## POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

# Biodegradazione di gomma naturale ad opera di *Alternaria alternata*



Relatori

prof. Francesca Bosco prof. Giulio Malucelli

Candidato

Andrea Porcelli

Ottobre 2017

## Indice

1.	Introd	uzione	1
	1.1	Struttura chimica e composizione delle Natural Rubber	2
	1.2	Condizioni essenziali per la biodegradazione di materiali polimerici	3
	1.3	Processo biodegradativo di materiali polimerici	5
		1.3.1 Metodi per la valutazione della biodegradazione	7
		1.3.2 Biodegradazione da batteri	7
		1 3 3 Biodegradazione da funghi	8
		1 3 4 Enzimi coinvolti nella hiodegradazione	9
	14	Scopo del lavoro	9
2	Materi	ali e metodi	11
2.	2 1	Microrganismi	11
	2.1 2.2	Gomma naturale	11
	2.2	Terreno colturale utilizzato	11
	2.3 2.4	Preparazione dell'inoculo fungino	12
	2.4	2.4.1 Inoculo su filtro	12
		2.4.2 Inoculo in "nellet" fungine	12
	25	2.4.2 moculo in periet fungine Prove di grassita basala in liquida in bauta Erlanmayor	12
	2.3	2.5.1 Allestimente dei mierososmi	13
	26	2.3.1 Anestimento dei microcosini Drova di his dagradaziona in liquida in hauta Erlanmayor	14
	2.0	2.6.1. Dronourgriana dai frommanti di ND	14
		2.6.1 Preparazione dei mannenti di INK	15
	27	2.0.2 Anestimento del microcosini Drova di histogradazione in liquida in hauta Famhach	10
	2.1	2.7.1 Allestiments misses a smi	1 / 17
	20	2./.1 Allestimento microcosmi	l / 10
	2.8	Determinazioni analitiche	18
		2.8.1 Prove respirometriche	18
		2.8.2 Analisi sul terreno colturale	20
		2.8.2.1 Valutazione del pH	20
		2.8.2.2 Analisi dell'attivita enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi)	20
		2.8.2.3 Valutazione delle proteine totali PI	21
		2.8.3 Valutazione della biomassa prodotta	21
		2.8.4 Analisi sulle NR	21
		2.8.4.1 Procedura di lavaggio dei campioni di NR	21
		2.8.4.2 Valutazione del peso secco	22
		2.8.4.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	22
3.	Risulta	ati	23
	3.1	Prove di crescita basale in liquido in beute Erlenmeyer	23
		3.1.1 Prove respirometriche	23
		3.1.2 Biomassa prodotta nelle colture	24
		3.1.3 Attività enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi)	25
	3.2	Prove di biodegradazione in liquido in beute Erlenmeyer	25
		3.2.1 Prove respirometriche	26
		3.2.2 Influenza del pH sull'attività enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi)	27
		3.2.3 Valutazione delle proteine totali (PT)	29
		3.2.4 Biomassa prodotta nelle colture	31
		3.2.5 Valutazione della perdita di peso delle NR	32
		3.2.6 Analisi SEM	34
	3.3	Scale-up di prove di biodegradazione in liquido in beute Fernbach	37

3.3	1 Prove respirometriche	38
3.3	2 Influenza del pH sull'attività enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi	) 39
3.3	3 Biomassa prodotta nelle colture	42
3.3	4 Valutazione della perdita di peso delle NR	42
3.4 Con	fronto dei risultati in beute Erlenmeyer e Fernbach	43
3.4	1 Confronto delle prove respirometriche	43
3.4	2 Confronto del pH e dell'attività enzimatica perossidasica	44
3.4	3 Confronto della biomassa prodotta	46
3.4	4 Confronto della perdita di peso secco	47
4. Conclusion	i	49
5. Bibliografi	a	51
6. Appendice		53

## 1. Introduzione

Nel 2014, solamente negli Stati Uniti, sono stati prodotti 258,5 milioni di tonnellate di rifiuti, il principale dei quali è la gomma.

La produzione totale mondiale di gomma è aumentata a 26,7 Milioni di tonnellate nel 2015, mostrando un incremento di produzione dal 2010 (23,7 milioni di tonnellate) del 11,3% (IRSG, 2016a). Di questi 26,7 milioni prodotti, il 51% è relativo a gomma naturale (Natural Rubber), mentre il 49% a gomma sintetica (IRSG, 2016b).

Tale aumento è stato dettato dalla maggiore richiesta di gomma naturale, in relazione ai bassi costi di produzione, alle buone caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche e alla facile reperibilità. La maggior parte della gomma prodotta trova applicazione in ambito industriale, in particolare nella produzione di pneumatici: nel 2012 più del 75% della Natural Rubber presente in commercio è stata utilizzata in questo ambito produttivo (Fainleib, 2013).

La quasi totalità di pneumatici usati non viene riciclata, crea un accumulo di gomma nelle discariche, rendendone necessario lo smaltimento: milioni di tonnellate di pneumatici usati, e in seguito scartati, sono attualmente disponibili in tutto il mondo e milioni vengono aggiunti ogni anno, con i conseguenti rischi sanitari e ambientali. Inoltre i siti utilizzati come discariche per lo stoccaggio di rifiuti di gomma sono limitati e non si presentano sicuramente come alternativa sostenibile nel tempo (Adhikari et al., 2000).

La gestione dei rifiuti (ad esempio di pneumatici usati) risulta quindi essere una delle principali problematiche del XXI secolo: i materiali polimerici non si decompongono facilmente, la degradazione naturale richiede molto tempo a causa della struttura polimerica della gomma e della presenza di additivi e stabilizzanti nella mescola (Chia et al., 2014). La combustione di rifiuti di gomma tantomeno si pone come soluzione sostenibile, in quanto genera una grande quantità di fumi, una delle principali cause del riscaldamento globale (Stevenson et al., 2008), e di gas tossici come l'ossido di carbonio (CO).

La biodegradazione microbica di scarti di gomma naturale ha dunque attratto notevole interesse scientifico negli ultimi anni in quanto si pone come prospettiva ecocompatibile per il riutilizzo di scarti polimerici; nonostante molti dei meccanismi che stanno alla base dei processi biodegradativi non siano ancora totalmente chiari.

#### 1.1 - Struttura chimica e composizione delle Natural Rubber.

Le applicazioni della gomma naturale, in inglese Natural Rubber (NR), sono innumerevoli; essa trova vasto impiego in ambito industriale come anche nella vita quotidiana. Alcuni esempi sono l'applicazione in campo automobilistico per i pneumatici o per componenti per le automobili, in campo medico per i guanti in lattice. I dati statistici confermano come l'utilizzo di Natural Rubber sia in costante aumento: la produzione mondiale ha raggiunto il valore di 12,4 milioni di tonnellate prodotte annualmente nel 2015, dimostrando come sia un materiale sempre più utilizzato in ambito industriale (IRSG, 2016b).

La Natural Rubber è un biopolimero che viene sintetizzato da più di 2500 specie vegetali; ma l'*Hevea brasiliensis*, una pianta appartenente alla famiglia delle *Euphorbiaceae*, rappresenta la fonte più utilizzata (più del 90% della produzione mondiale), sia per l'elevata resa di estrazione che per le proprietà fisiche della gomma stessa (Asawatreratanakul et al., 2003). Dal punto di vista chimico il lattice derivante da *Hevea brasiliensis* presenta la seguente composizione chimica (percentuali in peso): 25-35% polisoprene, 1-1,8% proteine, 1-2% carboidrati, 0,9-1,7% lipidi, 0,4-0,6% componenti inorganici, 0,4% amminoacidi, ammidi, etc. e 50-70% acqua.

La Natural Rubber viene ottenuta sotto forma di coagulato o precipitato dalla secrezione di lattice di *Hevea brasiliensis*, il quale forma catene polimeriche parzialmente vulcanizzabili aventi peso molecolare di circa  $10^6$  Da. Dal punto di vista strutturale, la Natural Rubber è formata da unità C<sub>5</sub>H<sub>8</sub> (isoprene), ognuna delle quali contenente un doppio legame in configurazione *cis* (Figura 1.1), fatta eccezione per i due doppi legami terminali del polimero, caratterizzati da una configurazione *trans*.



Figura 1.1: struttura chimica della natural rubber.

La Natural Rubber è composta per il 90% (in peso) di poli-isoprene, il rimanente 10% invece è legato alla presenza di altri componenti nella mescola (lipidi, carboidrati, proteine, additivi, etc.). La gomma che si ottiene dalle piante appartenenti alla specie *Hevea brasiliensis* è una gomma ad elevato peso molecolare, di alta qualità, che presenta proprietà come l'elevata elasticità, dispersione termica e resistenza abrasiva; caratteristiche che la rendono facilmente commercializzabile (Yikmis e Steibuchel, 2012).

Nel 1839 è stato messo a punto il processo di vulcanizzazione, consistente nell'aggiunta di zolfo alla Natural Rubber e al successivo riscaldamento a 140-180°C in pressione; esso migliora drasticamente le caratteristiche meccaniche del polimero. In questo modo tra le catene di polisoprene si formano legami covalenti sotto forma di ponti solfuro e la gomma risulta essere più rigida e resistente al calore. Il processo di vulcanizzazione si è diffuso particolarmente nella produzione di pneumatici automobilistici, al fine di ottenere le caratteristiche meccaniche desiderate. In alternativa, la vulcanizzazione si effettua anche impiegando perossidi organici (Coran, 1978) o radiazioni (Shah et al., 2013), ma in questo caso i polimeri vulcanizzati presenteranno caratteristiche meccaniche peggiori, in quanto,

essendo assente lo zolfo, le catene polimeriche sono legate solo da legami carbonio (Rose e Steinbuchel, 2005).

Infine la gomma sintetica (Synthetic rubber) deriva dai composti petroliferi ed è un polimero formato da unità di cis-isoprene legate in posizione 1,4 e per il 10% da unità trans-isoprene (Figura 1.2).



Figura 1.2: struttura chimica della synthetic rubber.

Confrontando la gomma sintetica con la Natural Rubber, quest'ultima presenta proprietà (elasticità, resistenza all'abrasione e all'impatto, dispersione del calore) che non possono essere eguagliate dalla gomma sintetica derivante dal petrolio. L'ottenimento delle gomme sintetiche è però decisamente più semplice e questo ha portato ad una grande diffusione delle stesse (75% del totale negli USA), nonostante la Natural Rubber garantisca caratteristiche migliori (Shah et al., 2013).

Infine si citano gli additivi, ossia composti che vengono aggiunti alla mescola polimerica al fine di migliorare determinate proprietà. Ad esempio vengono utilizzati additivi vulcanizzanti, pigmenti, rinforzanti, plastificanti, antiossidanti, etc.

Come precedentemente discusso, in seguito all'enorme diffusione della Natural Rubber nella realtà industriale mondiale, la difficoltà di smaltimento del poli(cis-1,4-isoprene) in seguito ad utilizzo è diventata una delle principali problematiche a livello ambientale. Infatti, le attuali soluzioni di stoccaggio o di incenerimento non risultano essere eco-compatibili e possono causare seri danni a livello ambientale: basti solo pensare che possono rilasciare sostanze tossiche come composti solforati e ossidi di azoto (Lucas et al., 2008). In questo contesto, la biodegradazione microbica delle Natural Rubber si pone come soluzione alternativa ecocompatibile in quanto, rispetto a processi puramente chimici come l'incenerimento, non produce sostanze nocive o tossiche per l'ambiente o per l'uomo. Inoltre dal punto di vista energetico risulta essere meno dispendioso. D'altro canto è necessario considerare che la biodegradazione è influenzata da molti fattori chimico-fisici e microbiologici, come possono essere le caratteristiche polimeriche, la tipologia di microrganismo considerato, l'eventuale presenza di additivi all'interno della mescola polimerica (i microrganismi risultano essere molto sensibili nei confronti degli additivi utilizzati al fine di migliorare le caratteristiche del polimero), l'eventuale vulcanizzazione del polimero, il peso molecolare, la presenza di gruppi funzionali, etc. (Gu et al., 2000b).

#### <u>1.2 – Condizioni essenziali per la biodegradazione di materiali polimerici.</u>

Mediante il termine *biodegradazione* si definisce la decomposizione di sostanze organiche in seguito all'azione di microrganismi: riciclo di carbonio, mineralizzazione (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e sali) di composti organici e generazione di nuova biomassa (Lucas et al., 2008).

Microrganismi quali batteri e funghi sono coinvolti nella degradazione di polimeri naturali e sintetici. In particolare, si conosce molto poco a proposito della biodegradazione di materiali polimerici sintetici (Gu et al., 2000a), probabilmente a causa del recente sviluppo della produzione di questa classe di materiali e della velocità di degradazione relativamente lenta in ambienti naturali.

I materiali polimerici presentano grande varietà strutturale e di composizione chimica, anche a causa dell'elevata versatilità dei legami C-C, C-H e C-R: si possono individuare ad esempio differenti configurazioni di legame, al pari di numerosi sostituenti radicalici. Questa elevata varietà di composizione chimica influisce fortemente sulla biodegradabilità (Odian, 2004). Inoltre, fattori da considerare sono il tipo di microrganismo considerato, la natura di eventuali pretrattamenti effettuati sul polimero, la presenza di additivi (Shah et al., 2013). Risulta dunque evidente come i fenomeni biodegradativi siano estremamente complessi.

Attualmente i fenomeni biodegradativi sono stati parzialmente compresi, ma risultano ad ogni modo estremamente difficili da schematizzare in maniera chiara e coincisa, proprio per la loro complessità. In generale, si possono considerare essenziali quattro condizioni al fine di ottenere biodegradazione:

- 1. Nell'ambiente devono essere presenti microrganismi dotati di capacità cataboliche appropriate. Essi producono enzimi, i quali possono essere costitutivi se sempre espressi, oppure inducibili se espressi solamente in presenza di un determinato composto. In particolare, gli enzimi coinvolti nei processi biodegradativi sono generalmente appartenenti alla classe delle idrolasi e/o ossidoriduttasi (Lucas et al., 2008).
- 2. L'ambiente in cui avviene il processo biodegradativo deve avere caratteristiche chimico-fisiche favorevoli alla crescita del microrganismo. Fattori quali pH, temperatura, presenza o meno di ossigeno e potenziale redox possono favorire o reprimere la crescita microbica (Lucas et al., 2008). Si consideri ad esempio la presenza o meno di ossigeno nell'ambiente: quando è presente l'ossigeno sono i microrganismi aerobi a degradare il polimero; i prodotti finali sono biomassa microbica, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Al contrario, se l'ossigeno è assente, i microrganismi anaerobi degradano il polimero: si ottiene biomassa microbica, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O come prodotti finali (condizioni metanogeniche) oppure biomassa microbica, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S e H<sub>2</sub>O (condizioni solfurogeniche) (Shah et al., 2013).
- 3. Le caratteristiche del polimero devono essere favorevoli all'attacco del microrganismo. La presenza di gruppi funzionali, determinati tipi di legami, la complessità strutturale del polimero stesso, la presenza di anelli benzenici come sostituenti sono tutti fattori che determinano l'efficacia o meno del fenomeno biodegradativo (Shah et al., 2013). In particolare, il composto deve contenere gruppi funzionali che possano essere attaccati da enzimi sintetizzabili dal microrganismo considerato.

4. Il microrganismo non deve essere inibito dal composto stesso, ossia occorre controllare il processo biodegradativo al fine di evitare la formazione di composti (finali o intermedi) tossici per i microrganismi biodegradanti.

#### <u>1.3 – Processo biodegradativo di materiali polimerici.</u>

La biodegradazione di materiali polimerici prevede quattro differenti passaggi: biodeteriorazione, depolimerizzazione, assimilazione e mineralizzazione.

In primo luogo, l'azione combinata di fattori abiotici e popolazioni microbiche degrada il polimero in catene più corte. Questa è la prima fase, chiamata **biodeteriorazione**.

Individuiamo in primo luogo l'azione dei <u>fattori abiotici</u>: i materiali polimerici sono generalmente esposti alle condizioni ambientali esterne, quali ad esempio le condizioni meteorologiche e l'invecchiamento; possono di conseguenza subire delle trasformazioni più o meno importanti che influiscono sulla biodegradabilità dei materiali stessi. Spesso l'effetto dei fattori abiotici è quello di indebolire la struttura polimerica (favorendo quindi la successiva biodegradazione), ma in alcuni casi provocando alterazioni indesiderate del materiale. Risulta quindi di primaria importanza lo studio di questi fenomeni, per poter stimare la durata di un materiale polimerico, nel nostro caso la Natural Rubber (Lucas et al., 2008).

Tra i fattori principalmente coinvolti troviamo la *degradazione meccanica*. Si verifica in seguito a compressione, tensione e/o forze di taglio applicate sul materiale polimerico, ad esempio a causa di turbolenze in mezzi fluidi come aria o acqua, agli sforzi a fatica del componente. La degradazione generalmente non è visibile a livello macroscopico, ma agisce a livello di struttura molecolare polimerica (Lucas et al., 2008).

Un secondo fattore abiotico coinvolto nel processo è la *fotodegradazione*. Molti materiali sono fotosensibili: l'energia trasportata dai fotoni può destabilizzare numerose molecole, causando reazioni di cross-linking oppure processi ossidativi. Tra i fattori abiotici, la luce risulta essere uno dei parametri più importanti (Lucas et al., 2008). In determinati casi, possono essere volontariamente aggiunte alla catena polimerica delle strutture molecolari particolarmente fotosensibili, in modo da indurre la fotodegradazione dell'intera macromolecola.

Il terzo fattore abiotico da considerare è la *degradazione termica*. La degradazione termica di polimeri termoplastici avviene alla temperatura di fusione (Tf), con il passaggio dallo stato solido a quello liquido. Generalmente la temperatura dell'ambiente esterno è inferiore a quella di fusione dei materiali polimerici termoplastici, fatta eccezione per alcuni casi, quale ad esempio il Policaprolattone (PCL), dove Tf è circa uguale alla temperatura ambiente (Tf =  $60^{\circ}$ C). Nel caso di polimeri caratterizzati da una temperatura di transizione (Tg) tra regione a comportamento cristallino e comportamento amorfo, si osserva come per temperature superiori alla Tg la disorganizzazione delle catene favorisca il processo di biodegradazione. Le proprietà dipendenti dalla composizione polimerica (tipo e percentuale dei diversi monomeri nella struttura del polimero), da cui si determinano i valori di Tg e Tf, sono dunque fondamentali per lo studio della degradazione dovuta alla temperatura (Lucas et al., 2008).

Infine la *degradazione chimica*. Le trasformazioni chimiche sono il secondo fattore abiotico per importanza. Inquinanti atmosferici possono interagire con il polimero, portando ad una modifica delle proprietà macromolecolari dello stesso (Briassoulis, 2005). Il composto principale che porta a degradazione chimica risulta però essere l'ossigeno, il quale trovandosi

nell'atmosfera in forma  $O_2$  e  $O_3$  attacca i legami covalenti polimerici generando radicali liberi. Questa degradazione ossidativa dipende dalla struttura polimerica e può essere sinergica alla fotodegradazione nella produzione dei radicali liberi. I radicali prodotti possono in seguito portare a reazioni di cross-linking o rotture di catena.

La degradazione chimica può infine anche essere causata dall'acqua e si parla in questo caso di idrolisi, dipendente da parametri quali attività dell'acqua, temperatura, pH e tempo (Lucas et al., 2008).

Insieme ai fattori abiotici, agiscono nella fase di biodeteriorazione i <u>fattori biotici</u> legati alla crescita di microrganismi sulla superficie, o all'interno, del materiale polimerico. Come precedentemente detto, la crescita microbica dipende dalla natura, dalla proprietà del polimero e dalle condizioni ambientali.

I microrganismi interessanti dal punto di vista biodegradativo sono differenti, principalmente funghi e batteri che, attraverso una serie di reazioni che coinvolgono la presenza di enzimi, rompono le catene polimeriche della Natural Rubber in unità monomeriche o oligomeriche. La rottura delle catene è ipotizzabile avvenga in corrispondenza del doppio legame C=C presente nella struttura del polisoprene, con scissione conseguente a reazioni di ossidazione e all'azione di enzimi prodotti dal microrganismo operante la degradazione.

Vi sono tre differenti modalità con cui un microrganismo può attaccare il polimero: attacco di tipo fisico, chimico o enzimatico (Lucas et al., 2008).

*Attacco di tipo fisico*. Per poter aderire alla superficie polimerica, i batteri producono una matrice adesiva che, penetrando nei pori del materiale, agisce alterandone le dimensioni. I microrganismi di tipo fungino invece rimangono adesi alla superficie sviluppando un micelio: le ife penetrano all'interno del polimero, creando spaccature e fori. La microstruttura della Natural Rubber presenta spesso fratture o lesioni in seguito a crescita microbica.

Attacco di tipo chimico. I microrganismi formano una aggregazione detta biofilm, che favorisce la penetrazione degli stessi all'interno del materiale polimerico. L'adesione iniziale alla superficie avviene attraverso legami deboli di Van der Waals; successivamente si sviluppano strutture di adesione cellulare. A questo punto il biofilm cresce attraverso divisioni cellulari o aggiunta di altri microrganismi. Si è evidenziato come la presenza di una popolazione microbica mista favorisca il fenomeno di biodeteriorazione.

*Attacco di tipo enzimatico*. Avviene ad opera di enzimi prodotti dai microrganismi coinvolti nella biodegradazione, in particolare lipasi, esterasi, ureasi e proteasi. Come precedentemente detto, l'attacco enzimatico si ipotizza avvenga sul doppio legare C=C all'interno della struttura polimerica (Lucas et al., 2008).

La seconda fase del processo di biodegradazione è la **depolimerizzazione**, in cui i microrganismi producono enzimi (lipasi, esterasi, ecc.) o radicali liberi al fine di scindere le molecole polimeriche, riducendo progressivamente il loro peso molecolare. In seguito a scissione, i monomeri prodotti sono riconosciuti dai recettori delle cellule microbiche e possono essere facilmente assimilati dalla cellula (Lucas et al., 2008).

La fase di **assimilazione** consiste nell'utilizzo da parte del microrganismo delle molecole trasportate all'interno del citoplasma al fine di produrre nuova biomassa, metaboliti ed energia (ATP) (Lucas et al., 2008).

Infine, alcuni metaboliti (semplici o complessi) possono essere rilasciati nell'ambiente extracellulare. Ad esempio molecole come CO2, N2, CH4 e H2O sono liberati nell'ambiente. Questa fase è chiamata **mineralizzazione** (Lucas et al., 2008).

#### 1.3.1 - Metodi per la valutazione della biodegradazione.

Si effettua di seguito una breve trattazione sulle metodologie frequentemente usate in letteratura per valutare la biodegradazione delle Natural Rubber.

La **quantificazione della CO<sub>2</sub> prodotta** in seguito alla crescita del microrganismo è il metodo più frequentemente usato per la valutazione della biodegrazione. Esso fornisce un'informazione diretta sulla bioconversione del carbonio contenuto nella catena polimerica in prodotti metabolici (Shah et al., 2013). Una maggiore produzione di CO<sub>2</sub> da parte del microrganismo è dovuta ad una maggiore crescita dello stesso e può ragionevolmente essere relazionata ad una maggiore biodegradazione espletata dal microrganismo sulla Natural Rubber.

**Microscopio a scansione elettronica (SEM)**. Microscopicamente, la biodegradazione può essere efficacemente studiata mediante l'utilizzo del SEM. (Shah et al., 2013). Confrontando le immagini SEM precedenti e successive al processo di biodegradazione si osserva come la crescita del microrganismo, con la conseguente rottura delle catene polimeriche, causino la formazione di evidenti spaccature, fratture e fori sulla superficie della Natural Rubber. (Ismail et al., 2013)

**Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).** I cambiamenti a livello molecolare causati dal processo biodegradativo possono essere studiati mediante utilizzo di analisi FTIR (Ismail et al., 2013), determinando la presenza di gruppi carbonili C=O, prodotti dai processi ossidativi enzimatici. Infatti studi effettuati con differenti microrganismi mostrano come l'ossidazione del doppio legame del poli(cis-1,4-isoprene) sia il primo passaggio del processo biodegradativo (Shah et al., 2013).

**Determinazione del peso secco**. Una delle principali valutazioni effettuate al fine di studiare la biodegradazione polimerica è la determinazione della perdita di peso secco del polimero. Ad una maggiore perdita di peso viene associata una più efficace biodegradazione della catena polimerica.

#### 1.3.2 - Biodegradazione da batteri.

Nell'ultimo secolo sono stati individuati diversi batteri in grado di utilizzare la gomma come sola fonte carboniosa e di energia (Rose e Steinbuchel, 2005). Questi batteri possono essere divisi in due categorie, in base alla strategia di biodegradazione utilizzata dal microrganismo (Linos et al., 2000).

I batteri appartenenti alla prima categoria, formano "zone chiare" (ossia aloni lucidi) nella crescita su medium agarizzato (Shah et al., 2013). Tale crescita risulta essere favorita in questo caso rispetto ad una crescita in coltura sommersa. Appartengono a questa categoria i generi *Streptomyces, Actinoplanes* e *Micromonospora* (Ismail et al., 2013).

I batteri appartenenti alla seconda categoria non formano invece "zone chiare": affinché avvenga la crescita devono essere a diretto contatto con la superficie della gomma, la quale funge da fonte carboniosa e da supporto fisico. La crescita di questi batteri risulta essere particolarmente favorita in coltura sommersa. Appartengono a questa categoria i generi *Corynebacterium, Gordonia e Nocardia Mycobacterium* (Shah et al., 2013).

La differenza principale tra i batteri appartenenti alle due classi è dunque la secrezione di enzimi litici e la seguente formazione della zona chiara nel primo caso, cosa che non accade nel secondo caso.

La quasi totalità delle specie batteriche in grado di biodegradare la Natural Rubber sono mesofiliche, con rare eccezioni in campo termofilico (Shah et al., 2013).

#### 1.3.3 - Biodegradazione da funghi.

I funghi filamentosi sono microrganismi eucarioti dotati di parete cellulare ed estremamente diffusi in un considerevole numero di biomi. Dal punto di vista biodegradativo, particolari attenzioni sono state rivolte ai funghi filamentosi prelevati da terreno solido, in quanto numerosi studi hanno evidenziato le loro elevate potenzialità biodegradative. Sono microrganismi eterotrofi, vengono suddivisi in tre gruppi in base alle esigenze nutritive: saprofiti, parassiti e simbionti. Il primo dei tre gruppi (saprofiti) comprende i funghi che degradano materia organica morta animale o vegetale per ottenere nutrienti e di conseguenza è il gruppo che mostra le potenzialità biodegradative più elevate. Ad esempio, la lignina e la cellulosa vengono degradate da diversi funghi: mediante il rilascio di enzimi extracellulari le molecole vengono frammentate in composti più semplici assimilabili dal fungo (Nayanashree, 2013).

Strutturalmente il corpo dei funghi filamentosi è formato da ife, ossia strutture filamentose che, ramificandosi ed intrecciandosi, formano uno strato compatto e talvolta spesso detto micelio (Figura 1.3) (Madigan et al., 2003).



Figura 1.3: immagine SEM del micelio di A.Alternata.

De Vries (1928) fu il primo a studiare la degradazione della gomma ad opera di microrganismi fungini. In seguito numerosi studi sono stati effettuati, si sono individuati ceppi fungini particolarmente promettenti in questo ambito (in particolare appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*) (Shah et al., 2013). È inoltre stato dimostrato come la crescita fungina risulta essere migliore in presenza di rugosità superficiali della gomma: l'adesione e lo sviluppo del micelio sono favoriti dalla presenza di cavità e fori, all'interno dei quali si accumulano nutrienti. Dopo lo sviluppo del micelio adeso alla superficie della

gomma, le ife penetrano all'interno del polimero, utilizzandone la componente carboniosa per il proprio metabolismo (Shah et al., 2013).

Tale crescita, prima superficiale e poi penetrazione delle ife in profondità nella NR, è stata osservata per numerosi ceppi fungini, ad esempio appartenenti al genere *Aspergillus* sp. (Ismail et al., 2013).

#### <u>1.3.4 – Enzimi coinvolti nella biodegradazione.</u>

Come precedentemente spiegato, alcuni enzimi extra-cellulari prodotti dal microrganismo favoriscono il processo di biodegradazione della NR, in quanto portano a scissione del doppio legame C=C del monomero cis-1,4-isoprene (Fainleib et al., 2013). La maggior parte degli studi effettuati in questo campo nel corso degli anni, hanno evidenziato come tale scissione avvenga come primo step del meccanismo di degradazione, a prescindere dal tipo di microrganismo utilizzato (Rose e Steinbuchel, 2005).

Si sono evidenziati tre principali enzimi coinvolti attivamente nei processi biodegradativi: la lignino perossidasi, la manganese perossidasi e la laccasi. Tali enzimi appartengono alla classe delle ossidoreduttasi e sono coinvolti in reazioni di tipo redox, caratterizzate quindi da trasferimento di elettroni (Nayanashree, 2013). Le perossidasi sono una sottoclasse delle ossidoreduttasi e solitamente utilizzano come substrato di reazione il perossido di idrogeno  $(H_2O_2)$ .

#### <u>1.4 – Scopo del lavoro.</u>

Il presente lavoro di tesi si è focalizzato sulla valutazione delle potenzialità biodegradative dei microrganismi fungini *A. alternata* ceppo ANR e *A. alternata* ceppo BNR, isolati dalla superficie delle gomme. Si è articolato in tre distinte fasi.

Una prima fase in cui si è valutata la capacità di crescita in terreno liquido dei due funghi filamentosi isolati, al fine di selezionare il ceppo fungino che presentasse le maggiori capacità di crescita in coltura liquida statica.

Una seconda fase in cui si è incubato il microrganismo fungino precedentemente selezionato in beute Erlenmeyer da 500 mL in presenza di campioni di NR. L'obiettivo di questa seconda fase è stato valutare la biodegradazione dei campioni di NR ad opera di *A. alternata* ceppo BNR.

Una terza fase in cui si è incubato il microganismo fungino selezionato in beute Fernbach da 2000 mL, in presenza di campioni di NR. Si è nuovamente valutata la biodegradazione dei campioni di NR ad opera di *A. alternata* ceppo BNR. L'obiettivo di questa terza e ultima fase è stato valutare l'influenza di uno scale-up sul processo biodegradativo dei campioni di NR.

In seguito a questa introduzione, si elencano materiali e metodi utilizzati nel corso dello studio effettuato e si riportano e discutono infine i risultati ottenuti.

## 2. Materiali e metodi

#### 2.1 - Microrganismi.

I microrganismi utilizzati nel lavoro di tesi sono due funghi filamentosi isolati dalla superficie della Natural Rubber (NR): *Alternaria alternata* ceppo ANR (Figura 2.1a) e *Alternaria alternata* ceppo BNR (Figura 2.1b).

I microrganismi erano già stati precedentemente testati ed avevano mostrato una buona potenzialità biodegradativa nei confronti della NR.



Figura 2.1a: Alternaria alternata ceppo ANR



Figura 2.1b: Alternaria alternata ceppo BNR

#### 2.2 - Gomma naturale.

La NR utilizzata è stata stampata a caldo mediante l'utilizzo di una pressa *Collin* "Teach Line". La gomma è stata posta tra due fogli di carta distaccante e, successivamente, posizionata tra due lastre di acciaio dalla superficie piana e omogenea. La temperatura di stampaggio, pari a 190 °C, è stata raggiunta mediante riscaldamento delle due lastre piane e ha causato la fusione della gomma. Di seguito si è applicata una pressione di stampaggio di 100 bar per 4 minuti, cui è seguito un raffreddamento di 6 minuti. L'utilizzo della carta distaccante è dovuto all'alta adesione della gomma alle superfici metalliche.

#### 2.3 - Terreno colturale utilizzato.

Il terreno colturale utilizzato è stato il terreno Czapek (CZ), la cui composizione è riportata di seguito: glucosio 30.0 g/L, Na(NO<sub>3</sub>) 3.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub> 10.0 mg/L.

Nel corso delle prove sperimentali, in alcuni casi, il terreno CZ è stato modificato: è stato preparato senza la fonte di carbonio (glucosio 30.0 g/L).

Infine, il terreno CZ completo è stato utilizzato per la crescita dei microrganismi su terreno solido tramite aggiunta di agar 20.0 g/L.

#### 2.4 - Preparazione dell'inoculo fungino.

#### 2.4.1 - Inoculo su filtro.

Per la preparazione dell'inoculo su filtro, un filtro sterile di microfibra di vetro ( $\emptyset$  4.5 cm, porosità 0.7 µm) è stato posizionato al centro di una capsula Petri ( $\emptyset$  9 cm) contenente il terreno solido CZ.

Al centro del filtro è stato quindi appoggiato un tondino di micelio di *A. alternata* ceppo ANR o ceppo BNR, come mostrato nella Figura 2.2 (il tondino di micelio è stato prelevato da una colonia cresciuta su terreno CZ, a temperatura ambiente, per 5 giorni).

Entrambi i funghi sono stati incubati al buio, a temperatura ambiente, sino alla completa copertura del filtro da parte del micelio.



Figura 2.2: inoculo su filtro.

#### 2.4.2 - Inoculo in "pellet" fungine.

La preparazione dell'inoculo in "pellet" fungine è stata effettuata in beute Erlenmeyer (500 mL) contenenti 200 mL di terreno CZ inoculato con 13 tondini di micelio. Questi ultimi sono stati prelevati da colonie fungine di A. alternata ceppo BNR cresciute su terreno CZ, per 5 giorni, a temperatura ambiente.

Prima dell'inserimento nelle rispettive beute, i tondini di micelio sono stati spezzettati meccanicamente, tramite vortizzazione, assieme ad un'aliquota di medium colturale.

Le beute Erlenmeyer sono state quindi mantenute in agitazione, a 125 rpm, per 6 giorni alla temperatura di 30°C.

Al termine del periodo di incubazione le pellet (visibili in Figura 2.3) sono state separate dal terreno colturale mediante blanda centrifugazione, a 1300 rpm per 5 minuti, ed utilizzate per il successivo inoculo.



Figura 2.3: "pellet" fungine.

#### 2.5 - Prove di crescita basale in liquido in beute Erlenmeyer.

Nello studio delle prove di crescita basale dei microrganismi fungini, si sono previste due linee colturali: un controllo abiotico, privo dell'inoculo, ed una linea biotica inoculata con *A*. *alternata* ceppo ANR o con *A*. *alternata* ceppo BNR.

In Tabella 2.1 sono schematicamente riportate le caratteristiche delle linee colturali allestite.

Linea Terreno utilizz		Inoculo	Numero di repliche
Controllo abiotico CZ completo		No	2
A. alternata ANR CZ comple		Si	3
<i>A. alternata</i> BNR	CZ completo	Si	3

#### 2.5.1 - Allestimento dei microcosmi.

Nell'allestimento dei microcosmi per le prove di crescita basale sono state utilizzate beute Erlenmeyer (500 mL) riempite con un monostrato di selle di Berl (95 g, area superficiale 78 cm<sup>2</sup>) in ceramica (DN 1/2") come supporto per la crescita dei microrganismi fungini. All'interno delle beute sono stati dispensati 70 mL di terreno CZ completo e si è proceduto alla sterilizzazione in autoclave (20 minuti, 121°C, 2 atm).

Si è previsto, per queste prove, un inoculo fungino su filtro (descritto nel *par 2.4.1.*). Il filtro ricoperto di micelio è stato prelevato in condizioni di sterilità e posto al centro della beuta, sul monostrato di selle di Berl. La chiusura delle beute è stata effettuata utilizzando tappi di vetro. Tutte le beute sono state mantenute in condizioni statiche e a temperatura ambiente.

I microcosmi sono stati periodicamente ossigenati. Al termine di ciascuna ossigenazione, prima della chiusura delle beute, in ciascuna di esse è stata inserita una provetta (Figura 2.4) contenente la soluzione di NaOH per la cattura della  $CO_2$ . Tale operazione ha consentito di effettuare la misura della respirometria dei microcosmi e sarà descritta, assieme alla modalità di ossigenazione, nel *par 2.8.1*.

Si è, inoltre, effettuata, al termine del periodo di incubazione, la valutazione dell'attività enzimatica perossidasica (vedi *par 2.8.2.2*) e la valutazione del peso secco della biomassa prodotta (vedi *par 2.8.3*).



Figura 2.4: beuta Erlenmeyer contenente il sistema di cattura della CO<sub>2</sub>.

#### 2.6 - Prove di biodegradazione in liquido in beute Erlenmeyer.

Le prove di biodegradazione della NR nelle beute Erlenmeyer (500 mL) sono state condotte utilizzando *A. alternata* ceppo BNR. Si sono allestite cinque differenti linee colturali, più precisamente: un controllo abiotico (CA), una linea di biodegradazione (BD), un controllo

biotico (CB), una linea di biodegradazione in presenza di glucosio (BD+G) ed un controllo biotico in presenza di glucosio (CB+G).

In Tabella 2.2 sono schematicamente riportate le caratteristiche delle linee colturali allestite.

Linea	Terreno utilizzato	Presenza NR	Inoculo	Numero di repliche
CA	CZ senza glucosio	Si	No	3
CB	CZ senza glucosio	No	Si	3
BD	CZ senza glucosio	Si	Si	5
CB+G	CZ completo	No	Si	3
BD+G	CZ completo	Si	Si	3

Tabella 2.2: linee allestite.

#### 2.6.1 - Preparazione dei frammenti di NR.

I frammenti di NR, utilizzati per le prove di biodegradazione, sono stati tagliati in forma rotonda (Figura 2.5),  $\emptyset$  2,54 cm, a partire da uno stesso film di NR; il taglio è avvenuto tramite l'ausilio di una fustella foratappi.

Per ciascun frammento è stata effettuata la valutazione del peso secco a 55°C. Prima dell'inserimento nelle beute i frammenti sono stati sterilizzati in autoclave (20 minuti, 121°C, 2 atm).



Figura 2.5: frammento di NR.

#### 2.6.2 - Allestimento dei microcosmi.

I microcosmi, sono stati allestiti in beute Erlenmeyer, 500 ml, riempite con un monostrato di selle di Berl (95 g, area superficiale 78 cm<sup>2</sup>) e 70 mL di terreno colturale. Si è previsto per queste prove un inoculo fungino su filtro, descritto nel *par 2.4.1*. In seguito a sterilizzazione delle beute, si è dunque proceduto, dove necessario, ad inserire nelle beute il filtro ricoperto di micelio. Inoltre, in ciascuna delle beute in cui era previsto, sono stati inseriti quattro frammenti di NR; i frammenti sono stati disposti sul bordo del filtro, a contatto con il microrganismo fungino, in modo da renderli facilmente colonizzabili, come è visibile nella Figura 2.6. Tutte le beute sono state chiuse con un tappo di vetro e mantenute in condizioni statiche, a temperatura ambiente.

Come è stato descritto per le prove di crescita basale, *par 2.5.1*, anche in questo caso, è stata effettuata una periodica ossigenazione dei microcosmi e la valutazione della respirometria, entrambe dettagliatamente illustrate nel *par 2.8.1*.

Si sono periodicamente prelevate aliquote di terreno per valutazioni analitiche (*par 2.8.2*) quali: valutazione del pH, dell'attività enzimatica perossidasica e della concentrazione di proteine totali. Al termine del periodo di incubazione, inoltre, si è effettuata la valutazione del peso secco della biomassa prodotta (*par 2.8.3*).

Infine, si sono periodicamente effettuati prelievi di campioni di NR incubati, i quali sono stati sottoposti a determinazioni analitiche (*par 2.8.4*) quali valutazione della perdita di peso e analisi SEM.



Figura 2.6: disposizione dei frammenti di NR a contatto con il microrganismo fungino.

#### 2.7 - Prove di biodegradazione in liquido in beute Fernbach.

Le prove di biodegradazione di NR in beute Fernbach, 2000 mL, sono state effettuate utilizzando *A. alternata* ceppo BNR. Si sono allestite quattro differenti linee colturali: un controllo abiotico (CA), una linea di biodegradazione di frammenti di NR nuovi (BD1), una linea di biodegradazione di frammenti di NR precedentemente incubati in linea di biodegradazione per 76 giorni ed in seguito lavati (BD 2) e infine una linea di biodegradazione in presenza di glucosio (BD+G).

In Tabella 2.3 sono riportate schematicamente le caratteristiche delle differenti linee.

Linea	Terreno utilizzato	Presenza NR	Inoculo	Numero di repliche
CA	CZ senza glucosio	Si	No	1
BD 1	CZ senza glucosio	Si	Si	1
BD 2	CZ senza glucosio	Si	Si	1
BD+G	CZ completo	Si	Si	1

Tabella 2.3: linee allestite.

#### 2.7.1 - Allestimento dei microcosmi.

I microcosmi sono stati allestiti in beute Fernbach (2000 mL) riempite con un monostrato di selle di Berl (320 g, area superficiale 298 cm<sup>2</sup>) e, al fine di mantenere costante il rapporto (peso supporti di immobilizzazione) / (volume di terreno colturale) nella procedura di scaleup, si sono dispensati 220 mL di terreno colturale. Le beute sono state successivamente sterilizzate.

Per tali prove si è previsto, per ciascuna beuta, un inoculo in "pellet" fungine pari a 22 g di biomassa umida (vedi *par 2.4.2*). L'inoculo è stato effettuato con l'ausilio di un imbuto di vetro. Successivamente, in ogni beuta, sono stati inseriti 12 frammenti di NR (vedi Figura 2.7), al fine di mantenere costante il rapporto (numero di NR) / (area superficiale dei supporti).



Figura 2.7: disposizione dei frammenti di NR all'interno del microcosmo.

I frammenti utilizzati nella BD 1 sono stati preparati come descritto nel *par 2.6.1*. Relativamente alla linea BD 2, invece, i frammenti sono stati prelevati al termine di una precedente incubazione di 76 giorni (linea di biodegradazione) in beute Erlenmeyer in presenza di *A. alternata* ceppo BNR. Questi ultimi sono stati sottoposti ad una procedura di lavaggio, descritta nel *par 2.8.4.1*, asciugati in stufa a 55°C per 24 ore e, infine, sterilizzati. Al termine dell'allestimento, è stato inserito il sistema di cattura della CO<sub>2</sub> (Figura 2.8) e tutti i microcosmi sono stati chiusi con tappo in vetro. Tutte le beute sono state mantenute in condizioni statiche, a temperatura ambiente.



Figura 2.8: beuta Fernbach contenente il sistema di cattura della CO<sub>2</sub>.

Anche per tale prova è stata effettuata la valutazione della respirometria e le beute allestite sono state periodicamente sottoposte ad ossigenazione (*vedi par 2.8.1*).

Si sono periodicamente prelevate aliquote di terreno per valutazioni analitiche (*par 2.8.2*) quali valutazione del pH e dell'attività enzimatica perossidasica. Al termine del periodo di incubazione si è effettuata una valutazione del peso secco della biomassa (*par 2.8.3*).

Infine, si sono periodicamente effettuati prelievi di campioni di NR, i quali sono stati sottoposti ad una valutazione della perdita di peso secco (*par 2.8.4.2*).

#### 2.8 - Determinazioni analitiche.

#### 2.8.1 - Prove respirometriche.

La valutazione della respirazione all'interno dei microcosmi (sistemi chiusi rappresentati dalle beute, Erlenmeyer o Fernbach, chiuse con tappo in vetro) è stata effettuata misurando la CO<sub>2</sub> prodotta da parte dei microrganismi fungini; la quale è stata catturata in una soluzione di NaOH. La concentrazione della soluzione di NaOH è stata variata a seconda del tipo di beuta utilizzata: si è utilizzata una soluzione 1.5 N per le prove in beute Erlenmeyer e si è utilizzata una concentrazione 4.5 N per le prove nelle beute Fernbach.

Si sono dispensati 10 mL di soluzione all'interno di provette di polipropilene sterili, a loro volta appese all'interno della beuta per mezzo di un filo come rappresentato in Figura 2.4. Nei casi in cui si è prospettata una maggiore produzione di  $CO_2$  si sono appese due provette anzichè una (Figura 2.8). L'acqua, utilizzata per la preparazione della soluzione di cattura, è stata portata a ebollizione per un tempo minimo di 45 minuti al fine di decarbonatarla.

La quantità di CO<sub>2</sub> catturata è stata valutata mediante titolazione acido-base della soluzione di NaOH con HCl 1.5N, utilizzando come agente precipitante  $BaCl_2$  e come indicatore la fenolftaleina (soluzione 1% in etanolo). Questa operazione è stata effettuata più rapidamente possibile per evitare che la CO<sub>2</sub> contenuta nell'aria dell'ambiente esterno si solubilizzi nella soluzione di NaOH.

Prima di inserire la provetta contenente la soluzione di cattura, si è effettuata l'ossigenazione del microcosmo utilizzando il sistema di ossigenazione rappresentato in Figura 2.9. Tale sistema ha garantito la sterilità del microcosmo mediante la presenza di due filtri (cut-off 0.20  $\mu$ m) sui due tubi in entrata e uscita, l'aria in ingresso è stata umidificata in seguito al passaggio in acqua sterile contenuta nella prima beuta del sistema.



Figura 2.9: sistema di ossigenazione.

La formula empirica che permette di calcolare la quantità di  $CO_2$  prodotta dai microrganismi nei microcosmi è la (2.1).

$$CO_2(mg) = (V_0 - V) \cdot f$$
(2.1)

dove:

 $V_0$  è il volume di HCl 1.5N utilizzato per titolare i campioni abiotici V è il volume di HCl 1.5N utilizzato per titolare il campione in esame f è il fattore di conversione ricavabile dalla formula  $f = 22 \cdot M$  ( dove M è la molarità della soluzione di HCl).

#### 2.8.2 - Analisi sul terreno colturale.

Le analisi sul terreno colturale sono state effettuate periodicamente prelevando un volume di 5 mL dai microcosmi. In seguito al prelievo, si è effettuata una centrifugazione a 4100 rpm per 10 minuti in centrifuga *Nuve NF048* e si è separata l'eventuale biomassa depositatasi. Sul prelievo si è effettuata una misura del pH, una analisi dell'attività enzimatica ed una valutazione delle proteine totali (PT).

#### 2.8.2.1 - Valutazione del pH.

La valutazione del pH del terreno colturale prelevato è stata effettuata utilizzando un pHmetro *WTW inoLab pH 730*.

#### 2.8.2.2 - Analisi dell'attività enzimatica perossidasica (Manganese Perossidasi e Laccasi).

L'attività enzimatica totale è stata misurata spettrofotometricamente (Sato et al., 2003) procedendo come indicato di seguito.

Il substrato utilizzato per il saggio enzimatico è stato il 2,6-dimetossifenolo (2,6-DMP), con coefficiente di estinzione molare pari a 23100  $M^{-1}$ cm<sup>-1</sup>. L'operazione è stata effettuata alla temperatura di 22°C. Le misurazioni spettrofotometriche sono state eseguite alla lunghezza d'onda di 468 nm, utilizzando uno spettrofotometro *HP 8452A*.

Si riporta di seguito la composizione della miscela di reazione nella cuvetta utilizzata (volume totale 3 mL):

- Tampone tartrato di sodio 200 mM, pH 5: 1500 µL
- 2,6-DMP 10 mM: 300 μL
- MnSO4 10 mM: 30  $\mu L$
- Aliquota di terreno colturale: 1000 µL
- H<sub>2</sub>O distillata: 120 μL

In seguito alla preparazione della miscela di reazione si è proceduto come segue:

- 1. È stata effettuata la lettura del bianco, utilizzando una cuvetta preparata come riportato sopra.
- 2. Si sono aggiunti 50 µL di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,1 mM, iniziatore di reazione.
- 3. I campioni sono stati incubati a 22°C in un bagnetto termostatato per un tempo pari a 15 minuti al termine del quale si è effettuata la misura spettrofotometrica.

Per calcolare l'attività enzimatica totale (espressa in UI/L) è stata utilizzata la relazione (2.2).

$$\frac{UI}{L} = \frac{\Delta A \cdot V_{tot} \cdot 60 \cdot 10^6}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot V_{campione}}$$

(2.2)

dove:

 $\Delta A$  è la differenza di assorbanza nell'intervallo di tempo  $\Delta t$   $V_{tot}$  è il volume totale di miscela (3000 µL)  $\epsilon$  è il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_{MnP}$ = 23100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)  $\Delta t$  è l' intervallo di tempo, espresso in secondi

 $V_{campione}$  è il volume di campione usato (1000 µL)

#### 2.8.2.3 - Valutazione delle proteine totali PT.

Sono state effettuate valutazioni sul quantitativo di proteine totali (PT) presenti nel terreno colturale mediante il saggio di Bradford. Si è dunque utilizzato il colorante *Brilliant Blue G* che, reagendo con le proteine, ha causato uno spostamento del massimo di assorbanza da 465 a 595 nm. Il protocollo del metodo prevede l'utilizzo di 1 mL di colorante e 1 mL di campione colturale. Si è proceduto all'incubazione della cuvetta a temperatura ambiente per 45 minuti e infine si è misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il bianco rispetto al quale è effettuata la lettura consisteva in una cuvetta contenente 1 mL di colorante e 1 mL di di di H<sub>2</sub>O.

Parallelamente si è costruita una retta di taratura utilizzando soluzioni di siero albumina bovina (BSA) a concentrazione nota (1, 0.75, 0.5 e 0.25 mg/mL); in questo modo è stato possibile mettere in relazione l'assorbanza valutata a 595 nm con la concentrazione del campione. Il calcolo della concentrazione di proteine totali si è effettuato mediante l'utilizzo dell'equazione della retta di taratura.

#### 2.8.3 - Valutazione della biomassa prodotta.

Si è effettuata una valutazione della biomassa prodotta all'interno dei microcosmi al termine del periodo di incubazione. A tal fine si è inizialmente proceduto alla eliminazione della maggior parte del terreno colturale dai microcosmi, mediante l'ausilio di una pipetta. Successivamente la biomassa e le selle di Berl sono state asciugate alla temperatura di 105 °C per 24 ore e quindi pesate. Il peso secco della biomassa è stato calcolato avendo preventivamente valutato quello delle selle di Berl.

#### 2.8.4 - Analisi sulle NR.

Nel corso dell'incubazione, alcuni campioni di NR, presenti nei differenti microcosmi, sono stati prelevati ed analizzati. Alcuni di questi campioni sono stati sottoposti a procedura di lavaggio al fine di rimuovere la biomassa adesa alla superficie. In particolare, la valutazione del peso secco si è eseguita sui soli campioni lavati; mentre l'analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM) si è eseguita sia su campioni lavati che su campioni non lavati.

#### 2.8.4.1 - Procedura di lavaggio dei campioni di NR.

La procedura di lavaggio si è resa necessaria per rimuovere la biomassa adesa alla superficie dei campioni di NR. La procedura di lavaggio può essere schematizzata in 4 principali fasi:

- Una sonicazione con ultrasuoni per 5 minuti con sonicatore *Elmasonic S60H* (50 Hz) a cui è seguito passaggio in ghiaccio per altri 5 minuti. Durante questa operazione i campioni di NR sono stati immersi in acqua deionizzata all'interno di provette *Falcon*. L'intera operazione è stata ripetuta per tre volte;
- Una centrifugazione per 15 minuti a 10000 rpm in centrifuga Kontron Instruments, Centrikon T-42K;
- Un lavaggio meccanico con Agitatore Vortex *Heidolph Reax Top*. Durante questa fase i campioni di NR sono stati nuovamente immersi in acqua deionizzata all'interno di provette *Falcon*;
- Un lavaggio meccanico con idropulsore.

#### 2.8.4.2 - Valutazione del peso secco.

La misura di peso secco dei campioni di NR prelevati dai microcosmi è stata effettuata successivamente al lavaggio. Si sono essiccati i campioni in stufa a 55°C per 24 ore e successivamente si è valutato il peso secco mediante utilizzo di una bilancia di precisione *SCALTEC SBC31*.

#### 2.8.4.3 - Microscopia elettronica a scansione (SEM).

Alcuni campioni di NR, lavati e non, sono stati sottoposti ad analisi morfologica SEM. A tale scopo i campioni di NR sono stati fissati in glutaraldeide (5%) per 12 ore e, successivamente, a sciugati in stufa a 55°C per 24 ore. Prima di essere analizzati, i campioni sono stati, inoltre, resi conduttivi mediante copertura con un sottile strato di oro. L'analisi morfologica della superficie dei campioni di NR incubati è stata effettuata utilizzando un microscopio SEM *LEO-1450 VP*.

## 3. Risultati

#### 3.1 - Prove di crescita basale in liquido in beute Erlenmeyer.

La crescita dei funghi *A. alternata* ceppi ANR e BNR è stata valutata su terreno CZ completo (contenente 30.0 g/L di glucosio) a temperatura ambiente e in condizioni di coltura statica. I microcosmi sono stati allestiti in beute Erlenmeyer da 500 mL con supporto di selle di Berl (crescita superficiale del microrganismo). La produzione di biomassa è stata monitorata mediante prove respirometriche durante il periodo di incubazione (29 giorni).

#### 3.1.1 - Prove respirometriche

I risultati delle prove respirometriche sono relativi ai 29 giorni di incubazione dei microrganismi fungini all'interno dei microcosmi.

La Figura 3.1 rappresenta la produzione totale di  $CO_2$  dei funghi *A. alternata* ceppi ANR e BNR nel tempo. Sono riportate nel grafico le deviazioni standard. I dati sperimentali sono riportati in appendice, nella Tabella 6.1.



Figura 3.1: prove respirometriche.

L'andamento della produzione di  $CO_2$  è risultato essere sigmoidale, come atteso dalla teoria sulla crescita microbica in coltura batch. Le prove respirometriche sono state interrotte al 29° giorno di incubazione, in corrispondenza del quale è stato raggiunto l'andamento asintotico per entrambi i funghi.

Il valore di CO<sub>2</sub> totale prodotta al termine del periodo di incubazione è risultato confrontabile tra i due ceppi fungini (821,1 mg prodotti da *A. alternata* ceppo BNR, 779,3 mg prodotti da *A. alternata* ceppo ANR).

Per confrontare in maniera più rigorosa la crescita dei microrganismi, si è valutata la velocità di crescita giornaliera (mg CO<sub>2</sub> prodotti/giorno), rappresentata in Figura 3.2.

I dati sperimentali di tale andamento sono riportati in Tabella 6.2.



Figura 3.2: andamento della velocità di crescita dei due ceppi fungini nel tempo.

Si osserva come *A. alternata* BNR abbia raggiunto il massimo valore di velocità di crescita (81,95 mg CO<sub>2</sub> prodotta/giorno) dopo 8 giorni di incubazione, mentre *A. alternata* ANR lo abbia raggiunto (72,05 mg CO<sub>2</sub> prodotta/giorno) dopo 16 giorni.

Questa osservazione è coerente con quanto evidenziato in Figura 3.1: *A. alternata* ceppo BNR è entrato in fase di crescita esponenziale in un tempo di incubazione minore rispetto *A. alternata* ceppo ANR.

#### <u>3.1.2 - Biomassa prodotta nelle colture.</u>

È stato valutato il peso secco della biomassa sviluppata dai due ceppi fungini al termine dei 29 giorni di incubazione. I risultati sono riportati in Tabella 3.1.

Linea	Peso biomassa [g]	Peso biomassa medio [g]
ANR 1	0,750	
ANR 2	0,750	0,983
ANR 3	1,450	
BNR 1	3,200	
BNR 2	2,200	2,017
BNR 3	0,650	

Tabella 3.1: biomassa prodotta dopo 29 giorni di incubazione.

La biomassa prodotta da *A. alternata* BNR è risultata essere superiore al doppio del valore di quella prodotta da *A. alternata* ANR (rispettivamente 2,017 g e 0,983 g).

#### 3.1.3 - Attività enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi).

Al 29° giorno di incubazione è stata valutata l'attività enzimatica perossidasica nei terreni colturali. Si è evidenziata una maggiore attività in presenza di *A. alternata* ceppo BNR (attività enzimatica perossidasica pari a 0,898 UI/L), rispetto ad *A. alternata* ceppo ANR (attività enzimatica perossidasica pari a 0,265 UI/L).

I risultati delle analisi respirometriche, produzione di biomassa e determinazione dell'attività enzimatica hanno evidenziato come l'utilizzo di *A. alternata* ceppo BNR sia più promettente dal punto di vista biodegradativo.

#### <u>3.2 - Prove di biodegradazione in liquido in beute Erlenmeyer.</u>

In seguito alle considerazioni effettuate in merito alle prove di crescita basale in liquido (vedi *par 3.1*), l'isolato fungino selezionato per le prove in coltura liquida pura è stato *Alternaria alternata* ceppo BNR.

Si sono riportati di seguito i risultati relativi alle prove di biodegradazione condotte in terreno liquido, incubate in beute Erlenmeyer da 500 mL. Tali prove sono state mantenute a temperatura ambiente, sono state allestite 5 repliche per le linee di BD e 3 repliche per le linee di BD+G. Si sono inoltre previste: una linea di controllo abiotico, una di controllo biotico e una di controllo biotico con aggiunta di glucosio nel terreno colturale (vedi *par 2.6*). Il tempo di incubazione per le differenti linee (CA, CB, BD, CB+G, BD+G) è stato pari a 76 giorni; nel corso del quale è stato possibile osservare il graduale sviluppo di un fitto micelio fungino sulla superficie dei campioni di NR nelle linee di biodegradazione (Figura 3.3).



Figura 3.3: NR colonizzate da A. alternata BNR in beuta Erlenmeyer.

#### <u>3.2.1 - Prove respirometriche.</u>

In Figura 3.4 si è rappresentato l'andamento della  $CO_2$  prodotta da *Alternaria alternata* ceppo BNR nelle differenti linee in funzione del tempo. Le prove respirometriche sono state effettuate sino al 62° giorno di incubazione, in quanto l'andamento è risultato essere asintotico dopo tale tempo.

Al 29° giorno di incubazione, nelle linee BD+G e CB+G la concentrazione di glucosio nel terreno colturale è stata riportata al valore iniziale, pari a 30 g/L (rappresentato in Figura 3.4 dalla linea verde). Inoltre, al 57° giorno di incubazione, in tutte le linee, è stata addizionata la fonte di azoto Na(NO<sub>3</sub>) al fine di ripristinare la concentrazione iniziale, pari a 3 g/L (rappresentato in Figura 3.4 dalla linea marrone). I dati sperimentali delle prove respirometriche sono stati riportati nella Tabella 6.3.



Figura 3.4: prove respirometriche.

Si è osservato che le linee caratterizzate dalla presenza di glucosio nel terreno colturale, BD+G e CB+G, hanno prodotto un maggior quantitativo di CO<sub>2</sub> (rispettivamente 878,9 mg di CO<sub>2</sub> e 775,5 mg di CO<sub>2</sub> al 57° giorno di incubazione) rispetto alle prove in assenza di glucosio BD e CB (rispettivamente 116 mg di CO<sub>2</sub> e 69,3 mg di CO<sub>2</sub> al 57° giorno di incubazione).

Si considerino le linee contenenti glucosio (BD+G, CB+G). Nei primi 15 giorni di incubazione, l'andamento è risultato il medesimo nei due casi: elevata produzione di  $CO_2$  dovuta alla presenza di glucosio (30,0 g/L), substrato facilmente assimilabile dal microrganismo. In seguito, dopo che il glucosio è stato consumato, l'andamento si è differenziato: molto probabilmente, le NR sono diventate una fonte alternativa di carbonio che il microrganismo ha potuto utilizzare per il proprio metabolismo. Questo è dimostrato dalla maggiore produzione di  $CO_2$  nella linea BD+G, contenente i campioni di NR, rispetto al controllo con glucosio.

La medesima considerazione è stata effettuata per le linee senza glucosio (BD, CB): dopo un primo periodo (10 giorni) in cui le curve hanno presentato lo stesso andamento, la produzione di  $CO_2$  relativa alla linea BD (presenza di campioni di NR) è risultata essere superiore al rispettivo controllo.

Si può dunque ipotizzare che *A. alternata* BNR abbia utilizzato le NR come fonte di carbonio per il proprio metabolismo.

#### 3.2.2 - Influenza del pH sull'attività enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi).

Dopo ogni prelievo di terreno colturale è stata effettuata, sul liquido prelevato, una valutazione del pH per tutte e cinque le linee allestite.

L'andamento del pH nel tempo, relativo alle linee di BD+G e BD è stato rappresentato in Figura 3.5. I dati sperimentali del pH nel tempo delle differenti linee sono stati riportati in Tabella 6.4 e Figura 6.1.



Figura 3.5: andamento del pH del terreno colturale nel tempo.

Si è osservato un andamento del pH crescente (fino al giorno 48° di incubazione) per le linee di BD e BD+G; con un aumento di pH superiore in presenza di glucosio (BD+G). Ciò è dovuto al fatto che l'azoto nei terreni colturali si trovasse sotto forma di nitrati: un aumento del consumo di nitrati ha causato un aumento del pH. Di conseguenza in presenza di glucosio, a seguito di un maggiore consumo di nitrati, si è verificato un aumento maggiore del pH nel terreno colturale rispetto alle linee caratterizzate da assenza di glucosio (BD). Un andamento analogo è stato individuato per le linee di controllo (CB e CB+G) (Figura 6.1).

Sono state effettuate, parallelamente alle valutazioni del pH, analisi al fine di determinare l'attività enzimatica perossidasica.

In Figura 3.6 si sono riportate sull'asse principale i valori di attività enzimatica perossidasica (UI/L) in funzione del tempo (giorni) delle prove di BD+G e BD; sull'asse secondario il valore di pH di entrambe le linee. I dati sperimentali di attività enzimatica delle differenti linee sono riportati in Tabella 6.5.



Figura 3.6: influenza del pH sull'attività enzimatica perossidasica.

L'attività enzimatica ha evidenziato un picco in corrispondenza del 41° giorno di incubazione. Infatti, considerando la linea BD+G, l'attività è aumentata da un valore di 0,085 UI/L al 5° giorno ad un valore di 0,250 UI/L al 41° giorno, per poi diminuire drasticamente (0,074 UI/L al 48° giorno). Tale diminuzione è coincisa con il punto in cui il pH ha raggiunto il suo valore massimo (pH 9,73); si è dunque ipotizzato un effetto inibente di quest'ultimo sull'attività enzimatica. Un ragionamento analogo è stato effettuato per la linea di BD; in seguito ad incremento da 0,076 UI/L al 5° giorno a 0,242 UI/L al 41° giorno, la diminuzione di attività (0,057 UI/L al 48° giorno) è coincisa con il valore più elevato di pH (pH 9,14).

Per verificare se l'effetto inibitorio fosse causato dal pH, al 51° giorno di incubazione (rappresentato in Figura 3.5 con la linea verde) il valore di pH è stato corretto utilizzando HCl

(1,5 N) al fine di riportarlo al valore iniziale (pH 8,41). Nelle misure successive, nelle linee BD+G e BD, si è riscontrato un aumento dell'attività (rispettivamente 0,152 UI/L e 0,188 UI/L al 57° giorno di incubazione). Si è dunque ipotizzato che l'effetto inibente fosse dovuto al valore di pH molto basico.

Infine dopo il 57° giorno di incubazione il valore di attività enzimatica è diminuito in entrambe le linee (0,076 UI/L per BD+G, 0,156 UI/L per BD). Questo viene spiegato da una condizione di crescita non ottimale nella quale si è venuto a trovare il fungo: in seguito alla formazione di uno strato compatto e spesso di micelio all'interfaccia gas-liquido, molto probabilmente è risultato parzialmente ostacolato il trasporto di nutrienti e di ossigeno. Di conseguenza la crescita è stata rallentata (al pari della produzione enzimatica del microrganismo).

#### 3.2.3 - Valutazione delle proteine totali (PT).

È stata effettuata una valutazione delle proteine totali presenti nel terreno colturale a differenti tempi di incubazione. I dati sperimentali relativi alle 4 linee sono stati riportati in Tabella 6.6 e Figura 6.2. In Tabella 3.2 sono stati invece riportati i valori ottenuti relativi alle due linee di maggiore interesse: BD e BD+G.

			PT [mg/mL]		
Tempo [giorni]	36	41	48	54	62
BD	0,011	0,025	0,008	0,008	0,008
BD+G	0,049	0,047	0,031	0,038	0,039

*Tabella 3.2: concentrazione di proteine totali nel tempo.* 

Tali valori sono stati rappresentati graficamente in Figura 3.7.



Figura 3.7: concentrazione di proteine totali nel tempo.

La quantità di PT è risultata superiore in presenza di glucosio nel terreno colturale (BD+G), rispetto alla linea senza glucosio (BD) (0,049 mg/mL nella linea BD+G e 0,011 mg/mL nella linea BD al 36° giorno di incubazione; 0,031 mg/mL nella linea BD+G e 0,008 mg/mL nella linea BD al 48° giorno; 0,039 mg/mL nella linea BD+G e 0,008 mg/mL nella linea BD al 62° giorno). Un discorso analogo può essere fatto per le linee di controllo (vedi Figura 6.2).

In Figura 3.8 si sono confrontati l'andamento della concentrazione di PT con quello dell'attività enzimatica perossidasica in funzione del tempo per la linea BD+G.



Figura 3.8: Confronto PT e attività enzimatica perossidasica nel tempo nella linea BD+G.

Si è evidenziato come la diminuzione di concentrazione di PT (0,047 mg/mL al 41° giorno, 0,031 mg/mL al 48° giorno) sia avvenuta parallelamente alla diminuzione della attività enzimatica (0,25 UI/L al 41° giorno, 0,074 UI/L al 48° giorno).



#### Si è rappresentato in Figura 3.9 il medesimo confronto per la linea BD.

Figura 3.9: Confronto PT e attività enzimatica perossidasica nel tempo nella linea BD.

Anche per la linea BD, il decremento di concentrazione di PT (0,025 mg/mL al 41° giorno, 0,008 mg/mL al 48° giorno) è avvenuto in parallelo alla brusca diminuzione di attività enzimatica perossidasica (0,24 UI/L al 41° giorno, 0,057 UI/L al 48° giorno).

Di conseguenza si è ipotizzato che la maggior parte degli enzimi presenti nel liquido colturale siano enzimi perossidasici in quanto, in entrambe le linee BD+G e BD, ad una diminuzione di attività enzimatica perossidasica è seguito un rapido decremento della concentrazione di PT.

#### <u>3.2.4 - Biomassa prodotta nelle colture.</u>

È stato valutato il peso secco della biomassa ottenuta al termine del periodo di incubazione (76° giorno) nelle differenti linee. I risultati sono stati riportati in Tabella 3.3.

Linea	Peso biomassa [g]	Peso biomassa medio [g]	Concentrazione biomassa [g/L]	
CB+G 1	1,80			
CB+G 2	1,75	1,80	25,7	
CB+G 3	1,85			
BD+G 1	1,70			
BD+G 2	1,60	1,65	23,6	
BD+G 3	1,65			
CB 1	1,20			
CB 2	1,20	1,20	17,1	
CB 3	1,20			
BD 1	1,15			
BD 2	1,20	1,20	17 1	
BD 3	1,20		1/,1	
BD 4	1,25			

Tabella 3.3: biomassa prodotta dopo 76 giorni di incubazione.

La concentrazione di biomassa (in g/L), valutata in Tabella 3.3, è risultata essere superiore nelle linee caratterizzate da presenza di glucosio, quindi CB+G (25,7 g/L) e BD+G (23,6 g/L), rispetto alle linee in cui non era presente glucosio, ossia CB (17,1 g/L) e BD (17,1 g/L).

Ciò è dovuto al fatto che, nelle linee in cui era presente il glucosio nel terreno colturale (CB+G e BD+G), il microrganismo fungino aveva a disposizione una fonte di carbonio alternativa e più facilmente assimilabile rispetto alle linee CB e BD, dove l'unica fonte carboniosa disponibile erano le NR.

Di conseguenza si è ritenuta giustificabile una maggiore produzione di biomassa a parità di volume di terreno colturale (0,07 L) nelle linee di BD+G e CB+G rispetto alle linee di BD e CB.

#### 3.2.5 - Valutazione della perdita di peso delle NR.

Al fine di valutare la perdita di peso delle NR incubate nei microcosmi, è stata eseguita la procedura di lavaggio come descritto nel *par 2.8.4.1*.

Il lavaggio si è mostrato efficace nella rimozione della maggior parte della biomassa adesa sulla superficie della gomma.

In Figura 3.10a e 3.10b si è evidenziata la differenza macroscopica tra rispettivamente una NR tal quale (non lavata) e una NR lavata, prelevate al 41° giorno di incubazione.



Figura 3.10a: NR tal quale (41° giorno).



Figura 3.10b: NR lavata (41° giorno)

In seguito a lavaggio ed essiccamento in stufa si è valutato il peso secco (vedi *par 2.8.4.2*). Il lavaggio delle NR, dopo 76 giorni di incubazione, è risultato macroscopicamente meno efficace (Figura 3.10c) rispetto a quello a 41 giorni di incubazione; probabilmente in relazione ad una maggiore penetrazione delle ife fungine all'interno della struttura polimerica della gomma e di conseguenza ad una maggiore difficoltà nella rimozione del micelio adeso.



Figura 3.10c: NR lavata (76° giorno).

Si sono riportate in Tabella 3.4 le perdite di peso medie calcolate delle gomme prelevate al 41° e al 76° giorno di incubazione. I valori di perdita di peso dei singoli campioni di NR prelevati a 41 e 76 giorni di incubazione, sono riportati rispettivamente in Tabella 6.7 e 6.8.

Linea	Perdita di peso percentuale dopo 41 giorni di incubazione	Perdita di peso percentuale dopo 76 giorni di incubazione
BD+G	1,068%	1,521%
BD	1,284%	2,008%

Tabella 3.4: perdite di peso secco percentuali dopo 41 e 76 giorni di incubazione.

Dai dati ottenuti dopo 41 e 76 giorni di incubazione si è evidenziato come le perdite di peso risultino essere superiori nel caso delle linee di BD (1,284% a 41 giorni, 2,008% a 76 giorni) rispetto a quelle di BD+G (1,068% a 41 giorni, 1,521% a 76 giorni). In particolare, dopo 76 giorni, la perdita di peso nella linea BD è stata 1,32 volte superiore alla stessa ottenuta nella linea BD+G. Questi dati hanno dimostrato come non sia necessario fornire al microrganismo una fonte alternativa di carbonio facilmente assimilabile (nel nostro caso il glucosio): la biodegradazione è risultata superiore in presenza di NR come unica fonte di carbonio.

Il valore contenuto di perdita di peso, ottenuto dopo 76 giorni di incubazione, è da porre in relazione al fatto che la biodegradazione della NR è un processo molto lento a causa della complessità dei fenomeni che lo caratterizzano (produzione e secrezione di enzimi, rottura delle catene isopreniche).

#### 3.2.6 - Analisi SEM.

Le analisi SEM sono state effettuate su campioni prelevati da coltura pura liquida di *A. alternata* ceppo BNR dopo 41 giorni di incubazione.

Si è considerato un primo confronto tra un campione di NR incubato in microcosmo abiotico e un campione di NR incubato in microcosmo BD+G. La NR incubata nel microcosmo abiotico si è presentata macroscopicamente priva di micelio adeso (Figura 3.11a). Nel campione di NR incubato in BD+G invece era visibile un micelio compatto e ben sviluppato; la superficie della NR risultava totalmente colonizzata (Figura 3.11b).



Figura 3.11a: NR da linea abiotica.

*Figura 3.11b: NR da linea* BD+G.

Si è effettuato di seguito lo stesso confronto, nel contesto delle analisi SEM.

In Figura 3.12a è possibile osservare un campione di NR incubato in microcosmo abiotico. La superficie risulta omogenea, non interessata da alcun fenomeno biodegradativo; si osservano solo delle disomogeneità superficiali, probabilmente imputabili al processo di produzione della gomma.

In Figura 3.12b si osserva il campione di NR incubato in microcosmo BD+G, le ife che compongono il micelio sono ben definite. La superficie omogenea che si osserva nel campione in Figura 3.12a è stata completamente ricoperta da biofilm, coerentemente con l'osservazione macroscopica preliminare effettuata.



Figura 3.12a: Abiotico. Ingrandimento: 1000X.

Figura 3.12b: BD+G non lavato. Ingrandimento: 1000X.

Si consideri il campione derivante da linea di BD+G, non sottoposto a trattamento di lavaggio, a due differenti ingrandimenti (Figura 3.13a e Figura 3.13b). Si osserva che il micelio presenta delle spaccature ben definite, imputabili al processo di essicamento effettuato sui campioni di NR dopo essere stati prelevati dai microcosmi.



Figura 3.13a: BD+G non lavato. Ingrandimento: 250X.

Figura 3.13b: BD+G non lavato. Ingrandimento: 500X.

Per valutare al meglio le variazioni morfologiche sulla superficie della gomma, sono state analizzate immagini SEM di gomme a seguito del processo di lavaggio (vedi *par 2.8.4.1*). Il lavaggio è risultato essere molto efficiente nella rimozione del biofilm adeso alla superficie (come descritto nel *par 3.2.5*), come si può osservare nell'immagine SEM in Figura 3.14a e 3.14b. Sono infatti evidenti i "solchi" lasciati dalla rimozione delle ife.



Figura 3.14a: BD+G lavato. Ingrandimento: 250X).

Figura 3.14b: BD+G lavato. Ingrandimento: 1000X.

Queste spaccature presenti sulla superficie (non presenti nel campione incubato in microcosmo abiotico), indicate in rosso in Figura 3.14b, sono state dunque causate dalla crescita delle ife sulla superficie del campione di NR incubato. Di conseguenza si è ipotizzata una crescita prevalentemente superficiale del micelio sulla gomma naturale.

Si consideri ora il campione prelevato da linea di BD, non sottoposto a trattamento di lavaggio, a due differenti ingrandimenti. Il micelio cresciuto sul campione appare meno spesso e le spaccature meno definite (Figura 3.15a e Figura 3.15b) rispetto al campione derivante da linea di BD+G (Figura 3.13a e Figura 3.13b).



Figura 3.15a (BD non lavato. Ingrandimento: 500X).

Figura 3.15b (BD non lavato. Ingrandimento: 1000X).

In seguito a lavaggio, è stato possibile osservare i "fori" causati dalla crescita delle ife. Per il campione derivante da linea di BD, le ife sembra siano cresciute in profondità all'interno della

gomma, causando quindi la formazione di veri e propri fori (in rosso in Figura 3.16a) nel campione. Per chiarire tale osservazione, si considerino le Figure 3.16a e 3.16b.



Figura 3.16a: BD lavato. Ingrandimento 2500X.

Figura 3.16b: BD+G lavato. Ingrandimento 2500X.

La superficie del campione di NR incubato nella linea di BD (Figura 3.16a) presenta sulla superficie dei fori profondamente differenti dalla forma delle ife visibile sulla superficie del campione incubato nella linea di BD+G (Figura 3.16b). Ciò può essere imputato al fatto che le ife nel primo caso si siano sviluppate in profondità all'interno della gomma e non superficialmente come è osservato nel campione incubato nella linea di BD+G (Figura 3.16b).

La crescita delle ife sulla superficie (e in profondità) dei campioni di NR incubati evidenzia come le NR siano effettivamente un substrato compatibile con la crescita del microrganismo fungino *A. alternata* BNR e che sia avvenuta biodegradazione delle stesse, coerentemente con quanto ottenuto dalla valutazione della perdita di peso secco dei campioni incubati (*par 3.2.5*).

#### 3.3 - Scale-up di prove di biodegradazione in liquido in beute Fernbach.

In seguito ai risultati ottenuti dalle prove in liquido in beute Erlenmeyer da 500 mL, si è effettuato uno scale-up in beute Fernbach da 2000 mL. Tali prove sono state mantenute a temperatura ambiente. Sono state allestite 2 linee di BD, 1 linea di BD+G ed una linea di controllo abiotico (vedi *par 2.7*). Il tempo di incubazione per le differenti linee (CA, BD 1, BD 2, BD+G) è stato pari a 62 giorni.

Nel processo di scale-up alcuni parametri sono stati mantenuti costanti; il primo dei quali è stato il tipo di terreno colturale utilizzato (CZ). Inoltre, si è mantenuto costante il rapporto (peso supporti di immobilizzazione) / (volume di terreno colturale) ed il rapporto (numero di NR) / (area superficiale dei supporti).

La modalità di inoculo è stata, invece, variata in relazione all'aumento di area superficiale dei supporti. Si è utilizzato, al posto dell'inoculo su filtro, un inoculo in "pellet" fungine da coltura agitata (vedi *par 2.4.2*). Tale inoculo ha consentito una migliore dispersione del microrganismo all'interno del microcosmo ed una maggiore quantità iniziale di biomassa.

#### 3.3.1 - Prove respirometriche.

In Figura 3.17 si è rappresentato l'andamento della  $CO_2$  prodotta da *A. Alternata* ceppo BNR nelle differenti linee in funzione del tempo. I dati sperimentali della prova respirometrica sono riportati nella Tabella 6.9.



Figura 3.17: prove respirometriche.

Si è osservato, in analogia con le precedenti prove di biodegradazione in beute Erlenmeyer, come le linee contenenti glucosio nel terreno colturale (BD+G) abbiano prodotto un quantitativo di CO<sub>2</sub> superiore (3933,6 mg di CO<sub>2</sub> al 62° giorno di incubazione) rispetto alle linee non contenenti glucosio (rispettivamente 597,3 mg di CO<sub>2</sub> nella linea BD 1 e 478,5 mg di CO<sub>2</sub> nella linea BD 2 al 62° giorno di incubazione). L'andamento è risultato essere sigmoidale per tutte le linee.

Si confrontino le linee BD 1 e BD 2. Tali linee di biodegradazione differivano per i campioni di NR inseriti nei microcosmi: nella linea BD 1 si sono utilizzati campioni di NR sottoposti per la prima volta a biodegradazione, nella linea BD 2 si sono invece utilizzati campioni di NR precedentemente incubati (linea di biodegradazione in presenza di *A. alternata* ceppo BNR) in beute Erlenmeyer per 76 giorni e successivamente sottoposti a trattamento di lavaggio. Tale confronto si è effettuato al fine di valutare l'influenza di una seconda incubazione sul processo biodegradativo della NR. Per meglio evidenziare le differenze dal punto di vista respirometrico, le curve relative a BD1 e BD2, limitatamente a 36 giorni di incubazione, sono state riportate nuovamente in Figura 3.18.



Figura 3.18: prove respirometriche.

Si è osservato come le due curve presentino valori simili per i primi 5 giorni di incubazione. A partire dal 6° giorno la linea BD 1 ha iniziato a presentare una produzione di  $CO_2$  superiore alla linea BD 2. La differenza tra le due curve è poi aumentata per tempi di incubazione superiori, fino ad assestarsi ad un valore pressoché costante a partire dal 23° giorno di incubazione.

Si è dunque osservato che la produzione di CO<sub>2</sub> da parte di *A. alternata* ceppo BNR è risultata favorita in presenza di campioni di NR incubati una sola volta.

#### 3.3.2 - Influenza del pH sull'attività enzimatica perossidasica (MnP e Laccasi).

Il liquido colturale, periodicamente prelevato da tutte e tre le linee allestite, è stato sottoposto ad una valutazione del pH.

L'andamento del pH nel tempo, relativo alle linee di BD+G, BD 1 e BD 2 è stato rappresentato in Figura 3.19. I dati sperimentali sono riportati in Tabella 6.10 e rappresentati in Figura 6.3.



Figura 3.19: andamento del pH nel tempo.

L'andamento del pH delle tre linee è risultato essere crescente (analogamente a quanto osservato nelle prove di biodegradazione in liquido in beute Erlenmeyer) fino al giorno  $20^{\circ}$  di incubazione. In corrispondenza del  $20^{\circ}$  giorno, il pH è stato riportato al valore iniziale di 7,5 (tale operazione sarà discussa in seguito) in tutte le linee (linea gialla in Figura 3.19); in seguito il pH è nuovamente aumentato, fino ad assestarsi ad un valore pari a 8,01 per la linea BD 1, 8,06 per BD 2 e 8,12 per BD+G al 35° giorno.

Parallelamente alle valutazioni del pH, è stata effettuata la determinazione dell'attività totale degli enzimi perossidasici (MnP e Laccasi).

In Figura 3.20 sono state riportate le attività enzimatiche perossidasiche (UI/L) in funzione del tempo (giorni) per le linee BD 1, BD 2 e BD+G. I dati sperimentali di attività enzimatica perossidasica delle differenti linee sono stati riportati in Tabella 6.11.



Figura 3.20: andamento dell'attività enzimatica perossidasica nel tempo.

L'attività enzimatica perossidasica delle differenti linee è risultata essere crescente nel tempo dal 2° al 6° giorno di incubazione. Si consideri la linea BD 2: l'attività enzimatica è aumentata da un valore di 0,118 UI/L al 2° giorno fino a 0,401 UI/L al 6° giorno per poi diminuire progressivamente fino ad un valore di 0,055 UI/L al 17° giorno, in corrispondenza dei valori massimi di pH raggiunti (pH 8,74 al 17° giorno, pH 8,89 al 20° giorno).

Si è evidenziato nuovamente l'effetto inibente del pH sull'attività enzimatica. Per tale motivo si è effettuata una correzione (rappresentata in Figura 3.19 con la linea gialla) utilizzando HCl (1,5 N) in corrispondenza del 20° giorno di incubazione, al fine di riportare il pH al valore iniziale (pH 7,5). In seguito alla correzione, l'attività enzimatica perossidasica è aumentata nel tempo, assestandosi ad un valore pressoché costante (0,190 UI/L).

Un discorso analogo è stato sviluppato per le linee BD 1 e BD+G. Infatti, considerando la linea BD 1, si è evidenziato come l'attività enzimatica perossidasica sia aumentata dal  $2^{\circ}$  giorno (0,124 UI/L) al 6° giorno (0,499 UI/L) e diminuita poi fino al 17° giorno (0,124 UI/L), dove il pH ha raggiunto il valore di 8,59. In seguito alla correzione del pH effettuata al 20° giorno, l'attività enzimatica perossidasica ha nuovamente iniziato a crescere, fino al valore di 0,193 UI/L al 35° giorno di incubazione.

Infine, considerando la linea BD+G, si è evidenziato come dal 2° al 6° giorno si sia presentato un incremento dell'attività enzimatica perossidasica da un valore pari a 0,081 UI/L, a 0,563 UI/L. Si è evidenziata, analogamente alle due precedenti linee, la diminuzione dell'attività fino al 17° giorno (0,090 UI/L) a causa dell'aumento del pH (8,18 al 17° giorno). In seguito a correzione l'attività enzimatica perossidasica è cresciuta, sino al valore di 0,317 UI/L relativo al 35° giorno di incubazione.

Concludendo, si è evidenziato (coerentemente con quanto osservato in beute Erlenmeyer, vedi *par 3.2.2*) come l'attività enzimatica perossidasica e il pH siano strettamente correlati: ad un eccessivo aumento di pH, segue una diminuzione dell'attività enzimatica perossidasica.

#### 3.3.3 - Biomassa prodotta nelle colture.

È stato valutato il peso secco della biomassa prodotta al termine del periodo di incubazione (62° giorno) nelle differenti linee. I risultati sono stati riportati in Tabella 3.5.

Linea	Peso biomassa [g]	Concentrazione biomassa [g/L]
BD 1	3,70	16,82
BD 2	3,60	16,36
BD+G	5,70	25,91

Tabella 3.5: biomassa prodotta dopo 62 giorni di incubazione.

Si è evidenziato come le due linee di biodegradazione BD 1 e BD 2 abbiano prodotto un quantitativo di biomassa confrontabile (rispettivamente 3,70 g e 3,60 g). Tale valore è risultato invece essere più elevato nella linea BD+G (5,70 g) in seguito alla presenza del glucosio nel terreno colturale: essendo questo una fonte di carbonio facilmente assimilabile, ha favorito la crescita fungina e di conseguenza la produzione di biomassa. Tali osservazioni sono, ovviamente, valide anche per i valori di concentrazione di biomassa: nelle linee BD 1 e BD 2 (rapporto pari rispettivamente a 16,82 g/L e 16,36 g/L) si è ottenuto un valore inferiore rispetto alla linea BD+G (rapporto pari a 25,91 g/L).

#### 3.3.4 - Valutazione della perdita di peso delle NR.

Al termine dei 62 giorni di incubazione si è proceduto al lavaggio come descritto nel *par* 2.8.4.1 per determinare la perdita di peso dei campioni di NR incubati. Il lavaggio è risultato efficace nella rimozione del micelio, in particolare per le linee BD 1 (Figura 3.21b) e BD+G. E' risultato invece meno efficace per i campioni derivanti da linea di biodegradazione BD 2 (Figura 3.21a).



Figura 3.21a: NR lavata da linea BD 2.

Figura 3.21b: NR lavata da linea BD 1.

La rimozione del micelio fungino dal campione incubato nella linea BD 2 è risultata meno efficace probabilmente perché, in seguito alla precedente incubazione in linea di biodegradazione in beuta Erlenmeyer, la superficie della NR risultava parzialmente biodegradata e di conseguenza meno uniforme e più rugosa. In particolare tale rugosità ha probabilmente favorito l'adesione micelio fungino, aumentando la difficoltà di rimozione dello stesso.

In seguito a lavaggio ed essiccamento in stufa, si è valutata la perdita di peso secco (vedi *par* 2.8.4.2). Si sono riportate in Tabella 3.6 le perdite di peso medie delle gomme prelevate al  $62^{\circ}$  giorno di incubazione. I valori relativi ai singoli campioni di NR prelevati sono stati riportati in Tabella 6.12.

Linea	Perdita di peso percentuale media dopo 62 giorni di incubazione
BD 1	4,242%
BD 2	2,494%
BD+G	1,164%

Tabella 3.6: perdita di peso secco percentuale dopo 62 giorni di incubazione.

Al termine dei 62 giorni di incubazione, si è evidenziato come la linea di biodegradazione BD 1 presenti una perdita di peso secco percentuale dei campioni di NR incubati superiore alla linea BD 2 (rispettivamente 4,242% e 2,494%). Ciò è coerente con quanto osservato nelle prove respirometriche, dove la linea BD 1 presentava una più marcata produzione di CO<sub>2</sub> rispetto alla linea BD 2 (rispettivamente 597,3 mg di CO<sub>2</sub> nella linea BD 1 e 478,5 mg di CO<sub>2</sub> nella linea BD 2 al 62° giorno di incubazione).

Inoltre si è evidenziato che, come già osservato nelle prove di biodegradazione in beute Erlenmeyer, la linea BD+G ha presentato una perdita di peso dei campioni di NR inferiore (1,164%) rispetto alle due linee BD 1 e BD 2 (rispettivamente 4,242% e 2,494%). Coerentemente con quanto sostenuto in precedenza (vedi *par 3.2.5*), l'assenza di glucosio nel terreno colturale ha favorito la biodegradazione di NR.

#### 3.4 - Confronto dei risultati in beute Erlenmeyer e Fernbach.

Nei seguenti paragrafi la trattazione si è incentrata sul confronto tra le prove biodegradative svolte in beute Erlenmeyer e beute Fernbach, evidenziandone le principali differenze. In tale confronto, si è considerata solo la linea BD 1, quale linea di biodegradazione in beute Fernbach, in quanto nella linea BD 2 sono stati utilizzati campioni di NR incubati due volte e di conseguenza non sarebbe stato possibile confrontarla con le precedenti prove di biodegradazione in beute Erlenmeyer.

#### 3.4.1 - Confronto delle prove respirometriche.

Si sono confrontati i risultati derivanti dalle prove respirometriche in beute Erlenmeyer e in beute Fernbach dopo 62 giorni di incubazione. I valori di CO<sub>2</sub> prodotta in seguito allo scaleup in beuta Fernbach sono risultati significativamente più elevati di quelli prodotti in beuta Erlenmeyer: nella linea BD+G in beuta Fernbach sono stati prodotti 3933,6 mg di CO<sub>2</sub>, circa 4,34 volte superiori ai 906,4 mg prodotti in beuta Erlenmeyer. Analogamente, per la linea BD tale rapporto è risultato pari a 4,87, in quanto in beuta Fernbach sono stati prodotti 597,3 mg di CO<sub>2</sub>, mentre in beute Erlenmeyer sono stati prodotti 122,6 mg di CO<sub>2</sub>. Tali valori sono stati schematizzati in Tabella 3.7.

Linea	Beuta utilizzata	Volume totale beuta [mL]	CO <sub>2</sub> prodotta [mg]	(mg CO <sub>2</sub> prodotti in Fernbach)/ (mg CO <sub>2</sub> prodotti in Erlenmeyer)
BD	Erlenmeyer	500	122,6	4.97
BD	Fernbach	2000	597,3	4,87
BD+G	Erlenmeyer	500	906,4	4.24
BD+G	Fernbach	2000	3933,6	4,34

Tabella 3.7: confronto delle prove respirometriche in seguito a scale-up.

L'incremento di CO<sub>2</sub> prodotta è risultato essere proporzionale all'aumento del quantitativo di biomassa sviluppatasi nel microcosmo. Per chiarire tale concetto si è riportata di seguito la Tabella 3.8, dalla quale risulta evidente come la produzione specifica di CO<sub>2</sub> (valutata come *mg CO<sub>2</sub> prodotta/g biomassa prodotta*) sia confrontabile in Erlenmeyer e in Fernbach: 102,2 mg/g e 161,4 mg/g per le linee BD; 549,3 mg/g e 690,1 mg/g per le linee BD+G. Quindi, l'aumento di CO<sub>2</sub> prodotta in seguito a scale-up, è dipeso unicamente dal maggior quantitativo di biomassa presente all'interno del microcosmo.

Linea	Beuta utilizzata	Volume totale beuta [mL]	CO <sub>2</sub> prodotta [mg]	Biomassa prodotta [g]	(mg CO <sub>2</sub> prodotta)/ (g biomassa prodotta)
BD	Erlenmeyer	500	122,6	1,20	102,2
BD	Fernbach	2000	597,3	3,70	161,4
BD+G	Erlenmeyer	500	906,4	1,65	549,3
BD+G	Fernbach	2000	3933,6	5,70	690,1

Tabella 3.8: confronto della produzione specifica di  $CO_2$  in seguito a scale-up.

#### 3.4.2 - Confronto del pH e dell'attività enzimatica perossidasica.

Si sono confrontati i risultati derivanti dalle valutazioni del pH del terreno colturale in beute Erlenmeyer e in beute Fernbach. In entrambi i casi l'andamento del pH è risultato crescente nel tempo e il pH è stato riportato al valore iniziale nel momento in cui un suo aumento eccessivo avrebbe potuto causare la diminuzione dell'attività enzimatica perossidasica (vedi *par 3.2.2 e par 3.3.2*).

Si sono confrontati in Tabella 3.9 gli incrementi del pH nel tempo, valutati in un arco di tempo di incubazione di 15 giorni.

Linea	Beuta utilizzata	Volume totale beuta [mL]	pH al tempo zero	pH valutato dopo 15 giorni	Variazione di pH
BD	Erlenmeyer	500	8,41	8,48	0,07
BD+G	Erlenmeyer	500	8,41	8,46	0,05
BD	Fernbach	2000	7,10	8,59	1,49
BD+G	Fernbach	2000	6,73	8,18	1,45

Tabella 3.9: confronto dell'andamento del pH in seguito a scale-up.

Si è osservato come la crescita del pH sia risultata estremamente più rapida nelle linee in beuta Fernbach rispetto alla beuta Erlenmeyer. Infatti nella linea BD, considerando i primi 15 giorni di incubazione, si è evidenziato un aumento minimo di pH da un valore di 8,41 ad un valore di 8,48 in beuta Erlenmeyer ed un aumento significativo da 7,10 a 8,59 in beuta Fernbach. Analogamente, nella linea BD+G, sempre nei primi 15 giorni di incubazione, si è osservato un incremento minimo da 8,41 a 8,46 in Erlenmeyer ed un aumento significativo da 6,73 a 8,18 in Fernbach.

Ciò è probabilmente dovuto alle differenti modalità di inoculo: in beuta Fernbach si è utilizzato un inoculo in "pellet" fungine, che, differentemente dall'inoculo su filtro, ha garantito una buona dispersione del microrganismo nel terreno colturale ed un adeguato quantitativo di biomassa per l'iniziale colonizzazione delle NR. Di conseguenza nelle beute Fernbach la crescita fungina è stata rapida fin dall'inizio, così come l'incremento del pH del terreno colturale; mentre nelle beute Erlenmeyer l'aumento osservato è stato minimo.

Si sono confrontate le attività enzimatiche perossidasiche valutate nelle linee BD e BD+G (Figura 3.22).



Figura 3.22: confronto dell'attività enzimatica perossidasica in seguito a scale-up.

L'attività enzimatica valutata nelle linee BD e BD+G in beuta Fernbach (andamento rispettivamente in rosso e blu in Figura 3.22) è risultata superiore alla stessa valutata in beuta Erlenmeyer (andamento rispettivamente in arancio e azzurro). Infatti, confrontando l'attività enzimatica al 5° giorno di incubazione in beuta Erlenmeyer e al 6° giorno di incubazione in beuta Fernbach, si è evidenziato come i valori determinati in beuta Fernbach (0,563 UI/L nella linea BD+G, 0,499 UI/L nella linea BD) siano significativamente più elevati dei valori determinati in beuta Erlenmeyer (0,085 UI/L nella linea BD+G, 0,076 UI/L nella linea BD). Si sono, inoltre, confrontati i valori di attività al 13° giorno in Fernbach (0,251 UI/L nella linea BD) con quelli al 15° giorno in Erlenmeyer (0,208 UI/L nella linea BD) e i valori al 35° giorno in Fernbach (0,317 UI/L nella linea BD+G, 0,103 UI/L nella linea BD) con quelli al 36° giorno in Erlenmeyer (0,277 UI/L nella linea BD+G, 0,106 UI/L nella linea BD). Anche in questi due casi l'attività in Fernbach è risultata superiore.

In corrispondenza del 6° giorno di incubazione si è inoltre osservato un picco di attività enzimatica in beuta Fernbach: la produzione enzimatica è stata quindi anticipata (e più abbondante) rispetto alla stessa valutata in beuta Erlenmeyer, dove il picco di attività enzimatica si era ottenuto per tempi pari a 41 giorni (attività pari a 0,250 UI/L in linea BD+G, 0,242 UI/L in linea BD). Tale anticipo del picco enzimatico è stato probabilmente dovuto alla differente modalità di inoculo utilizzata (inoculo in "pellet" fungine), che ha portato ad una crescita fungina più rapida.

#### 3.4.3 - Confronto della biomassa prodotta.

Si sono confrontati i pesi secchi di biomassa totale prodotta all'interno dei microcosmi nelle linee in beuta Fernbach (Tabella 3.5) e in beuta Erlenmeyer (Tabella 3.3). Il confronto è stato riportato in Tabella 3.10.

Linea	Beuta utilizzata	Volume totale beuta [mL]	Biomassa prodotta [g]	(Biomassa prodotta in Fernbach)/ (Biomassa prodotta in Erlenmeyer)
BD	Erlenmeyer	500	1,20	2.09
BD	Fernbach	2000	3,70	5,08
BD+G	Erlenmeyer	500	1,65	2.45
BD+G	Fernbach	2000	5,70	5,45

Tabella 3.10:	confronto della	ı biomassa prodotta	in seguito a scale-up.
---------------	-----------------	---------------------	------------------------

La biomassa totale prodotta è risultata superiore in beuta Fernbach (BD 3,70 g, BD+G 5,70 g) rispetto a quella ottenuta in beuta Erlenmeyer (BD 1,20 g, BD+G 1,65 g): il maggior volume di terreno colturale (220 mL in Fernbach, 70 mL in Erlenmeyer) e della beuta (2000 mL in Ferbach, 500 mL in Erlenmeyer) hanno permesso un maggior sviluppo del micelio fungino.

Il rapporto tra biomassa prodotta in Fernbach e biomassa prodotta in Erlenmeyer nella linea BD+G è risultato confrontabile con quello relativo alla linea BD (rispettivamente 3,45 e 3,08).

#### 3.4.4- Confronto della perdita di peso secco.

Si sono confrontate le perdite di peso secco dei campioni di NR al termine del periodo di incubazione in beute Erlenmeyer (vedi *par 3.2.5*) e Fernbach (vedi *par 3.3.4*). Tale confronto è stato riportato in Tabella 3.11.

Linea	Beuta utilizzata	Volume totale beuta [mL]	Tempo di incubazione [giorni]	Perdita di peso secco percentuale al termine dell'incubazione
BD	Erlenmeyer	500	76	2,008%
BD	Fernbach	2000	62	4,242%
BD+G	Erlenmeyer	500	76	1,521%
BD+G	Fernbach	2000	62	1,164%

Tabella 3.11: confronto della perdita di peso secco in seguito a scale-up.

Si è osservato come lo scale-up in beuta Fernbach abbia influenzato la perdita di peso percentuale dei campioni incubati nella linea BD. Infatti si è evidenziata una perdita di peso del 2,008% dopo 76 giorni in beuta Erlenmeyer e una perdita di peso del 4,242% dopo 62 giorni in beuta Fernbach. Nonostante il periodo di incubazione sia stato inferiore in beuta Fernbach, la perdita di peso percentuale è stata superiore (più del doppio).

Invece, nella linea BD+G, si è ottenuta una perdita del 1,521% in beuta Erlenmeyer e una perdita del 1,164% in beuta Fernbach; non evidenziando dunque in questo caso un'influenza dello scale-up sulla perdita di peso secco dei campioni.

L'elevata concentrazione di enzimi perossidasici, osservata nel *par 3.4.2*, è correlata con l'aumento di perdita di peso dei campioni di NR incubati. Si può dunque concludere che lo scale-up e la modalità di inoculo in "pellet" fungine, hanno favorito la crescita fungina, anticipato la produzione enzimatica e di conseguenza favorito il processo biodegradativo delle NR

### 4. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi si è studiato il processo biodegradativo di NR ad opera di *Alternaria alternata* ceppo BNR.

In un lavoro precedente erano stati isolati dalla superficie di NR due differenti ceppi di *A. alternata* denominati rispettivamente ceppo ANR e BNR. In colture liquide immobilizzate, mantenute in condizioni statiche, il ceppo BNR ha mostrato una migliore capacità di crescita, evidenziata da: analisi respirometriche, determinazione della biomassa prodotta e produzione di enzimi perossidasici. Per tale motivo, *A. alternata* ceppo BNR è stato scelto per le successive prove di biodegradazione di NR.

Le prove di biodegradazione sono state inizialmente allestite in terreno liquido, in beute Erlenmeyer da 500 mL, ponendo le NR all'interfaccia gas-liquido. I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità di *A. alternata* BNR di utilizzare NR quale unica fonte di carbonio. Le analisi enzimatiche, condotte sul terreno colturale, hanno mostrato la presenza di enzimi perossidasici (Perossidasi Manganese dipendente e Laccasi). Dopo 76 giorni di incubazione, è stata misurata una diminuzione di peso della NR pari al 2% circa e, tramite analisi SEM, è stato possibile osservare un cambiamento morfologico superficiale caratterizzato da spaccature e fori. Tale modifica si può attribuire al fitto micelio fungino che colonizzava la superficie della gomma.

Visti i buoni risultati ottenuti, è stato effettuato uno scale-up in beute Fernbach da 2000 mL. Sono state mantenute costanti le seguenti condizioni: tipo di terreno colturale, rapporto peso supporti di immobilizzazione/ terreno colturale e numero di NR/ area superficiale dei supporti. È stato, invece, necessario variare la modalità di inoculo al fine di garantire un quantitativo di biomassa iniziale sufficiente alla colonizzazione delle NR; tale modalità ha portato ad una crescita fungina più veloce. *A. alternata* BNR ha confermato la capacità di crescita in presenza di NR come unica fonte di carbonio. È stata valutata una produzione enzimatica anticipata e più abbondante, probabilmente in relazione alla differente modalità di inoculo. In questo caso, dopo 62 giorni di incubazione la perdita di peso valutata è stata pari a 4,2%, valore doppio rispetto a quello ottenuto in beuta Erlenmeyer.

## 5. Bibliografia

Adhikari B., De D., Maiti S., 2000, Reclamation and recycling of waste rubber, *Progress in Polymer Science*, **25**, 909-948.

Asawatreratanakul K., Zhang Y., Wititsuwannakul D., Wititsuwannakul R., Takahashi S., Rattanapittayaporn A., Koyama T., 2003, Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from Hevea brasiliensis: a key factor participating in natural rubber biosynthesis, *Eur. J Biochem.*, **270**(23), 4671–4680.

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

Chia K.H., Nanthini J., Thottathil G., Najimudin N., Haris M., Sudesh K., 2014, Identification of new rubber-degrading bacterial strains from aged latex, *Polymer Degradation and Stability*, **109**, 354-361.

Coran A. Y., 1978, Vulcanization of rubber, *Science and Technology of Rubber*, (F.R. Eirich Ed.)., Chap 7, Academic Press, New York, USA.

De Vries O., 1928, Zersetzung von kautschuk-kohlenwasserstoff durch Pilze, Zentralbl Bakteriol Parasitenkd. Infektionskrankh, 74, 22-24.

Fainleib A., 2013, Degradation of non-vulcanized natural rubber- renewable resource for fine chemicals used in polymer synthesis, *Polimeros*, **23**(4), 441-450.

Gu J.D., Ford T.E., Mitton D.B., Mitchell R., 2000a, Microbial corrosion of metals, *The Uhlig Corrosion Handbook*, (second ed. Wiley), New York, USA, 915-927.

Gu J.D., Ford T.E., Mitton D.B., Mitchell R., 2000b, Microbial degradation and deterioration of polymeric materials, *The Uhlig Corrosion Handbook*, (second ed.), Wiley, New York, USA, 439-460.

IRSG, International Rubber Study Group, 2016a, available online at <u>https://www.statista.com/statistics/618804/total-global-natural-and-synthetic-rubber-production/</u>

IRSG, International Rubber Study Group, 2016b, available online at <u>https://www.statista.com/statistics/275387/global-natural-rubber-production/</u>

Ismail M., Mohamed N., Shoreit A.M., 2013, Degradation of Ficus elastica rubber latex by Aspergillus terreus, Aspergillus flavus and Myceliophthora thermophila, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **78**, 82-88.

Linos A., Berekaa M.M., Reichelt R., Keller U., Schmitt J., Flemming H., Kroppenstedt R.M., Steinbuchel A., 2000, Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(4), 1639-1645.

Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J., 2008, Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques, *Chemosphere*, **73**, 429-442.

Madigan T.M., Martinko J.M., Parker J., 2003, Brock Biology of Microorganisms, 360-362.

Nayanashree G., Thippeswamy B., 2013, Natural rubber degradation by Aspergillus niger and penicillum SP, *International Journal of Recent Scientific Research*, **4**(9), 1337-1341.

Odian G., 2004, Principles of Polymerization, (fourth ed.), Wiley, New York, USA.

Rose K., Steinbuchel A., 2005, Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms, *Applied and environmental Microbiology*, **71**(6), 2803-2812.

Sato S., Honda Y., Kuwahara M., Watanabe T., 2003, Degradation of vulcanized and nonvulcanized polyisoprene rubbers by lipid peroxidation catalyzed by oxidative enzymes and transition metals, *Biomacromolecules*, **4**, 321-329.

Shah A., Hasan F., Shah Z., Kanwal N., Zeb S., 2013, Biodegradation of natural and synthetic rubber: A review, *International Biodeterioratio & Biodegradation*, **83**, 145-157.

Stevenson K., Stallwood B., Hart A.G., 2008, Tire rubber recycling and bioremediation: a review, *Bioremediation Journal*, **12**, 1-11.

Yikmis M., Steibuchel A., 2012, Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber, *Applied and environmental Microbiology*, **78**(13), 4543-4551.

## 6. Appendice

Tempo [giorni]	CO <sub>2</sub> prodotta A. alternata ANR [mg]	CO <sub>2</sub> prodotta A. alternata BNR [mg]
0	0	0
1	6,60	33,00
2	13,20	71,50
3	20,90	113,30
6	64,90	275,00
7	82,50	355,30
8	116,00	437,25
10	168,80	532,95
13	312,90	618,75
15	439,95	653,40
16	512,00	669,35
17	569,20	681,40
20	668,20	726,50
29	779,30	821,10

 Tabella 6.1: prove respirometriche, linee di crescita basale in terreno liquido.

Tempo [giorni]	CO <sub>2</sub> prodotta/giorno ANR [mg]	CO2 prodotta/giorno BNR [mg]
0	0	0
1	6,60	33,00
2	6,60	38,50
3	7,70	41,80
4	14,67	53,90
5	14,67	53,90
6	14,67	53,90
7	17,60	80,30
8	33,55	81,95
9	26,40	47,85
10	26,40	47,85
11	48,03	15,27
12	48,03	15,27
13	48,03	15,27
14	63,53	17,33
15	63,53	17,33
16	72,05	15,95
17	57,20	12,10
18	33,00	15,03
19	33,00	15,03
20	33,00	15,03
21	12,34	10,51
22	12,34	10,51
23	12,34	10,51
24	12,34	10,51
25	12,34	10,51
26	12,34	10,51
27	12,34	10,51
28	12,34	10,51
29	12,34	10,51

 Tabella 6.2: velocità di crescita, linee di crescita basale in terreno liquido.

Tampa [aiami]	CO2 prodotta [mg]						
Tempo [giorni]	CB	CB+G	BD	BD+G			
0	0	0	0	0			
5	11,0	190,3	12,5	196,9			
12	37,4	480,7	60,7	493,9			
15	38,5	592,9	65,3	609,4			
23	50,6	732,6	86,5	777,7			
29	58,3	750,2	96,4	808,5			
34	59,4	759,0	99,0	849,2			
36	59,4	760,1	99,7	853,6			
41	59,4	761,2	100,3	858,0			
48	59,4	762,3	101,1	861,3			
51	59,4	762,3	101,9	862,4			
54	67,1	771,1	111,1	874,5			
57	69,3	775,5	116,0	878,9			
62	72,6	784,3	122,6	906,4			

 Tabella 6.3: prove respirometriche, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

 Tabella 6.4: andamento del pH, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

Tempo [giorni]	СА	СВ	CB+G	BD	BD+G
1	8,41	8,41	8,41	8,41	8,41
15	7,54	8,56	8,39	8,48	8,46
36	7,54	8,82	9,53	8,84	9,46
41	7,52	8,87	9,56	8,88	9,54
48	7,68	9,11	9,75	9,14	9,73
51	8,40	8,40	8,40	8,41	8,40
54	8,06	8,45	9,09	8,53	9,06
57	7,69	8,48	9,24	8,58	9,22
62	7,67	8,46	9,16	8,63	9,13



*Figura 6.1*: andamento del pH, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

Tama [aiami]	Attività enzimatica [UI/L]					
rempo [giorni]	CB	CB+G	BD	BD+G		
5	0,061	0,032	0,076	0,085		
15	0,096	0,358	0,105	0,208		
36	0,110	0,318	0,106	0,277		
41	0,130	0,165	0,242	0,250		
48	0,078	0,024	0,057	0,074		
54	0,152	0,090	0,169	0,078		
57	0,144	0,089	0,188	0,152		
62	0,132	0,075	0,156	0,076		

 Tabella 6.5: attività enzimatica perossidasica, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

Tompo [giorni]	PT [mg/mL]					
Tempo [gioini]	36	41	48	54	62	
CB	0,006	0,022	0,004	0,006	0,005	
CB+G	0,048	0,046	0,034	0,040	0,043	
BD	0,011	0,025	0,008	0,008	0,008	
BD+G	0,049	0,047	0,031	0,038	0,039	

 Tabella 6.6: valutazione delle PT, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.



*Figura 6.2*: valutazione delle PT, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

 Tabella 6.7: valutazione della perdita di peso delle NR dopo 41 giorni di incubazione, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

Campione	Peso secco iniziale [g]	Peso secco dopo 41 giorni di incubazione [g]	Perdita di peso percentuale	Media perdita di peso percentuale
BD 1	0,4653	0,4610	0,9241%	1 0680/
BD 2	0,2970	0,2934	1,2121%	1,00870
BD+G1	0,2045	0,2019	1,2714%	
BD+G 2	0,2145	0,2124	0,9790%	1,284%
BD+G4	0,3185	0,3134	1,6013%	

 Tabella 6.8: valutazione della perdita di peso delle NR dopo 76 giorni di incubazione, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Erlenmeyer.

Campione	Peso secco iniziale [g]	Peso secco dopo 41 giorni di incubazione [g]	Perdita di peso percentuale	Media perdita di peso percentuale
BD 1	0,2457	0,2418	1,587%	
BD 2	0,3467	0,3415	1,500%	
BD 3	0,2294	0,2261	1,439%	
BD 4	0,2549	0,2509	1,569%	
BD 5	0,2099	0,2066	1,572%	
BD 6	0,3102	0,3053	1,580%	2 0000/
BD 7	0,3122	0,3070	1,666%	2,00870
BD 8	0,3100	0,2970	4,194%	
BD 9	0,3015	0,2973	1,393%	
BD 10	0,3268	0,3217	1,561%	
BD 11	0,3757	0,3604	4,072%	
BD 12	0,2038	0,1998	1,963%	
BD+G 1	0,2403	0,2369	1,415%	
BD+G 2	0,2275	0,2229	2,022%	
BD+G 3	0,1915	0,1881	1,775%	
BD+G 4	0,3401	0,3355	1,353%	
BD+G 5	0,3341	0,3290	1,526%	1,521%
BD+G 6	0,3232	0,3198	1,052%	
BD+G 7	0,3105	0,3074	0,998%	
BD+G 8	0,3626	0,3581	1,241%	
BD+G 9	0,2996	0,2927	2,303%	

Tempe [eiemi]		CO2 prodotta [mg	5]
Tempo [giorni]	BD 1	BD 2	BD+G
0	0	0	0
2	59,4	66,0	82,5
6	221,1	198,0	808,5
8	353,1	313,5	1402,5
10	435,6	363,0	2062,5
13	485,1	399,3	3102,0
15	508,2	409,2	3319,8
17	524,7	412,5	3468,3
20	547,8	435,6	3649,8
23	561,0	438,9	3748,8
27	567,6	445,5	3814,8
30	574,2	448,8	3851,1
35	580,8	455,4	3884,1
62	597,3	478,5	3933,6

 Tabella 6.9: prove respirometriche, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Fernbach.

*Tabella 6.10*: andamento del pH nel tempo, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Fernbach.

Tempo [giorni]	СА	BD 1	BD 2	BD+G
2	7,33	7,10	7,13	6,73
10	7,35	7,91	8,31	7,65
13	7,53	8,24	8,56	8,35
17	7,58	8,59	8,74	8,18
20	7,60	8,77	8,89	8,35
23	7,66	7,50	7,40	7,50
27	7,68	7,73	7,66	7,89
30	7,65	7,81	7,80	8,06
35	7,61	8,01	8,06	8,12



*Figura 6.3*: andamento del pH nel tempo, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Fernbach.

*Tabella 6.11*: attività enzimatica perossidasica, prove di biodegradazione in terreno liquido in beute Fernbach.

Tompo [giomi]	Attività enzimatica [UI/L]		
Tempo [gioim]	BD 1	BD 2	BD+G
0	0,273	0,273	0,273
2	0,124	0,118	0,081
6	0,499	0,401	0,563
10	0,329	0,319	0,240
13	0,203	0,129	0,251
17	0,124	0,055	0,090
20	0,144	0,142	0,187
27	0,263	0,167	0,318
35	0,193	0,190	0,317

Campione	Peso secco iniziale [g]	Peso secco dopo 41 giorni di incubazione [g]	Perdita di peso percentuale	Media perdita di peso percentuale
BD 1	0,3444	0,3334	3,194%	
BD 1	0,3394	0,3175	6,453%	
BD 1	0,3589	0,3424	4,597%	
BD 1	0,2972	0,2905	2,254%	
BD 1	0,3225	0,3144	2,512%	4.212%
BD 1	0,3014	0,2867	4,877%	
BD 1	0,2694	0,2563	4,863%	
BD 1	0,2761	0,2669	3,332%	
BD 1	0,2883	0,2737	5,064%	
BD 1	0,2973	0,2825	4,978%	
BD 2	0,2318	0,2258	2,588%	
BD 2	0,3415	0,3229	5,447%	
BD 2	0,2161	0,206	4,674%	
BD 2	0,4066	0,393	3,345%	
BD 2	0,3073	0,3056	0,553%	2 494%
BD 2	0,3090	0,3074	0,518%	2,19170
BD 2	0,2570	0,254	1,167%	
BD 2	0,2973	0,2968	0,168%	
BD 2	0,3732	0,3691	1,099%	
BD 2	0,3604	0,341	5,383%	
BD+G	0,3498	0,3454	1,258%	
BD+G	0,3319	0,3266	1,597%	
BD+G	0,2739	0,2698	1,497%	
BD+G	0,2898	0,2858	1,380%	
BD+G	0,3404	0,3361	1,263%	1,164%
BD+G	0,3082	0,3053	0,941%	
BD+G	0,3216	0,3198	0,560%	
BD+G	0,2738	0,2702	1,315%	
BD+G	0,2999	0,2979	0,667%	

**Tabella 6.12**: valutazione della perdita di peso delle NR dopo 62 giorni di incubazione, prove di<br/>biodegradazione in terreno liquido in beute Fernbach.