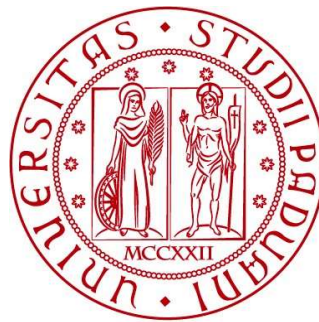


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Microplastiche in ambiente marino: potenziale  
biodegradativo microbico**

**Tutor:** Prof.ssa Paola

Venier

Dipartimento di

Biologia

**Laureando:** Antonio  
Todisco

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITOLO 1 – Polimeri plastici comuni in ambiente marino e influenza degradativa dei fattori abiotici .....</b>	<b>3</b>
1.1 Degradazione a opera dei fattori ambientali .....	3
<b>CAPITOLO 2 – BIODEGRADAZIONE DELLE (MICRO)PLASTICHE .....</b>	<b>4</b>
2.1 Formazione, crescita e successione della comunità microbica .....	4
2.1.2 Meccanismi di formazione del biofilm e habitat microbico sulla platisfera.....	5
2.2 Composizione della comunità microbica .....	6
2.2.1 Diatomee .....	8
2.2.2 Cianobatteri .....	8
2.2.3 Proteobatteri .....	8
2.3 Microrganismi potenzialmente biodegradanti.....	8
2.3.1 Batteri .....	8
2.4 Funghi.....	11
2.5 Meccanismi ed enzimi di biodegradazione delle microplastiche.....	13
<b>CAPITOLO 3 – METODI e TECNICHE UTILI PER DETERMINARE LA DEGRADAZIONE DELLE (MICRO)PLASTICHE .....</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSIONE .....</b>	<b>20</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>21</b>

## INTRODUZIONE

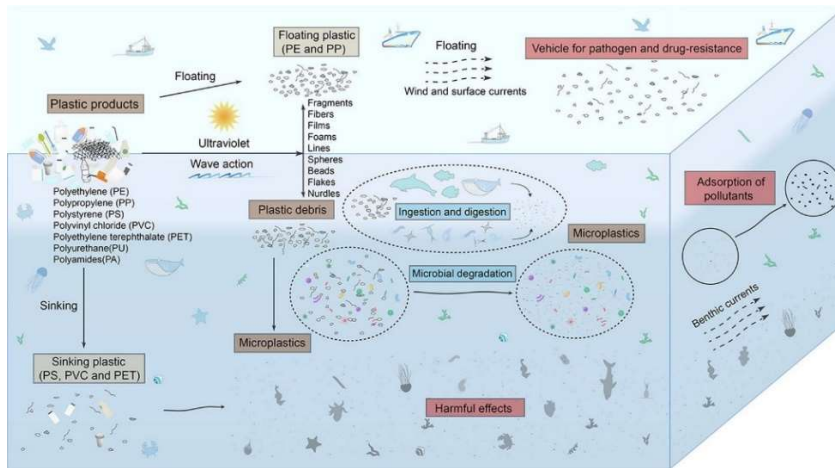
L'industria della plastica è cresciuta notevolmente nell'ultimo secolo, così com'è aumentato in modo esponenziale anche lo smaltimento delle materie plastiche. L'inquinamento da plastica negli ambienti acquatici rappresenta uno dei problemi più rilevanti a livello mondiale: ogni anno, milioni di tonnellate di prodotti di scarto vengono riversati sia nelle acque marine che in quelle dolci, persistendo a lungo e determinando gravi effetti sugli organismi viventi. La stragrande maggioranza della plastica marina proviene ovviamente da fonti terrestri ed entra nell'ambiente acquatico attraverso lo scarico diretto da parte dell'uomo, la redistribuzione delle discariche, le perdite nel trasporto e dagli impianti di trattamento delle acque reflue. Le stime attuali suggeriscono come ci siano circa 5,25 trilioni di particelle di plastica che attualmente inquinano gli oceani. <sup>[1]</sup>

Le materie plastiche che entrano nell'ambiente marino sono soggette all'azione di agenti chimico-fisici, che ne riducono l'integrità strutturale, permettendo a piccole particelle di plastica di diffondersi nell'ambiente marino (e non solo). La frammentazione delle materie plastiche di grandi dimensioni genera frammenti minori anche di dimensioni molto ridotte; quando non superano i 5 millimetri, questi frammenti prendono il nome di microplastiche (MP), e possono essere distinte in primarie e secondarie. Le MP primarie includono prodotti per uso domestico e industriale, come prodotti cosmetici e per la cura della persona, prodotti per bambini, repellenti per insetti, creme solari ecc. Le MP secondarie sono generate nel tempo per infragilimento a seguito della rottura di oggetti in plastica di maggiori dimensioni, a causa di processi di fotodegradazione, decomposizione chimica, frammentazione fisica e, in parte, degradazione biologica.

Le MP destano particolare preoccupazione poiché sono disponibili per l'ingestione da parte di una vasta gamma di organismi marini con varie strategie di alimentazione e riferibili a diversi livelli trofici: detritivori (es. nematodi e anfipodi), filtratori e sospensivori (es. cirripedi, copepodi e mitili), echinodermi (cetrioli di mare), zooplancton, fitoplancton e organismi di dimensioni maggiori, come tartarughe, uccelli marini e pesci. Le piccole dimensioni delle particelle di microplastica e la loro accattivante colorazione e galleggiabilità consentono una facile individuazione e ingestione da parte dei pesci, che possono scambiare per prede naturali (es. plancton), oppure ingerirle indirettamente quando queste sono presenti all'interno o adese alla preda. Tra le conseguenze più evidenti dell'ingestione di microplastiche da parte dei pesci c'è il rischio di blocco fisico degli organi digestivi e l'interferenza con l'alimentazione a causa della sensazione di sazietà causata dall'ingestione di questi materiali plastici. Altri pericoli derivano dalla forma stessa di questi frammenti, poiché le microplastiche di tipo duro sono generalmente di forma irregolare con spigoli che possono penetrare il rivestimento intestinale dei pesci e causare lesioni meccaniche.

Frammenti di dimensioni ancora minori, chiamati nanoplastiche (NP), possono invece penetrare i tessuti entrando nel sistema circolatorio, alterando il metabolismo con conseguenze come la sovraregolazione di acidi grassi, la sottoregolazione amminoacidica e l'alterazione del rapporto tra trigliceridi e colesterolo nel siero del sangue. <sup>[2]</sup>

Le (micro)plastiche possono inoltre essere un vettore per l'introduzione negli organismi marini di composti tossici e additivi chimici, aggiunti ai prodotti in plastica durante i processi di fabbricazione per migliorarne le proprietà finali (es. antiossidanti, conservanti biologici) e che possono indurre una varietà di effetti dannosi nella biota marina. [3]



**Figura 2.** Il possibile destino delle (micro)plastiche nell'ecosistema marino <sup>4</sup>

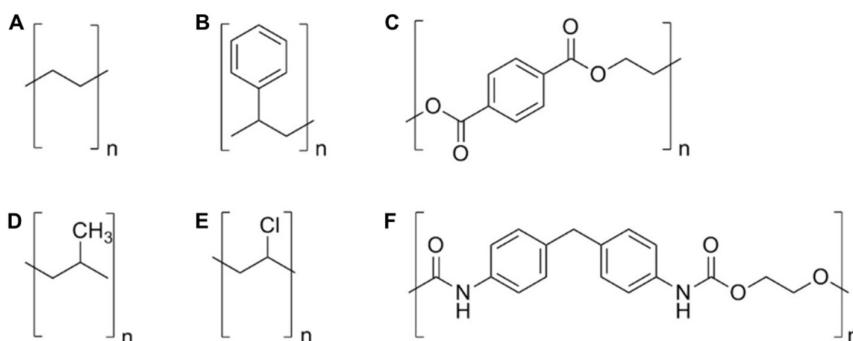
Con questo elaborato viene presentato lo stato attuale delle conoscenze sulle interazioni microbo-plastica, esplorando come queste ultime influenzano l'esposizione dei consumatori alle microplastiche e ai prodotti della degradazione della plastica. Particolare attenzione viene posta allo sviluppo del biofilm e alla possibile biodegradazione microbica, formulando ipotesi su come il potenziale degradativo dei microbi possa eventualmente influenzare la distribuzione e la densità delle microplastiche in mare.

Le plastiche a cui viene fatto riferimento in questo elaborato sono quelle considerate "biodegradabili", differenti da quelle che invece provengono unicamente da combustibili fossili (petrolio), che vengono prodotte attraverso processi di riscaldamento del propilene, con la conseguente formazione di legami carbonio-carbonio estremamente solidi a comporre catene polimeriche di polipropilene. Questi legami richiedono una grande energia per essere formati, e di conseguenza una notevole energia anche per essere spezzati; energia che la maggior parte dei microrganismi non è in grado di fornire. Le bioplastiche o plastiche biodegradabili sono invece materie derivanti da fonti rinnovabili, come amido, cellulosa, oli vegetali e grassi vegetali. Di questi polimeri a base biologica i più comuni sono l'amido termoplastico, l'acido polilattico, il succinato di polibutilene e il poliidrossibutirrato. I legami chimici che uniscono questi polimeri "bioplastici" sono più facilmente attaccabili da enzimi microbici.

## CAPITOLO 1 – Polimeri plastici comuni in ambiente marino e influenza degradativa dei fattori abiotici

I detriti di plastica si ritrovano nell'ambiente marino in un'ampia gamma di dimensioni, con diversa densità specifica, composizione chimica, colore e forma, anche perché sono soggetti a deterioramento da parte di diversi agenti atmosferici.

Nell'acqua di mare, i polimeri sintetici che si ritrovano più frequentemente sottoforma di microplastiche sono polipropilene (PP), polietilene (PE), polistirene (PS), polivinilcloruro (PVC) e polietilene tereftalato (PET). Il Polietilene (PE) è il più comune in assoluto; è considerato la struttura base più semplice di qualsiasi polimero, ed è il più commercializzato grazie a caratteristiche come basso costo, facilità di fabbricazione, resistenza chimica, flessibilità ed eccellente isolamento elettrico. [5]



**Figura 1.** Struttura molecolare dei polimeri plastici <sup>5</sup>. (A) polietilene, (B) polistirene, (C) polietilene tereftalato, (D) polipropilene, (E) cloruro di polivinile e (F) poliuretano

### 1.1 Degradazione a opera dei fattori ambientali

I polimeri plastici nell'ambiente marino sono esposti a luce solare, ad agenti ossidanti e stress fisico, di conseguenza sono soggetti a deterioramento nel lungo periodo. Le radiazioni UV e l'ossigeno sono i fattori che maggiormente sono responsabili della degradazione dei polimeri costituiti da legami carbonio-carbonio. Frammenti di polimeri più piccoli formati dalla scissione della catena sono poi maggiormente suscettibili alla biodegradazione da parte dei microrganismi. [6]

Le radiazioni UV sono un'importante fattore di deterioramento abiotico, vista la loro capacità di causare degradazione ossidativa dei polimeri C-C. A stadi avanzati di deterioramento, la plastica sviluppa caratteristiche superficiali per cui si indebolisce, iniziando a perdere integrità, permettendo ad eventuali forze meccaniche (come onde o vento) di rompere la plastica indebolita in particelle sempre più piccole.

I polimeri plastici sono poi soggetti ad altri fattori abiotici che ne causano il deterioramento, come la degradazione termica, causata da temperature tali da causare alterazioni chimiche nelle strutture polimeriche, oppure la termo-ossidazione, con cui la plastica perde le sue proprietà chimico-fisiche per reazione con l'ossigeno dovuto all'azione di calore e luce. [5]

Nelle materie plastiche in commercio sono inoltre spesso presenti anche numerosi additivi chimici, che vengono aggiunti per migliorare la resistenza meccanica, ridurre i costi di produzione oppure esplicare una funzione estetica. Questi additivi, in seguito al deterioramento dovuto all'azione dei fattori abiotici sopracitati, possono venir rilasciati e contaminare l'ambiente e generare per degradazione altri inquinanti ambientali. Generalmente la presenza di questi additivi influenza, inoltre, l'azione dei fattori degradanti sia biotici che abiotici, potenzialmente rendendo più complessa la loro frammentazione e successiva biodegradazione. [6]

## **CAPITOLO 2 – BIODEGRADAZIONE DELLE (MICRO)PLASTICHE**

La degradazione biotica o biodegradazione avviene invece per azione di enzimi microbici, che permettono la conversione dei composti organici costituenti la plastica in composti organici più semplici, fino alla mineralizzazione e redistribuzione degli elementi come carbonio, azoto e zolfo in altra forma nella biosfera (cicli biogeochimici).

Esistono due fattori che influenzano la biodegradabilità della plastica: la presenza di microbi con potenziale degradativo e le caratteristiche chimico-fisiche del polimero. L'effettiva degradazione dipende dal tipo di microrganismo, dalla sua distribuzione, dalle condizioni di crescita (temperatura, pH, concentrazione di ossigeno, nutrienti, ecc.) e dalla eventuale dotazione di enzimi (intracellulari e/o extracellulari) utili alla degradazione delle MP. Le caratteristiche del polimero includono proprietà superficiali, struttura chimica, peso molecolare, temperatura di fusione, elasticità e cristallinità.

### **2.1 Formazione, crescita e successione della comunità microbica**

Come per altre superfici, i microrganismi presenti in un corpo idrico tendono a colonizzare immediatamente le microplastiche formando un biofilm. Il termine "plastisfera" descrive proprio la comunità microbica attaccata alla plastica, un ambiente di vita distinto dall'ambiente circostante. Le comunità microbiche nella plastisfera sono composte di un'ampia varietà di microrganismi, quali batteri, funghi, virus, archea, alghe e protozoi. [7]

La colonizzazione delle (micro)plastiche avviene secondo vari stadi di sviluppo. Nella fase iniziale, i microrganismi pionieri sono in grado di formare una rete microbica, cercando di coprire la massima superficie possibile della plastica. Si tratta di organismi generalisti, che proliferano senza competizione diretta, con l'unico obiettivo di coprire la più ampia fetta di superficie possibile; questi apriranno la strada all'adesione da parte di altri microrganismi.

Quando il biofilm cresce, nel giro di pochi giorni i microrganismi si attaccano alla superficie della plastica in modo irreversibile, seguiti da una successione di altri batteri, virus e microrganismi eucarioti; questo avviene grazie ai pili, all'adesione mediata da specifiche proteine e alla produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) complesse, che facilitano l'adesione alle superfici e lo stabilirsi di interazioni cellula-cellula.

Questi processi precedono la catalizzazione di reazioni metaboliche, tra cui l'adsorbimento e il desorbimento e la frammentazione dei composti associati alla microplastica. Infine, il continuo reclutamento, perdita e sostituzione di specie trasforma la struttura in un *hotspot* per diversi tipi di microrganismi che interagiscono tra loro, dando luogo ad una plastisfera matura. [8]

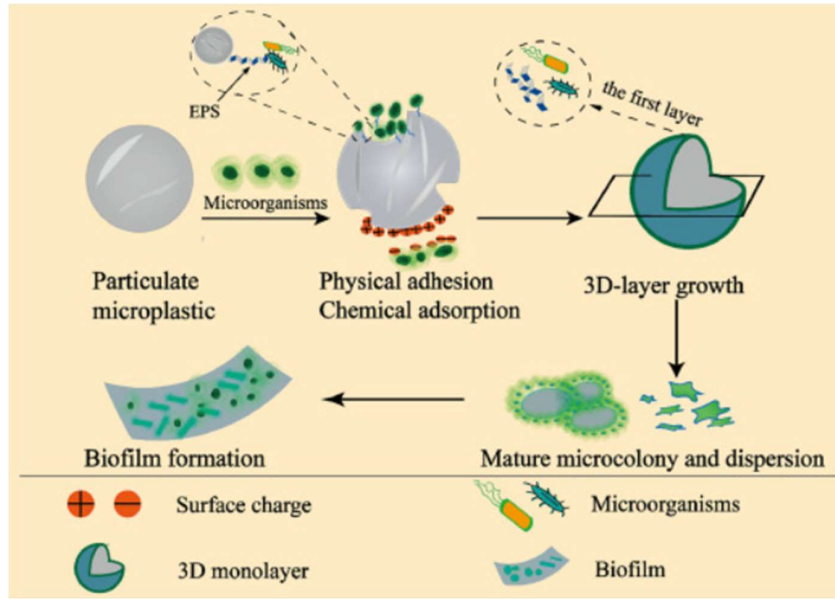


Figura 3. Formazione e maturazione della plastisfera <sup>1</sup>

La formazione del biofilm e la degradazione mediata delle microplastiche si compone quindi di quattro fasi: (1) i microrganismi aderiscono alla superficie della (micro)plastica e ne alterano le proprietà superficiali, (2) il possibile bio-deterioramento, in cui gli enzimi secreti contribuiscono alla degradazione della MP, portando al rilascio di componenti quali additivi e monomeri, (3) bioframmentazione – il materiale plastico inizia a perdere la sua stabilità meccanica e diventa fragile anche a causa dell'attacco microbico, e (4) assimilazione – durante il quarto stadio i filamenti microbici e l'acqua iniziano a penetrare nel polimero, che si traduce nella decomposizione e nell'utilizzo della MP da parte dei microrganismi. [5]

### 2.1.2 Meccanismi di formazione del biofilm e habitat microbico sulla plastisfera

Le interazioni microbiche con le MP possono essere attive o passive. Nel caso di interazione attiva, le MP vengono utilizzate direttamente come fonte di carbonio dai microrganismi: attraverso la reazione con l'ossigeno disponibile, il nitrato e/o gli ioni ferrici che agiscono come accettori di elettroni nell'acqua e l'ambiente redox influenza la comunità microbica facendola interagire attivamente con gli accettori di elettroni disponibili. L'erosione della plastica porta al rilascio di idrocarburi gassosi e DOC (Carbonio Organico Disciolto) e, in conseguenza di processi abiotici come la fotodegradazione, al rilascio donatori di elettroni che



possono essere utilizzati dai microrganismi per formare biofilm. Le interazioni biochimiche e fisiche tra MP e microrganismi che utilizzano particelle di MP solo come base per la formazione di biofilm sono invece considerate interazioni passive. [1]

## **2.2 Composizione della comunità microbica**

La crescita microbica e la composizione della comunità della plastisfera è governata da vari fattori, come le caratteristiche della microplastica (ad esempio, tipo di polimero, morfologia), condizioni temporali (ad esempio, successione) e condizioni ambientali.

La composizione della comunità microbica della plastisfera può variare quindi in base ai fattori sopracitati, e molti studi hanno rivelato differenze significative rispetto ai microhabitat nello stesso ambiente. Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Cyanobacteria sono i *phyla* di batteri più comunemente identificati nella plastisfera. I dati disponibili indicano che la plastisfera è una nicchia ecologica specifica, arricchita in microrganismi con potenziali adattamenti metabolici, percorsi metabolici specifici che facilitano i processi di adesione, chemiotassi, resistenza additiva, degradazione, secrezione, fissazione dell'azoto e motilità. [8]

Sampling site	Month	Plastic types	Core communities	Method
Western Mediterranean Sea	4–11	PE PP PS	Cyanobacteria (40.8%, mainly <i>Pleurocapsa</i> sp., <i>Oscillatoriales</i> , <i>Chroococcales</i> , <i>Nostocales</i> and <i>Pleurocapsales</i> orders, <i>Synechococcus</i> sp., <i>Calothrix</i> sp., <i>Scytonema</i> sp. and <i>Pleurocapsa</i> sp.) <i>Alphaproteobacteria</i> (32.2%, mainly <i>Roseobacter</i> sp.)	Field sampling
The North Atlantic	10, 12	PE PP PS	<i>Alphaproteobacteria</i> (17.67% ± 5.28%) <i>Gammaproteobacteria</i> (40.76% ± 8.43%) <i>Flavobacteria</i> (16.83% ± 2.64%) <i>Cyanobacteria</i> (9.09% ± 7.40%)	Field sampling
The North Atlantic	6	PE PET PS	<i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Streptomycetales</i> , Bacteroidetes and <i>Cyanobacteria</i>	Field sampling
North Sea	3, 6, 9	PE PP	<i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> and Bacteroidetes	Field sampling
North Sea	9–7	PE	Proteobacteria and Bacteroidetes	<i>In situ</i> incubation
Mediterranean Sea	11	PE PP	Bacteroidetes, <i>Gammaproteobacteria</i> and <i>Alphaproteobacteria</i>	Field sampling
The Yangtze estuary	4	PE PP PS	Proteobacteria, <i>Cyanobacteria</i> , Bacteroidetes and <i>Actinobacteria</i>	Field sampling
The North Atlantic	5, 6, 7	PP PE	<i>Vibrio</i> sp.	Field sampling
The equatorial Atlantic	10–12	PVC PE PA	Proteobacteria (52%), Bacteroidetes (10%), and Crenarchaeota	Field sampling
The Eastern North Pacific	7	PE PP PS	<i>Bacillus</i> bacteria and pennate diatoms	Field sampling
North Sea	1, 7	PE PP	Bacteroidetes, <i>Cyanobacteria</i> and Proteobacteria	Field sampling
Baltic Sea	8, 9	HDPE PS	<i>Flavobacteriaceae</i> , <i>Rhodobacteraceae</i> and <i>Planctomycetaceae</i>	<i>In situ</i> incubation
The North Pacific	8	PE PP	<i>Cyanobacteria</i> and <i>Alphaproteobacteria</i>	Field sampling
Baltic Sea	8	PE PP PS	<i>Alphaproteobacteria</i> and <i>Sphingomonadaceae</i>	<i>In situ</i> incubation
Mediterranean Sea	–	PVC	<i>Gammaproteobacteria</i> ( <i>Oceanospirillaceae</i> and <i>Alteromonadaceae</i> ), <i>Alphaproteobacteria</i> ( <i>Rhodobacteraceae</i> ) and Bacteroidetes ( <i>Flavobacteriia</i> )	<i>In situ</i> incubation
Mediterranean Sea	–	PS	Proteobacteria and Firmicutes	Field sampling
South China Sea	5, 8	PS	<i>Rhodobacteraceae</i> and <i>Sphingomonadaceae</i>	<i>In situ</i> incubation
South China Sea, the Yellow Sea	4, 7, 11, 1	PP PVC	<i>Alphaproteobacteria</i> ( <i>Rhodobacteraceae</i> ) and <i>Gammaproteobacteria</i>	Field sampling
Mediterranean Sea	8	PE	<i>Roseobacter</i> , <i>Oleiphilus</i> , and <i>Aestuariibacter</i>	<i>In situ</i> incubation
Baltic Sea	2	PE PP PS	<i>Gammaproteobacteria</i> (47%–81%), <i>Alphaproteobacteria</i> (7%–34%) and <i>Bacteroidia</i> (3%–20%)	<i>In situ</i> incubation
Mediterranean Sea	10	PE	<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> and Bacteroidetes	Field sampling
The Yellow Sea	8	–	<i>Vibrio</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> and <i>Alteromonas</i>	<i>In situ</i> incubation
North Sea	–	PE PP PS PVC PET	<i>Alphaproteobacteria</i> (18%–53%) and <i>Gammaproteobacteria</i> (20%–75%)	<i>In situ</i> incubation
Southern Ocean	2	HDPE	<i>Gammaproteobacteria</i> and <i>Betaproteobacteria</i>	Field sampling
Mangrove in China	4, 7	PP PS	<i>Vibrio</i> , <i>Rhodobacteraceae</i> , <i>Alteromonadaceae</i> and <i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>In situ</i> incubation
Bohai Sea	7, 8, 9	PVC PP PE PS PU	<i>Gammaproteobacteria</i> ( <i>Vibrio</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> ) and Bacteroidetes	<i>In situ</i> incubation

**Tabella 1.** Studi sulla plastisfera. Viene riportato sito e tempo di campionamento, tipo di plastica e comunità microbica <sup>8</sup>

### 2.2.1 Diatomee

Le diatomee sono microorganismi comuni nella plastisfera e sono spesso segnalate come colonizzatori precoci e persino dominanti su detriti di plastica (in particolare quelli esposti alla luce solare). Sebbene il ruolo dominante delle diatomee diminuisca con la maturazione della plastisfera, rimangono membri coerenti. Le interazioni tra fitoplancton e batteri svolgono un ruolo chiave nel mediare i cicli ecologici della Terra e la struttura delle reti trofiche negli oceani. Questo tipo di associazione tra autotrofi e altri microorganismi è presente anche nella plastisfera. Questi autotrofi possono fornire una fonte di materia organica alla plastisfera e regolare la comunità microbica. [8]

### 2.2.2 Cianobatteri

I cianobatteri assieme alle diatomee contribuiscono alla produzione primaria netta nella nicchia sui detriti plastici, fornendo nutrienti per gli eterotrofi della plastisfera. Molti studi hanno dimostrato che i cianobatteri sono candidati dominanti della plastisfera, specialmente nelle fasi iniziali. In particolare, il genere *Phormidium* è stato trovato comunemente su vari substrati, presente infatti su campioni di PE, PET e PP (**Tabella 1**). [8]

### 2.2.3 Proteobatteri

Essendo il *phylum* più abbondante a livello globale, i proteobatteri costituiscono il *phylum* più arricchito sulla plastisfera rispetto alle popolazioni nell'acqua di mare. La famiglia Rhodobacteraceae, della classe Alphaproteobacteria, occupa la posizione centrale della plastisfera (**Tabella 1**); in particolare *Roseobacter* è stato riconosciuto come colonizzatore primario di vari substrati plastici negli ambienti marini. [8]

## 2.3 Microrganismi potenzialmente biodegradanti

In natura, la degradazione della (micro)plastica è un processo integrato di fattori di degradazione fisico-chimica e microbica. I microrganismi possono adattarsi a quasi tutti gli ambienti e hanno il potenziale per degradare diversi composti, comprese le MP. [8]

### 2.3.1 Batteri

Caratteristiche costitutive e reazioni metaboliche di alcuni ceppi batterici possono contribuire all'adsorbimento, al desorbimento e alla disgregazione della (micro)plastica: utilizzando i materiali polimerici come unica fonte di carbonio in terreni nutritivi minimi, riducono il peso secco e il peso molecolare medio dei polimeri plastici cambiandone la morfologia e la struttura chimica. In pratica questi microrganismi potrebbero essere utilizzati per ridurre l'inquinamento da plastica e microplastica nell'ambiente. L'uso di ceppi puri può far scoprire vie metaboliche e consentire la valutazione dell'effetto di diverse condizioni ambientali sulla degradazione di MP. Anche i consorzi batterici, cioè due o più popolazioni diverse di batteri che vivono nello stesso habitat, sono stati utilizzati per studiare la degradazione della (micro)plastica. L'uso di consorzi batterici fornisce una comunità microbica stabile, eliminando gli effetti dei metaboliti tossici prodotti da alcuni ceppi del consorzio, poiché frequentemente i metaboliti tossici prodotti da

un ceppo possono essere utilizzati come substrato da un altro ceppo. Ciò potrebbe spiegare la migliore efficienza di biodegradazione, e perché questi consorzi mostrano livelli di degradazione più elevati rispetto alla media ottenuta per i ceppi puri.

Diverse specie di *Bacillus* sono state utilizzate per studiare la degradazione delle (micro)plastiche: in alcuni casi, come nel caso di *Bacillus cereus* e *Bacillus gottheilii*, le (micro)plastiche sono state pretrattate con radiazioni UV, per valutare l'effetto della pre-degradazione abiotica sulla biodegradazione microbica. Entrambe le specie sopra indicate sono state in grado di modificare la superficie della microplastica, dove sono comparse crepe e scanalature e sono stati alterati i gruppi funzionali strutturali e altre proprietà, con risultati diversi a seconda del tipo di MP: *Bacillus cereus* pare agire efficacemente sul PS, causando una diminuzione del peso percentuale del polimero plastico, ma *B. gottheilii* è risultato in grado di degradare un'ampia varietà di microplastiche e può essere considerato un potenziale degradatore multiplo. <sup>[9]</sup>

### **Attinobatteri**

Gli attinobatteri, o attinomiceti, sono batteri Gram-positivi filamentosi. Questi sono presenti in vari habitat ecologici, come i suoli e gli ambienti marini e d'acqua dolce. Gli attinomiceti hanno metabolismi distinti e possono svolgere diverse funzioni nell'ambiente. Oltre alla produzione di antibiotici, antitumorali, fungicidi e altri metaboliti secondari bioattivi, alcuni sono in grado di digerire carboidrati resistenti (ad esempio cellulosa e chitina); altri sono utilizzati nel biorisanamento grazie alla loro capacità di degradare materiali tossici o di svolgere un ruolo nel riciclo del carbonio organico e, recentemente scoperto, nella degradazione di polimeri complessi. Diversi studi hanno riportato la degradazione di plastiche/microplastiche da parte di attinomiceti e sono presentati nella **Tabella 2**, di seguito.

Actinomycetota	Plastic type	Biodegradation assay conditions(Media, time, rpm, T°C)	Biodegradation detection method	Polymer reduction%
<i>Rhodococcus ruber</i> strain C208	PE	Synthetic media, for 2 months, 150 rpm, at 30 °C	Weight loss; SEM	7.5
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 29672	PE	Mineral salt media, for 6 months, at 27 °C and 85% humidity	FTIR; SEM; GPC	n.a.
<i>Micrococcus</i> sp.	PE	Nutrient broth media, for 1 month	Weight loss	6.61
<b>Bacterial consortia</b> <i>Arthrobacter viscosus</i> ; <i>Micrococcus lylae</i> ; <i>Micrococcus luteus</i> ; <i>Bacillus mycoides</i> ; <i>Bacillus cerus</i> ; <i>Bacillus pumilus</i> ; <i>Bacillus thuringiensis</i>	PE	Films buried in soil for 7.5 months, at RT	Weight loss; FTIR; SEM; elongation at brake	17.0
<i>Microbacterium paraoxydans</i> *	PE (pre-treated with nitric acid)	Minimal broth media, for 2 months, 180 rpm, at RT	Weight loss; FTIR	61.0
<i>Streptomyces badius</i>	Starch-PE (10 d-heat-tread)	0.6% yeast extract media, for 0.75 months, 125 rpm, at 37 °C	FTIR; tensile strength at brake; GPC	n.a.
<i>Streptomyces setonii</i>	Starch-PE (10 d-heat-tread)	0.6% yeast extract media, for 0.75 months, 125 rpm, at 37 °C	FTIR; tensile strength at brake; GPC	n.a.
<i>Streptomyces viridosporus</i>	Starch-PE (10 d-heat-tread)	0.6% yeast extract media, for 0.75 months, 125 rpm, at 37 °C	FTIR; tensile strength at brake; GPC	n.a.
<i>Rhodococcus ruber</i>	PS	Synthetic media, for 2 months, 120 rpm, at 35 °C	Weight loss; SEM	0.8
<i>Rhodococcus</i> sp. strain 36*	PP	Bushnell Haas (BH) media, for 1.25 months, at 29 °C	Weight loss; FTIR; SEM	6.4
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 29672	PP (pre-treated with photo and thermo-oxidation)	Mineral media, for 6 months, at 27 °C	FTIR; <sup>1</sup> H NMR; ADP/ATP ratio	n.a.
<i>Micrococcus</i> sp. AF10	PU	Films buried in soil, for 6 months, at 30-35 °C	Clear zone test; SEM; FTIR	n.a.
<i>Arthrobacter</i> sp. AF11	PU	Films buried in soil, for 6 months, at 30-35 °C	Clear zone test; SEM; FTIR	n.a.
<i>Amycolatopsis orientalis</i> * (enzyme production)	PLA (production of purified enzyme)	Incubation for 8h, 140 rpm, at 30 °C	FTIR, pH variation; enzyme degrading activity	100
<i>Saccharothrix waywayandensis</i> *	PLA	Basal media with 0.1% gelatin, for 0.25 months, 180 rpm, at 30 °C	Weight loss; pH variation	95
<i>Kibdelosporangium aridum</i> *	PLA	Basal media with 0.1% gelatin, for 0.5 months, 180 rpm, at 30 °C	Weight loss; pH variation; SEM	97
<i>Actinomadura</i> sp. T16-1 (enzyme production)	PLA (production of PLA-degrading enzyme)	Basal media with 0.2% gelatin, for 96h, 150 rpm, at 50 °C	Enzyme activity	n.a.

**Tabella 2.** Campioni di plastica degradati da attinomiceti, indicate anche condizioni di biodegradamento e metodi di rilevamento utilizzati <sup>8</sup>

Gli attinomiceti hanno capacità di degradazione relativamente buone agendo su diversi tipi di microplastiche (**Tabella 2**). Per esempio, utilizzando il ceppo C208 di *Rhodococcus ruber*, i primi segni di degradazione sono comparsi dopo soli 16 giorni. Questa specie è riuscita a formare un biofilm sulla superficie del PE e le micro-colonie hanno iniziato a organizzarsi e a differenziarsi dopo 12-15 ore di incubazione, aumentando le loro dimensioni, la loro forma e la loro densità, fino a formare strutture multicellulari tridimensionali. Dopo 1 giorno di incubazione, le strutture del biofilm hanno raggiunto le dimensioni finali. In 2 mesi, *Rhodococcus ruber* risulta aver degradato il 7,5% del peso iniziale della microplastica, utilizzando il PE come unica fonte di carbonio. *Rhodococcus ruber* può essere considerato una specie modello nella degradazione dei polimeri.

Membri del *phylum Actinobacteria* dimostrano un'efficiente capacità di degradazione dell'acido polilattico (PLA), una delle bioplastiche di elezione in alternativa ai polimeri non biodegradabili. Gli attinomiceti che degradano il PLA sono in grado di degradare questo biopolimero sia in natura che in laboratorio. Come riportato in **Tabella 2**, *Amycolatopsis orientalis* esprime un enzima extracellulare che degrada PLA con alta efficienza (degradazione al 100% entro 8 ore). Anche il ceppo *Kibdelosporangium aridum* ha mostrato un'elevata capacità di biodegradazione, riducendo circa il 97% del polimero iniziale. Anche i ceppi dei generi *Amycolatopsis* e *Actinomadura* sono stati segnalati per la loro promettente capacità di degradare il PLA.

In **Tabella 2** sono evidenziati con “\*” gli attinomiceti di derivazione marina: questi hanno rivelato un'elevata capacità di degradazione del polimero (PLA) e capacità di indurre cambiamenti strutturali e chimici dello stesso. Benché siano ancora poco indagati, alcuni attinomiceti marini sembrano capaci di utilizzare, e degradare, dei polimeri plastici come unica fonte di carbonio, soprattutto il PLA. [8]

Risultati convincenti di biodegradazione sono stati ottenuti con il ceppo *Rhodococcus ruber* ATCC 29672. In questo caso, il polimero è stato pretrattato, sottoposto a foto-invecchiamento e si è osservata una forte diminuzione del peso e della distribuzione molecolare del polimero. Il pretrattamento UV simula la naturale degradazione abiotica, causata da fattori ambientali, che precede la degradazione biotica (entrambe contribuiscono al consumo del polimero). Anche consorzi batterici in cui siano presenti attinomiceti e diverse specie di *Bacillus* hanno un elevato potenziale biodegradativo. Dopo l'incubazione, oltre alla perdita di peso indicata nella **Tabella 2**, la microplastica subisce cambiamenti strutturali, fisici e chimici. Anche il pretrattamento con acido nitrico, come il pretrattamento con raggi UV, rappresenta un vantaggio per la degradazione da parte dei microrganismi. L'acido nitrico riduce infatti i legami nativi nei polimeri rompendoli in catene più piccole e consentendo l'incorporazione di gruppi carbonilici del polimero plastico, aumentandone il tasso di degradazione, per esempio da parte di *Microbacterium paraoxydans*. I polimeri nella loro forma originale richiedono molto tempo per essere degradati, ma l'uso dell'acido nitrico facilita la biodegradazione, fino a valori del 61%. Questi dati indicano quindi come il pretrattamento dei polimeri plastici migliori il tasso di biodegradazione da parte di molti microrganismi.

## 2.4 Funghi

Grazie al loro vasto potenziale metabolico, compresi i complessi multi-enzimatici extracellulari, i funghi sono candidati naturali per la ricerca delle loro capacità di biodegradazione della plastica. Come per le specie batteriche, i biofilm di (micro)plastica sono una promettente risorsa di specie fungine in grado di degradare i frammenti di plastica. È importante notare che i biofilm rappresentano un *hotspot* per l'attività microbica (compresa la crescita fungina), poiché anche la composizione delle comunità fungine sui biofilm differisce significativamente dagli ambienti circostanti.<sup>[10]</sup> Da un lato, ciò potrebbe rappresentare una fonte di specie patogene e quindi una minaccia per l'ambiente e la salute; dall'altro, queste

comunità rappresentano un'opportunità per identificare nuove vie metaboliche e specie che degradano la plastica.

Come descritto nella **Tabella 3**, i funghi sono in grado di degradare in modo efficiente diversi tipi di plastica, anche maggiormente rispetto agli attinomiceti e ad altri batteri. Diversi ceppi dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, ovvero *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Penicillium pinophilum*, *P. frequentan*, *P. oxalicum*, *P. chrysogenum*, *Fusarium redolens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Acremonium kiliense*, *Verticillium lecanii* e *Glioclodium virens* sono stati in grado di degradare il polietilene (PE) (**Tabella 3**). [8]

Strain	Plastic type	Biodegradation assay conditions(Media, time, rpm, T°C)	Biodegradation detection method	Polymer reduction (%)	Ref.
<i>Aspergillus flavus</i> VRKPT2	PE	Synthetic media with mineral oil, for 1 month, at 30 °C	Weight loss; FTIR; SEM	9.34	(Devi et al., 2015)
<i>Aspergillus tubingensis</i> VRKPT1	PE	Synthetic media with mineral oil, for 1 month, at 30 °C	Weight loss; FTIR; SEM	6.88	(Devi et al., 2015)
<i>Aspergillus oryzae</i>	PE	Synthetic medium with ampicillin, for 4 months, at 28 °C in a shaker incubator	Weight loss; FTIR; GC-MS	36.4	(Muhonja et al., 2018)
<i>Penicillium simplicissimum</i> YK	PE	Medium C with 0.5g polymer, for 3 months, 150 rpm, at 30 °C	FTIR; GPC	n.a.	(Yamada-Onodera et al., 2001)
<i>Zalerion maritimum</i>	PE	Minimum growth media with 0.130g of polymer, for 0.94 months, 120 rpm, at 25 °C	Weight loss; FTIR; NMR	43	(Paço et al., 2017)
<i>Trichoderma harzianum</i>	PE (UV treated)	Mineral salt medium for 3 months	Weight loss; SEM; FTIR; NMR	40	(Sowmya et al., 2014)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PE (120 days exposed to sunlight)	Mineral medium, for 2 months, at 25 °C	FTIR; SEM; mechanical properties	n.a.	(Luz et al., 2019)
<i>Cephalosporium</i> sp. (NCIM 1251)	PS	Mineral salt media, for 2 months, at 120 rpm, at 28 °C	Weight Loss; FTIR; SEM; pH variation; gel permeation chromatography	2.17	(Chaudhary and Vijayakumar, 2020)
<i>Mucor</i> sp. (NCIM 881)	PS	Mineral salt media, for 2 months, at 120 rpm, at 28 °C	Weight Loss; FTIR; SEM; pH variation; gel permeation chromatography	1.81	(Chaudhary and Vijayakumar, 2020)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	PS (styrofoam)	Malt extract broth, for 1 month, at 25 °C	Weight loss; FTIR; SEM	74.43	(Yanto et al., 2019)
<i>Ceriporia</i> sp.	PS (styrofoam)	Malt extract broth, for 1 month, at 25 °C	Weight loss; FTIR; SEM	19.44	(Yanto et al., 2019)
<i>Cymatoderma dendriticum</i>	PS (styrofoam)	Malt extract broth, for 1 month, at 25 °C	Weight loss; FTIR; SEM	15.50	(Yanto et al., 2019)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ∴	PU	Agar medium*	Clear zone test; FTIR	n.a.	(Brunner et al., 2018)
<i>Phoma</i> sp.	PU	Buried in soil for 5 months	Clear zone test; tensile strength	95	(Cosgrove et al., 2007)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	PU	Mineral salt medium, for 0.75 months, at 150 rpm, at 37 °C	FTIR; SEM; tensile strength	90	(Khan et al., 2017)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PVC (blended with cellulose)	Soil buried (soil was mixed with municipal sewage sludge), for 6 months	Clear zone test; FTIR; SEM	n.a.	(Ali et al., 2009)
<i>Tritirachium album</i>	PLA	Basal media, for 0.5 months, at 180 rpm, at 30 °C	Weight loss; SEM; pH variation	76	(Jarerat and Tokiwa, 2001)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	PLA	Wheat grain with mineral salt medium, for 2 months, at 50 °C	SEM; tensile strength	n.a.	(Karamanlioglu et al., 2014)
<i>Trichoderma viride</i>	PLA (plasticized with USE)	Liquid Sabouraud medium, for 0.7 months, at 28 °C	Weight loss; FTIR; gel permeation chromatography; SEM	1.2	(Lipsa et al., 2016)

**Tabella 3.** Campioni di plastica degradati da funghi, indicate anche condizioni di biodegradamento e metodi di rilevamento utilizzati <sup>8</sup>

*Zalerion maritimum*, un fungo marino, ha mostrato la più alta capacità degradativa del PE (43%), in terreni di crescita minimi, utilizzandolo come unica fonte di carbonio. Ha causato gravi danni a pellicole di PE, riducendone la massa e le dimensioni, con un aumento della sua biomassa.

La degradazione fungina può essere migliorata utilizzando un pretrattamento della plastica con radiazioni UV prima del test di biodegradazione, così come avviene per i batteri. Per esempio, il ceppo *Trichoderma harzianum* ha degradato efficacemente il PE pretrattato con radiazioni UV, causando la formazione di cavità ed erosioni sulla superficie della plastica. D'altra parte, l'esposizione preliminare di pellicole di PE alla luce solare non è sufficiente a promuoverne la biodegradazione, ma questo passaggio è importante per aumentare la crescita dei ceppi sui polimeri, come nel caso del *Pleurotus ostreatus*. In sintesi, la combinazione di processi abiotici e biotici risulta efficiente per la degradazione delle (micro)plastiche.

Il polistirene (PS) non è riciclabile né biodegradabile, il che può spiegare i bassi tassi di degradazione presentati da *Cephalosporium sp.* e *Mucor sp.* Tuttavia, sono stati osservati cambiamenti morfologici nella superficie del PS, che hanno portato alla comparsa di crepe, fori ed erosione. Quando il PS viene utilizzato nei test di biodegradazione sotto forma di polistirolo, il tasso di biodegradazione è molto più elevato, anche perché usando un terreno liquido a base di estratto di malto ossia una ricca fonte di carbonio e azoto, si favorisce la crescita microbica e la produzione di enzimi. L'ottimizzazione del mezzo gioca un ruolo importante nell'efficienza della biodegradazione. [8]

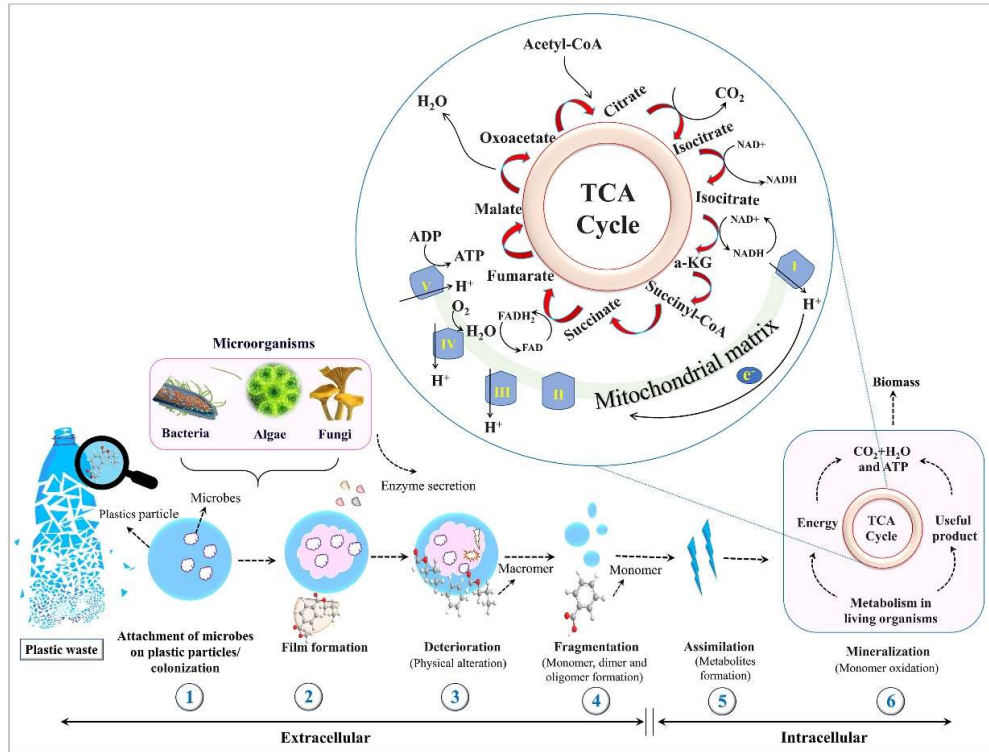
Anche i funghi del genere *Penicillium* (ascomiceti) sono stati utilizzati per la degradazione di polimeri plastici; *Penicillium simplicissimum* è stato utilizzato per la degradazione del PE: dopo tre mesi di coltivazione del fungo su un terreno solido accompagnato da PE è stata osservata una significativa riduzione del peso molecolare del polimero plastico. [11]

Importante specificare come le comunità sui detriti di plastica nelle acque superficiali differiscano da quelle dell'acqua di mare circostante. Un esempio sono i cianobatteri filamentosi fotosintetici, cioè *Phormidium* e *Rivularia*, che dominano i detriti di plastica, ma non sono abbondanti nell'acqua di mare. [12]

## 2.5 Meccanismi ed enzimi di biodegradazione delle microplastiche

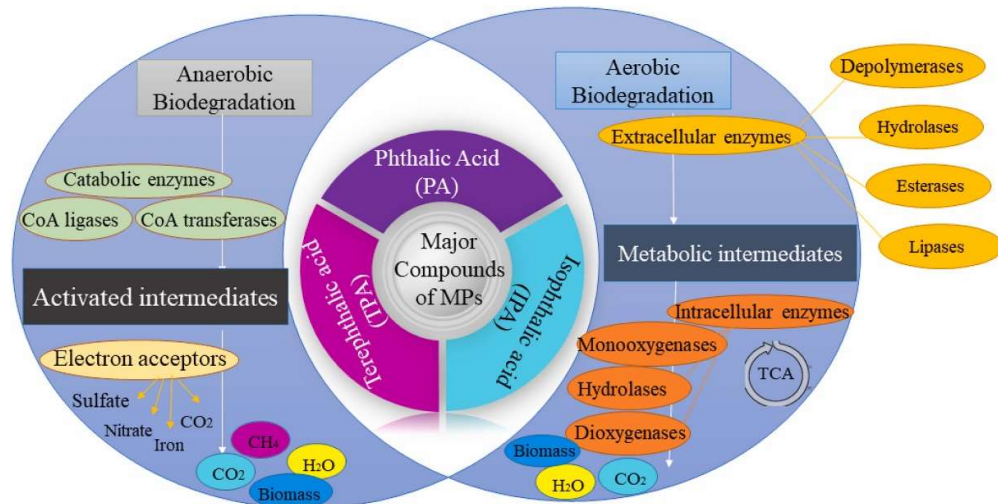
Dopo la colonizzazione della superficie delle MP, i microrganismi rilasciano enzimi extracellulari che si combinano con i polimeri e li scindono. Ciò porta alla depolimerizzazione in oligomeri, dimeri e persino monomeri a basso peso molecolare. Questi processi solitamente prevedono l'idrolisi (per plastiche idrolizzabili) e la degradazione ossidativa (per plastiche idrolizzabili e non). Dopo la depolimerizzazione, gli oligomeri entrano nelle cellule e fungono da fonte di carbonio per la crescita microbica (fase di assimilazione). Con la successiva fase di mineralizzazione ci si riferisce alla decomposizione di diversi tipi di (micro)plastiche in piccole molecole, come CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O, attraverso il ciclo TCA in **Figura 5**. Fino ad ora, è stato riportato che gli enzimi di degradazione della plastica includono idrolasi (come esterasi, lipasi, cheratinasi e cutinasi) e ossidoreduttasi (come laccasi, manganese perossidasi, idrossilasi e lignina perossidasi). [8]





**Figura 5.** Schema visivo del meccanismo di biodegradazione delle microplastiche <sup>11</sup>

Schematizzando il processo di biodegradamento delle (micro)plastiche ad opera dei microrganismi è possibile identificare quindi diverse fasi, indicate in **figura 5**: (1) adesione dei microrganismi sulle superfici che prendono il nome di plastisfera, con conseguente (2) formazione di un biofilm e successiva (3) degradazione iniziale dei polimeri in particelle di dimensioni inferiori a partire da grandi strutture polimeriche, in questa fase sono essenziali enzimi extracellulari come le idrolasi, che permettono di scomporre la superficie plastica in molecole più piccole; inoltre, assieme ad altri enzimi extracellulari (come lipasi, esterasi, lignina perossidasi, laccasi e manganese perossidasi), sono essenziali per aumentare l'idrofilia dei polimeri plastici permettendo un miglioramento dell'adesione microbica e quindi l'ulteriore biodegradazione. (4) Frammentazione di polimeri in oligomeri, dimeri e monomeri, (5) formazione dei metaboliti da assimilare e (6) mineralizzazione delle (micro)plastiche in biomassa microbica. In **Figura 6** è illustrato uno schema della scomposizione delle MP in anidride carbonica (mineralizzazione completa) attraverso l'utilizzo di diversi enzimi e la trasformazione degli intermedi prodotti da utilizzare come fonte di produzione di nuova energia e biomassa. <sup>[11] [13]</sup>



**Figura 6.** Vie schematiche aerobiche e anaerobiche ed enzimi associati nella biodegradazione delle (micro)plastiche <sup>13</sup>

Diversi fattori sono necessari per una biodegradazione efficiente, in particolare, la presenza di opportune vie metaboliche e specifici enzimi nei microbi potenzialmente utilizzabili. Anche parametri ambientali come pH, salinità, temperatura e contenuto di umidità possono giocare favorevolmente. Per quanto riguarda le materie plastiche, esse devono presentare caratteristiche fisiche che devono consentire l'adesione del microrganismo alla loro superficie. <sup>[13]</sup>

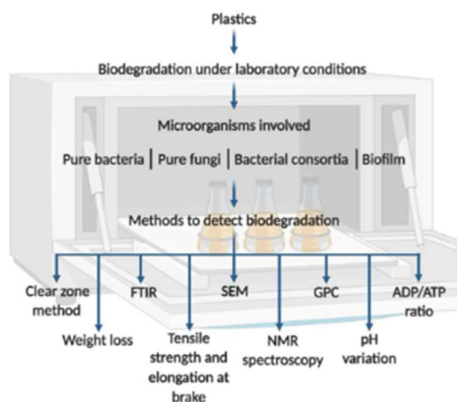
È opportuno sottolineare come le vie metaboliche e gli enzimi sfruttati dai microrganismi per la degradazione delle MP variano anche in base al tipo di polimero e quindi in base ai legami che lo caratterizzano.

### CAPITOLO 3 – METODI e TECNICHE UTILI PER DETERMINARE LA DEGRADAZIONE DELLE (MICRO)PLASTICHE

Esistono due strategie principali per lo studio della plastisfera sulle MP marine, ovvero il campionamento ambientale e prove di laboratorio. Gli studi sul campionamento ambientale sono limitati a causa delle difficoltà e della spesa per il campionamento, in particolare sui fondali oceanici. In condizioni di laboratorio, sono stati condotti diversi studi in cui frammenti di plastica vengono incubati in acqua di mare o sedimenti raccolti in condizioni di laboratorio stabilite *ad hoc*, che escludono il disturbo di ambienti naturali variabili. Uno studio in condizioni controllate è solitamente adatto per osservare la capacità di degradazione della plastica dei microrganismi marini e la funzione degli enzimi di degradazione, allo stesso tempo però questo tipo di approccio è distante da quelle che sono le normali condizioni di disturbo, biotico e abiotico, che ritroviamo invece in ambiente marino.

Riguardo all'approccio alternativo, i primi studi sulla plastisfera si basavano principalmente sulla microscopia o sulla microscopia elettronica a scansione (SEM) per identificare morfologicamente i diversi organismi presenti. Solo di recente è stato utilizzato il sequenziamento ad alto rendimento (*high-throughput*) per lo studio dei microrganismi presenti nella plastisfera, con cui si utilizzano segmenti del gene 16S rRNA, che sono molto conservati, e vengono amplificati per determinare quali organismi si trovano in un campione, e in che modo questi differiscono con l'ambiente.

Gli studi incentrati sull'analisi di microrganismi eucarioti nella plastisfera marina sono relativamente pochi, le cui tecniche principali sono rappresentate schematicamente in **Figura 7**. Tuttavia, in quanto parte naturale della plastisfera, sono necessari studi futuri per l'individuazione anche di taxa eucariotici. <sup>[4]</sup>



**Figura 7.** Metodi per registrare la biodegradazione della plastica in condizioni di laboratorio. FTIR (*Fourier Transform Infrared spectroscopy*); SEM (*Scanning Electron Microscopy*); NMR (*Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*); GPC (*Gel Permeation Chromatography*); ADP/ATP (rapporto adenosina difosfato/adenosina trifosfato) <sup>5</sup>

#### Metodo della zona chiara

In primo luogo, è importante eseguire uno *screening* preliminare dei microrganismi presenti nel campione per scoprire quali microrganismi hanno la capacità di degradare i polimeri e quali polimeri possono essere degradati. Per questo screening, viene utilizzato il metodo della zona chiara con piastre di agar. Attraverso l'inoculazione del microrganismo in piastre di agar contenenti polimeri emulsionati. Questo test fornisce informazioni sul potenziale di degradazione dei microrganismi per un polimero selezionato. I microrganismi in grado di degradare i polimeri

espellono enzimi extracellulari che si diffondono attraverso l'agar e degradano il polimero in materiali solubili in acqua. I principali vantaggi di questo metodo sono la semplicità, il costo relativamente basso, la rapidità di risposta e l'efficacia. I terreni solidi contenenti particelle di polimero in sospensione consentono di isolare potenti degradatori. Quando un microrganismo cresce in questo terreno e consuma il polimero, si può osservare una zona chiara su una piastra torbida, a conferma dell'avvenuta degradazione del polimero. Non indica necessariamente il consumo di tutti i composti, ma riflette la rottura delle catene polimeriche. Per eseguire lo *screening*, è necessario incorporare il polimero nel terreno di coltura. L'incorporazione può avvenire tramite emulsione, polvere macinata o sospensione. Un pretrattamento chimico dei polimeri può essere vantaggioso per ottenere materiali solubili in acqua. <sup>[5]</sup>

### **Determinazione gravimetrica della perdita di peso**

Questa tecnica è ampiamente utilizzata nei saggi di degradazione dei polimeri per valutare la perdita di peso gravimetrica. Questo metodo deve essere utilizzato e interpretato con attenzione, poiché la perdita di peso può derivare dall'idrolisi chimica e dalla disintegrazione (frammentazione) della plastica, soprattutto nel caso di polimeri in polvere. I risultati della perdita di peso sono molto imprecisi, poiché l'entità della biodegradazione è limitata e relativamente lenta. La perdita di peso dipende dal tempo di incubazione e dalle condizioni di analisi, oltre che dai microrganismi e dai polimeri utilizzati. Questo metodo viene solitamente associato ad altre tecniche per verificare la veridicità dei risultati. <sup>[5]</sup>

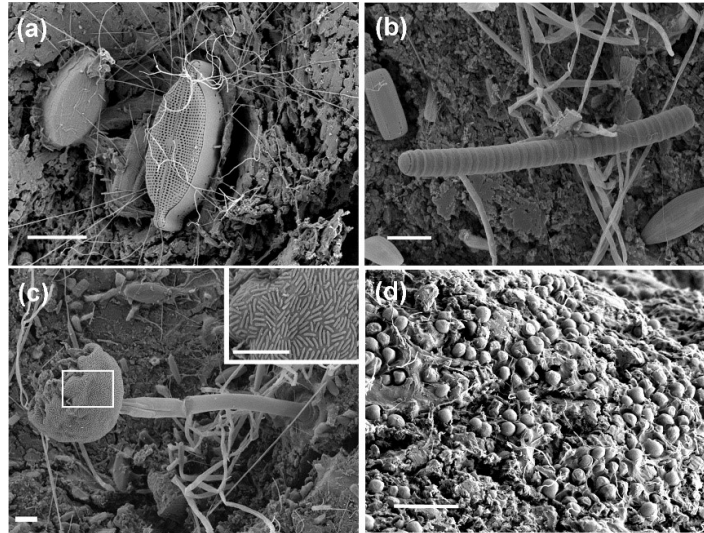
### **Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) e Spettroscopia Raman (FTR)**

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier può essere utilizzata per studiare e monitorare le modifiche chimiche nella struttura del film polimerico. L'obiettivo di questa tecnica è la misurazione dello spettro di assorbimento di una particolare sostanza, cioè la misurazione di quanto quella sostanza assorba energia sotto forma di luce a diverse lunghezze d'onda. Gli spettri FTIR forniscono informazioni sui gruppi funzionali chimici del polimero, rilevando i cambiamenti chimici dovuti al loro consumo o alla produzione dovuta all'attività microbica. Questi cambiamenti si verificano nei gruppi funzionali della superficie del polimero. Anche la spettroscopia FTR (*Fourier Transform Raman*) è una tecnica veloce e altamente selettiva, in grado di identificare anche le cariche minerali presenti nelle materie plastiche, è una tecnica basata sul fenomeno di diffusione di una radiazione elettromagnetica monocromatica da parte del campione analizzato. L'efficienza della spettroscopia FTIR e FTR consente di rilevare la maggior parte dei componenti polimerici ed eventuali modificazioni strutturali dovute all'azione di biodegradatori microbici. Tuttavia, sono state verificate alcune limitazioni nella spettroscopia FTIR, tra cui un'elevata sensibilità allo stato della superficie del polimero. <sup>[5]</sup>

### **Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

La microscopia elettronica a scansione (SEM) consente di rilevare la colonizzazione microbica e la conseguente degradazione superficiale attraverso cambiamenti nell'aspetto fisico della superficie del polimero. La valutazione della

biodegradazione del polimero è visibile dai cambiamenti delle proprietà fisiche, dalla formazione di buchi e crepe o dalla formazione di biofilm sulle superfici del polimero. Gli svantaggi dell'utilizzo del SEM risiedono nei costi elevati delle macchine e nella specifica formazione necessaria per il loro utilizzo. [5]



**Figura 5.** Immagini SEM che mostrano esempi della ricca comunità microbica su PMD: (a) diatomee pennate con possibili filamenti proteici da batteri simili a *Hyphomonas*; (b) cianobatteri filamentososi; (c) ciliato sottore ricoperto di batteri ectosimbiotici (nel riquadro) insieme a diatomee, batteri e cellule filamentosose; (d) cellule microbiche lungo la superficie. Tutte le barre della scala sono di 10  $\mu\text{m}$  [7]

### Cromatografia a permeazione di gel (GPC)

Questa tecnica si basa sul peso molecolare medio (MW%) e sulla distribuzione del peso molecolare del polimero. Di solito, questa analisi viene eseguita sul polimero sfuso e potrebbe non consentire di rilevare le fasi iniziali della biodegradazione, poiché quest'ultima avviene in primo luogo sulla superficie del polimero. Pertanto, la GPC non è una tecnica altamente sensibile ma può essere utilizzata in combinazione con altre, in quanto la diminuzione del MW del polimero può essere la prova di una scissione della catena, che indica un attacco microbico. [14]

### Test di resistenza a trazione ( $R_m$ ) e allungamento a rottura ( $\epsilon_r$ )

Le modifiche alla resistenza alla trazione e all'allungamento al freno sono segni di biodegradazione, cioè di attacco microbico ai polimeri. Una volta che i polimeri sono costituiti da monomeri diversi e le catene sono orientate in modo diverso, hanno valori distinti per la resistenza alla trazione e l'allungamento al freno. Ciò significa che la forza necessaria per deformare e rompere un polimero sarà diversa. Quando avviene la degradazione microbica, si verificano cambiamenti significativi nelle proprietà meccaniche, causati da modifiche biochimiche dei polimeri. Queste modifiche possono derivare dalla formazione di legami di reticolazione tra le catene monomeriche o dalla disintegrazione del film, che accorcia le catene polimeriche e serve come fonte di carbonio ed energia. A seconda del microrganismo, del polimero e del tempo di incubazione, i valori di  $R_m$  e  $\epsilon_r$  variano. [5]

## **Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)**

La risonanza magnetica nucleare è una tecnica che esplora le proprietà magnetiche di alcuni nuclei atomici (ad esempio, nuclei  $^1\text{H}$ ) per determinare le proprietà fisiche o chimiche degli atomi o delle molecole che compongono i polimeri. Questa tecnica fornisce informazioni dettagliate su struttura, dinamica, stato di reazione e ambiente chimico delle molecole. La maggior parte delle molecole è composta da atomi di idrogeno e questo nucleo ha una forte risonanza, che fornisce all' $^1\text{H}$  NMR ampie applicazioni. I protoni di gruppi chimici diversi hanno una diversa schermatura magnetica; pertanto, i nuclei  $^1\text{H}$  in ambienti diversi danno luogo a spostamenti chimici diversi. La spettroscopia NMR consente di analizzare i cambiamenti molecolari che si verificano durante il processo di biodegradazione. I cambiamenti nell'intensità dei picchi, nei valori di integrazione e nello spostamento chimico negli spettri NMR possono essere attribuiti alla biodegradazione del polimero da parte dei microrganismi. Con l'NMR è possibile analizzare la struttura molecolare dei prodotti degradati o dei loro intermedi. L'analisi NMR dei polimeri foto- e termo-ossidati può rivelare la presenza di prodotti degradati e intermedi durante i saggi di biodegradazione. Questa tecnica permette di visualizzare i substrati solubili ottenuti dai polimeri ossidati che possono essere utilizzati come fonte di carbonio ed energia dalle cellule microbiche. <sup>[5]</sup>

## **Variazione del pH**

Anche il pH è un fattore molto importante che regola la sopravvivenza e l'attività enzimatica dei microrganismi; quindi, influenza il tasso complessivo di biodegradazione. Le variazioni di pH si osservano quando avviene la biodegradazione, poiché gli intermedi e i prodotti degradati possono influenzare il pH del mezzo.

## **Rapporto ADP/ATP**

L'adenosina trifosfato (ATP) è una molecola chiave in tutti i metabolismi energetici e riflette i livelli di attività metabolica di una cellula e quindi anche di una coltura cellulare. Misurando le concentrazioni di ATP e adenosina difosfato (ADP), si determina se i microrganismi possono mantenere il loro stato energetico durante il processo di biodegradazione; il rapporto ADP/ATP è infatti estremamente sensibile, rappresenta un'istantanea dello stato energetico delle cellule, permettendo di valutare eventuali variazioni in presenza di diversi tipi di polimeri plastici. <sup>[5]</sup>

## CONCLUSIONE

L'obiettivo di questo elaborato è stato quello di effettuare una ricerca in letteratura ed elaborare una visione dello stato dell'arte sui processi di formazione e composizione delle comunità microbiche della plastisfera, analizzando come queste influenzino la struttura chimico-fisica dei polimeri plastici, nonché il loro meccanismo di degradazione delle (micro)plastiche stesse.

L'inquinamento da plastica è un grave problema che deve essere risolto con urgenza e che negli ultimi anni, a causa dei numerosi eventi naturali anomali, sta guadagnando sempre più attenzione sia pubblica che scientifica. I microrganismi forniscono una nuova prospettiva riguardo l'esplorazione del trattamento delle plastiche. Allo stato attuale, però, molti dei meccanismi che regolano il rapporto microbo-plastica vanno ancora approfonditi, come la distribuzione delle (micro)plastiche, la struttura delle diverse comunità microbiche, il processo di formazione della plastisfera e le modalità di biodegradazione. La conoscenza degli enzimi che inducono la biodegradazione della plastica può risultare estremamente importante anche per future applicazioni industriali, poiché si potrebbe imitare la biodegradazione microbica senza l'utilizzo del microrganismo originale. Anche l'elaborazione di nuovi polimeri plastici, più facilmente degradabili dai microrganismi potrebbe essere una strada da seguire, abbiamo visto inoltre in che modo numerosi tipi di pretrattamento facilitino l'azione dei microbi nella colonizzazione e disgregazione dei polimeri plastici. L'impatto negativo delle plastiche post-consumo può poi essere ridotto al minimo sostituendo le plastiche di origine sintetica con quelle biodegradabili, che svolgono un importante ruolo nello sviluppo sostenibile perché utilizzano risorse rinnovabili, riducono le emissioni di CO<sub>2</sub> durante la produzione e hanno un minore impatto ambientale in seguito al loro smaltimento.

È sicuramente importante mantenere vivo l'interesse anche verso la ricerca di nuove vie per la sostituzione della maggior parte dei polimeri plastici per i classici utilizzi industriali. Molte multinazionali stanno infatti virando verso un utilizzo più responsabile di questi, per esempio sostituendo i materiali plastici con surrogati cartacei.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Sooriyakumar et al., «Biofilm formation and its implications on the properties and fate of microplastics in aquatic environments: A review,» *Journal of Hazardous Materials Advances*, 2022.
- [2] B. Jovanovič, «Ingestion of Microplastics by Fish and Its Potential Consequences from a Physical Perspective,» *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2017.
- [3] E. Guzzetti, A. Sureda, S. Tejada e C. Faggio, «Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects,» *Environmental Toxicology and Pharmacology (ETAP)*, 2018.
- [4] Y. Du, X. Liu, X. Dong e Y. Zhiqiu, «A review on marine plastisphere: biodiversity, formation, and role in degradation,» *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022.
- [5] Oliveira et al., «Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization,» *Frontiers in Marine Science*, 2020.
- [6] B. Gewert, M. M. Plassmann e M. MacLeod, «Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment,» *Environmental Science*, 2015.
- [7] E. R. Zettler, T. J. Mincer e L. A. Amaral-Zettler, «Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris,» *Environmental Science & Technology*, 2017.
- [8] X. Zhai, X.-H. Zhang e M. Yu, «Microbial colonization and degradation of marine microplastics in the plastisphere: A review,» *Frontiers*, 2023.



- [9] H. Auta, C. Emenike e S. Fauziah, «Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions,» *Environment International*, 2017.
- [10] Kettner et al., «Microplastics alter composition of fungal communities in aquatic ecosystems,» *Environmental Microbiology*, 2017.
- [11] Bacha et al., «Biodegradation of macro- and micro-plastics in environment: A review on mechanism, toxicity and future prospectives,» *Science of The Total Environment*, vol. 858, 2023.
- [12] Rogers et al., «Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics,» *Limnology and Oceanography*, 2020.
- [13] Miri et al., «Biodegradation of microplastics: Better late than never,» *Chemosphere*, 2022.
- [14] F. Fava e N. Raddadi, «Biodegradation of oil based plastics in the environment: Existing knowledge and needs of research and innovation,» *Scitotenv*, 2019.