

# Myco Recupero di Apparecchiature Elettriche ed Elettroniche

Anna Maria Cardinale\*, Ester Rosa\*\*, Simone Di Piazza\*\*, Grazia Cecchi\*\*, and Mirca Zotti\*\*

\* Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Genova

\*\* Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita, Università di Genova

## Sommario

I Rifiuti di Apparecchiature Elettriche ed Elettroniche (RAEE) sono una potenziale fonte di materie prime. La principale sfida odierna è mettere a punto un processo affidabile ed ecologico per riciclare materie prime ed elementi preziosi dai RAEE. In letteratura è noto da tempo il potenziale dei funghi nell'ambito tecnologie verdi volte al riciclaggio di elementi preziosi. Infatti, il meccanismo di bioaccumulo e l'attività di biolisciviazione di specie fungine filamentose sono già stati sfruttati proficuamente nei processi di estrazione. Tuttavia, non tutti i ceppi fungini possiedono le stesse caratteristiche; è quindi fondamentale scegliere i ceppi giusti da utilizzare. In questa ricerca sperimentale mostriamo un metodo per valutare l'efficienza di recupero di elementi preziosi dai RAEE per mezzo di ceppi fungini. In particolare, sono state studiate crescita, tolleranza e la capacità di accumulo di 3 ceppi fungini in presenza di un semilavorato RAEE ricco di elementi preziosi. I test sono stati eseguiti in capsule Petri su terreno agarizzato addizionato con 120 ppm di polvere di scarto elettronico. I risultati evidenziano differenze nella capacità di accumulo, nel tasso di crescita e nella produzione di biomassa. Tra gli elementi nei rifiuti testati, ittrio, rame e palladio mostrano il fattore di bioconcentrazione più elevato.

I risultati confermano il potenziale biotecnologico dei funghi di recuperare elementi preziosi su scala di laboratorio, evidenziando l'importanza di test di screening efficaci per valutare il ceppo più efficiente per ogni tipo di rifiuto.

### Parole chiave:

rifiuti elettronici, materie prime; bioassorbimento, elementi preziosi, *Aspergillus*; CAS-agar test.

## Abstract

Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE) is a potential source of raw materials. The main challenge today is to develop a reliable and environmentally friendly process to recycle raw materials and valuable elements from WEEE. The potential of fungi in green technologies for recycling valuable elements has long been known in the literature. Indeed, the bioaccumulation mechanism and bioleaching activity of filamentous fungal species have already been profitably exploited in extraction processes. However, not all fungal strains possess the same characteristics; it is therefore crucial to choose the right strains to use. In this experimental research, we show a method to evaluate the recovery efficiency of valuable elements from WEEE by means of fungal strains.

In particular, the growth, tolerance and accumulation capacity of 3 fungal strains were tested in the presence of a WEEE semi-finished product rich in valuable elements. The tests were carried out in Petri dishes on agarized medium supplemented with 120 ppm electronic waste powder. The results show differences in accumulation capacity, growth rate and biomass production. Among the elements in the waste tested, yttrium, copper and palladium show the highest bioconcentration factor.

The results confirm the biotechnological potential of fungi to recover valuable elements on a laboratory scale, highlighting the importance of effective screening tests to evaluate the most efficient strain for each type of waste.

---

# I. Introduzione

Nel 2020 (secondo il Global E-waste Monitor) la produzione globale di rifiuti elettronici ha superato i 50 milioni di tonnellate, mentre la produzione annua pro capite è stata di circa 6 kg. Ad aggravare questo scenario, oltre l'80% di questi rifiuti non è stato riciclato lasciando inutilizzate grandi quantità di materiali preziosi<sup>[1]</sup>. Tra le materie prime essenziali per la produzione di dispositivi elettronici vi sono gli elementi definiti "materie prime critiche". Questi elementi sia per la loro rarità, sia per le difficoltà di estrazione sono spesso il fattore limitante per lo sviluppo tecnologico in molte aree del mondo. Secondo l'obiettivo di sviluppo sostenibile 12 dell'Agenda 2030 stabilito dalle Nazioni Unite nel 2015, dobbiamo "Garantire modelli di consumo e produzione sostenibili". Per quanto riguarda l'approvvigionamento delle materie prime critiche occorre avviare una transizione dai metodi tradizionali a un nuovo modello basato sul riciclo circolare dai rifiuti di apparecchiature elettriche ed elettroniche (RAEE) attraverso approcci rispettosi dell'ambiente. I metodi di recupero tradizionali come adsorbimento, cristallizzazione, estrazione con solvente, coprecipitazione, purificazione, scambio ionico, preconcentrazione, sono spesso costosi e di elevato impatto ambientale<sup>[2]</sup>. Una grande sfida è mettere a punto un metodo efficiente ed ecologico per estrarre elementi preziosi dai rifiuti elettronici nello smaltimento dei rifiuti urbani. In questo contesto le biotecnologie, per il loro basso impatto sulla salute dell'ambiente e delle persone, possono rappresentare la soluzione, potendo essere implementati anche in aree densamente popolate; decentrando solo le parti più pericolose del processo<sup>[3]</sup>. Negli ultimi decenni, molti ricercatori hanno lavorato sull'isolamento e sulla selezione di microrganismi dedicati ai processi biometallurgici dimostrando la loro utilità grazie alla produzione di acidi organici e molecole che legano i metalli<sup>[4]</sup>. Oggi batteri, funghi e alghe sono già stati utilizzati con successo per mobilitare, dissolvere e recuperare metalli<sup>[4]</sup>. Finora i batteri sono gli organismi più studiati per questo scopo. Recentemente molti ricercatori hanno dimostrato la possibilità di applicare con successo diverse specie di funghi filamentosi come *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum* e *Trichoderma harzianum* nei processi estrattivi di V, Ni, Fe e Cu Gu et al 2018<sup>[5,6]</sup>. In particolare, la biolisciviazione effettuata dai funghi filamentosi ha mostrato una fase di latenza più breve e una maggiore capacità di tolleranza ai metalli rispetto ai batteri, che spesso vengono inibiti.<sup>[5,6]</sup> In questo contesto il nostro studio, proseguendo i risultati del brevetto *Metodo per recuperare metalli preziosi e terre rare da materiali di scarto "MIPREME"* dell'Università di Genova, si propone di individuare i ceppi fungini più efficienti sulla base del contesto specifico. In particolare, sono state studiate crescita, tolleranza e la capacità di accumulo di 3 ceppi fungini in presenza di un semilavorato RAEE ricco di elementi preziosi. I test sono stati eseguiti in capsule Petri su terreno agarizzato addizionato con 120 ppm di polvere di scarto elettronico. I risultati evidenziano differenze nella capacità di accumulo, nel tasso di crescita e nella produzione di biomassa tra i ceppi saggiati. In particolare il ceppo di *A. tubingensis*, ha mostrato un "fattore di bioconcentrazione" superiore agli altri ceppi. Invece, tra gli elementi testati nei rifiuti, ittrio, rame e palladio mostrano il fattore di bioconcentrazione più elevato. I risultati del presente lavoro confermano dunque l'importanza della corretta selezione del ceppo al fine di progettare e implementare bioreattori efficienti per il recupero di elementi preziosi all'interno di una tecnologia verde.

## II. Attività

Il lavoro sperimentale si è sviluppato secondo i seguenti punti:

### 1. Individuazione e identificazione di nuovi ceppi e/o messa in coltura di ceppi già identificati e saggiati.

Sulla base dei risultati ottenuti in precedenti prove, si è proceduto ad isolare, caratterizzare e individuare ceppi microfungini, capaci di tollerare e accumulare elevate concentrazioni di metalli presenti nell'ambiente in cui crescono. I ceppi sono stati isolati da suoli serpentini che rappresentano un ambiente naturalmente caratterizzato da fattori abiotici fortemente stressanti (in particolare elevata presenza di metalli ecotossici e pH generalmente acidi), quindi selettivi nei confronti degli organismi viventi. Infatti, tali condizioni tendono a selezionare una flora micologica potenzialmente predisposta a tollerare, accumulare e degradare sostanze inorganiche ecotossiche. I ceppi fungini sono stati isolati dal suolo mediante diluizioni in piastra 1:10000 e 1:100000 su due differenti media di coltura (Rosa Bengala e Malt Extract Agar) e incubati in termostato a 24° C per 15 giorni. In figura 1 l'aspetto di due colture.

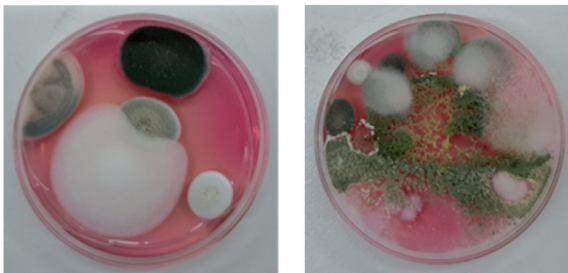


Figura 1: piastre da isolamento con terreno Rosa Bengala dopo 15 gg di incubazione

Dalle prove sono stati isolati in coltura axenica i 3 ceppi di funghi filamentosi più frequenti. I suddetti ceppi sono attualmente conservati nella collezione del Laboratorio di Micologia del DiSTAV CoID UNIGE - MIRRI IT.

La caratterizzazione molecolare, effettuata utilizzando tre differenti marcatori specifici LSU, Beta-tubulina e Calmodulina in base al genere di appartenenza, ha permesso di confermare l'identificazione preliminare effettuata solo su base morfologica riconducendo i tre ceppi impiegati alle seguenti specie: *Aspergillus tubingensis* Mosserray, *Penicillium glandicola* (Oudem.) Seifert & Samson, *Trichoderma harzianum* Rifai. Dati presenti in letteratura indicano queste specie come estremotolleranti, collocandole tra le specie più promettenti per applicazioni nell'ambito del *mycorecovery*.

La caratterizzazione molecolare, effettuata utilizzando tre differenti marcatori specifici LSU, Beta-tubulina e Calmodulina in base al genere di appartenenza, ha permesso di confermare l'identificazione preliminare effettuata solo su base morfologica riconducendo i tre ceppi impiegati alle seguenti specie: *Aspergillus tubingensis* Mosserray, *Penicillium glandicola* (Oudem.) Seifert & Samson, *Trichoderma harzianum* Rifai. Dati presenti in letteratura indicano queste specie come estremotolleranti, collocandole tra le specie più promettenti per applicazioni nell'ambito del *mycorecovery*.

### 2. Test delle capacità bioaccumulo dei ceppi selezionati.

Per queste prove i rifiuti elettronici utilizzati sono stati forniti da collettori accreditati. Si tratta di un semilavorato in polvere derivato da PC e/o telefoni cellulari, smontato e macinato in un mulino a palle fino a 140 mesh (granulometria circa 100 µm). Successivamente, al fine di rimuovere eventuali residui polimerici presenti, la polvere, additivata con il 20% in massa di segatura bagnata, subisce un trattamento in un forno a microonde per la carbonizzazione dei rifiuti di metalli preziosi – Violi S.r.L -Arezzo-Italy. Il trattamento avviene in un crogiolo della capacità di 30 L in atmosfera di azoto, a 1 kW di potenza. Il syngas prodotto viene opportunamente trattato prima dell'emissione in atmosfera. Il risultato del processo è una polvere fine arricchita di metalli preziosi e terre rare, la cui composizione elementare è stata definita mediante analisi di spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES). Le misurazioni ICP-OES sono state eseguite utilizzando un Varian (Springvale, Australia) Vista PRO. Il sistema di introduzione del campione consisteva in un nebulizzatore pneumatico tipo K concentrico in vetro (Varian) unito a una camera di nebulizzazione ciclonica in vetro (Varian). I risultati della caratterizzazione sono riportati in tabella 1.

Elemento	Ag	Al	Au	Cu	Fe	La	Nd	Pd	Pt	Sn	Tb	Y
Conc. (ppm)	868	6213	628	487	7833	0.26	1.27	93	50	3165	1.1	1.7

Tabella 1: composizione del semilavorato proveniente daRAEE

Terreno	Composizione standard	Composizione terreno + REE
MEA	20 g/L Estratto di malto 1 g/L Peptone 20 g/L Glucosio 20 g/L Agar	Composizione standard + di rifiuto elettronico (80, 120, 160 o 12000 mg/L).
CZ	Come indicazioni del produttore: 50 g/L di Czapek Dox Agar Sigma-Aldrich	Composizione standard + di rifiuto elettronico (80, 120, 160 o 12000 mg/L).

Tabella 2: modalità di preparazione dei terreni

Specie	Terreni di coltura e concentrazioni saggiate							
A. tubingensis	MEA	MEA	MEA	MEA	CZA	CZA	CZA	CZA
	C	80	120	160	C	80	120	160
P. glandicola	MEA	MEA	MEA	MEA	CZA	CZA	CZA	CZA
	C	80	120	160	C	80	120	160
T. harzianum	MEA	MEA	MEA	MEA	CZA	CZA	CZA	CZA
	C	80	120	160	C	80	120	160

Tabella 3: schema di lavoro per i test di screening di bioaccumulo

Elemento	Aggiunta 80	Aggiunta 120	Aggiunta 160
	Concentrazione terreno (ppm)	Concentrazione terreno (ppm)	Concentrazione terreno (ppm)
Ag	0,0694	0,1042	0,1389
Al	0,4970	0,7456	0,9941
Au	0,5028	0,7542	1,0056
Cu	0,0390	0,0584	0,0779
Fe	6,2666	9,4000	12,5333
La	0,0000	0,0000	0,0000
Nd	0,0001	0,0002	0,0002
Pd	0,0074	0,0112	0,0149
Pt	0,0040	0,0060	0,0080
Sn	0,2532	0,3798	0,5064
Tb	0,0001	0,0001	0,0002
Y	0,0001	0,0002	0,0003

Tabella 4: concentrazione dei metalli nei tre diversi terreni di coltura

Per effettuare lo *screening test* si è scelto di saggiare i 3 ceppi fungini isolati: *A. tubingensis*, *P. glandicola*, *T. harzianum*. Le basi scelte per i terreni di coltura utilizzati sono state MEA e CZ, la cui composizione è riportata in tabella 2.

Entrambi i terreni sono stati addizionati con 3 differenti concentrazioni di rifiuto elettronico. La tabella 3 riassume il disegno sperimentale adottato in questa fase. Le sigle dei terreni indicano rispettivamente le concentrazioni di rifiuto addizionate al terreno: C=controllo (0 ppm), 80=80 ppm, 120=120 ppm, 160=160 ppm

Sulla base della quantità di rifiuto aggiunto, per ogni elemento la concentrazione nel terreno di coltura dei funghi è riportata in tabella 4.

Una volta miscelati al rifiuto i terreni di coltura sono stati sterilizzati in autoclave a 120 °C per 20 minuti e posti in capsule Petri di diametro 9 cm. In seguito, i terreni sono stati inoculati con 100 µl di soluzione conidica, concentrata  $1 \times 10^8$  CFU  $\times$  mL<sup>-1</sup>, contenente i ceppi fungini selezionati. Le piastre inoculate sono state poste in incubatore ad una temperatura di 24 °C per 2 settimane e monitorate ogni 2 giorni per verificare l'andamento dello sviluppo fungino e le eventuali interazioni con le diverse concentrazioni di rifiuto presenti. L'esito della crescita dei ceppi inoculati sui terreni è stato positivo ed ha permesso di ottenere un quantitativo di biomassa più che sufficiente per effettuare le successive analisi chimiche previste dalla sperimentazione. In base a quanto osservato possiamo affermare che tutti e tre i ceppi selezionati sembrano ben tollerare le diverse concentrazioni di rifiuto aggiunto.

### 3. Recupero della biomassa fungina, e recupero delle materie prime.

la biomassa raccolta è stata essiccata in stufa non ventilata a 40 °C fino al raggiungimento di un peso costante, complessivamente il processo ha richiesto circa 120 ore. Durante l'essiccamento la massa dei miceli si è ridotta del 70% circa. I campioni essiccati sono stati disciolti in HNO<sub>3</sub> 65 % massa, per la dissoluzione il rapporto è di circa 10mL acido/g, il contenuto in metalli nella soluzione è stato analizzato tramite ICP-OES. Dal rapporto fra la concentrazione dei metalli



nel fungo essiccato e nel terreno di coltura si è determinato il “fattore di bioconcentrazione” per ogni metallo in ogni ceppo per le diverse concentrazioni di rifiuto aggiunto.

Il “fattore di bioconcentrazione” è la grandezza fondamentale per valutare l’efficienza dei processi in cui il recupero della fase assorbente (in questo caso il micelio).

### III. Risultati e ricadute

Figura 2 riporta i risultati delle prove di bioaccumulo per i diversi miceli e per i diversi terreni utilizzati espressi come fattore di concentrazione. Non sono riportati i valori di *T. harzianum* su CZ poiché si è osservato che produce una biomassa molto inferiore rispetto alle altre tesi, questo lo rende poco utile ai nostri scopi.

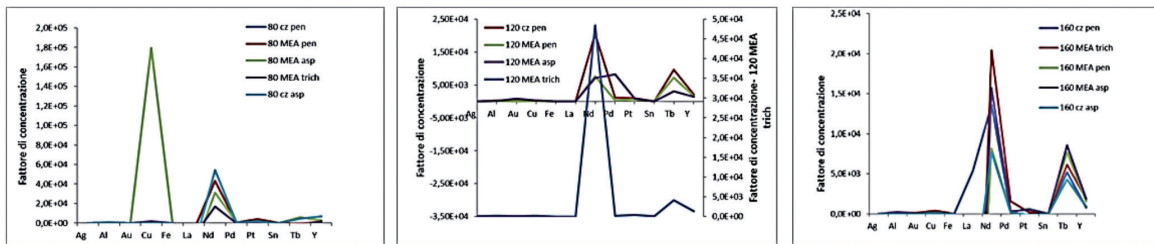


Figura 2: fattori di concentrazione per i tre miceli testati su terreni additivati con a) 80 ppm di rifiuto, b) 120 ppm di rifiuto, c) 160 ppm di rifiuto

Analizzando i risultati ottenuti e confrontando i fattori di concentrazione in funzione dei diversi parametri (quantità di rifiuto aggiunto, tipo di fungo e tipo di terreno di coltura) si possono fare le seguenti osservazioni:

oltre i 120 mg di rifiuto/L terreno l’accumulo rimane costante o comunque non si incrementa sensibilmente.

Il terbio ed il neodimio, pur essendo presenti in bassa concentrazione nel rifiuto iniziale sono stati concentrati dai miceli in modo interessante.

Indipendentemente dal tipo di fungo e di terreno, i metalli per i quali il fattore di concentrazione è maggiore sono Pd, Tb e Y. Il terbio si trova sia nei magneti Nd-Fe-B, per aumentarne la resistenza alle alte temperature, ma è presente in maggiore concentrazione nei rifiuti provenienti dai “fosfori” delle lampade a fluorescenza.

Elementi quali rame e alluminio vengono bene assorbiti e questo fenomeno può essere approfondito non tanto ai fini di recovery, ma di remediation. L’*Aspergillus* si è rivelato il meno efficiente fra i tre miceli testati, anche nei confronti di quei metalli quali rame, ferro ed alluminio che sono ben assorbiti dagli altri funghi. L’unico dato interessante è una buona capacità di concentrare l’ittrio se accresciuto su MEA.

La scelta del tipo di terreno non sembra influenzare il fattore di concentrazione, tuttavia va sottolineato che *T. harzianum* su CZ produce una biomassa molto inferiore rispetto alle altre tesi. Di questo occorre tenere conto nelle future valutazioni.

Sulla base dei risultati sperimentali, in previsione di uno scale up industriale, si è proceduto ad uno studio per la progettazione di un impianto pilota su scala di laboratorio.

Per questo, lo studio di fattibilità il progetto si è concentrato su un impianto pilota della capacità di circa 3 – 4 litri, ed è stato elaborato sulla base sia dei risultati sperimentali ottenuti sia tenendo in considerazione lo stato dell’arte relativamente a impianti che trattano biomassa fungina. La principale differenza che si può ipotizzare ci possa essere nel passaggio tra le prove sperimentali di assorbimento selettivo delle terre rare e metalli preziosi da parte dei ceppi fungini fatte utilizzando capsule Petri e l’impianto pilota è il substrato su cui dovrà crescere la biomassa fungina. Nel presente progetto il fungo è stato inoculato in uno terreno di coltura (stato solido), mentre nei bioreattori,

solitamente, viene alimentata una soluzione di coltura (stato liquido). Questa configurazione, oltre ad essere commercialmente più favorita, può anche permettere l'agitazione del substrato e facilitare l'incontro del polverino con il fungo.

L'impianto pilota (il cui schema è riportato in Figura 3) è costituito dalle stesse principali fasi studiate in laboratorio

1. Preparazione della soluzione di coltura a cui viene aggiunto il RAEE polverizzato (SOLUZCOL);
2. Preparazione dello starter di inoculo (PREPFUNG);
3. Assorbimento selettivo dei metalli preziosi e delle terre rare (BIOREATT);
4. Essiccazione della biomassa fungina (FORN);
5. Dissoluzione della biomassa fungina (DISSOLUZ).

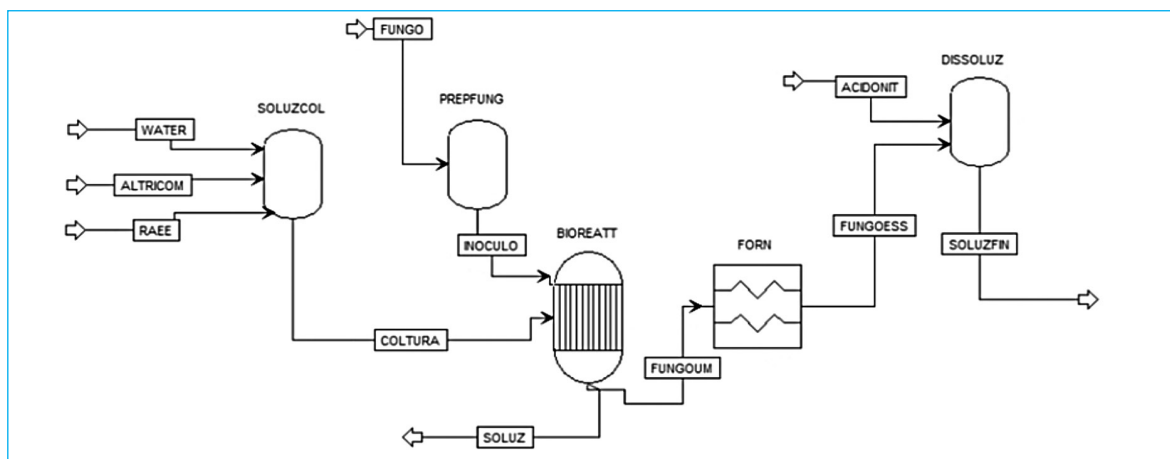


Figura 3: schema impianto pilota

È in corso una preliminare analisi economica considerando i principali costi fissi e di esercizio per la realizzazione e conduzione di un impianto pilota che possa trattare 4 litri di soluzione di coltura per l'assorbimento di metalli preziosi e terre rare da parte di biomassa fungina.

## IV. Conclusioni

Dalle prove in vitro sull'efficienza dei diversi miceli sui diversi terreni di coltura e dallo studio di fattibilità impiantistica al momento si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Focalizzando l'attenzione solo sul recovery i diversi miceli mostrano una certa selettività, seppure per pochi elementi fra quelli di interesse.
- A parità di substrato di crescita l'uso combinato dei diversi miceli assorbitori potrebbe permettere l'assorbimento selettivo almeno di platino palladio e ittrio.
- A seconda della soluzione impiantistica adottata i diversi miceli potrebbero essere utilizzati assieme o in sequenza.
- Merita attenzione anche la grandissima capacità estrattiva dell'argento mostrata dal *T. harzianum* in ambiente fortemente inquinato. Si tratta di valutare se la scarsa crescita del micelio sia in grado o meno di inficiare la resa del processo.
- La progettazione dell'impianto pilota suggerisce che si potrebbe ottimizzare e rendere maggiormente efficiente il processo, incrementandone la funzionalità e riducendone i costi. Alcune azioni come esempio:
  - diminuire le quantità delle sostanze nella soluzione di coltura o individuarne di altre al fine di rendere la preparazione della soluzione stessa maggiormente economica;
  - aumentare la quantità di RAEE tritato da alimentare alla fase di assorbimento: i test che sono stati svolti con tale obiettivo nella fase di ricerca di questo progetto hanno portato a

buoni risultati;

- valutare eventuali altre soluzioni, che a livello di laboratorio non sono realizzabili, ma che potrebbero possono essere facilmente applicate a livello industriale sia per ridurre i costi che l'impatto ambientale.

In conclusione, la prossima fase di questo studio dovrebbe essere la realizzazione e sperimentazione di un impianto

## V. Bibliografia

1. Forti, V.; Balde, C.P.; Kuehr, R.; Bel, G. *The Global E-Waste Monitor 2020: Quantities, Flows and The Circular Economy Potential*. 2020.
2. Yadav, A.N.; Singh, S.; Mishra, S.; Gupta, A. *Recent advancement in white biotechnology through fungi*; Springer, 2019.
3. Charter, L. *Leipzig Charter on sustainable European cities*. In *Proceedings of the European Conference of Ministers Re-sponsible for Spatial/Regional Planning, Resolution; 2007; Vol. 3*.
4. Dev, S.; Sachan, A.; Dehghani, F.; Ghosh, T.; Briggs, B.R.; Aggarwal, S. *Mechanisms of biological recovery of rare-earth elements from industrial and electronic wastes: A review*. *Chem. Eng. J.* 2020, 397, 124596.
5. Yu, Z.; Han, H.; Feng, P.; Zhao, S.; Zhou, T.; Kakade, A.; Kulshrestha, S.; Majeed, S.; Li, X. *Recent advances in the recovery of metals from waste through biological processes*. *Bioresour. Technol.* 2020, 297, 122416.
6. Zotti, M.; Di Piazza, S.; Roccotiello, E.; Lucchetti, G.; Mariotti, M.G.; Marescotti, P. *Microfungi in highly copper-contaminated soils from an abandoned Fe-Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation*. *Chemosphere* 2014, 117, 471–476.
7. Jakubiak, M., Giska, I., Asztemborska, M., Bystrejska-Piotrowska, G., *Bioaccumulation and biosorption of inorganic nanoparticles: factors affecting the efficiency of nanoparticle mycoextraction by liquid-grown mycelia of Pleurotus eringi and Trametes versicolor*. *Mycol. Progress.* 2013, 13, 525–532.