

BIODEGRADAZIONE DI POLIESTERI MEDIATA DA MICRORGANISMI FUNGINI

Pierangiola Bracco¹, Viktoria Ilieva¹, Giovanni Di Benedetto¹, Federica Spina², Giovanna Cristina Varese², Marco Zanetti^{1,3}

¹ Dipartimento di Chimica, SUSPLAS@UniTo Piattaforma Scientifica Plastiche Sostenibili, Università di Torino, via Pietro Giuria 7, 10125, Torino, Italy
e-mail: pierangiola.bracco@unito.it

² Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Mycotheca Universitatis Taurinensis, Università di Torino, viale Pier Andrea Mattioli 25 - 10125 Torino Italy

³ INSTM Centro di riferimento, Università di Torino, Via G. Quarello 15A, Torino, 10135, Italy

Introduzione

I polimeri biodegradabili hanno acquisito crescente importanza negli ultimi decenni e la loro produzione è in costante aumento. Tuttavia, la biodegradazione è un processo complesso, che coinvolge un gran numero di variabili, e lo studio della biodegradazione in diverse condizioni ambientali è ancora un argomento di ricerca dibattuto. I poliesteri, quali il poli(butilene succinato) (PBS), il poli(butilene sebacato) (PBSE) e il poli(butilene adipato co-tereftalato) (PBAT), sono tra i polimeri biodegradabili più diffusi e sono attualmente utilizzati in numerose applicazioni. Tuttavia, sebbene essi soddisfino le condizioni per la biodegradazione nel compostaggio industriale, la loro effettiva biodegradabilità in altri ambienti, ad esempio a basse temperature e con popolazioni microbiche meno variegata, è tuttora oggetto di dibattito in letteratura [1,2]. Inoltre, il destino dei prodotti di degradazione è stato finora poco investigato. L'obiettivo di questo studio è quello di indagare il ruolo di organismi fungini nella biodegradazione di PBS, PBSE e PBAT, a bassa temperatura e in mezzi di coltura minimali, così da estendere le conoscenze già esistenti a condizioni meno favorevoli e ottenere informazioni sulla capacità dei microrganismi di proliferare in presenza del polimero come unica fonte di carbonio.

Materiali strumenti e metodi

PBS, PBSE e PBAT in forma di pellet sono stati ottenuti da produttori commerciali. I film sono stati preparati mediante stampaggio a compressione, utilizzando una pressa da laboratorio, mentre le polveri sono state ottenute macinando i granuli in un mulino ultracentrifugo (Retsch ZM 200). Novantanove ceppi fungini conservati presso la Mycotheca Universitatis Taurinensis (MUT, Università di Torino) sono stati selezionati per i test di biodegradazione. I funghi testati erano stati precedentemente isolati da materiali plastici raccolti da discariche, da acque reflue trattate dell'industria conciaria e da diversi ambienti a 15 °C.

I polimeri sono stati caratterizzati mediante Cromatografia a Permeazione di Gel (GPC), Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC) e

misurazioni dell'angolo di contatto, prima e dopo i test di biodegradazione.

Con l'obiettivo di massimizzare l'area superficiale dei materiali testati, il primo screening biotico è stato eseguito con membrane di PBS elettrofilate. Le membrane sono state tagliate in pezzi di circa 3 cm per lato e sterilizzate con radiazione UV. In seguito, ogni campione è stato posto in piastre Petri in presenza di mezzo minerale (MM) agarizzato sterile e i ceppi fungini sono stati inoculati al centro delle piastre. Sono stati preparati anche controlli negativi (MM senza alcuna fonte di carbonio) e positivi (MM con 0,1% p/v di glucosio), nonché un controllo abiotico (MM e membrana polimerica senza fungo). La crescita, eventuale, delle colonie è stata valutata dopo 5 e 7 giorni. Per lo screening secondario, sono stati utilizzati film di circa 40 µm di spessore e 4 cm di diametro. Dopo la sterilizzazione UV, i film sono stati posti su piastra e i funghi sono stati inoculati come descritto in precedenza. Le piastre sono state incubate a 24 °C o a 15 °C, per 2 mesi, durante i quali la crescita dei microorganismi è stata valutata periodicamente attraverso misurazione dei diametri delle colonie. Alla fine dell'esperimento, ogni film o residuo di esso è stato rimosso e caratterizzato.

I polimeri in forma di polvere e film e i monomeri (acido succinico, sebacico, adipico e tereftalico e 1,4-butandiolo) sono stati sottoposti a prove in liquido in due diversi mezzi di coltura: un terreno minimale (MM) e un mezzo arricchito con nutrienti (MEA). Una sospensione di conidi di due ceppi fungini selezionati dai precedenti screening è stata inoculata in ogni beuta. Per stimolare la crescita fungina, è stata allestita una fase di pre-accrescimento: i funghi sono stati preliminarmente incubati in uno shaker rotativo a 24 °C a 110 rpm. Dopo 2 giorni, i polimeri (1% p/v) o i monomeri (500, 1000 o 2000 ppm ciascuno) sono stati aggiunti alle beute. La durata delle prove è stata di 14 giorni sui monomeri e 24 giorni sui polimeri. Ogni test è stato eseguito in triplicato.

Alla fine dell'esperimento, la biomassa e i polimeri residui sono stati separati dal mezzo liquido, che è stato successivamente sottoposto

ad analisi HPLC-RI/UV-Vis, per quantificare i monomeri e/o gli oligomeri eventualmente presenti in soluzione. L'entità della degradazione dei film polimerici è stata valutata per via gravimetrica.

Risultati e discussione

I risultati della caratterizzazione preliminare dei film polimerici sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1: Caratterizzazione poliesteri

Sample	Contact angle (°)	Cryst. (%)	M _w (kDa)
PBS	75.2 ± 2.4	35.4 ± 0.5	67.2 ± 4.4
PBSE	86.3 ± 0.9	51.1 ± 1.1	64.3 ± 6.1
PBAT	76.4 ± 5.0	13.2 ± 0.5	63.7 ± 4.4

Il primo screening di biodegradazione è stato effettuato per selezionare ceppi fungini capaci di crescere in presenza del polimero come unica fonte di carbonio. In totale, sono stati testati 48 generi fungini e 83 specie. Il 14% dei funghi ha mostrato, in presenza del polimero, una crescita significativamente superiore ($p \leq 0.05$) rispetto ai controlli positivi, il 28% ha mostrato una crescita comparabile, mentre il 58% è cresciuto meno dei controlli. I 37 funghi potenzialmente più promettenti selezionati dallo screening preliminare sono stati poi incubati con film di poliestere come unica fonte di carbonio, a 24 e 15 °C, per valutare la loro capacità degradativa in condizioni estreme.

Il tipo di polimero ha dimostrato di svolgere un ruolo importante, con 22 ceppi in grado di degradare il PBS in almeno una condizione, e solo 8 ceppi in grado di influenzare il PBSE, il polimero più recalcitrante. La resistenza del PBSE alla biodegradazione è stata principalmente attribuita alla sua idrofobicità e all'alto grado di cristallinità, che rallentano il processo di biodeterioramento. Anche la temperatura del test ha mostrato un ruolo importante, con effetti generalmente più sensibili osservati a 24 °C, sebbene con alcune eccezioni. I funghi che hanno dato i migliori risultati, in particolare a bassa temperatura, appartengono a due generi specifici e, tra questi, due ceppi, PL75 e PL81, sono apparsi più promettenti e sono stati selezionati per i test di capacità di assimilazione dei monomeri, i cui risultati sono riassunti di seguito.

Gli acidi succinico e sebacico sono stati completamente assimilati in entrambi i mezzi, a ciascuna concentrazione testata. L'acido adipico è stato invece quasi completamente assimilato in tutte e tre le concentrazioni e in entrambi i mezzi di coltura dal ceppo PL75, mentre è stato osservato un effetto inibitorio della concentrazione per il ceppo PL81 a 2000 ppm, in MM. L'1,4-butandiolo è stato trasformato più lentamente rispetto ai diacidi, e la sua

trasformazione non è stata completa, per entrambi i ceppi, in entrambi i mezzi. Il tasso di assimilazione in MEA è risultato maggiore che in MM, a causa della presenza di zuccheri semplici che favoriscono la crescita del microorganismo e il suo metabolismo. Infine, si è evidenziata un'assimilazione solo parziale dell'acido tereftalico da parte del ceppo PL75, mentre per il ceppo PL81 l'assimilazione è stata del tutto assente.

Lo stesso comportamento è stato osservato nei test di biodegradazione dei polimeri: sebbene si siano osservate perdite di peso per tutti i polimeri, l'analisi HPLC dei mezzi di degradazione non ha rilevato gli acidi succinico, adipico e sebacico, la cui rapida assimilazione evidentemente non ne consente l'accumulo nel mezzo liquido. Per tutti i poliesteri e con entrambi i ceppi fungini è stato invece osservato un accumulo iniziale di 1,4-butandiolo prodotto dalla depolimerizzazione, seguito da una lenta assimilazione solo nel mezzo arricchito. L'acido tereftalico, al contrario, si è accumulato costantemente nel mezzo di coltura.

Il PBS subisce depolimerizzazione a monomeri in entrambi i mezzi di coltura, sebbene a velocità diverse. Il PBSE è invece scarsamente degradato, come dimostrato dalla minima perdita di peso e dal mancato rilevamento di 1,4-butandiolo e acido sebacico nel mezzo di coltura. Il PBAT mostra la perdita di peso più significativa, confermata dalla presenza di acido tereftalico in soluzione, la cui concentrazione è aumentata nel tempo. Questo andamento conferma l'influenza di parametri quali il grado di cristallinità e l'idrofobicità sulla facilità di biodegradazione.

Conclusioni

I risultati di questo studio hanno permesso di acquisire conoscenze sul processo di biodegradazione dei poliesteri alifatici e alifatico-aromatici mediato da microrganismi fungini, in condizioni controllate di bassa temperatura e assenza di nutrienti aggiuntivi. È stato dimostrato che le caratteristiche chimiche e fisiche dei polimeri giocano un ruolo sia sull'efficienza della degradazione da parte dei microrganismi, che sulla loro capacità di assimilare i prodotti di degradazione.

Riferimenti

- [1] Haider, T. P., Völker et al. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(1), 50-62 (2019).
- [2] H. Jia, M. Zhang et al. *Journal of Environmental Sciences*, 103, 50–58 (2021).

