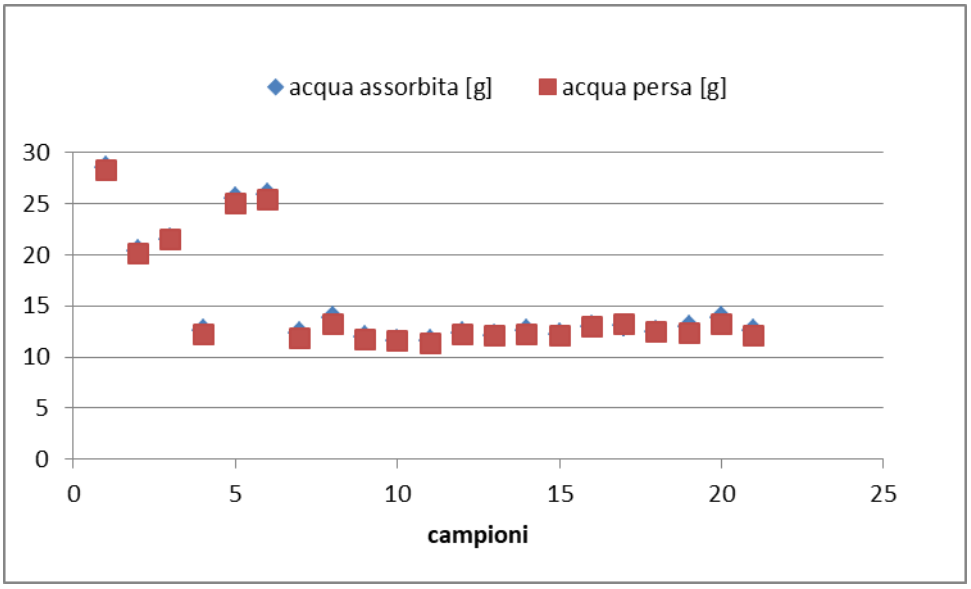

Figura 3. 6: confronto tra i grammi di acqua assorbita e persa a valle dell'essiccamento primario

Come è riscontrabile dal rapporto dei valori delle due sonde di pressione, la durata delle tre liofilizzazioni eseguite varia da 36 ore per la prima, 20 ore per la seconda e 25 ore per la terza (Figura 3.7). Il diverso peso dei campioni a seguito dell'immersione, così come la non perfetta planarità degli stessi portano ad avere dei tempi variabili di essiccamento primario.

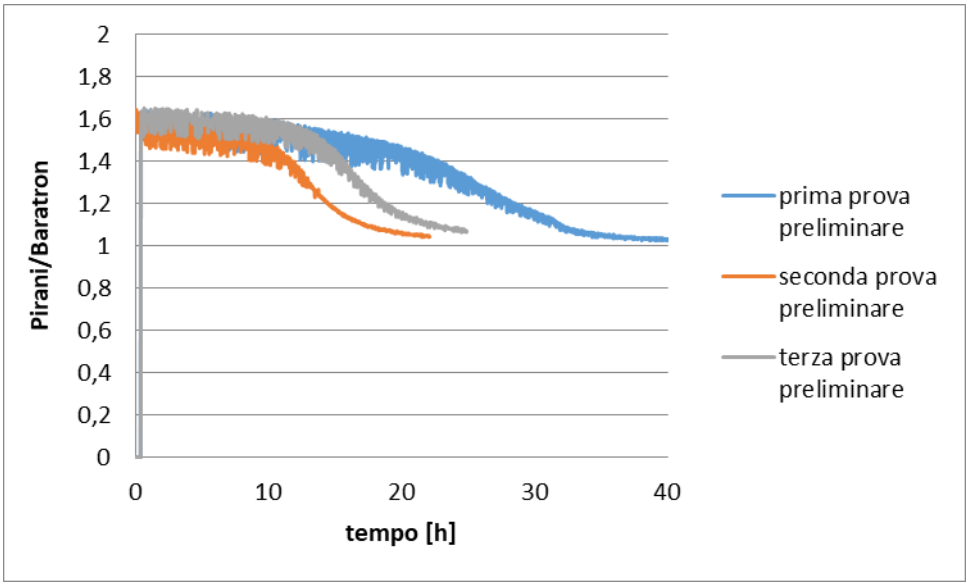

Figura 3. 7: confronto tra i rapporti dei valori registrati dalle due sonde di pressione delle prove preliminari di liofilizzazione

Per quanto riguarda la seconda prova preliminare di liofilizzazione, condotta su campioni contaminati da *S. epidermidis*, il termine dell'essiccamento primario è stato anche valutato attraverso le termocoppie inserite a metà spessore dei campioni. La temperatura dei prodotti si è portata alla temperatura dei ripiani al raggiungimento delle 15 ore circa (Figura 3.8), valore in corrispondenza del quale il rapporto tra le pressioni misurate dal sensore termoconduttivo e quello capacitivo inizia a scendere, indice dell'approssimarsi della fine dell'essiccamento primario.

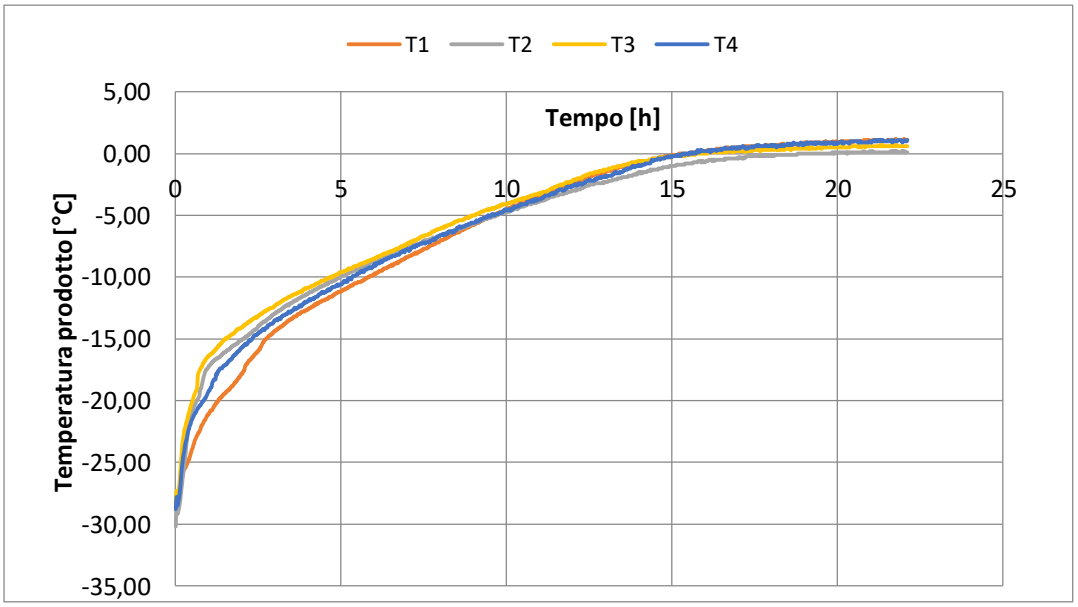

Figura 3. 8: andamento della temperatura del prodotto dei campioni contaminati da *S. epidermidis*

A seguito del congelamento di 72 ore in freezer e dell'essiccamento (prima prova preliminare), la crescita di *A. alternata* BNR (Figura 3.9) è visibile a 120 ore di incubazione, sia per il micelio non sporificato che per quello sporificato. A tale tempo il diametro della colonia è minore rispetto a quello del controllo. Inoltre, il diametro della colonia del foglio posizionato a metà spessore è inferiore, a parità di tempo, rispetto a quello posto in superficie, sia per il micelio non sporificato che per quello sporificato.

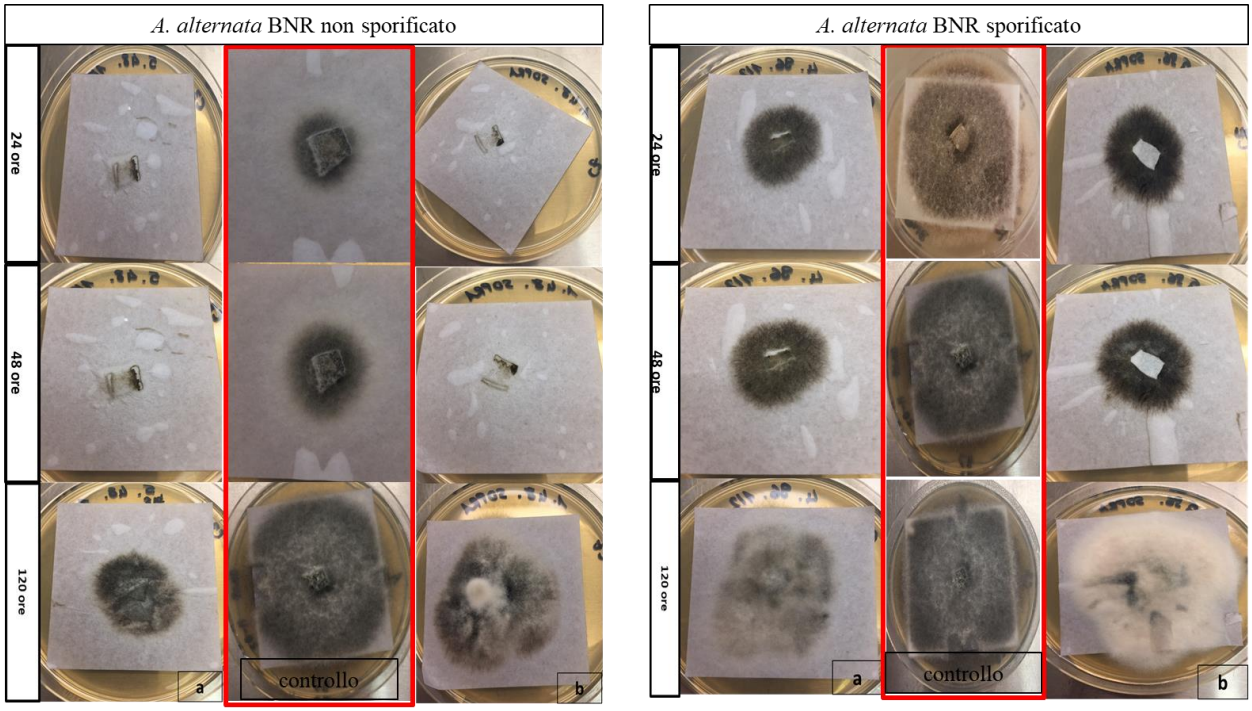

Figura 3. 9: *A. alternata* BNR a seguito della prima prova preliminare di liofilizzazione, posizionato a) a metà spessore e b) sopra

Il batterio *S. epidermidis* (Figura 3.10), a seguito di 24 ore di congelamento in freezer e dell'essiccamento (seconda prova preliminare), è cresciuto indipendetemente dalla posizione occupata dal foglio contaminato all'interno del blocchetto di carta. La liofilizzazione, quindi, non ha inibito la crescita del batterio.

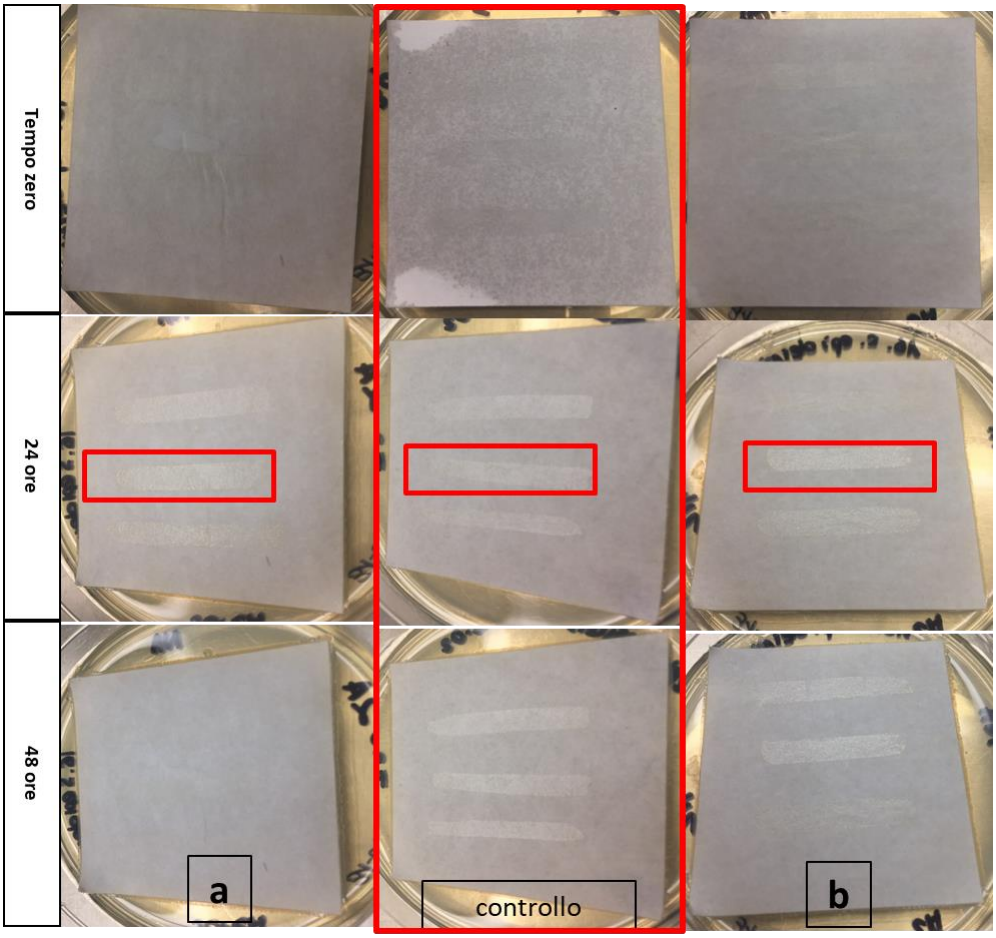

Figura 3. 10: *S. epidermidis* posizionato a) sopra il campione b) a metà spessore, a valle della seconda prova preliminare di liofilizzazione

Per quanto riguarda *R. mucilaginosa* (Figura 3.11) il congelamento in freezer di 18 giorni e il successivo essiccamento (terza prova preliminare) non hanno avuto un effetto di inibizione sulla crescita del lievito. I tre inoculi appaiono meno evidenti a 24 ore di incubazione rispetto alle 48 ore, così come nel caso del controllo. L'intensità della colorazione dei campioni sottoposti a liofilizzazione, a parità di tempo, è maggiore rispetto al controllo.

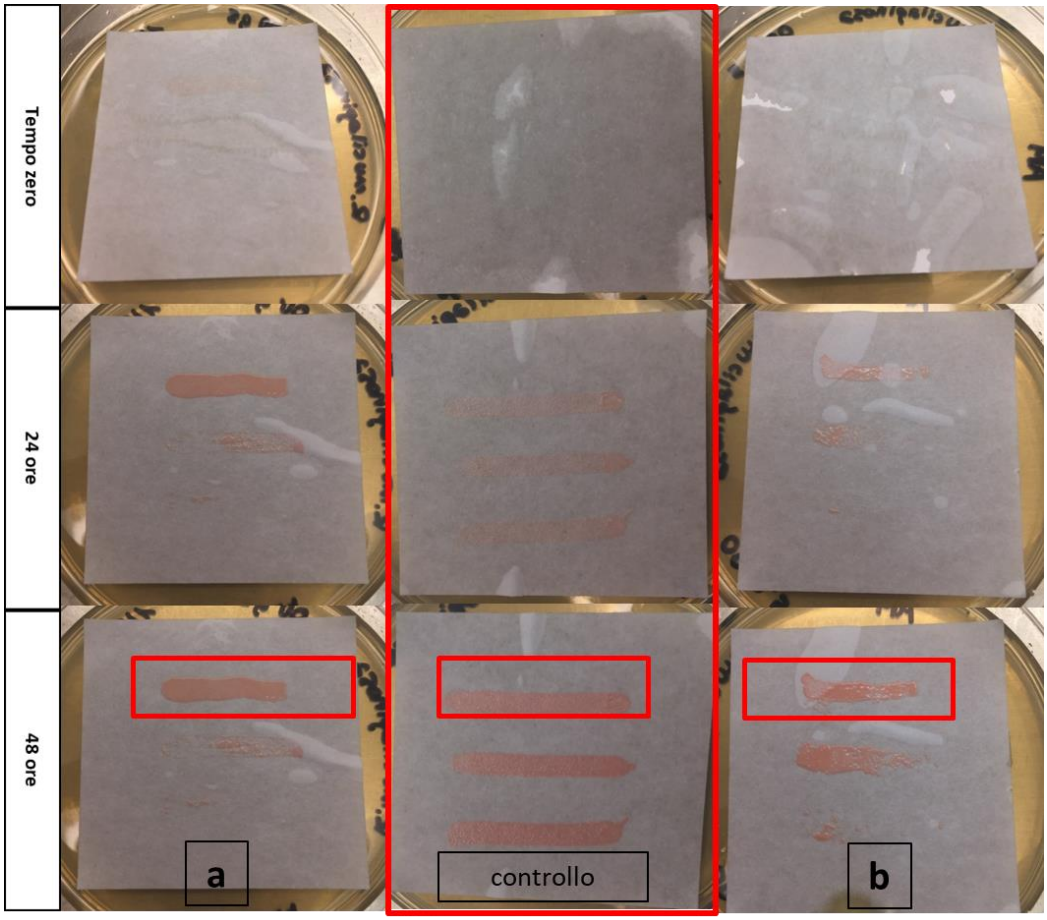

Figura 3. 11: *R. mucilaginosa* posizionato a) sopra e b) a metà spessore del blocchetto, a seguito della terza prova preliminare di liofilizzazione

3.2 Pesi dei campioni post-immersione e post-essiccamento

3.2.1 Immersione

Nel caso di studio sono stati immersi 94 campioni i quali hanno registrato un aumento di peso, rispetto al peso secco iniziale, pari a 49.59%, assorbendo 12.8796 ± 3.097 g di acqua (Figura 3.12).

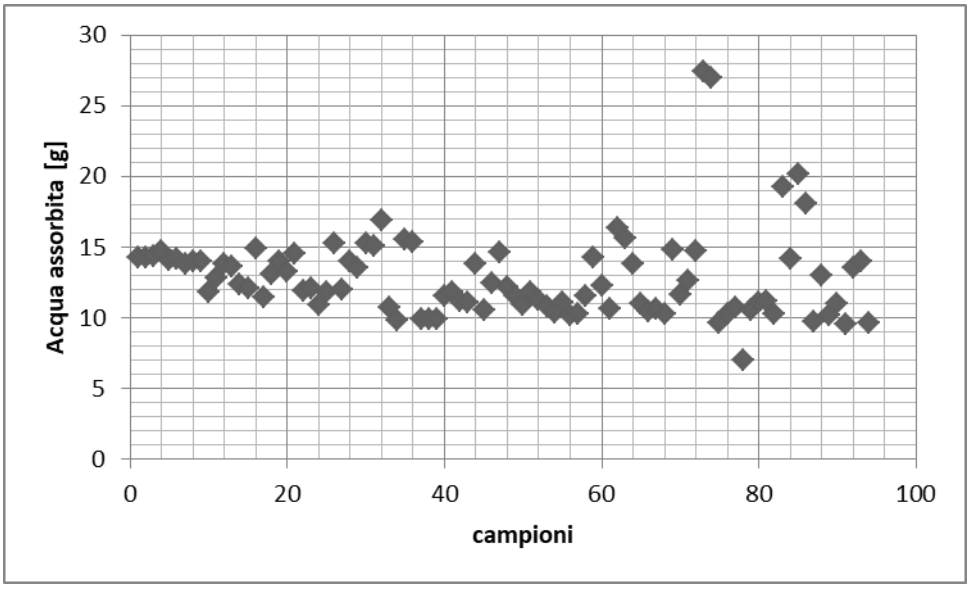

Figura 3. 12: grammi di acqua assorbita dai campioni a valle dell'immersione in acqua distillata

3.2.2 Essiccamento

L'acqua inizialmente assorbita dai campioni è completamente rimossa a valle dell'essiccamento primario (Figura 3.13). La liofilizzazione ha infatti permesso la rimozione di 12.025 ± 2.0719 g di acqua, passando dallo stato solido a quello vapore. I campioni mostrano un contenuto di umidità residua pari a 3.29%, valore congruo con un valore di umidità residua di prodotti liofilizzati con un essiccamento primario.

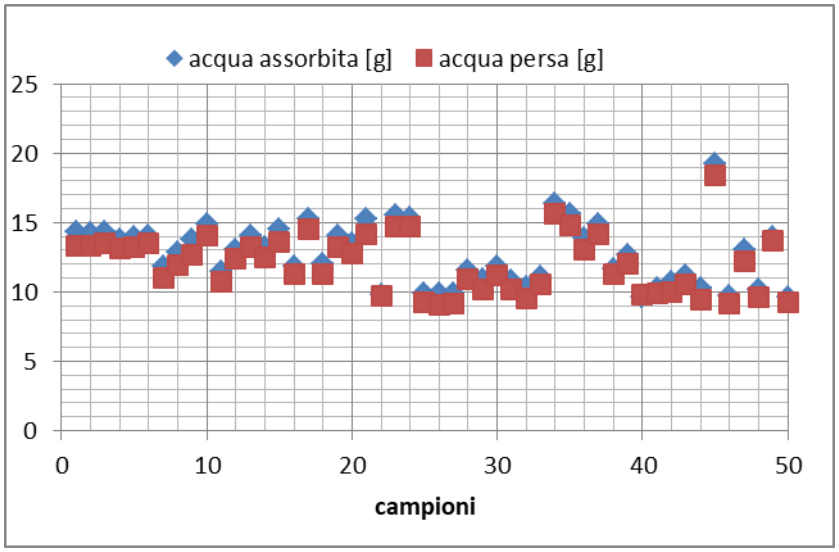

Figura 3. 13: confronto tra l'acqua inizialmente assorbita dopo l'immersione e l'acqua rimossa a valle dell'essiccamento

I blocchetti di carta essiccati non presentano il nucleo centrale di ghiaccio, indicando così l'efficacia del processo nel ripristinare i prodotti allo stato iniziale. Questi, inoltre, non presentano stati di degradazione, nemmeno sui fogli a diretto contatto con la piastra riscaldante (Figura 3.14). I cambiamenti della carta rilevati al termine dell'essiccamento sono di tipo tattile, mostrando una maggior rigidezza e un aumento di volume dei blocchetti; questi cambiamenti sono comunque attribuibili, per lo più, al contatto con l'acqua, piuttosto che al processo di liofilizzazione.

Figura 3. 14: Campione liofilizzato

3.3 Durata dell'essiccamento primario

I campioni essiccati sono stati ottenuti con un tempo di essiccamento che varia tra le 20 e le 25 ore; nello specifico, le liofilizzazioni condotte ad una temperatura dei ripiani pari a 0°C sono terminate dopo circa 25 ore, mentre la liofilizzazione condotta a 20°C si è conclusa dopo circa 20 ore, come è riscontrabile dal raggiungimento dell'asintoto orizzontale dei valori di pressione registrati dalla sonda termoconduttiva (Figura 3.15). Al fine di confrontare nel dettaglio le durate dei processi, in Figura 3.16 sono riportati i rapporti dei valori registrati dalle due sonde di pressione: si osserva, quindi, che il valore unitario, indice dell'assenza di vapore acqueo in camera, viene raggiunto dopo 20 e 25 ore di essiccamento, variabile a seconda della velocità di sublimazione.

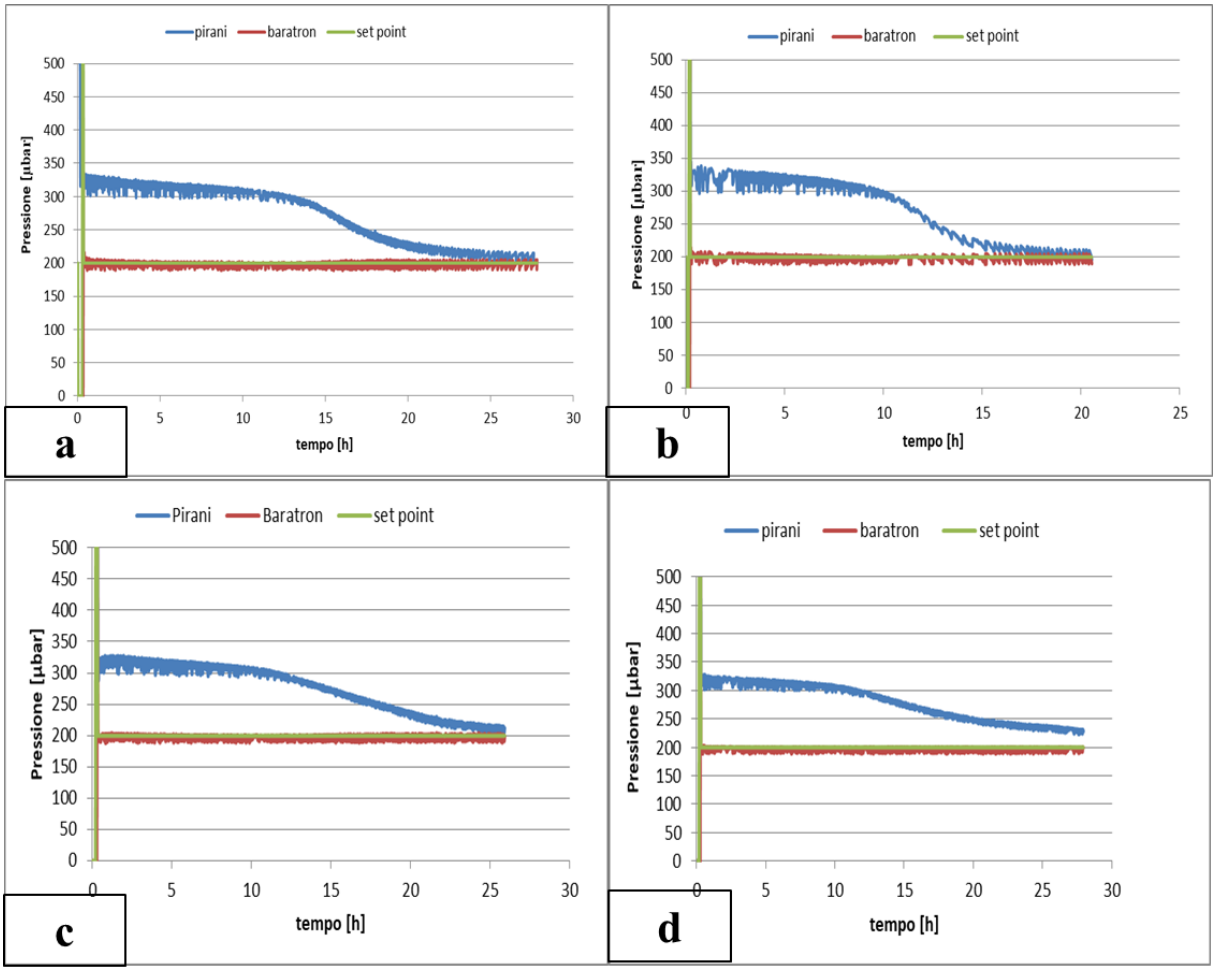

Figura 3. 15: andamento della pressione in camera, rispettivamente per il caso di essiccamento primario condotto a) a temperatura di 0°C, b) a temperatura di 20 °C, c) a temperatura di 0°C, d) a temperatura di 0°C

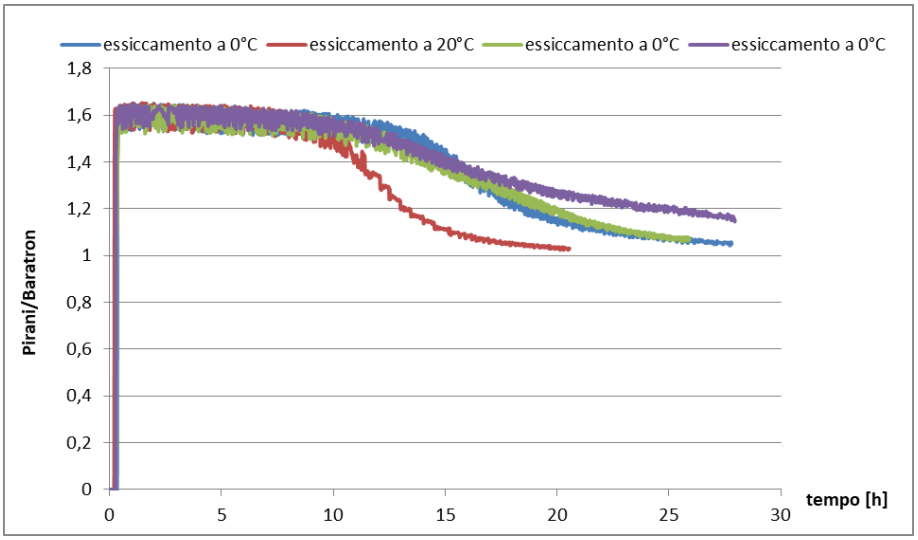

Figura 3. 16: confronto tra i rapporti dei valori registrati dalle due sonde di pressione delle varie liofilizzazioni eseguite

La fine dell'essiccamento primario nella terza liofilizzazione (Figura 3.15, caso c) è stata anche valutata tramite l'andamento dei valori registrati dalle termocoppie inserite a metà spessore e a 3-4 fogli dal fondo di due campioni; questi si sono portati alla temperatura dei ripiani dopo 20 ore circa, risultato congruo con quanto osservato con l'andamento del rapporto tra le pressioni misurate in camera. I fogli posti a metà spessore (TP3 e TP2) hanno raggiunto la temperatura dei ripiani più velocemente rispetto ai fogli posti a contatto con la piastra riscaldante (Figura 3.17). Questo andamento risulta essere congruo con la dinamica che viene generalmente assunta per il processo di essiccamento del campione, durante il quale l'interfaccia di sublimazione procede dall'alto verso il basso, aumentando nel tempo lo spessore del prodotto essiccato.

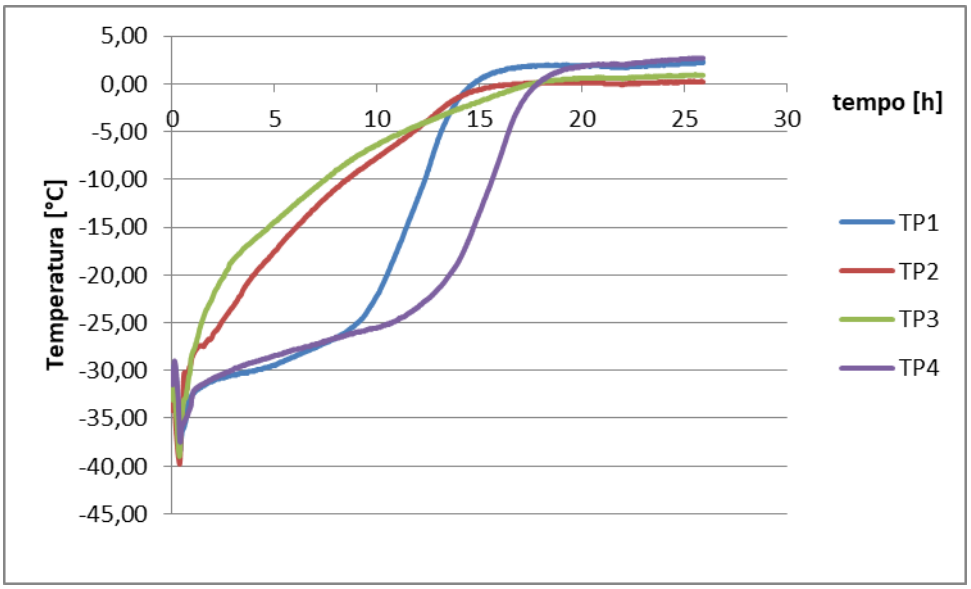

Figura 3. 17: andamento della temperatura dei prodotti

3.4 Effetto del congelamento sulla crescita microbica

3.4.1 Congelamento in freezer

A seguito dei 13 giorni di congelamento in freezer, alla temperatura di circa -20°C, la crescita di *R. mucilaginosa* (Figura 3.18) non è inibita; non si osservano differenze di crescita tra i fogli contaminati posizionati sopra il blocchetto e quelli posizionati a metà spessore. In entrambi i casi i tre inoculi appaiono meno evidenti a 24 ore di incubazione rispetto alle 48 ore, così come nel caso del controllo. L'intensità della colorazione dei campioni sottoposti a congelamento, a parità di tempo, è maggiore rispetto al controllo, questo potrebbe essere dovuto ad una maggiore crescita del lievito o ad una maggior produzione dei carotenoidi.

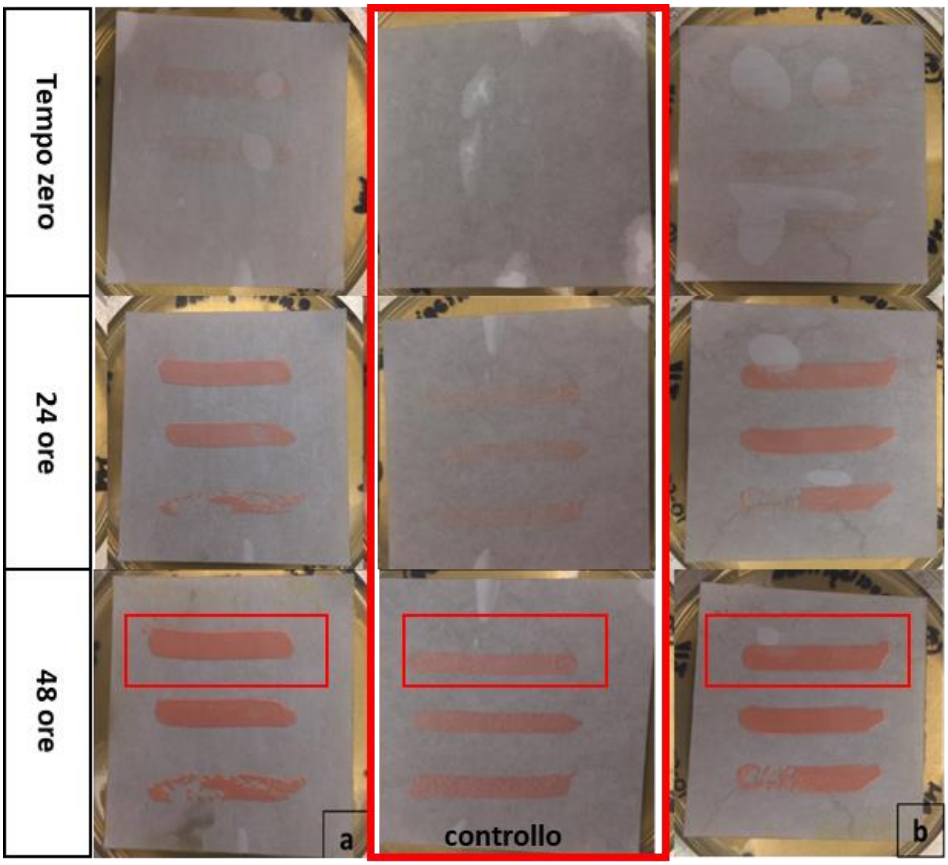

Figura 3. 18: *R. mucilaginosa* posizionata a) sopra e b) a metà spessore del blocchetto, a seguito del congelamento in freezer

La crescita di *S. epidermidis* nei fogli contaminati, sottoposti a congelamento, risulta essere stimolata rispetto al controllo: le colonie batteriche sono già evidenti dopo 24 ore di incubazione. Inoltre, è possibile osservare la crescita del batterio ai bordi del foglio contaminato (come indicato dalla freccia in figura 3.19), probabilmente per effetto della dispersione delle colonie dovuta alla migrazione dell'acqua all'interno del campione. Così come per il lievito, anche per il batterio non si osservano differenze evidenti di crescita tra il foglio posto sopra il blocchetto e quello posizionato a metà spessore (Figura 3.19).

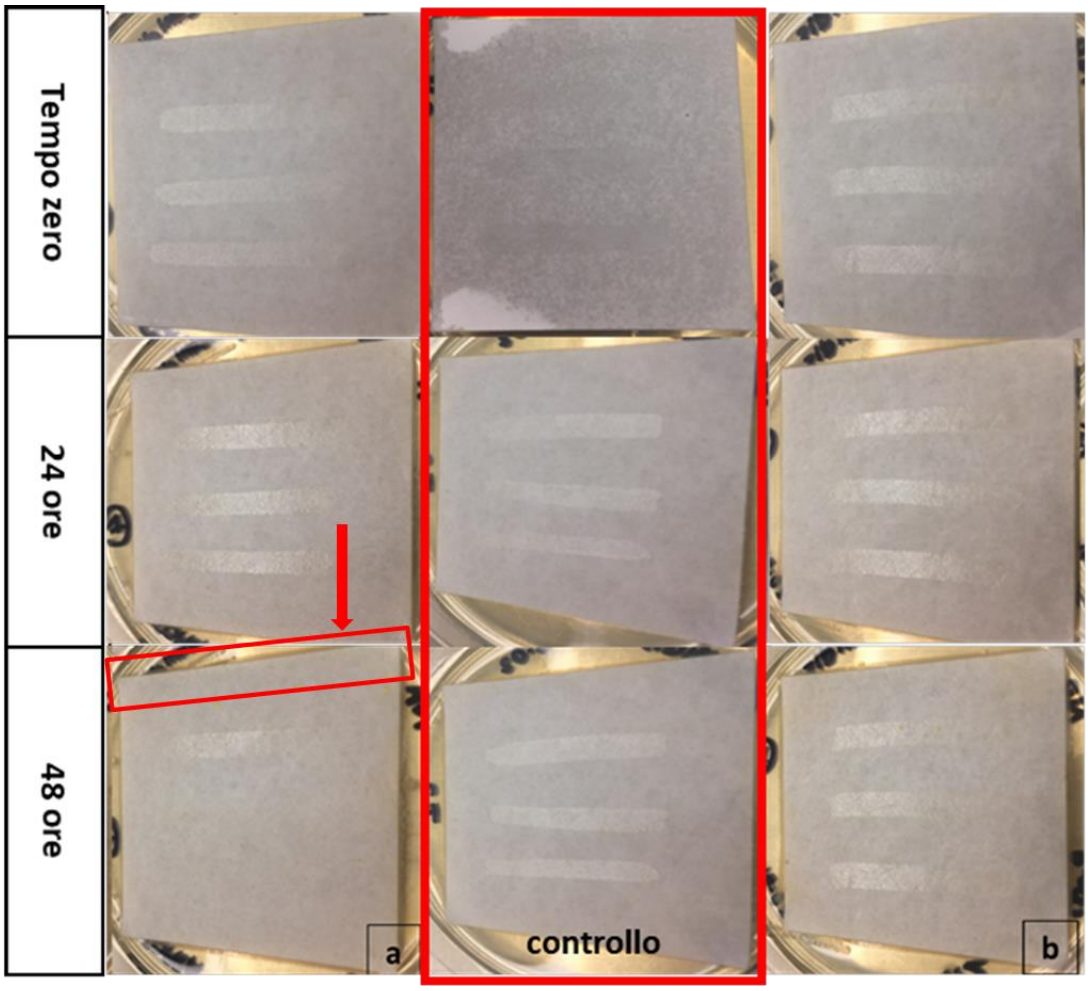

Figura 3. 19: *S. epidermidis* posizionato a) sopra il blocchetto e b) a metà spessore, a seguito del congelamento in freezer

Per quanto riguarda *A. alternata* (Figura 3.20), è possibile osservare che il fungo non sporificato congelato per 13 giorni, scongelato e riposizionato sul terreno nutritivo agarizzato, presenta una crescita visibile dopo 48 ore, indipendentemente dalla posizione del foglio contaminato. I diametri delle colonie sono confrontabili a parità di tempo, tuttavia è possibile osservare un maggior sviluppo del micelio aereo nel caso del foglio contaminato posizionato in superficie. Rispetto al controllo, è possibile osservare un diametro minore delle colonie, a parità di tempo, e l'assenza di sporificazione del micelio. Quanto osservato è confermato dalla curva di crescita riportata in Figura 3.21, riferita al solo foglio contaminato depositato sulla superficie del blocchetto.

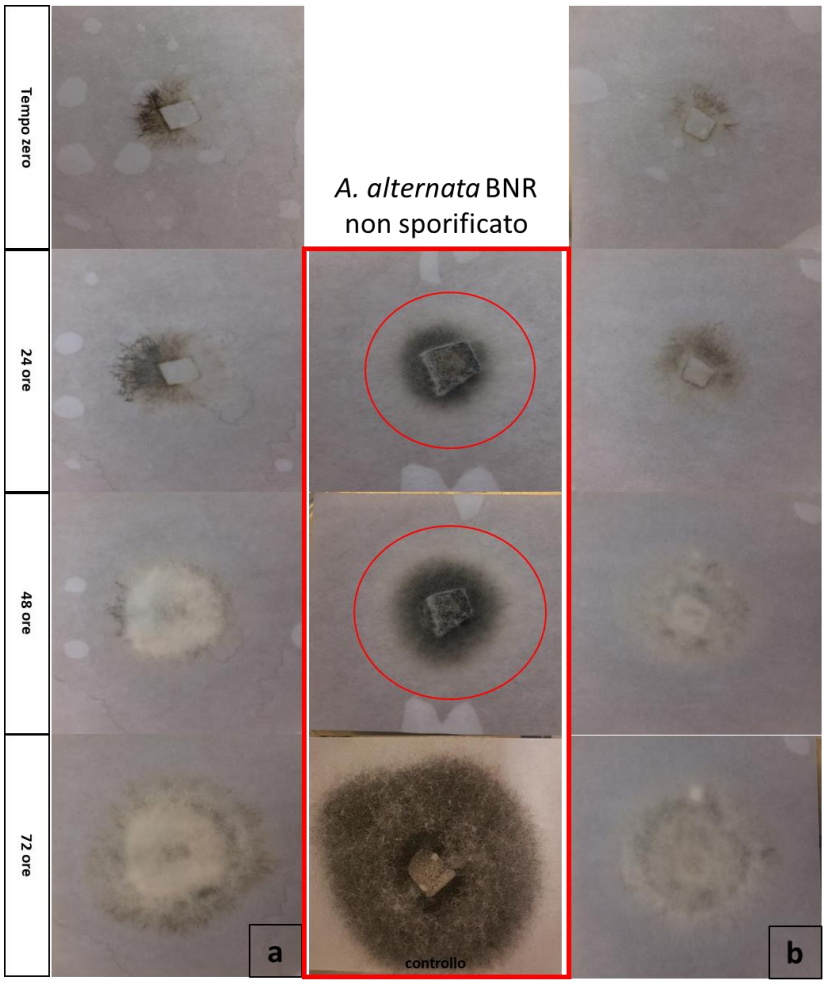

Figura 3. 20: *A. alternata* BNR non sporificato a seguito del congelamento in freezer, posizionato a) sopra il blocchetto e b) a metà spessore

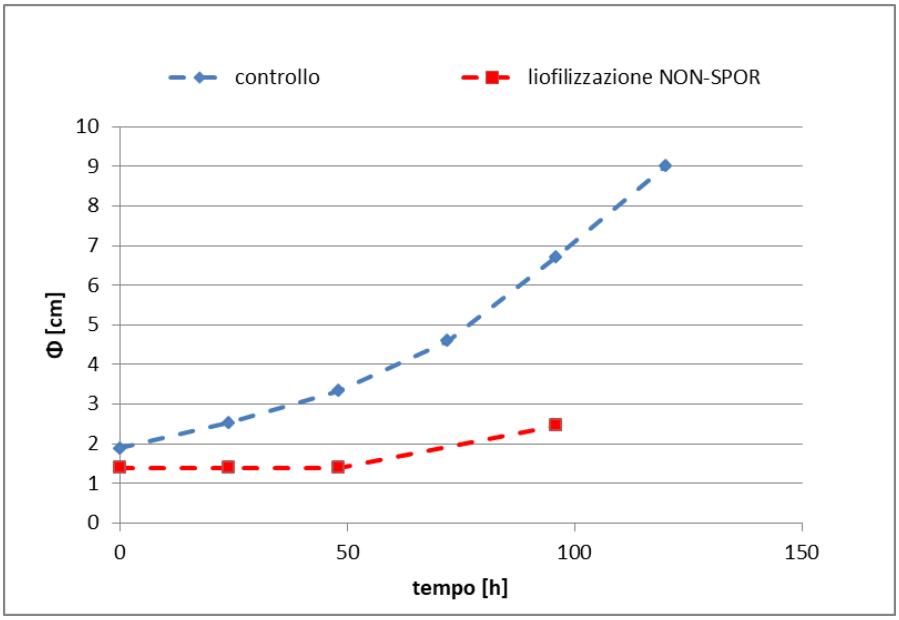

Figura 3. 21: diametro di *A. alternata* BNR non sporificato dopo il congelamento in freezer

Per quanto riguarda il campione con micelio sporificato (Figura 3.22) si osserva che, dopo scongelamento, a partire dalle 48 ore, si sviluppa un abbondante micelio aereo che ricopre quello precedentemente sporificato, indipendentemente dalla posizone del foglio contaminato all'interno del blocchetto. A differenza del controllo, nell'intervallo di tempo considerato il campione non raggiunge il bordo della capsula Petri. A seguito dello scongelamento è possibile osservare una fase di latenza di 24 ore, successivamente la crescita di *A. alternata* BNR sporificato riprende con una velocità paragonabile a quella del controllo, così come è possibile osservare dalla pendenza delle curve riportate in Figura 3.23.

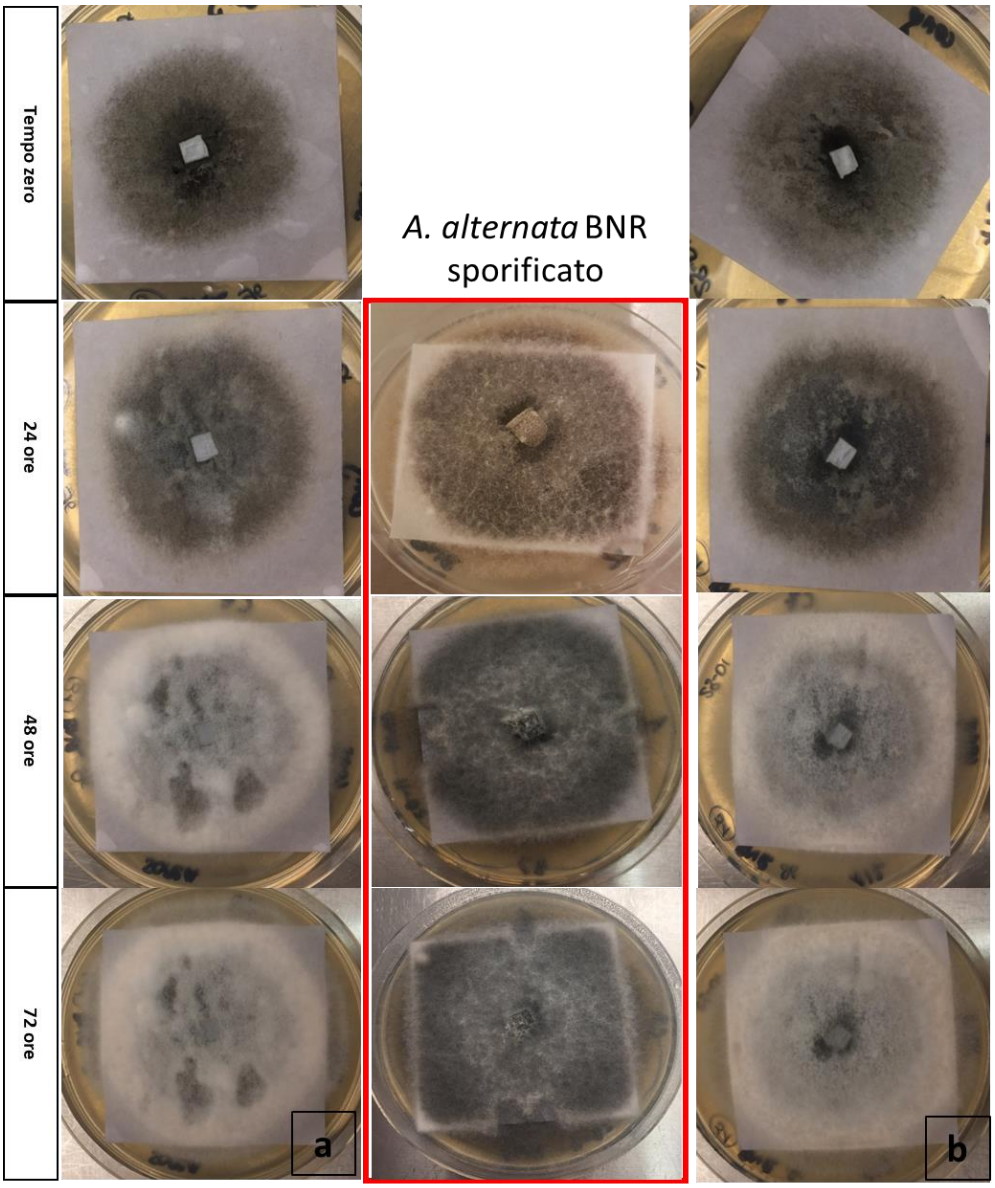

Figura 3. 22: *A. alternata* BNR sporificato a seguito del congelamento in freezer posizionato a) sopra il blocchetto b) a metà spessore

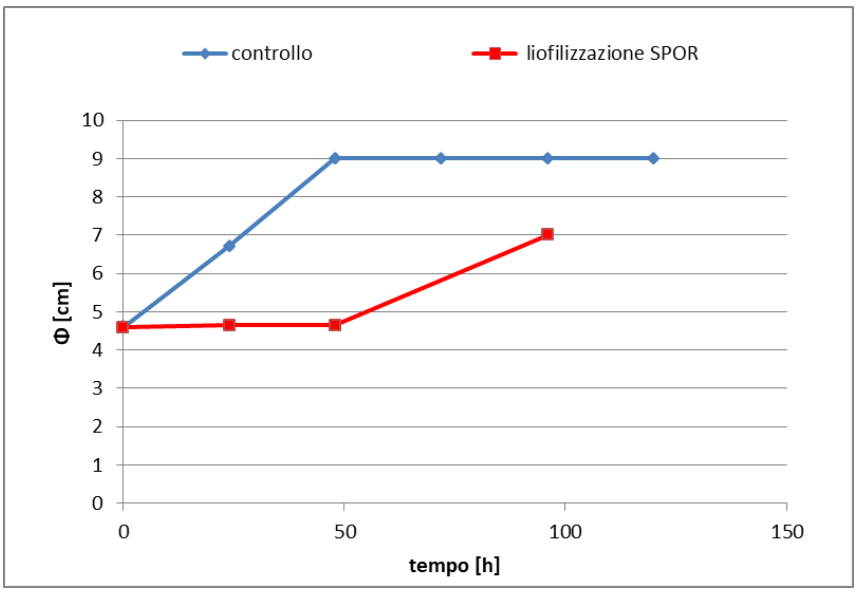

Figura 3. 23: diametro di *A. alternata* BNR sporificato a seguito del congelamento in freezer

3.4.2 Congelamento in liofilizzatore a -40°C

Il comportamento dopo scongelamento di *R. mucilaginosa* e *S. epidermidis* non presenta inibizione della crescita, così come descritto nel paragrafo precedente, relativo al congelamento in freezer. Per tale motivo non si riportano immagini relative a questa condizione.

A seguito del congelamento in liofilizzatore, la crescita di *A. alternata* BNR non sporificato è confrontabile a quanto ottenuto per il congelamento in freezer. E' stato infatti possibile osservare un rallentamento della crescita rispetto al controllo (Figura 3.24) e la presenza di micelio aereo non sporificato. Infatti, come è riscontrabile dalla curva di crescita riportata in Figura 3.25, l'aumento del diametro delle colonie nelle prime 48 ore è risultato essere pari a 1.38 cm e 1.3 cm, rispettivamente per il caso del congelamento in freezer e per il congelamento in liofilizzatore.

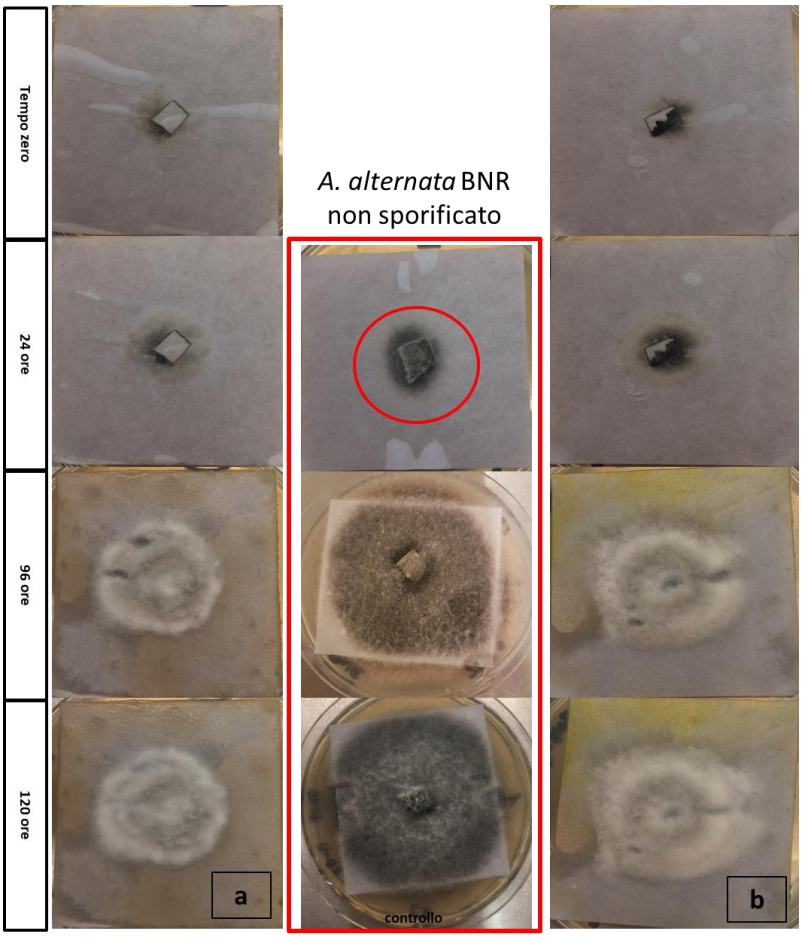

Figura 3. 24: *A. alternata* BNR non sporificato posizionata a) sopra il blocchetto e b) a metà spessore, a valle del congelamento in liofilizzatore a -40°C

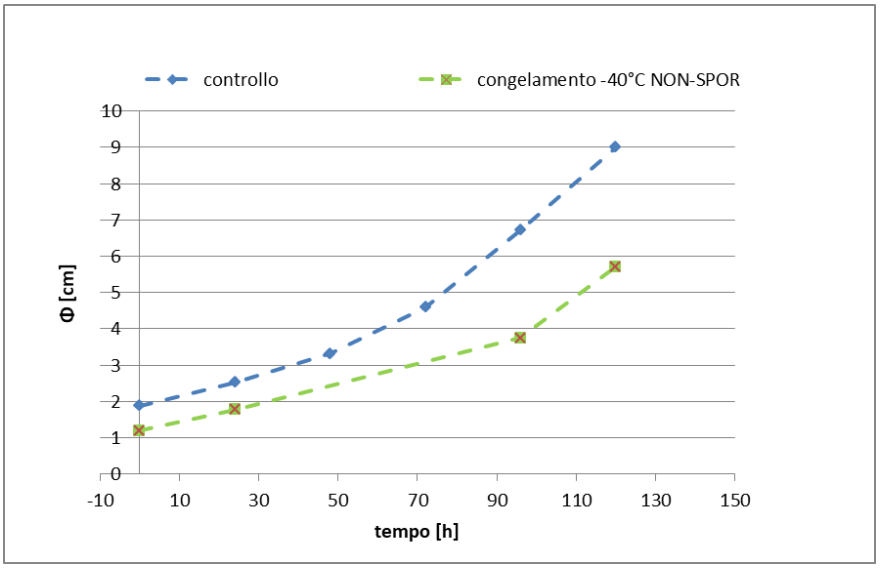

Figura 3. 25: diametro di *A. alternata* BNR non sporificato a seguito del congelamento in liofilizzatore a -40°C

Per quanto riguarda il campione di *A. alternata* BNR sporificato (Figura 3.26), come riscontrato per il congelamento in freezer, anche in questo caso si osserva un'abbondante presenza di micelio aereo, a partire dalle 96 ore. Rispetto al controllo, non si ha sporificazione nell'intervallo di tempo considerato, indipendentemente dalla posizione occupata all'interno del blocchetto. I diametri delle colonie sono confrontabili, a parità di tempo, con quelli del controllo, come è riscontrabile nella Figura 3.27.

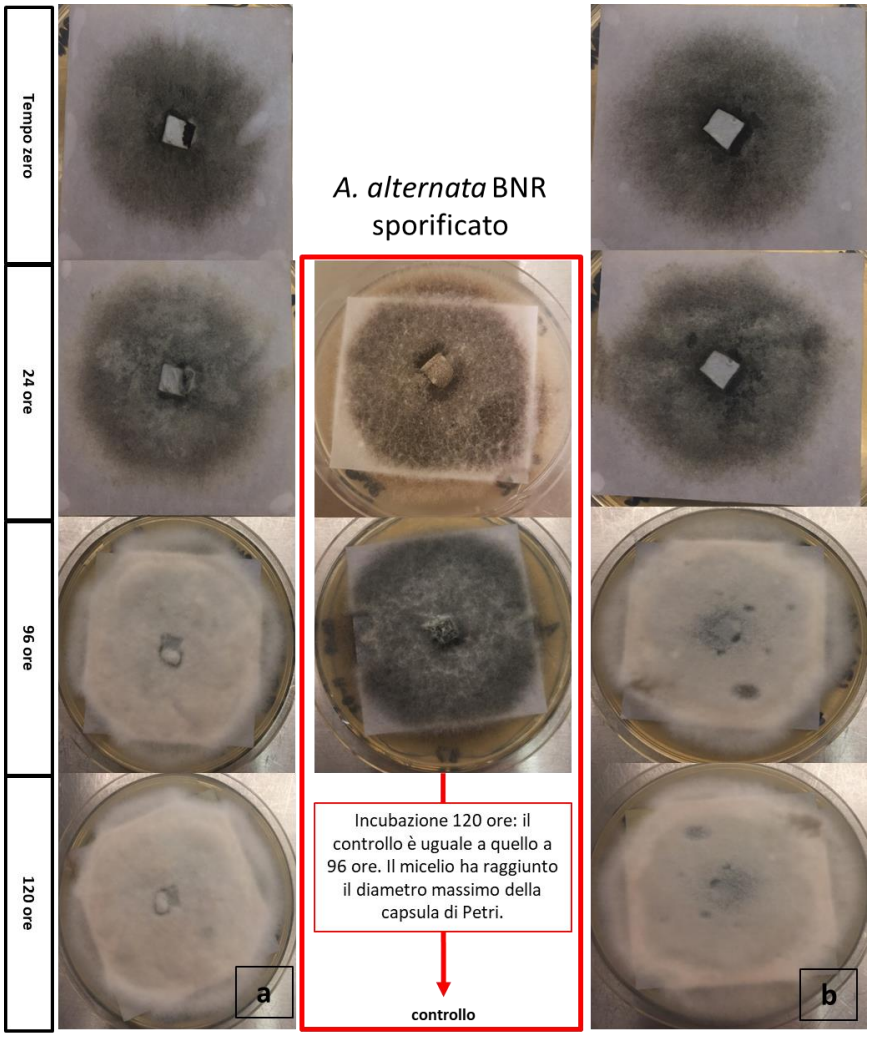

Figura 3. 26: *A. alternata* BNR sporificato a seguito del congelamento a -40°C posizionato a) sopra il blocchetto b) a metà spessore

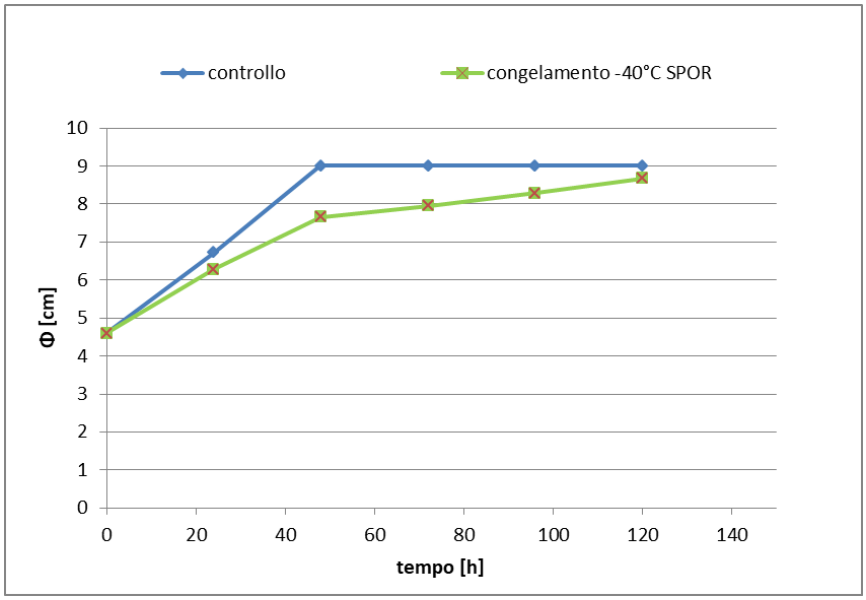

Figura 3. 27: diametro di *A. alternata* BNR sporificato a seguito del congelamento in liofilizzatore a -40°C

3.4.3 Congelamento in liofilizzatore a -20°C

La crescita di *R. mucilaginosa* e *S. epidermidis* a seguito del congelamento in liofilizzatore a -20°C non presenta differenze rispetto al caso del congelamento in freezer ed a quello in liofilizzatore a -40°C. Anche in questo caso non si riportano le immagini relative.

Relativamente al micelio fungino non sporificato (Figura 3.28) dopo 96 ore dallo scongelamento, si osserva una differenza rispetto ai casi precedenti. E' infatti presente una scarsa produzione di micelio aereo ed una cospiqua sporificazione, in particolare per il foglio posizionato sulla superficie del blocchetto. Si riscontra, inoltre, un minor diametro finale delle colonie rispetto al controllo. Questo è in accordo con le curve di crescita, riportate in Figura 3.29, che presentano una velocità pressochè costante, sino a raggiungere un diametro massimo di 5.62 cm dopo 168 ore.

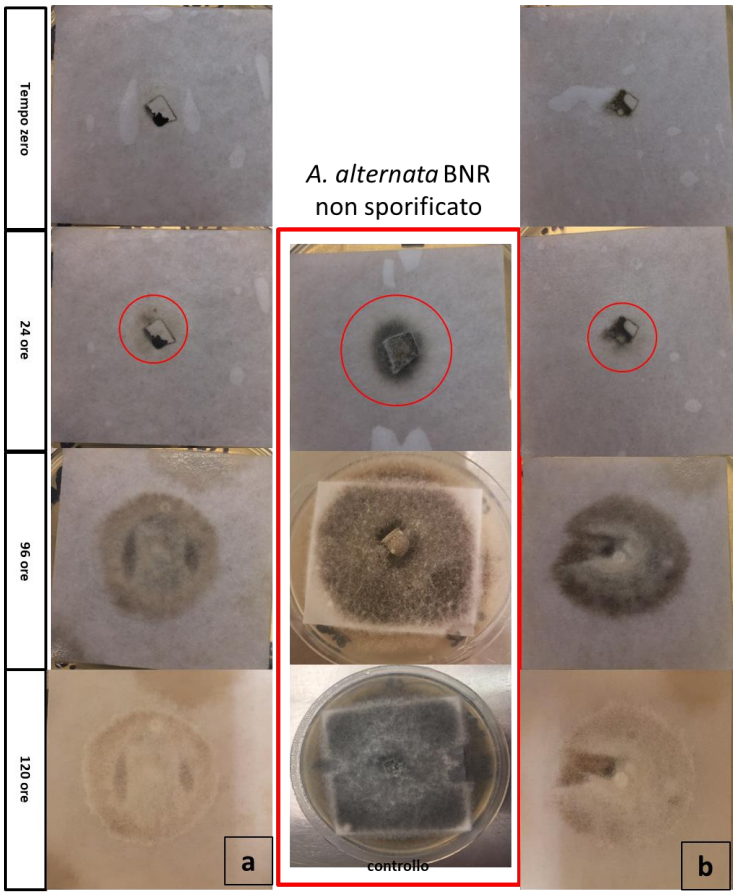

Figura 3. 28: *A. alternata* BNR non sporificato posizionato a) sopra il blocchetto e b) a metà spessore, a seguito del congelamento in liofilizzatore a -20°C

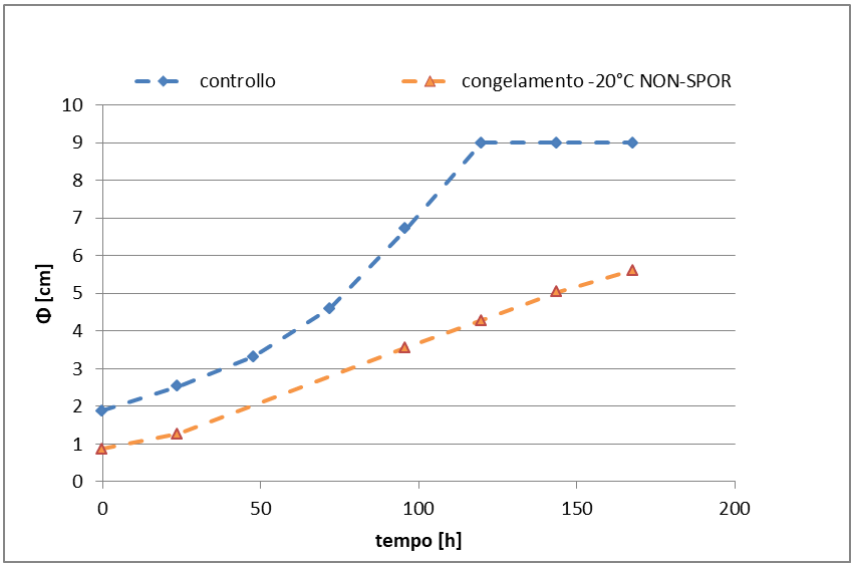

Figura 3. 29: diametro *A. alternata* BNR non sporificato a seguito del congelamento in liofilizzatore a -20°C

A seguito dello scongelamento del campione contaminato da *A. alternata* BNR sporificato (Figura 3.30) si osserva, dopo 24 ore, un minor diametro delle colonie rispetto al controllo. Dopo 96 ore si osserva un'abbondante presenza di micelio aereo che ricopre quello precedentemente sporificato, indipendentemente dalla posizione del foglio. È evidente un iniziale rallentamento della crescita, confermato dai valori di diametro riportati in Figura 3.31. In questo caso, rispetto a quello del micelio non sporificato, il diametro massimo raggiunto è pari a quello del controllo.

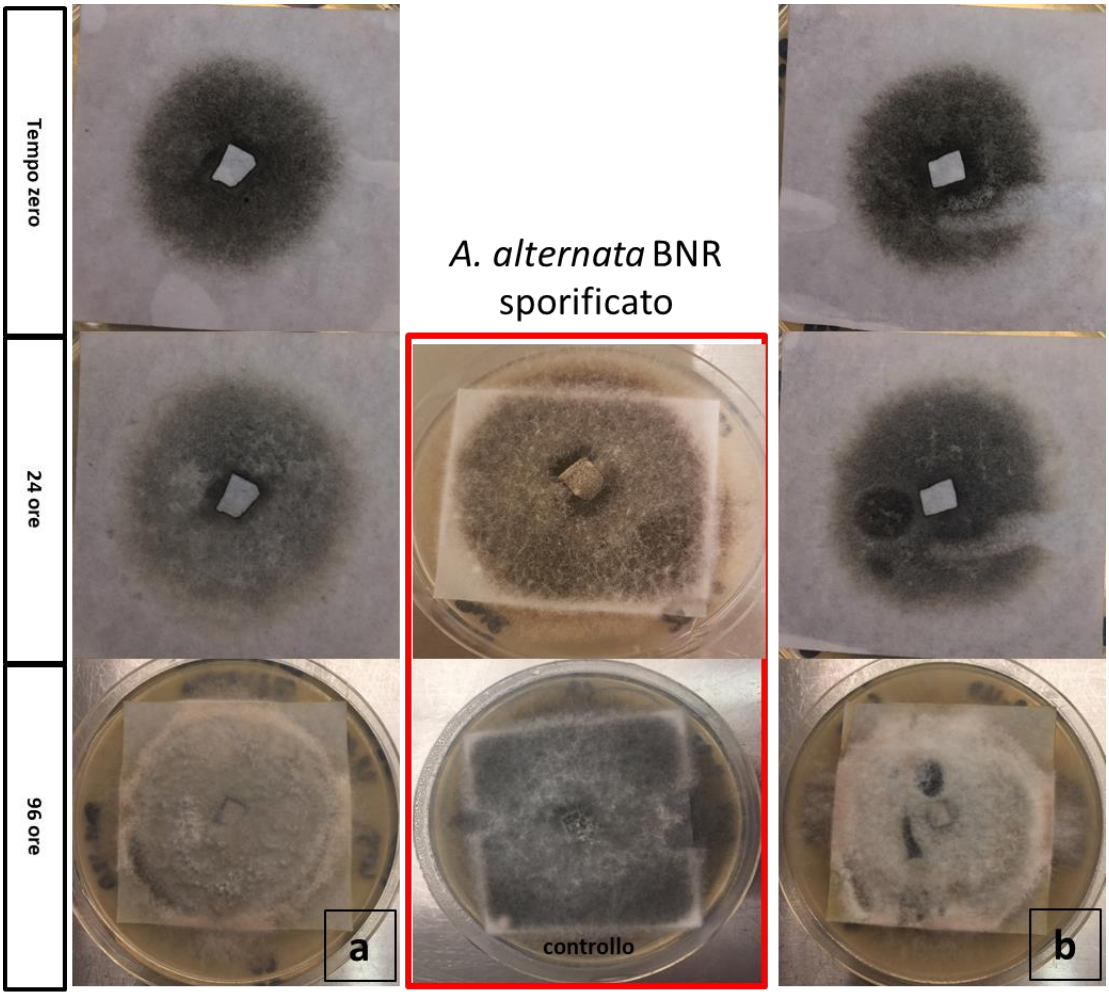

Figura 3. 30: *A. alternata* BNR sporificato posizionato a) sopra il blocchetto b) a metà spessore, a seguito del congelamento in liofilizzatore a -20°C

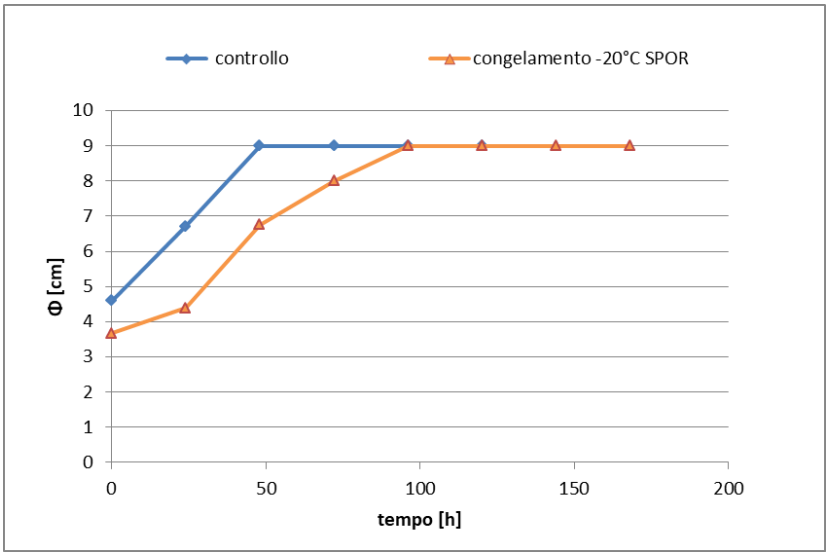

Figura 3. 31: diametro *A. alternata* BNR sporificato a seguito del congelamento in liofilizzatore a -20°C

3.4.4 Confronto tra le due modalità di congelamento in liofilizzatore

A seguito del posizionamento delle termocoppie all'interno di alcuni campioni la temperatura desiderata di congelamento è stata raggiunta, per entrambe le prove, dopo circa 100 minuti, corrispondenti ad una velocità di congelamento pari a circa -0.6°C/min, valore inferiore al range di velocità di congelamento ottimale per la vitalità microrganismi, il quale risulta essere, secondo Berny e Hennebert (1991), compreso tra 1°C/min e 10°C/min (Figura 3.32).

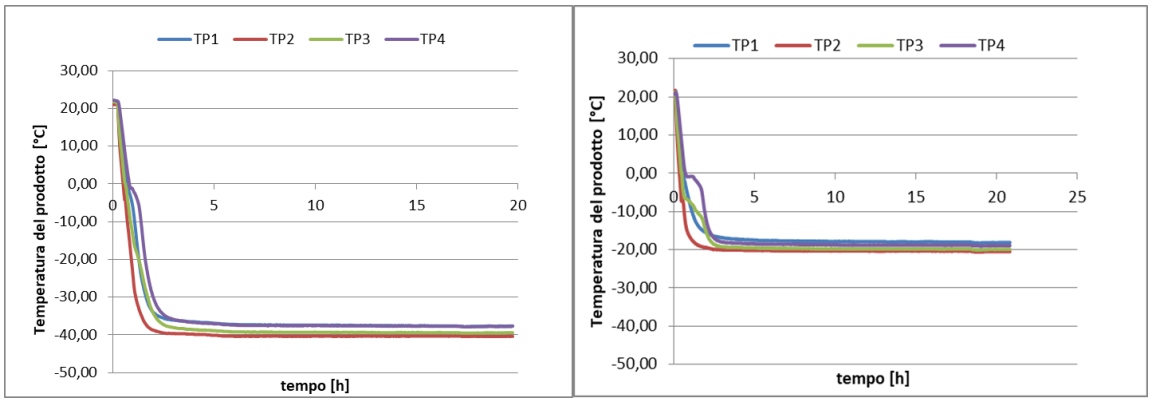

Figura 3. 32: andamento della temperatura del prodotto durante il congelamento a -40°C a sinistra, a destra durante il congelamento a -20°C

La crescita di *R. mucilaginosa* e di *S. epidermidis* non è stata influenzata dalle due differenti temperature di congelamento testate infatti, in nessun caso, è stato osservato un rallentamento della crescita.

Per quanto riguarda *A. alternata* BNR entrambe le prove di congelamento in liofilizzatore hanno portato ad un rallentamento della crescita per il campione costituito da micelio non sporificato, rispetto al controllo. Le due condizioni testate non presentano significative differenze sino a 96 ore (Figura 3.33, sinistra). Tra le 96 ore e le 120 ore, la velocità di crescita aumenta nel caso del congelamento a -40°C, arrivando ad un diametro pari a 5.72 cm, valore raggiunto dal campione congelato a -20°C dopo ulteriori 48 ore di incubazione. La crescita del micelio sporificato (Figura 3.33, destra), congelato a -20°C, presenta un ritardo di 24 ore, successivamente è comparabile a quella del controllo per entrambe le modalità di congelamento.

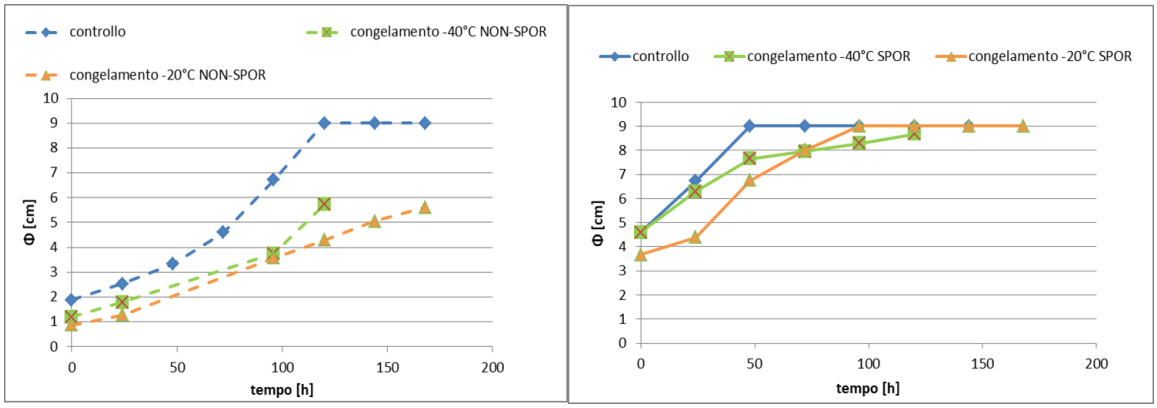

Figura 3. 33: a sinistra andamento del diametro di *A. alternata* BNR non sporificato, a destra del micelio sporificato

3.4.5 Confronto tra il congelamento a -20°C in freezer e in liofilizzatore

Si vuole confrontare, a parità di temperatura, dell'effetto della diversa velocità di congelamento tra il liofilizzatore, pari a circa -0.6°C/min, ed il freezer, il quale è caratterizzato da una velocità inferiore.

La crescita di *R. mucilaginosa* e *S. epidermidis* non mostra differenze significative tra le due diverse modalità di congelamento.

Per quanto concerne *A. alternata* BNR non sporificato (Figura 3.34, sinistra) la sua crescita risulta rallentata, rispetto al controllo, in entrambe le modalità di congelamento; questo è più evidente nel caso del congelamento in liofilizzatore, in seguito al quale il micelio raggiunge il diametro della capsula Petri. Il diametro massimo, raggiunto dopo 120 ore, è pari a 4.28 cm. La crescita del micelio sporificato (Figura 3.34, destra), è rallentata, con entrambe le modalità di congelamento, nelle prime 24 ore; successivamente le velocità sono paragonabili a quella del controllo.

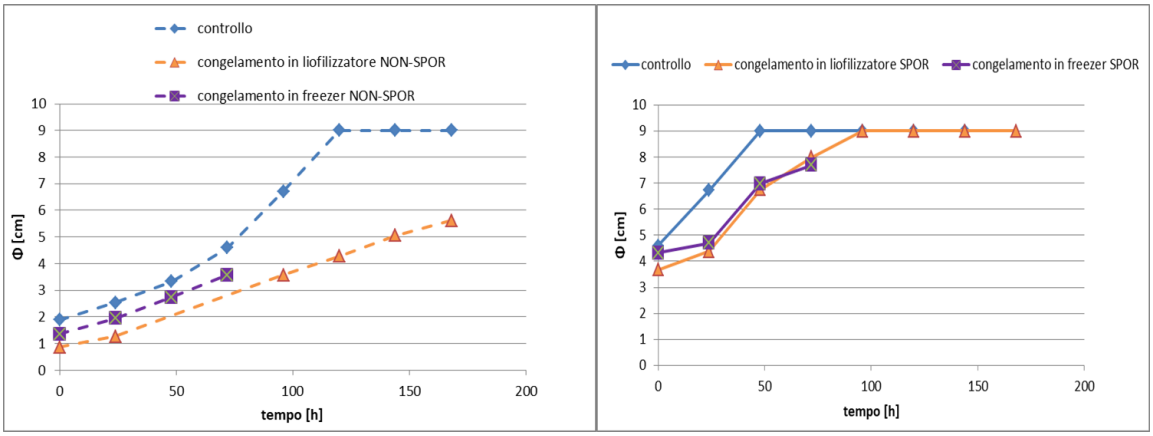

Figura 3. 34: a sinistra, andamento del diametro di *A. alternata* BNR non sporificato, a destra del micelio sporificato

3.5 Effetto della velocità di sublimazione

I campioni, precedentemente congelati in freezer a circa -20°C, vengono posti all'interno del liofilizzatore dove vengono essiccati con due velocità di sublimazione differenti, impostando la temperatura dei ripiani in un primo caso a 0°C e, in un secondo caso, a 20°C, ottenendo una velocità di sublimazione maggiore rispetto al primo.

In entrambi i casi non si sono riscontrate differenze evidenti di crescita per *R. mucilaginosa* e *S. epidermidis* rispetto al caso del solo congelamento in freezer. Per questo motivo, nei paragrafi successivi saranno mostrati i risultati relativi al solo fungo filamentoso *A. alternata* BNR.

3.5.1 Essiccamento a bassa velocità di sublimazione

A seguito del congelamento e del successivo essiccamento (0°C) è possibile osservare una netta inibizione della crescita di *A. alternata* BNR non sporificato sino alle 48 ore (Figura 3.35). Dopo 96 ore di incubazione si ha sviluppo del micelio, tuttavia il diametro delle colonie (2.45 cm) è nettamente inferiore a quello del controllo (circa 6.72 cm). A tale tempo è, inoltre, possibile osservare una evidente sporificazione, probabilmente dovuta ad una influenza negativa della fase di essiccamento sul micelio. Le curve, riportate in Figura 3.36 confermano il rallentamento della crescita. Non si osservano, infine, differenze nella modalità di crescita del fungo tra il foglio contaminato posizionato sulla superficie e quello a metà spessore del blocchetto.

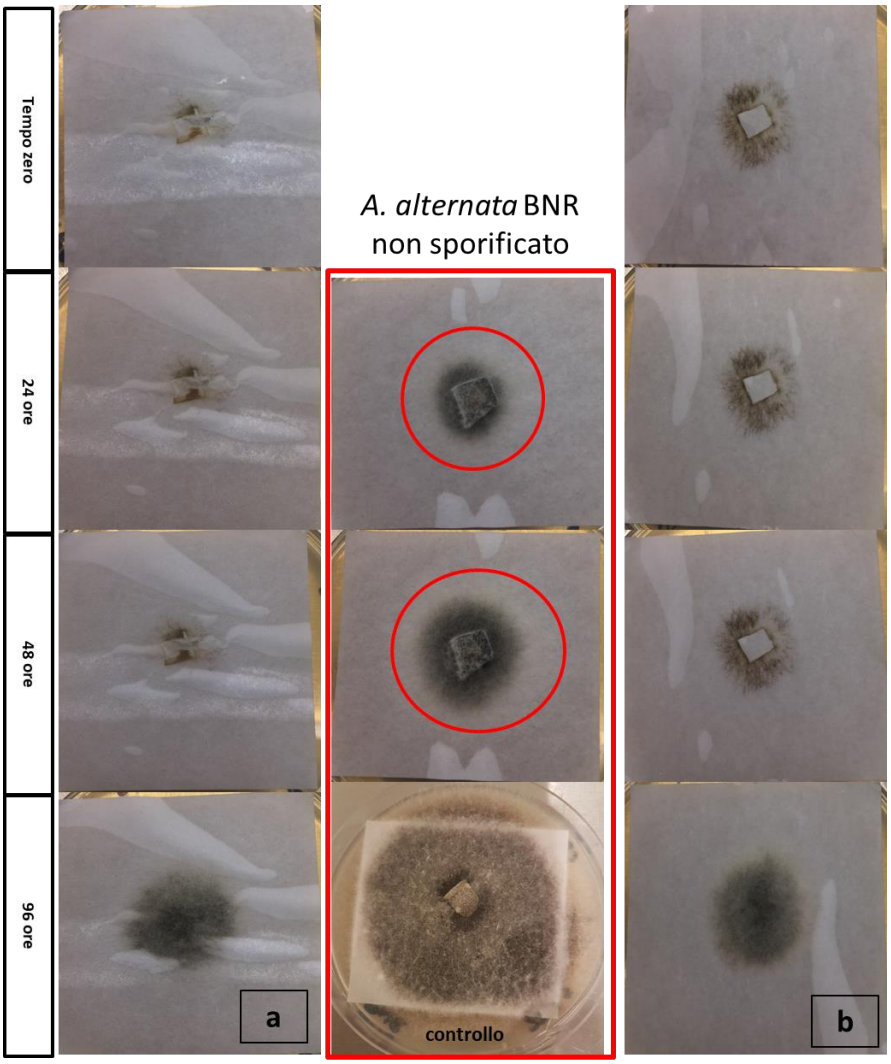

Figura 3. 35: *A. alternata* BNR non sporificato posizionato a) sopra e b) a metà spessore del campione, a seguito dell'essiccamento a bassa velocità di sublimazione

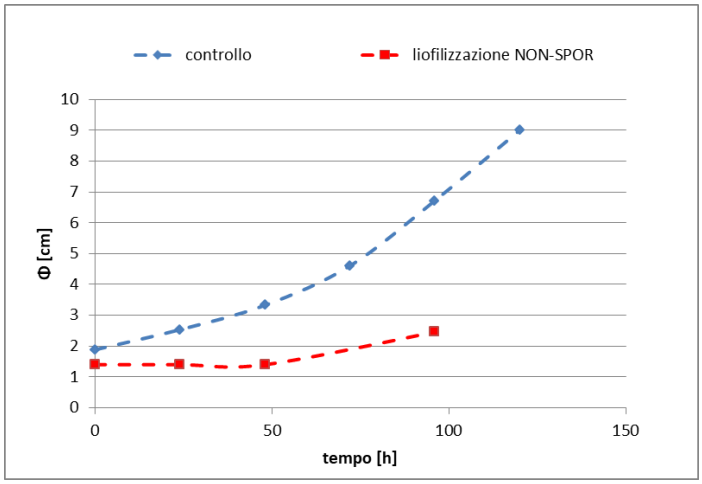

Figura 3. 36: diametro *A. alternata* BNR non sporificato a seguito della liofilizzazione a bassa velocità di sublimazione

Anche nel caso del micelio sporificato (Figura 3.37) si osserva una fase di latenza di 48 ore, a seguito della quale la crescita riprende con una velocità confrontabile a quella del controllo, indipendentemente dalla posizione del foglio. Infine, si osserva alle 96 ore una minor sporificazione dei campioni rispetto al controllo. La fase di latenza è chiaramente osservabile nella curva riportata in Figura 3.38.

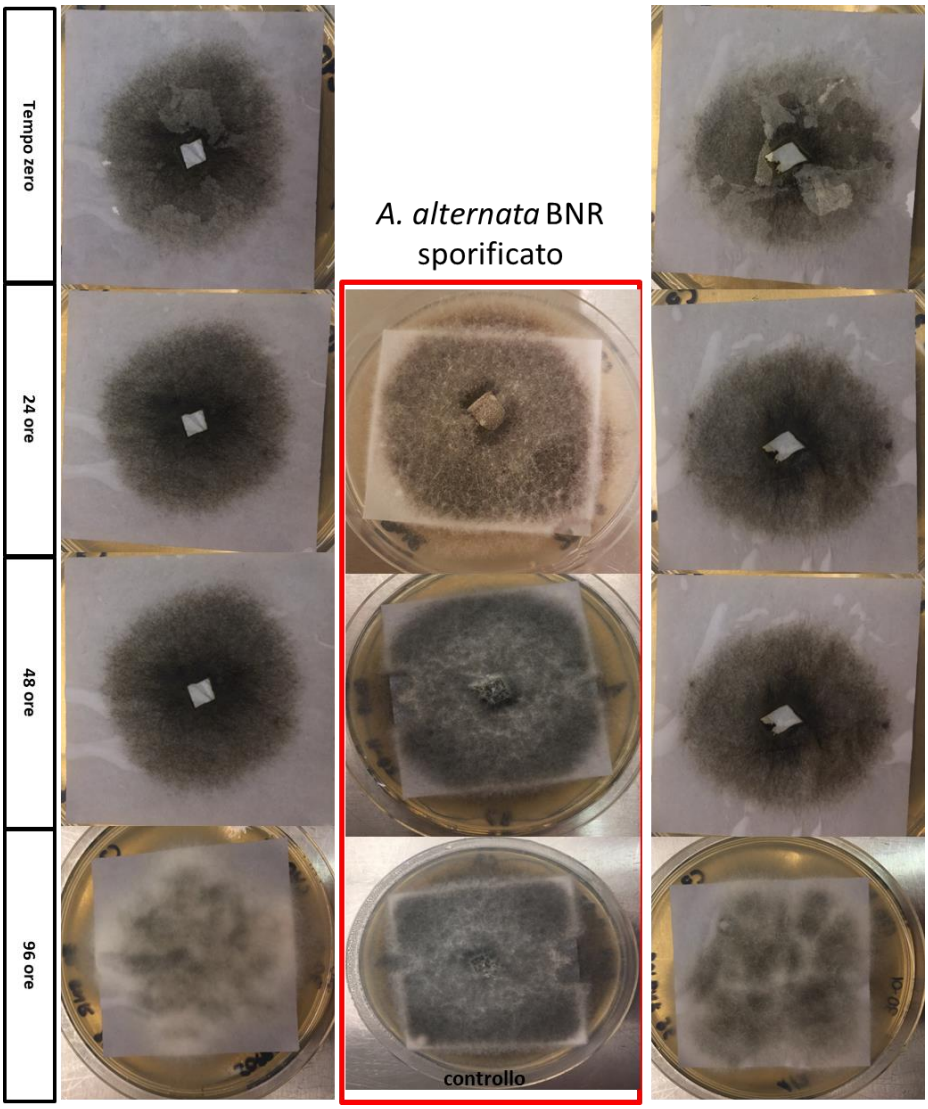

Figura 3. 37: *A. alternata* BNR sporificato posizionato a) sopra il campione b) a metà spessore, a seguito della liofilizzazione a bassa velocità di sublimazione

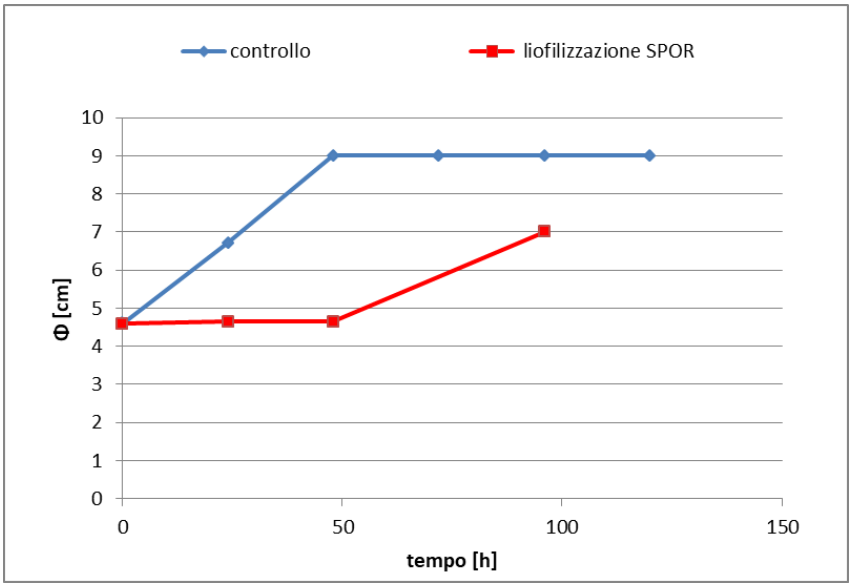

Figura 3. 19: diametro *A. alternata* BNR sporificato a seguito della liofilizzazione a bassa velocità di sublimazione

3.5.2 Essiccamento ad alta velocità di sublimazione

La crescita di *A. alternata* BNR non sporificato (Figura 3.39) a seguito del congelamento in freezer e dell'essiccamento ad alta velocità di sublimazione (20°C) mostra un comportamento molto simile a quello descritto per il caso precedente. Quanto osservato è, inoltre, confermato dalla curva di crescita riportata in Figura 3.40.

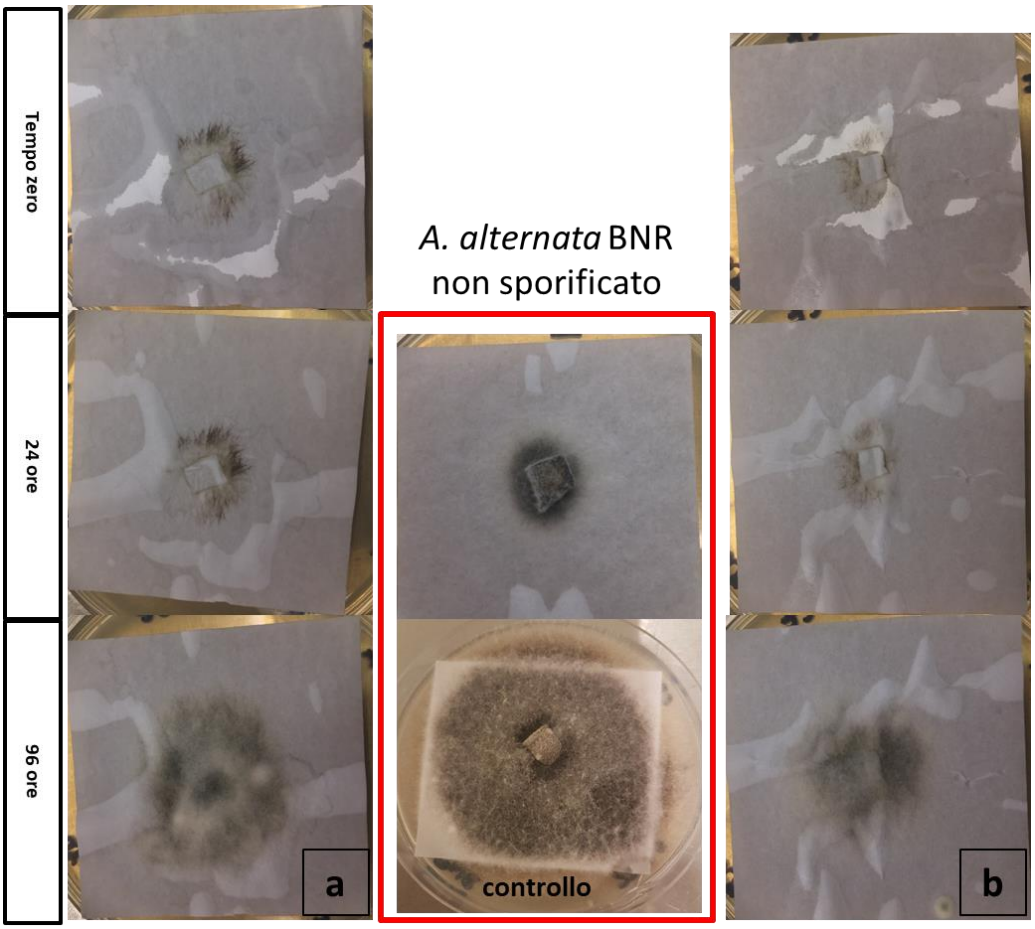

Figura 3. 39: *A. alternata* BNR non sporificato posizionato a) sopra e b) a metà spessore del campione, a seguito dell'essiccamento ad alta velocità di sublimazione

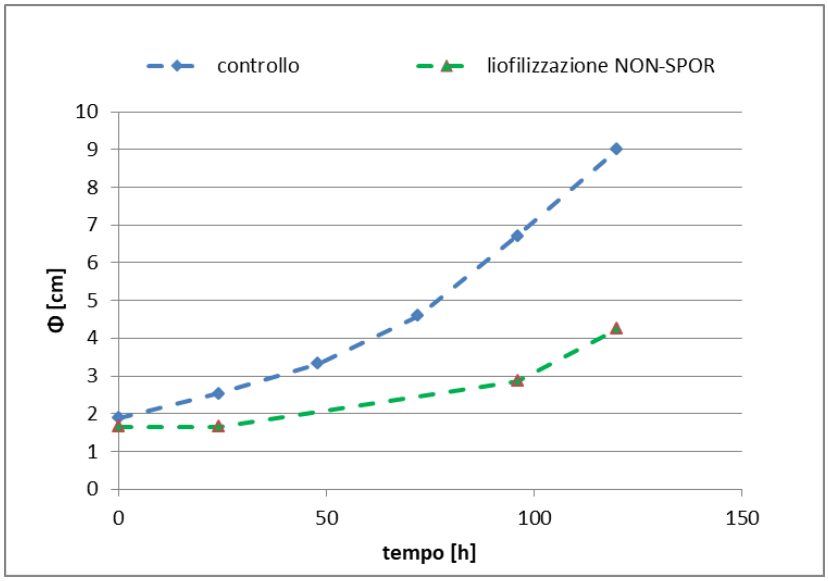

Figura 3. 40: diametri *A. alternata* BNR non sporificato a seguito dell'essiccamento ad alta velocità di sublimazione

Per quanto riguarda il micelio sporificato (Figura 3.41) è possibile osservare una fase di latenza pari a 24 ore, successivamente la crescita procede con una velocità paragonabile al controllo, raggiungendo alle 96 ore il bordo della capsula Petri. Il campione presenta una minor sporificazione rispetto al controllo, indipendentemente dalla posizione del foglio. Questo comportamento è confermato dalla curva di crescita fungina riportata in Figura 3.42.

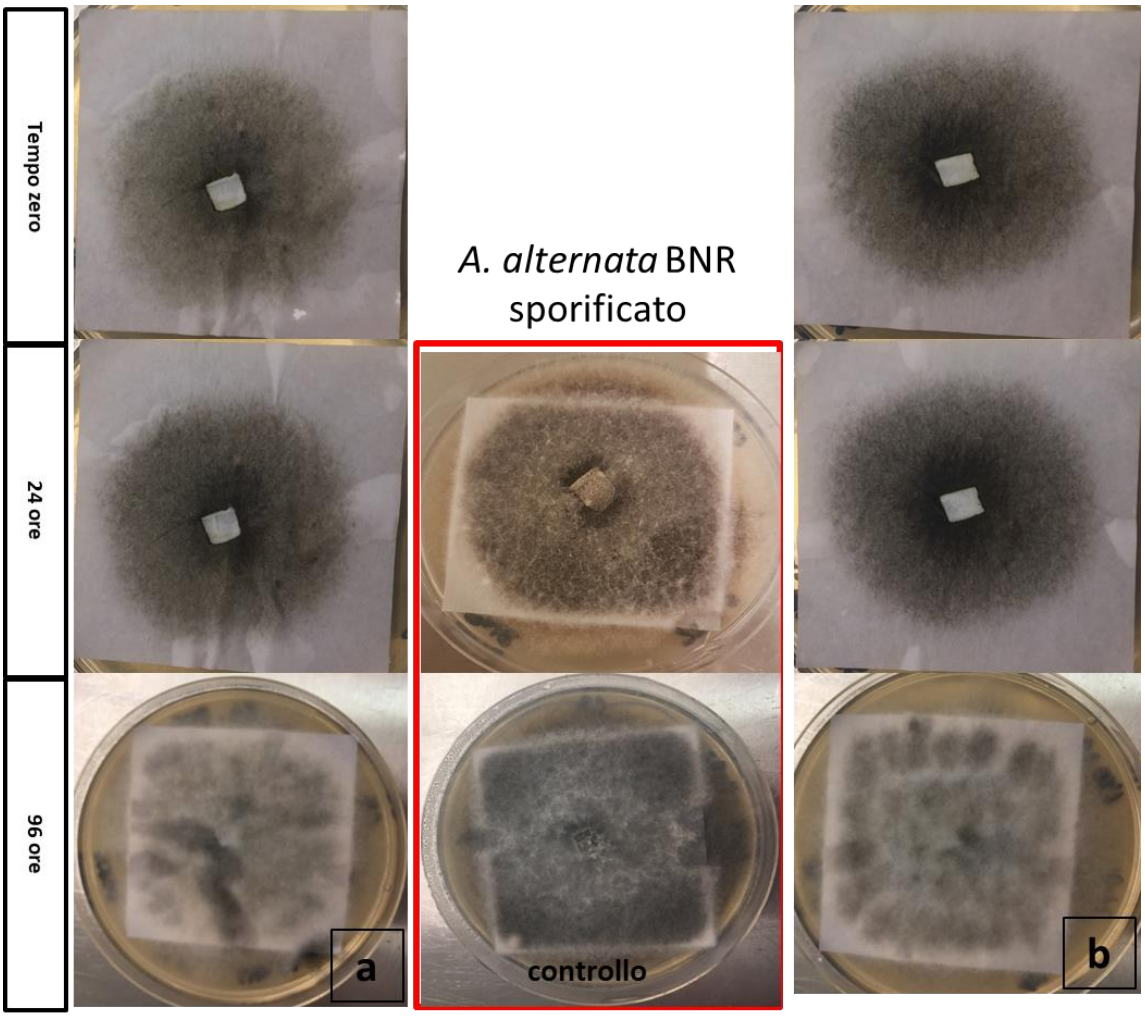

Figura 3. 41: *A. alternata* BNR sporificato posionato a) sopra il blocchetto b) a metà spessore, a seguito della liofilizzazione ad alta velocità di sublimazione

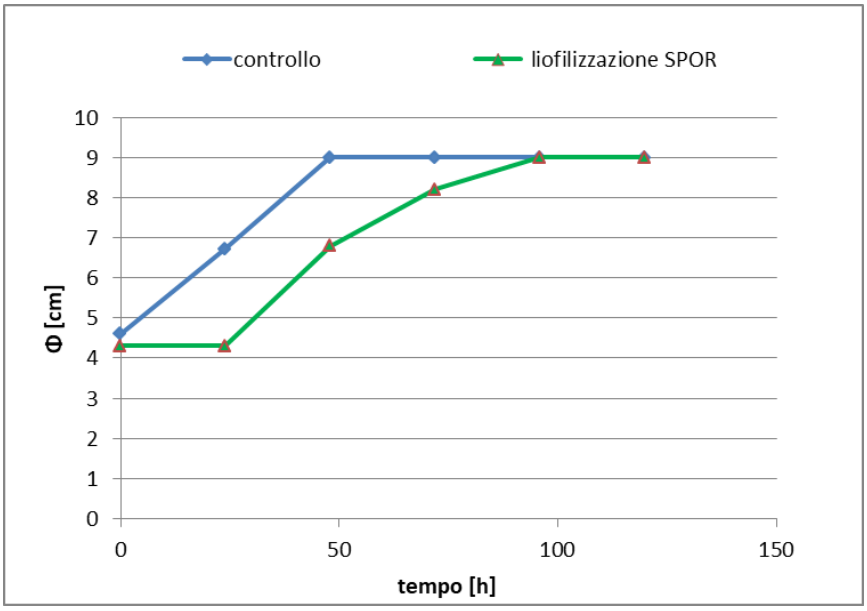

Figura 3. 42: diametri *A. alternata* BNR sporificato a seguito dell'essiccamento ad alta velocità di sublimazione

3.5.3 Confronto tra le diverse velocità di sublimazione

Entrambe le condizioni di liofilizzazione testate hanno avuto un effetto molto simile di rallentamento sulla velocità di crescita di *A. alternata* BNR non sporificato. È possibile osservare, infatti, dalle curve di crescita, riportate in Figura 3.43 a sinistra, che i diametri, a parità di tempo, sono confrontabili fra di loro: per esempio dopo 96 ore risultano pari a 2.87 cm e 2.46 cm, rispettivamente per il caso di alta e di bassa velocità di sublimazione. Per quanto concerne, invece, il micelio sporificato, Figura 3.43 a destra, è possibile notare una differenza nella durata della fase di latenza, che risulta essere maggiore nel caso dell'essiccamento a bassa velocità di sublimazione. Tuttavia, al termine della fase di latenza e indipendentemente dalla condizione operativa dell'essiccamento, la velocità di crescita del micelio sporificato è paragonabile a quella del controllo.

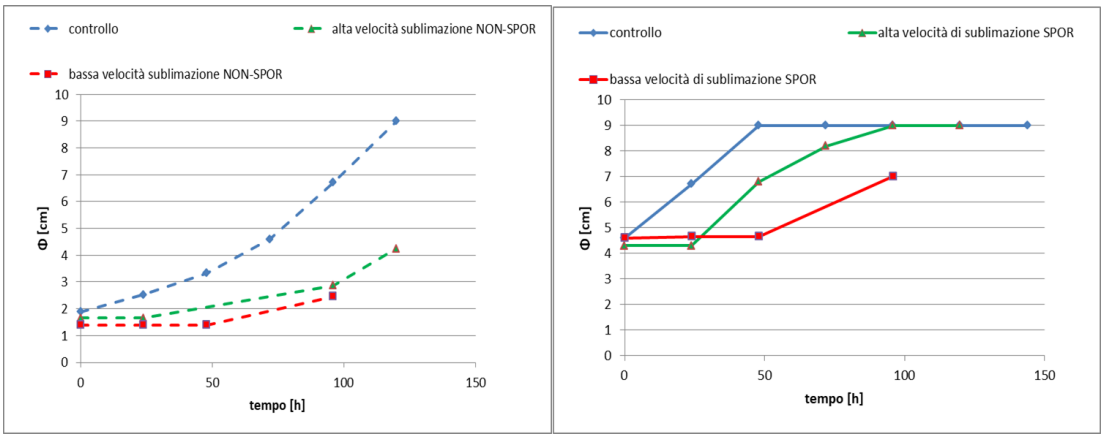

Figura 3. 43: a sinistra andamento del diametro di *A. alternata* BNR non sporificato, a destra del micelio sporificato

3.5.4 Confronto dell'essiccamento a bassa velocità di sublimazione con il congelamento

La liofilizzazione (congelamento in freezer ed essiccamento) ha determinato, rispetto alla sola fase di congelamento, un allungamento della fase di latenza, che è durata 48 ore, sia per il micelio non sporificato (Figura 3.44, sinistra) che per quello sporificato (Figura 3.44, destra). Al termine di questa fase la crescita procede con velocità paragonabile, così come è possibile osservare dalla pendenza delle curve di crescita. La liofilizzazione ha determinato, quindi, una maggiore inibizione della crescita di *A. alternata* BNR, rispetto al solo congelamento e quindi una maggiore possibilità di controllo.

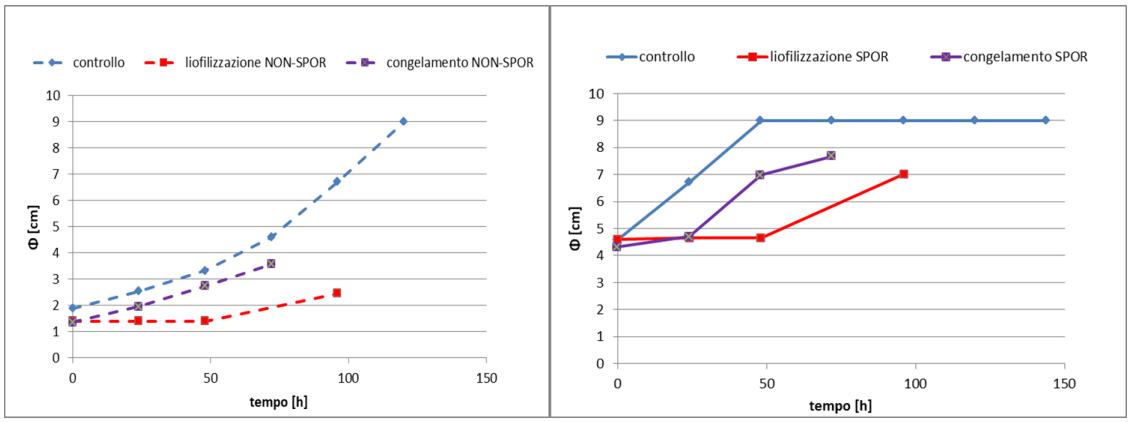

Figura 3. 44: a sinistra andamento del diametro di *A. alternata* BNR non sporificato, a destra del micelio sporificato

3.6 Effetto della liofilizzazione

I campioni, precedentemente congelati in liofilizzatore, a -40°C o a -20°C, vengono successivamente essiccati a 0°C, completando il processo di liofilizzazione.

I risultati di *R. mucilaginosa* e *S. epidermidis* non vengono qui di seguito riportati, in quanto la loro crescita è risultata essere concorde con quanto riportato nel caso del congelamento, non mostrando significative differenze.

3.6.1 Liofilizzazione con congelamento a -40°C

La crescita di *A. alternata* BNR non sporificato (Figura 3.45), a seguito del congelamento a -40°C e del successivo essiccamento, a differenza di tutti i casi precedentemente descritti, è caratterizzata da un allungamento della fase di latenza fino a 72 ore di incubazione, indipendentemente dalla posizione occupata dal foglio. Successivamente, il micelio inizia a crescere, raggiungendo un diametro delle colonie inferiore rispetto al

controllo a parità di tempo. A 120 ore il foglio posizionato sulla superficie risulta essere più sporificato, rispetto a quello posizionato a metà spessore. Quanto descritto è confermato dalla curva di crescita riportata in Figura 3.46.

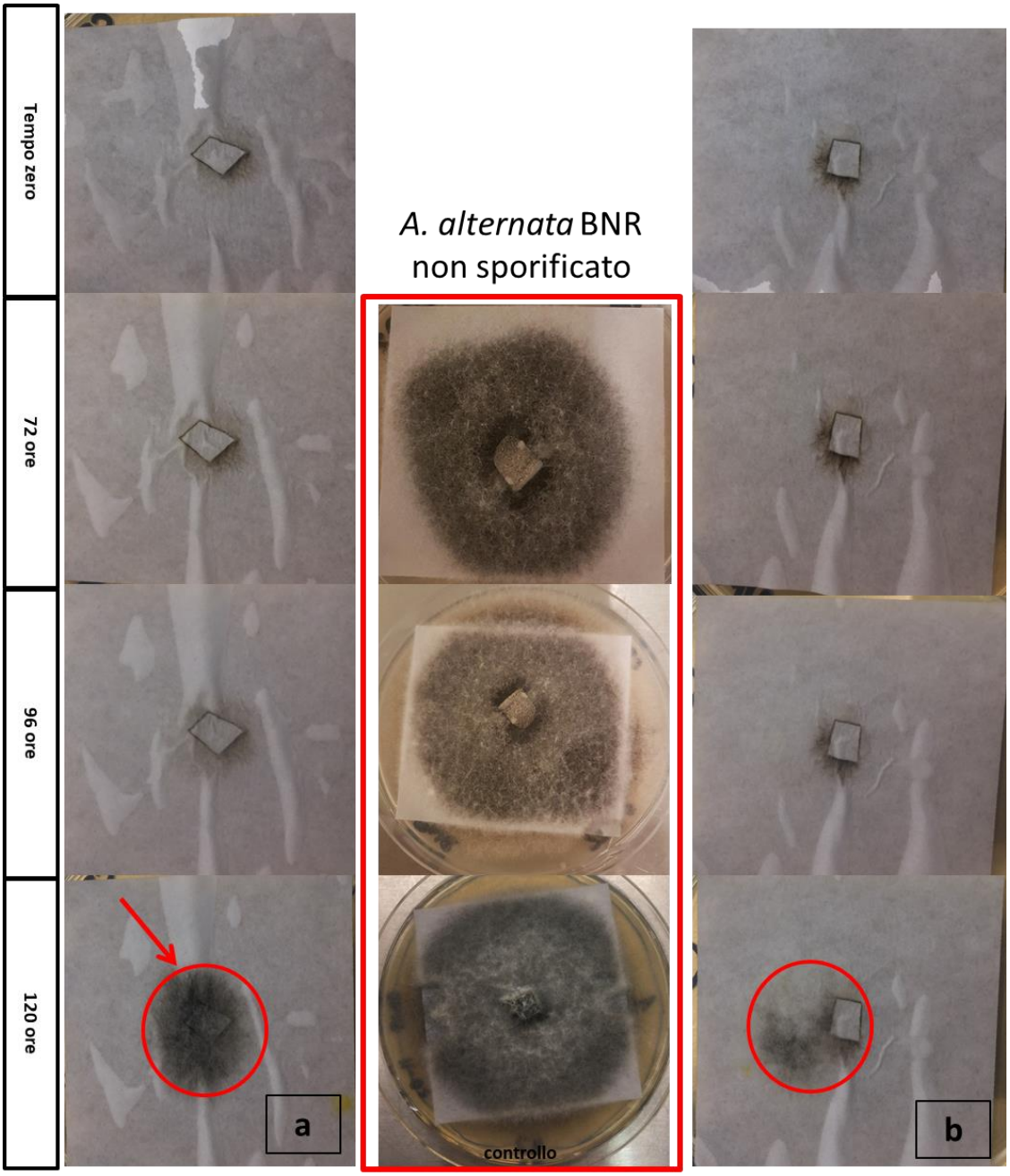

Figura 3. 45: *A. alternata* BNR non sporificato posizionato a) sopra e b) a metà spessore del campione, a valle della liofilizzazione

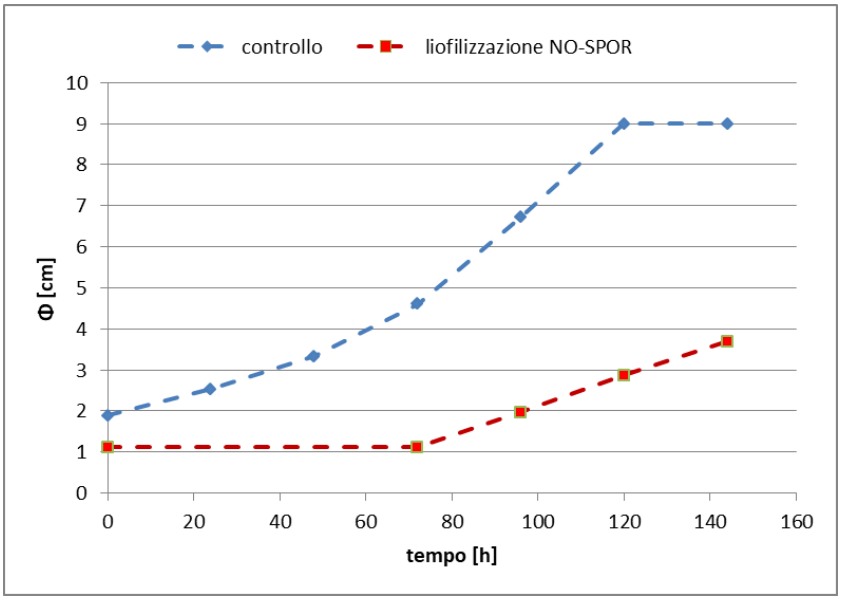

Figura 3.46: diametri *A. alternata* BNR non sporificata, a seguito della liofilizzazione

Per quanto riguarda il micelio sporificato (Figura 3.47), è possibile osservare un allungamento della fase di latenza oltre le 48 ore. Successivamente, il micelio fungino inizia a crescere e a sporificare in modo molto irregolare, indipendentemente dalla posizione occupata dal foglio. Nel caso del foglio posto a metà spessore, la crescita appare più rallentata e il diametro delle colonie inferiore rispetto al foglio posto in superficie. Per quest'ultimo la crescita è già evidente a 72 ore, mentre sono necessarie 96 ore per il foglio posto a metà spessore. Quanto osservato è confermato dalla curva di crescita riportata in Figura 3.48.

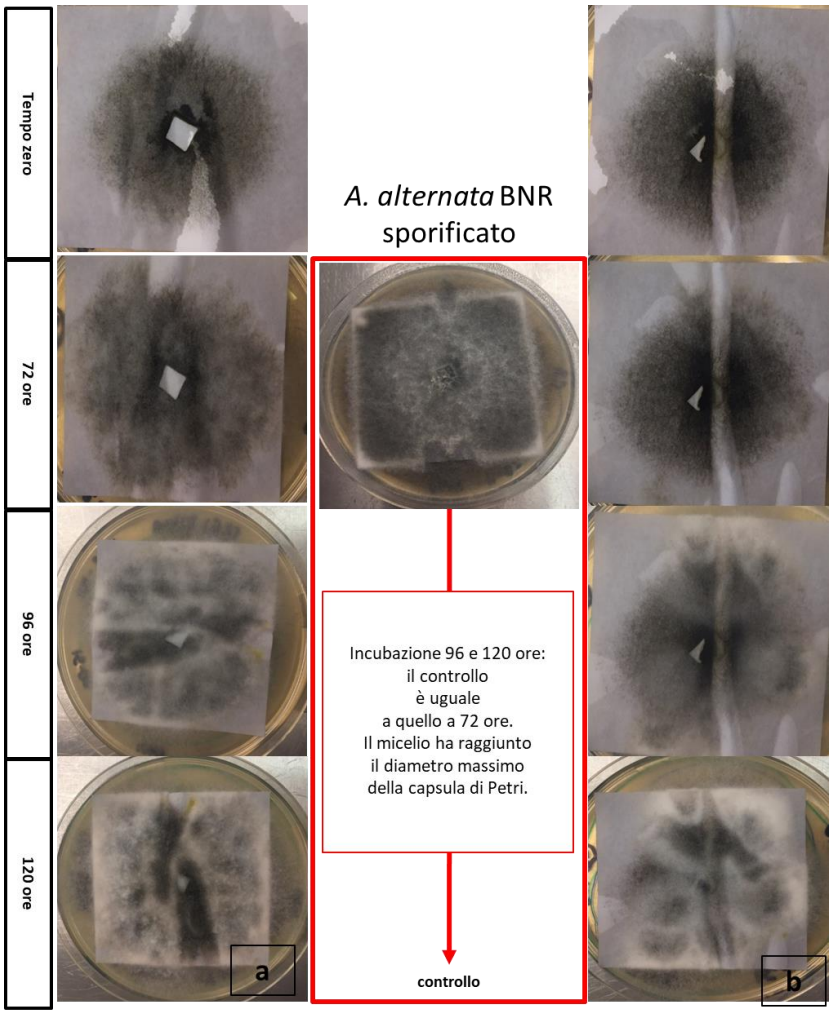

Figura 3. 47: *A. alternata* BNR sporificato posizionato a) sopra il blocchetto b) a metà spessore, a seguito della liofilizzazione

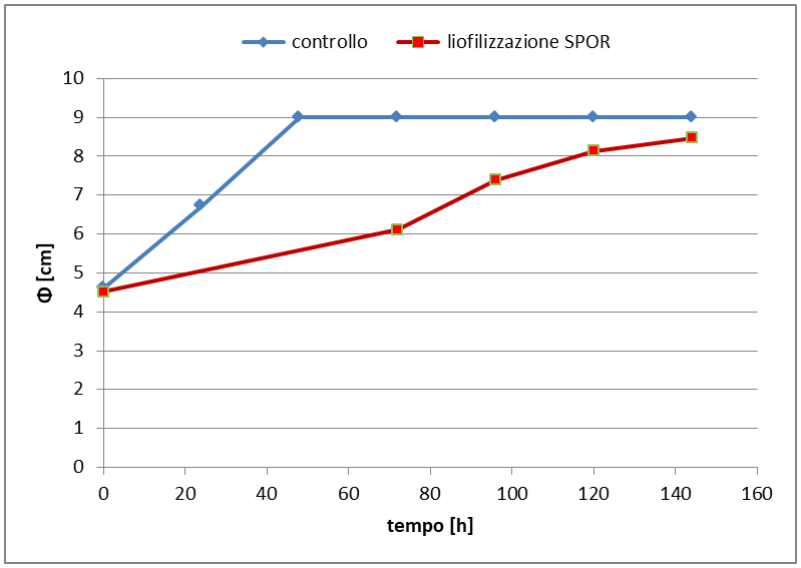

Figura 3.48: diametro *A. alternata* BNR sporificato a seguito della liofilizzazione

3.6.2 Liofilizzazione con congelamento a -20°C

A seguito della liofilizzazione la crescita di *A. alternata* BNR non sporificato (Figura 3.49) presenta una fase di latenza pari a 72 ore per il foglio posto in superficie. Allo stesso tempo di incubazione, il micelio posto sul foglio a metà spessore è cresciuto, tuttavia, il diametro delle colonie è inferiore a quello del controllo. Dopo la fase di latenza, la velocità di crescita del micelio non sporificato è confrontabile a quella del controllo. È possibile, inoltre, osservare un'assenza di sporificazione, indipendentemente dalla posizione del foglio. A parità di tempo, la crescita del micelio sul foglio posto a metà spessore è superiore rispetto a quella sul foglio posto in superficie. Quanto osservato è confermato dall'andamento della curva di crescita relativa al foglio contaminato posto in superficie, riportata in Figura 3.50.

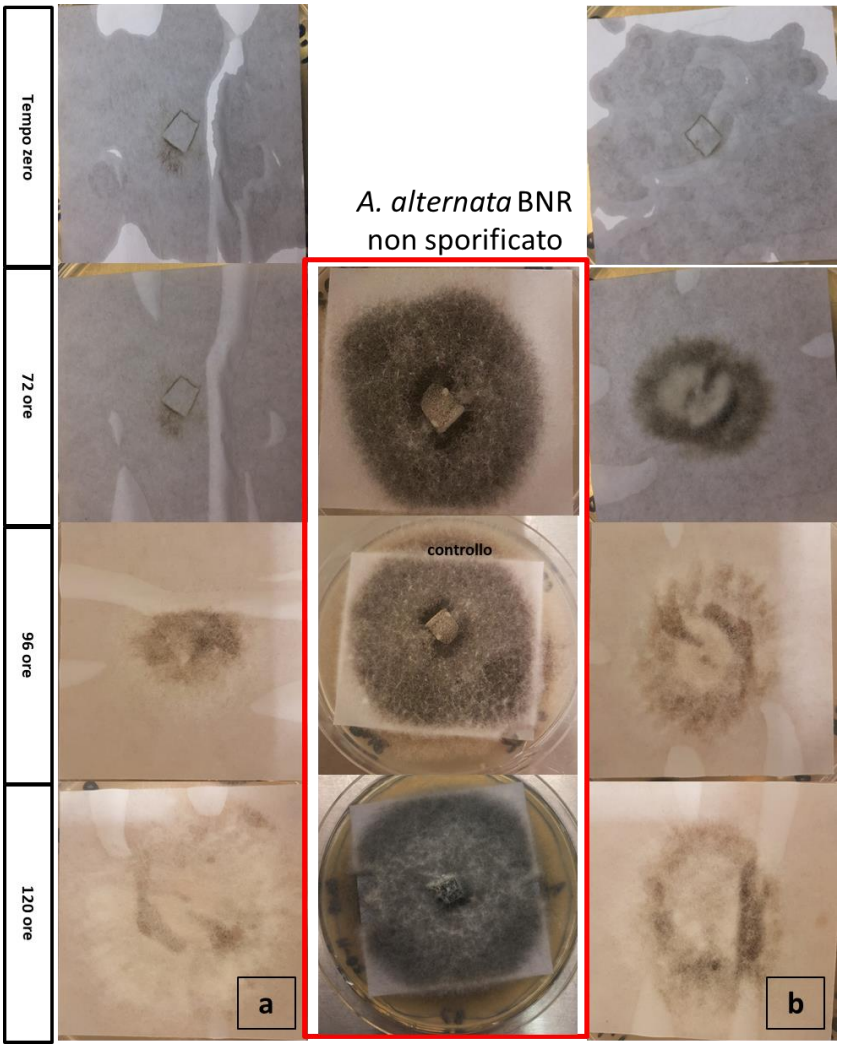

Figura 3. 49: *A. alternata* BNR non sporificato posizionato a) sopra e b) a metà spessore del campione, a seguito della liofilizzazione

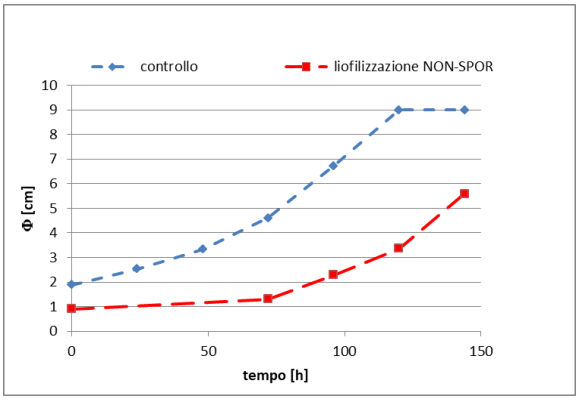

Figura 3. 50: diametro *A. alternata* BNR non sporificato a seguito della liofilizzazione

Per quanto riguarda la crescita di *A. alternata* BNR sporificato (Figura 3.51) è possibile osservare un allungamento della fase di latenza oltre a 48 ore. Successivamente, la crescita riprende con una velocità paragonabile a quella del controllo. È possibile, inoltre, osservare un micelio aereo non sporificato che ricopre la precedente sporificazione. Non si osservano, infine, differenze nella modalità di crescita tra il foglio contaminato posto in superficie e quello posizionato a metà spessore. Quanto osservato, si riscontra nella curva di crescita, riportata in Figura 3.52.

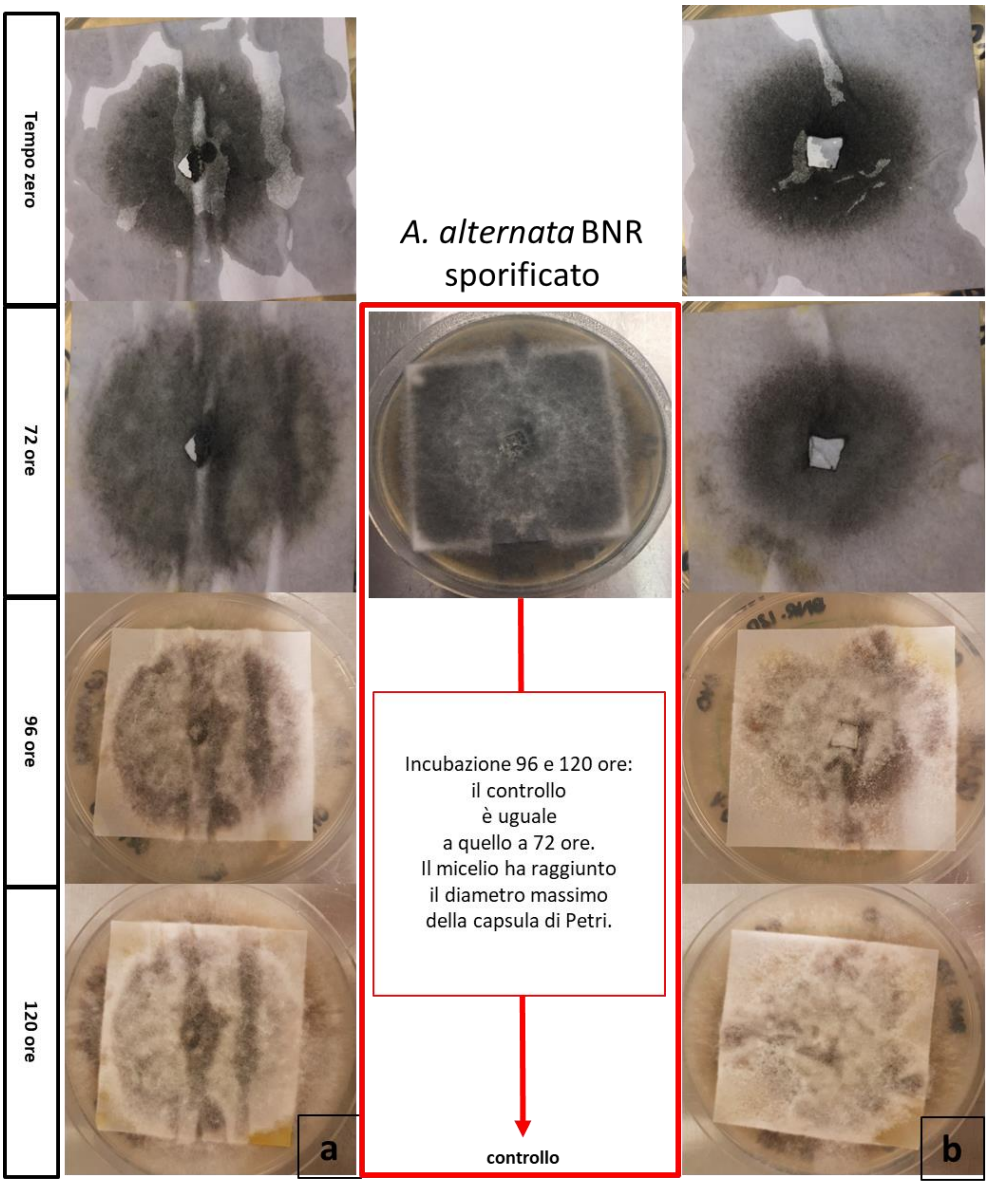

Figura 3. 51: *A. alternata* BNR sporificato posizionato a) sopra il blocchetto b) a metà spessore, a seguito della liofilizzazione

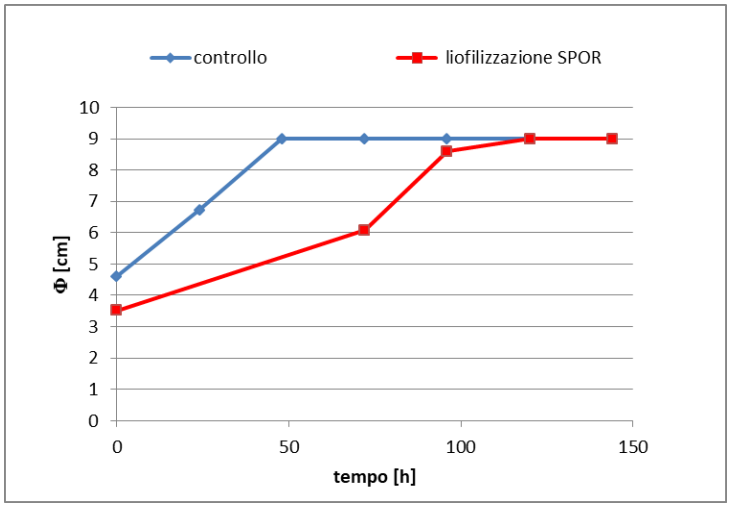

Figura 3. 52 dimetro *A. alternata* BNR sporificato a seguito della liofilizzazione

3.6.3 Confronto tra liofilizzazione e congelamento a -40°C

Il congelamento ha portato ad un rallentamento della velocità di crescita di *A. alternata* BNR non sporificato (Figura 3.53 a sinistra), rispetto al controllo. La liofilizzazione ne ha ulteriormente rallentato la crescita, rispetto al solo congelamento. L'essiccamento ha, infatti, determinato un allungamento della fase di latenza sino a 72 ore, non osservata in seguito al solo congelamento a -40°C. È possibile, inoltre, osservare che, nel caso della liofilizzazione, la velocità di crescita (pendenza della curva dopo la fase di latenza) rimane pressochè costante, sino a 144 ore; a tale tempo il diametro della colonia raggiunge un valore pari a 3.68 cm. Con il solo congelamento, invece, la velocità di crescita, a partire dalle 96 ore, aumenta in modo analogo al controllo. Per quanto riguarda *A. alternata* BNR sporificato (Figura 3.53 a destra) la liofilizzazione ha permesso un maggiore controllo della crescita del fungo, rispetto al solo congelamento, determinando un allungando della fase di latenza oltre 48 ore. Si evince, quindi, che la liofilizzazione rispetto al solo congelamento permette un maggiore controllo della crescita fungina, soprattutto per il micelio non sporificato. Questo potrebbe essere dovuto alla maggiore resistenza delle spore rispetto al micelio vegetativo (Troiano et al., 2012).

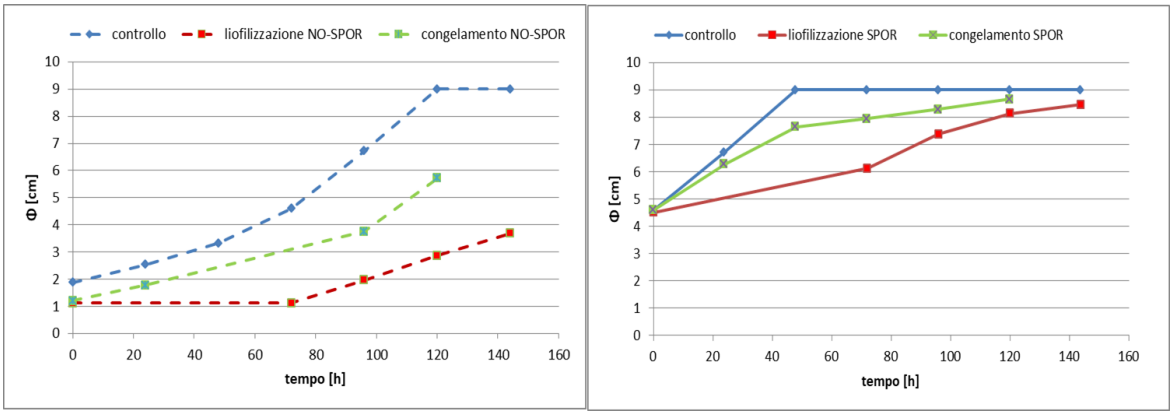

Figura 3. 53: a sinistra andamento del diametro di *A. alternata* BNR non sporificato, a destra del micelio sporificato

3.6.4 Confrontro tra liofilizzazione e congelamento a -20°C

Per quanto riguarda la crescita di *A. alternata* BNR non sporificato la liofilizzazione ha determinato un notevole allungamento della fase di latenza (sino a 72 ore), rispetto al solo congelamento (sino a 24 ore). La velocità di crescita, nel caso del solo congelamento, risulta essere circa costante, mentre dopo liofilizzazione essa è confrontabile con quella del controllo. Dopo circa 150 ore il diametro delle colonie raggiunge un valore molto simile sia per i campioni liofilizzati che per quelli congelati (5.58 cm e 5.05 cm rispettivamente). In entrambi i casi questi valori sono notevolmente inferiori, a parità di tempo, a quello del controllo (9 cm) (Figura 3.54 a sinistra). Per quanto riguarda il micelio sporificato, a seguito della liofilizzazione si ha un allungamento della fase di latenza oltre 48 ore, non osservato nel caso del solo congelamento. Le velocità di crescita, dopo una fase iniziale, sono comunque confrontabili con quelle del controllo, in entrambi i casi. A circa 100 ore, infatti, i diametri delle colonie raggiungono il bordo della capsula Petri (Figura 3.54 a destra).

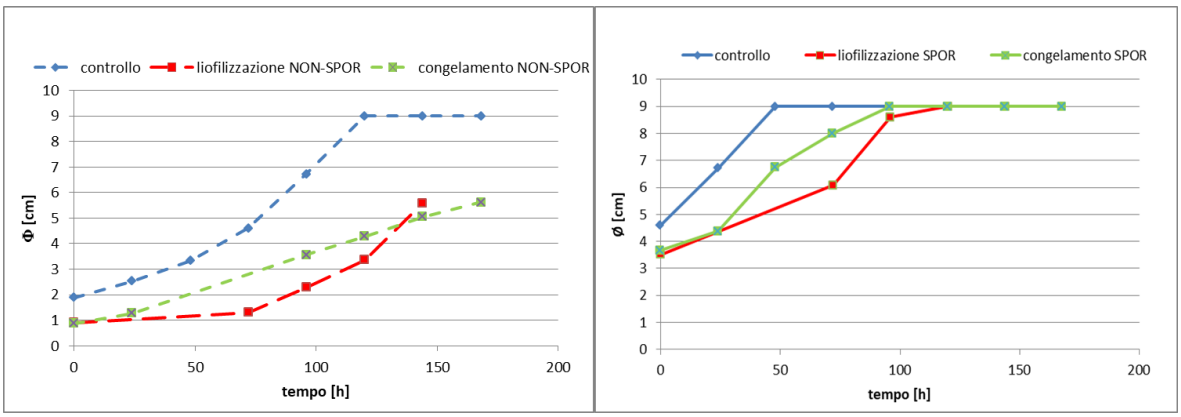

Figura 3. 54: a sinistra andamento del diametro di *A. alternata* BNR non sporificato, a destra del micelio sporificato

4. Conclusioni

Nel presente lavoro di Tesi si è studiato l'effetto della liofilizzazione sui microrganismi responsabili del biodeterioramento della carta alluvionata. I microrganismi selezionati, *Alternaria alternata* BNR, *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474 e *Rhodotorula mucilaginosa*, sono stati inoculati su fogli di carta bianca moderna con dimensioni pari a 6 x 6 cm. I campioni da sottoporre alle prove di liofilizzazione erano costituiti da blocchetti di carta (dimensione 6 x 6 cm, altezza 10 ± 1 mm), nei quali sono stati inseriti i fogli, precedentemente contaminati, sulla superficie e a metà spessore.

I campioni hanno subito, a seguito dell'allagamento, un aumento di peso pari a 49.59%, 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 3.29%, valore congruo con quello di prodotti liofilizzati nelle stesse condizioni. 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. I blocchetti apparivano più rigidi e voluminosi, probabilmente a seguito del contatto prolungato della carta con l'acqua. La durata dell'essiccamento primario variava tra 20 e 28 ore, in relazione alla velocità di sublimazione.

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.

Nel caso di studio si sono valutate diverse condizioni operative, sia di congelamento sia di liofilizzazione. La fase di congelamento è stata condotta in freezer (circa -20°C) e in liofilizzatore a due differenti temperature (-40°C e -20°C). L'essiccamento primario è stato condotto a due differenti velocità di sublimazione, impostando la temperatura dei ripiani a 0°C o a 20°C.

I risultati delle analisi condotte sul lievito *R. mucilaginosa* e sul batterio *S. epidermidis* hanno evidenziato che le condizioni operative testate non hanno, in nessun caso, inibito la crescita dei due microrganismi; al contrario, la crescita del batterio è stata stimolata.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti per i campioni contaminati dal fungo *A. alternata* BNR, non sono state riscontrate differenze di comportamento nelle diverse condizioni di congelamento testate. Tutte hanno determinato un rallentamento della crescita per il micelio non sporificato, mentre, per quello sporificato, dopo una fase di latenza di 24 ore, la crescita è ripresa con velocità confrontabile con quella del controllo.

A seguito del processo di essiccamento, è stato osservato un rallentamento della crescita di *A. alternata* BNR, indipendentemente dalla velocità di sublimazione.

Dai risultati ottenuti è infatti emersa la maggior efficacia del processo di liofilizzazione (congelamento e essiccamento) sull'inibizione della crescita fungina rispetto alla sola fase di congelamento. Questo comportamento è probabilmente dovuto alla rimozione totale, a seguito dell'essiccamento, dell'acqua libera, essenziale per la crescita microbica.

La condizione operativa più efficace per il controllo della crescita di *A. alternata* BNR è stata 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, prolungata sino a 72 ore, per il micelio non sporificato, seguita da una crescita rallentata. La fase di latenza è stata osservata anche per il micelio sporificato, oltre 48 ore, in questo caso la crescita è ripresa con velocità paragonabile a quella del controllo.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la maggior efficacia del processo di liofilizzazione sull'inibizione della crescita del micelio vegetativo, rispetto a quella delle spore, notoriamente più resistenti a shock termici ed a bassi valori di acqua libera.

5. Bibliografia

Berny J.F., Hennbert G.L., 1991, Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, **83**(6), 805-815.

Bicchieri M., Monti M., Frati & Livi S.R.L., 2006, La liofilizzazione quale intervento di recupero di volume danneggiati da catastrofi naturali. *Atti del IV congresso nazionale di Archeometria*, Pisa, Italia, 1-3 Febbraio 2006, pp 671-678.

Canhoto O., Pinzari F., Fanelli C., Magan N., 2004, Application of electronic nose technology for the detection of fungal contamination in library paper. *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**, 303-309.

Capolongo A., Barresi A.A., 2004, Freeze-drying of water-damaged paper material. *Restaurator*, 119-128.

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

Fissore D., 2013, Freeze drying of pharmaceuticals. *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology*, 1723-1737.

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.

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

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.

Mazur P., 1968, Survival of fungi after freezing and desiccation. **The fungi: An Advaced Treatise, Vol. III. The fungal populations** (G.C. Ainsworth and A.S. Sussman, eds.). Academic Press, New York, pp 325-394.

McCleary J. P., 1987, Vacuum freeze-drying, a method used to salvage water-damaged archival and library materials: a RAMP study with guidelines. General Information Programme and UNISIST, UNESCO, Paris (PGI-87/WS/7).

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

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.

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

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 congresso di Parma*, 16-17 novembre 2012.

Zyska B., 1997, Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *International Biodeterioration & Biodegradation* **40** (1), 43-51.

6. Ringraziamenti

Ringrazio il Professor Davide Fissore e la Professoressa Francesca Bosco, relatori di questa Tesi, per la grande opportunità e per il supporto donatomi durante questo periodo, oltre ai preziosi insegnamenti che sono riusciti a trasmettermi nei loro corsi.

Ringrazio, inoltre, la Dottoressa Chiara Mollea per l'aiuto pratico e morale, perchè senza i suoi insegnamenti e consigli questo lavoro di Tesi non avrebbe preso forma.

Un ringraziamento sentito va a mio padre, perchè senza di lui non avrei mai potuto inseguire il mio sogno, e la mia passione, di diventare un futuro ingegnere.

Un enorme grazie è rivolto a mia madre, per non aver mai smesso di credere in me e nelle mie potenzialità, anche quando io stessa pensavo di non potercela fare.

Ringrazio mia sorella Eleonora per avermi guidato in questa strada lunga, per avermi sempre dato un consiglio prezioso e per avermi accudito nei momenti più difficili, come solo una sorella maggiore sa fare.

Ringrazio Roberto che in tutti questi anni mi è stato accanto, non ostacolandomi mai nel mio percorso di vita, nonostante i chilometri che ci hanno sempre tenuto distanti. Nella speranza di fare ancora molta strada insieme, uno accanto all'altro.

Ringrazio voi, amiche di una vita, Alberta Giulia Valeria e Marta, per tutti i momenti passati assieme e per quelli che ancora ci attendono.

Ringrazio Antonio per la profonda amicizia che ci lega, per bellissime chiacchierate, per i giri in macchina con la musica a palla, per le feste quelle memorabili, per i venerdì sera davanti a X-Factor e per esserci sempre stato quando ne avevo bisogno.

Ringrazio Mariachiara per aver reso questi ultimi due anni a Torino indimenticabili. Grazie per i momenti condivisi di sclero, studio matto, supporto morale, serate in piazza Vitto, gossip sfrenato, partite di pallavolo dell'Italia maschile (perchè il femminile è noioso), perchè ormai basta uno sguardo che già SIAMO ALLINEATE. E, ovviamente, grazie a mamma Nadia per le quantità di ragù prodotte, e che ancora dovrà produrre per molti anni.

Ringrazio Giuseppe che dalla Sicilia con furore è approdato a Torino, rendendo le mie giornate al Poli molto meno noiose, perchè in te si racchiude una grande personalità e un immenso cuore. Grazie.

Ringrazio Veronica e Alessandra per tutti i momenti passati insieme qui a Torino, per le soddisfazioni che insieme abbiamo ottenuto, per le serate da ricordare, per la comprensione e il supporto che sempre mi avete dimostrato. Nella consapevolezza che questo durerà ancora per molti anni, indipendentemente dalla strada che ognuna di noi prenderà.

Ringrazio la mia squadra, che in questi due anni mi è stata accanto, in campo e fuori. Grazie a Marghe per dimostrarmi ogni giorno che nella vita si può fare tutto, a Sammi per la forza che sempre dimostri anche nei momenti difficili, a Vally per il tuo sorriso immancabile, a Vale per la tua grande maturità, a Elena per la gioia che trasmetti in chi ti sta accanto, a Sara per l'indipendenza e l'intraprendenza che ti caratterizza, a Chiara per la determinazione nell'inseguire i tuoi sogni, a Cinzia per la tua volontà nel non mollare mai, a Piz per la tua sensibilità e il rispetto per i sentimenti altrui, a Tube per l'infinita dolcezza che ti contraddistingue, a Totta che si rialza con maggior entusiasmo dopo ogni caduta, a

Gio per l'impegno e la passione che sempre dimostri. Che la vita vi riservi tutto il meglio che vi meritate. NON MOLLIAMO MAI!

Ed infine ringrazio Torino, che mi ha accolto 6 anni fa e che per tutto questo periodo mi ha accudito. Girovagando per le tue strade e le tue piazze penso a quanto una città possa essere così ammagliante ed elegante. Lascio molto di me qui ma so che è ben custodito, fino a quando, prima o poi, tornerò in quella che è ormai diventata casa mia.

Ognuno lascia la sua impronta nel luogo che sente appartenergli di più.