POLITECNICO DI TORINO
Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali

Tesi di Laurea Magistrale

Rivestimenti nanostrutturati per conferire proprietà antibatteriche a membrane per la filtrazione di acqua

Relatore universitario
Prof.ssa Cristina Balagna

Relatore aziendale – CRAB Medicina Ambiente
Dott. Chimico Alessandro Calogero

Candidato
Michela Toppan
S277758

Ottobre 2022

Indice

1 Introduzione 1
2 Ricerca bibliografica 3
3 Analisi sperimentale 11
3.1 Materiali e metodi 12
3.1.1 Materiali utilizzati 12
3.1.2 Tecnica di sputtering 14
3.1.3 Caratterizzazione morfologica, strutturale e composizionale (FESEM, EDS) 16
3.1.4 Test di antibattericità 16
3.1.5 Inoculazione su test di coltura - set up sperimentale per filtrazione 18
3.1.6 Spettrometria ICP-MS 22
3.1.7 Angolo di contatto 23
3.2 Risultati ottenuti e discussione 24
3.2.1 Deposizione dei rivestimenti sulle membrane 24
3.2.2 FESEM ed EDS 27
3.2.3 Test di antibattericità 34
3.2.4 Tecnica di filtrazione – inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa 38
3.2.5 Angolo di contatto 55
3.2.6 Sintesi e confronto dei risultati 57
4 Conclusioni 61
5 Riferimenti bibliografici 62
6 Ringraziamenti 64

1 Introduzione

La potabilità dell'acqua e la purificazione delle acque nei processi industriali sono trattamenti fondamentali per ottenere una riduzione degli impatti sull'ambiente e per fornire acqua potabile alla popolazione che risiede in quella determinata area. Per poter sottostare a specifici limiti dei parametri convenzionali delle acque di scarico, negli anni, sono state sviluppate diverse tecnologie di impianto.

Negli ultimi decenni, il rapido sviluppo dell'industria ha portato all'accumulo di ioni di metalli pesanti, coloranti, rifiuti farmaceutici, batteri ecc.

La rimozione di questi contaminanti è fondamentale nel trattamento delle acque reflue perché possono contaminare l'intera catena di approvvigionamento idrico: dai corpi idrici sotterranei naturali, all'acqua potabile e infine all'intero ecosistema.

L'utilizzo di filtri e membrane ha attirato molta attenzione proprio per la separazione selettiva, efficiente e affidabile dei contaminanti dell'acqua. Ciò ha anche permesso di consumare minore energia poiché i filtri sono più efficienti e ottenere una più bassa impronta di carbonio (carbon footprint).

I maggiori inquinanti sono composti organici nocivi e contaminanti microbici. Le nanoparticelle di Ag hanno ricevuto notevole attenzione in una varietà di applicazioni come in ambito elettronico, in applicazioni fotocatalitiche e antibatteriche. Rispetto ad altri tipi di nanoparticelle di metalli nobili come Au e Pt, quelle di Ag non solo mostrano una forte attività fotocatalitica ma anche una forte proprietà antibatterica per inibire la crescita di contaminanti microbici.

L'efficacia di un filtro o di una membrana è validata facendo passare attraverso il filtro una soluzione nota di batteri e verificando che i microrganismi non passino nel filtrato e quindi non siano presenti nella soluzione filtrata e verificando anche l'assenza degli stessi sulla membrana impiegata nell'esperimento.

Nel seguente elaborato si vogliono argomentare quali sono le tecniche di filtrazione dell'acqua tramite membrane. Nelle analisi sperimentali tali substrati sono stati trattati attraverso la tecnica di sputtering in modo tale da renderli antibatterici grazie alla deposizione di un rivestimento composito e da ridurre la carica batterica presente nella soluzione contaminata precedentemente preparata.

Attraverso l'utilizzo di differenti strumentazioni si procederà alla raccolta di dati che verranno analizzati e argomentati.

Gli impianti industriali posseggono impianti di depurazione e trattamento delle acque reflue che sono formati da filtri o membrane che permettono di trattenere i microrganismi e quindi di purificarle.

Per ottenere acque di alta qualità si possono usare membrane di microfiltrazione che rimuovono i microrganismi compresi i batteri ma possono essere utilizzate per vari scopi, ad es. per la decontaminazione e il riciclaggio delle acque di processo derivanti dall'industria.

Tale elaborato è nato dalla collaborazione tra il Gruppo Glance - DISAT del Politecnico di Torino e l'azienda CRAB Medicina Ambiente (Biella), nei quali ho svolto i test sperimentali che sono riportati nel capitolo "***3 - Analisi sperimentale***".

CRAB Medina Ambiente, di seguito CRAB, è un'impresa biellese facente capo all'Unione Industriale che eroga servizi organizzati ed integrati nell'ambito della sicurezza nei luoghi di lavoro ed impatto ambientale esterno. Oltre ad occuparsi di consulenza, CRAB svolge attività di formazione, per soddisfare le richieste delle imprese e per questo, è anche agenzia formativa accreditata dalla Regione Piemonte e certificata per la qualità (ISO 9001).

Inoltre, CRAB possiede un laboratorio interno che esegue analisi chimiche per le acque, per le emissioni in atmosfera e analisi microbiologiche accreditato ISO 17025.

In aggiunta offre consulenza anche nell'ambito dell'industria 4.0 e per il software gestionale "Keystone" di proprietà MINDSET che permette di gestire tutti gli aspetti di un'azienda secondo flussi predefiniti (salute e sicurezza, rischio chimico, formazione, qualità, sostenibilità, consumi, …).

Tale società di servizi ha definito l'assetto societario attuale, attraverso la fusione di CRAB SERVIZI AMBIENTALI e MEDICINA AMBIENTE, diventando sempre più un'impresa altamente competitiva nel suo ramo di attività al servizio delle imprese. CRAB Medicina Ambiente possiede due sedi, la principale sita in Biella e una succursale a Borgosesia.

Per la parte sperimentale dell'elaborato, l'obiettivo è testare il comportamento delle membrane polimeriche fornitemi, applicare uno specifico rivestimento al fine di valutare l'efficacia di filtrazione e la sua capacità antibatterica. Procedendo a tentativi e svolgendo in sequenza una serie di test è stato possibile ottenere dei risultati concreti e affidabili. Non sempre tali risultati sono stati positivi, infatti ho riscontrato anche dei "failure test", necessari a comprendere le reali potenzialità delle membrane polimeriche in esame.

2 Ricerca bibliografica

In questo capitolo verranno riportati in modo sintetico gli articoli ricercati in ambito filtrazione delle acque, i quali descrivono diversi metodi di analisi usando filtri o membrane di materiali con struttura differente. Il fine della ricerca bibliografica consiste nell'individuare altre combinazioni di filtri o membrane, con o senza rivestimenti, che associate ad analisi con svariate strumentazioni, permettano l'ottenimento di un filtro o di una membrana per la filtrazione delle acque reflue industriali.

I materiali polimerici maggiormente utilizzati e diffusi in questo campo sono [1]:

- poliacrilonitrile (PAN);
- policaprolattone (PCL);
- polivinilidenfluoruro (PVDF);
- polipropilene (PP);
- politetrafluoro etilene (PTFE);
- polietersulfone (PES);
- alcol polivinilico (PVA);
- cloruro di polivinile (PVC);
- poliammidi (PA).

Tali polimeri vengono utilizzati per la creazione delle membrane usate negli impianti di filtrazione delle acque di processo e soprattutto delle acque potabili. L'utilizzo di questi materiali si è sviluppato a seguito di quelli già maggiormente usati a base metallica [1].

I filtri sono nati proprio per ridurre, o ancor meglio azzerare, la concentrazione di ioni di metalli pesanti o di batteri di diversa natura presenti nelle acque da depurare.

Un classico impiego dei filtri è dato dalla riduzione di As(III) mediante nanofiltrazione (NF) o osmosi inversa (RO). In tale processo, il flusso naturale dell'acqua viene forzato attraverso una membrana, verso la soluzione più concentrata mediante una pressione idrostatica positiva che supera la pressione osmotica. La filtrazione con le tecniche appena citate non sempre è risultata efficiente, anzi Jahan et al. hanno riscontrato che, dopo accurati esperimenti, As(III) non viene trattenuto, ma è necessaria una fase di ossidazione intermedia da As(III) ad As(V) prima della rimozione da parte della membrana polimerica [1].

Sempre sull'utilizzo dell'osmosi inversa, gli stessi ricercatori hanno utilizzato un sistema di pompaggio che genera una pressione maggiore della pressione osmotica che si oppone, nel quale l'acqua viene spinta contro la membrana ed è costretta a migrare dalla fase più concentrata a quella più diluita [1].

Come ben noto, l'accumulo di ioni di metalli pesanti nel corpo umano può essere estremamente tossico o cancerogeno e questi ioni sono molto difficili da degradare.
Inoltre, nelle acque industriali possono essere presenti tracce di coloranti o ausiliari ampiamente utilizzati in molte industrie per tingere o finire materie prime e/o prodotti finiti. Dunque la necessità di rimuoverli dalla corrente principale per aumentare la percentuale di acqua recuperata è via via aumentata soprattutto negli ultimi anni con l'affermarsi e il progredire del concetto di sostenibilità e dell'apertura mentale a condurre una vita verso una riduzione dei consumi, tra cui il risparmio di acqua.

La grande quantità di colorante nelle acque reflue industriali, in base ai prodotti chimici utilizzati può essere più o meno pericolosa sia per gli organismi acquatici (prodotto chimico identificato con la frase di rischio: H410, H411, H412 e H413) che per l'uomo perché le molecole di colorante possono essere mutagene, cancerogene e allergiche per il corpo umano (frasi di rischio della serie H300).

Oltre all'osmosi inversa e alla nanofiltrazione, in base alla dimensione dei pori della membrana e alle caratteristiche di separazione, la tecnologia a membrana può essere anche suddivisa in osmosi diretta (FO), osmosi ritardata di pressione (PRO), distillazione a membrana (MD), microfiltrazione (MF), ultrafiltrazione (UF), bioreattore a membrana (MBR), separazione di gas (GS) e molte altre. Quelle riportate sono solo citate come esempio delle tecniche più valide maggiormente impiegate [2].

Per quanto riguarda la microfiltrazione (MF,) la membrana possiede una dimensione dei pori compresa tra 0,1 e 10 μm ed è efficace nella rimozione di batteri, particelle e contaminanti da una soluzione liquida. Le membrane di ultrafiltrazione (UF) con dimensioni dei pori comprese tra 0,01 e 0,1 μm possono respingere contaminanti inclusi virus, colloidi, oli emulsionati e proteine. Invece, una membrana di nanofiltrazione (NF) può rimuovere particelle di dimensioni comprese tra 0,001 e 0,01 μm, mentre le membrane ad osmosi inversa (RO) rimuovono particelle di dimensioni comprese tra 0,001 e 0,0001 μm.

In alternativa, per garantire determinate proprietà alla membrana, è possibile adsorbire carbone granulare o attivato in polvere, insieme ad adsorbenti a base di silice, allumina, zeoliti e ossido di metallo, proprio per rimuovere gli inquinanti emergenti negli impianti di acqua potabile, sebbene il consumo energetico e il costo degli adsorbenti siano molto elevati. A prova di quanto espresso Zhai *et al*. hanno testato queste combinazioni di materiali, alcuni dei quali sono stati sottoposti ad un processo di osmosi inversa [3].

Zhai *et al*. hanno composto un nuovo sistema di filtrazione efficiente ed efficace per il trattamento dell'acqua potabile e per il trattamento delle acque di fiume (RBF - Riverbank Filtration), chiamato One-Step Reverse Osmosis (OSRO). Il concetto OSRO combina il pretrattamento naturale e a basso costo dell'acqua di fiume, con un sistema di purificazione avanzato. Ciò permette di fornire una fonte d'acqua naturale continua con una qualità dell'acqua costante e una buona protezione dai contaminanti. Con la pre-rimozione di particelle, di materia organica, di microinquinanti organici e di microbi, RBF diventa un sistema ideale di purificazione basato su membrane ad osmosi inversa, rispetto al prelievo diretto da acque superficiali [3].

Il caso studio è stato sperimentato nei Paesi Bassi e lo svantaggio maggiore consiste nella precipitazione di $Fe(OH)_3$ dall'acqua di alimentazione che contiene sia Fe_2^+, sia O_2 che può seriamente ostacolare le prestazioni delle membrane ad osmosi inversa, rendendo necessaria una fase di pretrattamento aggiuntiva [3].

Dal punto di vista della gestione sostenibile delle risorse idriche e della garanzia di un approvvigionamento idrico adeguato, tale sistema è più conveniente rispetto ad altre opzioni, grazie al suo basso costo di rete, nella capacità di trattamento e nella gestione dei flussi di acqua potabile [3].

Dalla combinazione di più materiali, come l'utilizzo di un nanocomposito formato da nanoparticelle di Ag e PCBMA (Poli-carbossibetaina metacrilato) accoppiato ad a una membrana in PVDF, Li *et al*.

hanno svolto prove nel dettaglio per validare le loro capacità e comprendere i vantaggi ed impieghi di quest'altra tipologia di membrana. [4].

L'accoppiamento è stato ottenuto usando una tecnica di innesto di radicali liberi fisi-sorbiti e non di deposizione sputtering, tecnica impiegata nella sezione ***"3 – Analisi Sperimentale"***.

La morfologia e composizione della membrana sono state studiate attraverso le seguenti strumentazioni:

- FTIR-ATR;
- spettroscopia NMR - risonanza magnetica nucleare;
- ultrafiltrazione (UF);
- test antibatterici usando *Staphylococcus Aureus* ed *E. coli* identificati come batterio Gram positivo e Gram negativo per verificare l'attività antibatterica della membrana in PVDF attraverso il metodo di inibizione dell'area a contatto e attorno alla membrana.

Il polimero PCBMA possiede non solo caratteristiche idrofile ma anche proprietà antibatteriche e antimicrobiche. Dai test effettuati, Li *et al*. hanno ottenuto che la membrana PVDF-g-PCBMA/Ag ha mostrato una zona di inibizione significativamente più grande [4].

Come noto, le nanoparticelle di argento possiedono proprietà antibatteriche spinte ma paragonando la membrana in PVDF-g-PCBMA/Ag con le sole nanoparticelle di Ag hanno trovato che anche la membrana così composta risultava antibatterica e ciò ha dimostrato che il polimero PCBMA e le nanoparticelle di Ag hanno un effetto sinergico in termini di proprietà antibatteriche [4].

Tra le tecnologie per la filtrazione dell'acqua presenti sul mercato, ci sono anche quelle che sono formate da un filtro o membrana ottenuto tramite electrospinning, che è modificato attraverso l'uso di tecniche di deposizione su una o più facce, oppure è lui stesso un composito formato, ad esempio, da una matrice polimerica e da una fase di nanoparticelle di diversa natura [5].

L'origine dell'electrospinning come tecnica praticabile di filatura di fibre risale ai primi anni '30. Nel 1934 Formhals brevettò la sua prima invenzione relativa al procedimento e all'apparato per la produzione di filamenti artificiali mediante cariche elettriche.

L'utilizzo dell'electrospinning è diffuso come tecnica di formazione di membrane, impiegate anche nella rimozione di metalli pesanti [5]. Infatti la loro presenza nelle acque di scarico è un serio problema ambientale a causa dell'elevata tossicità e della caratteristica natura cumulativa di questi ioni negli organismi viventi.

Mishra *et al*. hanno formato un filtro in PCL con la tecnica di electrospinning. I materiali in nanofibra polimerica prodotti mediante electrospinning hanno un rapporto superficie-massa (o volume) estremamente elevato e una struttura porosa con un'eccellente interconnettività dei pori [2].

Un'indagine sugli effetti dei parametri di electrospinning sul diametro e sulla lunghezza della nanofibra ha mostrato che le nanofibre continue di PCL con diametri compresi tra circa 350 nm e 1 µm possono avere lunghezze di 35–50 cm e che la concentrazione di polimero, la tensione applicata e la dimensione dell'ugello hanno avuto effetti significativi sulla lunghezza massima, sul diametro e sull'uniformità della fibra filata [2].

Proseguendo, una volta creata la membrana si procede alla deposizione del rivestimento. Per quanto riguarda la tecnica impiegata, nella sezione "***3 - Analisi sperimentale***", viene descritta la tecnica di sputtering che impiega zirconia e nanoclusters di argento per la deposizione sul campione di analisi, mentre Görgün *et al*. hanno depositato, tramite magnetron sputtering, variante dello sputtering tradizionale, un ossido di rame sul substrato formato da nanofibre in PVDF-HFP create tramite electrospinning [6].

Il sistema, così composto, è stato usato per ridurre la percentuale di colorante presenti nelle acque di scarico industriali. Il test effettuato, che ha dimostrato l'efficacia della riduzione di colore, è stato svolto usando una soluzione di blu di metilene [6].

Nello sputtering magnetico, come si intuisce dal nome, si utilizzano magneti, posti sotto il target, con lo scopo di confinare maggiormente le particelle cariche (elettroni e ioni) in prossimità della superficie del materiale. In questo caso gli elettroni emessi dal target seguono un percorso più lungo, dettato dalle linee di campo del campo magnetico, incrementando notevolmente la possibilità di ionizzare gli atomi di Argon. È quindi possibile operare ad una minore pressione all'interno della camera con una deposizione molto più elevata.

I film ottenuti con il metodo dello sputtering magnetico mostrano prestazioni migliori rispetto ai film ottenuti con altri metodi di deposizione fisica, come il solution casting, l'electrochemical deposition, lo spray coating e la crescita sol-gel [6].

I principali svantaggi di queste tecniche, rispetto al magnetron sputtering, sono:

- distribuzione non uniforme sulla superficie;
- granulometria delle particelle e spessore del film non ridotti tanto quanto con lo sputtering tradizionale;
- capacità di penetrazione della tecnica di spruzzatura del magnetron sputtering superiore anche a causa della dimensione atomica delle particelle spruzzate [6].

In aggiunta l'attività dei fotocatalizzatori è stata monitorata mediante la decolorazione della soluzione di blu di metilene sotto la luce visibile. La concentrazione di blu di metilene è stata seguita dallo spettrofotometro UV visibile a 664 nm. I catalizzatori che sono stati prodotti con un rivestimento in Cu_2O a 100 nm, 200 nm e 300 nm, non hanno mostrato adsorbimento.

Görgün *et al*. hanno anche dimostrato che le strutture di nanofibre in PVDF-HFP sono prodotte con successo mediante la tecnica dell'electrospinning, riuscendo ad ottenere fibre molto fini, i cui diametri sono inferiori a 200 nm e rivestite in modo omogeneo con la tecnica dello sputtering magnetico [6]. Le membrane sono state caratterizzate mediante SEM, EDX e spettroscopia UV.

Invece, per quanto riguarda la contaminazione batterica e l'antibattericità del filtro, Ferraris *et al*. [7] hanno svolto prove impegnando diverse strumentazioni come lo sputtering, EDS, XPS, Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) e Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), alcune delle quali sono state utilizzate anche per la parte sperimentale di questo elaborato, come descritto nel capitolo ***"3 – Analisi sperimentale"***.

Ferraris *et al*. hanno depositato dei rivestimenti compositi di silice e nanoclusters d'argento mediante la tecnica di co-sputtering a radiofrequenza (RF), su diversi materiali tra cui vetro, ceramica, metallo e polimero. Hanno utilizzato questa tecnica di deposizione proprio per il fatto che

lo sputtering è estremamente versatile e adatto alla maggior parte dei substrati dato che non richiede temperature elevate che potrebbero diminuire le proprietà meccaniche dei materiali rivestiti [7].

Per quanto riguarda i substrati polimerici, è stata applicata la stessa tecnica di co-sputtering, tenendo conto della limitata resistenza termica di alcuni di essi come PP o PMMA [7].

La contaminazione batterica delle superfici è principalmente correlata alla formazione di biofilm, una complessa struttura 3D di microrganismi e materiale extracellulare che aderisce alle superfici solide e rende i batteri più resistenti agli agenti antimicrobici [7].

Il rivestimento composito è antibatterico nei confronti del ceppo di *Staphylococcus Aureus*, col quale è stato testato. Infatti Ferraris *et al*. hanno osservato la crescita dell'alone di inibizione ben visibile di circa 4-5 mm che si è formato attorno al rivestimento depositato e risulta leggermente ridotto dopo trattamento termico a 450°C [7].

In aggiunta, Ferraris *et al*. hanno affermato che le nanoparticelle d'argento di dimensioni inferiori hanno un comportamento antibatterico migliore a causa della loro elevata area superficiale, infatti quando la dimensione dei nanoclusters aumenta con la temperatura, l'efficienza antimicrobica si riduce di conseguenza.

La superficie del PMMA è stata studiata al FESEM, rivelando una morfologia porosa tipica della silice spruzzata con nanocluster di argento, visibili come punti luminosi. Mentre l'analisi EDS conferma la natura composita del rivestimento spruzzato, mostrando la presenza di Ag e di Si con un rapporto atomico Ag/Si di circa 0,3 [7].

La deposizione sputtering resta dunque una tecnica che viene utilizzata per svariate applicazioni. L'uso in ambito purificazione delle acque è solo uno dei tanti impieghi. Tra questi è presente anche quello che fornisce proprietà antibatteriche e di biocompatibilità anche in campo biomedicale e su tessuti in ambito tessile.

Prima che la membrana venga utilizzata nell'applicazione specifica, è bene che questa venga testata e controllata alle diverse strumentazioni che ne permettono un'analisi strutturale, morfologica e composizionale come ad es. FESEM, EDX, XPS. In alternativa è possibile utilizzare anche TEM, AFM secondo il fine della specifica ricerca [2].

In sintesi, per quanto riguarda l'antibattericità del filtro, è possibile svolgere un test per verificarla, utilizzando alcune piastre agar, un batterio specifico e un incubatore [8], tale analisi è stata svolta anche per la parte sperimentale di questo elaborato, come definito nel capitolo ***"3.1.4 - Test di antibattericità"***.

Yao *et al*. [8] hanno sintetizzato nuove membrane fibrose e ne hanno valutato le proprietà antibatteriche. Queste membrane sono costituite da nanofibre ibride composte da 3-glicidossipropiltrimetossisilano e nanoparticelle di gelatina di argento tramite un metodo combinato di riduzione in situ, via sol-gel ed electrospinning.

Quella che Yao *et al*. definiscono come "gelatina" è un biopolimero di derivazione naturale e mostra un'eccellente biocompatibilità e biodegradabilità. Contiene molti gruppi funzionali come gruppi

amminici e gruppi carbossilici e ha una forte affinità con le nanoparticelle di Ag. Inoltre, le nanofibre di gelatina sono state sintetizzate con successo attraverso la tecnica di electrospinning.

La proprietà antibatterica è stata testata con l'incubazione delle membrane ibride di nanofibre con il batterio *Escherichia Coli*. Quando esposte all' *E. Coli*, queste hanno mostrato una forte proprietà antibatterica e hanno fortemente inibito la crescita del batterio.

Dall'analisi XRD hanno riconosciuto i picchi caratteristici delle nanoparticelle di argento e hanno anche dimostrato un'azione fotocatalitica dopo incubazione con la soluzione a base di nonilfenolo (4-NP) e $NaBH_4$. Il nonilfenolo è stato selezionato come inquinante modello per dimostrare l'attività fotocatalitica delle nanofibre perché è uno degli inquinanti organici rappresentativi nelle acque reflue.

In sintesi le proprietà di tale membrana sono un'elevata antibattericità, l'attività fotocatalitica e la riciclabilità, mentre la struttura ottenuta si è presentata fibrosa e composta da numerose nanofibre [8].

Nello specifico, per la rimozione di batteri, funghi, protozoi e virus presenti nelle acque reflue, sono state messe in atto diverse tecnologie per poter risolvere questo problema, tra cui le tecniche di adsorbimento superficiale che utilizzano nano-adsorbenti a base di carbone attivo e biochar [9].

Le nanoparticelle di ossido di ferro inattivano *l'E. Coli*, mentre i coliformi, famiglia di batteri che è una delle principali cause di contaminazione dell'acqua, vengono comunemente rimossi dall'acqua utilizzando nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO), zeoliti o materiali zeolitici.
L'impiego delle zeoliti (soprattutto quelle a base di TiO_2) per la filtrazione dell'acqua a livello nanometrico è una risorsa estremamente versatile [9].

È stato studiato che i nanomateriali con una superficie più ampia hanno una maggiore risposta alle interazioni antimicrobiche. Le nanoparticelle metalliche come le nanoparticelle d'argento possono fornire prestazioni di rimozione più elevate nei confronti di *E. Coli*, *Salmonella Spp* [9].

Anche alcuni nanocompositi, come quello formato da polipropilene (PP) e TiO_2, possiedono proprietà antimicrobiche. Grazie alle capacità fotocatalitiche questo nanocomposito è stato utilizzato per la degradazione delle cellule microbiche. La presenza della titania fa aumentare la costante dielettrica del nanocomposito e proprio l'accoppiamento polimero-metallo permette la rimozione della maggior parte degli inquinanti microbici presenti nell'acqua [9].

Li *et al*. [10] si sono occupati di preparare 15 mezzi filtranti antibatterici per una migliore rimozione dei batteri dall'acqua piovana e di confrontarli. Le loro prestazioni sono state valutate nell'arco di 24 settimane in condizioni operative estreme.

I filtri a base zeolite, con l'aggiunta di composti del rame, hanno mostrato una robusta efficienza antibatterica. Quelle modificate con Cu_2^+ e $Cu(OH)_2$ hanno mostrato un'efficace rimozione dei batteri durante eventi umidi (a basso quantitativo di acqua), mentre quello con $Cu(OH)_2$ ha mostrato un'ottima stabilità durante i temporali. In particolare i filtri di zeolite, modificati con rame e carbone attivo granulare (GAC), sono stati preparati mediante impregnazione con Cu_2^+ e precipitazione in situ $Cu(OH)_2$ [10].

Tale zeolite così composta ha portato ad una riduzione di *E. Coli* entro 40 minuti dall'inizio del test, anche in presenza di altre unità microbiche naturalmente presenti all'interno dell'acqua piovana.
Mentre con le analisi al SEM hanno rivelato che la morfologia superficiale non è stata modificata in modo significativo dopo l'immobilizzazione con gli ioni rame.
Il precipitato sulla zeolite si è presentato uniforme e continuo, mentre quello sul GAC sembrava localizzato principalmente nei macropori [10].

La rimozione dei patogeni dagli scarichi delle acque piovane è di grande importanza per un'efficace raccolta delle acque stesse. I filtri, dopo la modifica con agenti antibatterici, possono potenzialmente migliorare l'efficienza di rimozione dei patogeni [10].

Un'altra applicazione, che non utilizza membrane, è data dall'impiego di microtubi in ceramica (zirconia), in particolare in zirconia stabilizzata con sesquiossido di ittrio (YSZ) [11].

Secondo quanto individuato da Kroll *et al.,* la preparazione dei microtubi di ZrO_2 è avvenuta per estrusione e hanno anche effettuato una modifica eterogenea della superficie dei microtubi in ceramica per contrastare la crescita microbica nei pori della membrana [11].

Anche altri ricercatori, come Cooper *et al*., hanno testato delle membrane, successivamente impiegate nella filtrazione, a base di chitosano e PCL, prodotte tramite electrospinning, con i seguenti batteri: *Pseudomonas Aeruginosa* (Gram negativo), *E. Coli* (Gram negativo) e *Staphylococcus Aureus* (Gram positivo) [12].

Cooper *et al*. hanno utilizzato proprio il chitosano per le proprietà antimicrobiche nei confronti di batteri, virus e funghi. In questo caso le membrane nanofibrose sono formate da fibre di chitosano-PCL con diametri di 200–400 nm e un contenuto di chitosano del 25%, 50% e 75% in peso [12].

In una serie di test effettuati per valutare l'antibattericità di questi substrati, c'è stata una riduzione significativa soprattutto nei confronti dello *S. Aureus*. Nei test di permeabilità all'acqua e rimozione delle contaminazioni in soluzione, le membrane fibrose con il 25% di chitosano hanno supportato un flusso d'acqua maggiore con la rimozione del 100% di particolato a 300 nm, pur mantenendo l'integrità della membrana mentre quelle con il 75% in peso di chitosano hanno maggiormente inibito la crescita delle colonie batteriche [12].

Sempre per valutare la risposta antibatterica di filtri, questa volta non polimerici, Mihut *et al*. hanno analizzato il comportamento di strutture flessibili costituite da sottili film metallici (rame, argento) depositati su filtri di carta a contatto con acqua contaminata [13].

I rivestimenti sono stati eseguiti a basse temperature utilizzando magnetron sputtering.
La morfologia superficiale del filtro è stata caratterizzata mediante microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione (SEM). I substrati fibrosi hanno mostrato un'ampia area di esposizione per i metalli ai batteri [13].

Lo spettrometro ad emissione di energia (EDS) è stato utilizzato per identificare la composizione chimica delle strutture.
L'analisi delle unità formanti colonie per *E. Coli* e coliformi totali, è stata fatta con un test su agar.

I rivestimenti in rame e argento hanno riportato elevate prestazioni antibatteriche [6]/[13], in particolare il rame mostra una maggiore efficacia rispetto all'argento. Il rame è un'alternativa preferibile all'argento poiché a basso costo [13].

Un'altra applicazione delle nanofibre ottenute da electrospinning nella purificazione dell'acqua è la membrana nanocomposita a film sottile (TFNC), un tipo importante di membrane per osmosi inversa (RO) e nanofiltrazione (NF), che è formata da tre strati: il primo strato barriera di polimerizzazione, una membrana elettrofilata in poliacrilonitrile o polifluoruro di vinilidene come secondo strato e come terzo strato, PET non tessuto [14].

Mentre la miscelazione è la strategia di incorporazione più utilizzata, le nanoparticelle metalliche e i composti di ammonio quaternario (QAC) sono gli agenti incorporanti più utilizzati nelle nanofibre elettrofilate rispettivamente per scopi di rimozione di batteri e virus [14].

Le nanofibre elettrofilate sono state impiegate come filtrazione dell'acqua per la desalinizzazione, la rimozione dei metalli, la filtrazione di materiali organici/microparticelle e la rimozione dei microbi.

Grazie alla sua stabilità chimica e alle eccellenti proprietà di resistenza agli agenti atmosferici, il poliacrilonitrile (PAN) è il polimero più utilizzato per la produzione di nanofibre elettrofilate nelle applicazioni di filtrazione dell'acqua [1].

In conclusione la morfologia porosa interconnettiva e i nanopori delle membrane elettrofilate sono caratteristiche perfette per i processi di filtrazione di liquidi a pressione come la microfiltrazione, l'ultrafiltrazione, la nanofiltrazione e l'osmosi inversa. Diversi fattori tra cui area superficiale, rugosità superficiale, diametro dei pori e inclusione di agenti antibatterici o biocidi determinano le prestazioni antimicrobiche della membrana.

Infine non esistono metodi standard unanimi per valutare il potenziale antibatterico o antivirale dei filtri per la disinfezione dell'acqua. Le tecniche di analisi e i substrati impiegati come filtri o membrane sono in fase di studio ancora oggi.

"Non il possesso della conoscenza, della verità irrefutabile, fa l'uomo di scienza, ma la ricerca critica, persistente e inquieta, della verità."
Karl Copper

3 Analisi sperimentale

In questo capitolo sono riportati e descritti i diversi test effettuati presso il Politecnico di Torino e l'azienda CRAB Medicina Ambiente che hanno permesso l'ottenimento di risultati concreti, attendibili e dimostrabili, come riportati nella sezione "***3.2 – Risultati ottenuti e discussione***".

Le prime analisi svolte per la preparazione del campione sono state effettuate presso i laboratori del dipartimento DISAT del Politecnico di Torino. In questa sede ho preparato, seguita dalla Professoressa Cristina Balagna e dalla dottoranda Angelica Luceri, il substrato tramite la deposizione sputtering di un rivestimento composito di nanoclusters di argento (Ag) in una matrice di zirconia (ZrO_2).

I due substrati di materiale polimerico (PCL e PAN+PCL) sono stati gentilmente forniti a scopo di studio da una azienda terza (Nanofaber S.r.l.) che collabora con il Gruppo Glance-DISAT del Politecnico di Torino e sono stati trattati prima nei suoi laboratori e solo successivamente, una volta effettuata la deposizione e il taglio dei campioni, sono stati trasferiti, presso il laboratorio chimico e microbiologico di CRAB Medicina Ambiente, in appositi contenitori, che li hanno protetti da ulteriori contaminazioni provenienti dall'ambiente esterno.

Al Politecnico di Torino ho svolto la deposizione sputtering, i test alle strumentazioni FESEM e EDS, i test di antibattericità e il calcolo dell'angolo di contatto.

Presso CRAB, seguita dal dottor chimico Alessandro Calogero, responsabile del laboratorio, e dalla biologa Giulia Caso, ho effettuato il test di inoculazione su terreno di coltura attraverso l'applicazione della tecnica di filtrazione della soluzione contaminata. In seguito le soluzioni sono state analizzate con la spettrometria di massa a plasma accoppiato (ICP-MS), per valutare l'eventuale rilascio ionico dal substrato polimerico.

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Materiali utilizzati

I materiali usati sono due membrane, una in policaprolattone (PCL), e una composta da poliacrilonitrile al 70% e PCL al 30% (PAN/PCL).

La membrana in PAN/PCL, è stata realizzata da parte di Nanofaber, per unire le proprietà microstrutturali del PCL e le proprietà fisiche del PAN.

Entrambe le membrane sono di color bianco (*Figura 1*) e hanno uno spessore compreso nel range di 40 - 140 µm prodotte tramite la tecnica di electrospinning creando una struttura tridimensionale a rete di fibre, non tessuta.

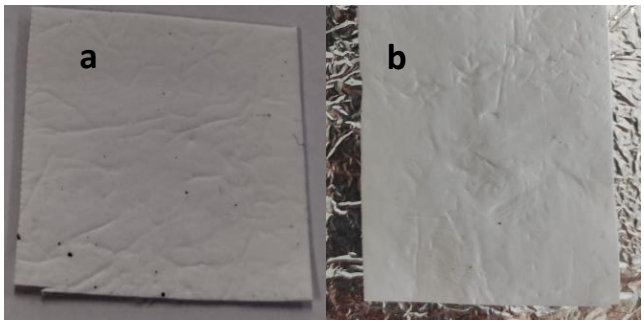


Figura 1 –
a) Membrana in PAN/PCL tal quale
b) Membrana in PCL tal quale

Il termine electrospinning cioè "elettrofilatura" deriva da "filatura elettrostatica". La soluzione polimerica viene sottoposta a un campo elettrico per formare filamenti polimerici all'interno di elettrodi di cariche opposte.

L'electrospinning è un processo produttivo per la produzione di fibre con diametri estremamente ridotti, tipicamente inferiori al micron, fino a pochi nanometri. In termini di versatilità del processo, questa tecnica consente la fabbricazione di fibre in modo continuo a partire da fusi polimerici che sono portati ad uno stato fluido ad alta viscosità attraverso il rammollimento tramite calore.

Nel fuso di partenza possono essere aggiunte anche particelle ceramiche, nanoparticelle metalliche o molecole funzionalizzate col fine di conferire alla fibra finale particolari proprietà utili in applicazioni altamente specializzate.
Nel caso in esame i filtri usati per gli esperimenti non sono stati prodotti con l'inserimento di altre nanoparticelle all'interno del fuso polimerico.

L'allungamento del fuso polimerico avviene grazie ad un campo elettrostatico esterno e mediante l'applicazione di alte tensioni.

La dimensione media della fibra dipende dalla viscosità del fuso polimerico, secondo quanto definito dalla reologia del polimero stesso.

Dai fogli forniti sono stati ricavati dei filtri di forma circolare o rettangolare in modo tale da possedere una luce di passaggio di circa 2 cm, così preparati per il test specifico di filtrazione. Nelle prime prove i filtri usati avevano forma circolare con diametro di circa 2,5 cm. Successivamente per avere maggiore superficie a disposizione e per restare più lontano dai bordi, che sono le zone di maggiore difettosità, sono stati tagliati con una forma rettangolare per ridurre il danneggiamento del filtro a causa del taglio.

I filtri non hanno dei pori ben definiti e di forma circolare, proprio perché essendo stati preparati attraverso la tecnica dell'electrospinning, è l'intreccio delle fibre stesse a generare dei vuoti, la cui dimensione è altamente variabile.
Nei capitoli: "***3.2.2 - FESEM ed EDS"*** e "***3.2.6 - Sintesi e confronto dei risultati***" verrà trattato più nel dettaglio come le fibre sono intrecciate.
In seguito sono riportati i codici e composizioni dei campioni analizzati.

Il campione in PAN/PCL ha i seguenti riferimenti:

codice: 22006-PP
composizione: PAN/PCL - 70/30
UR (umidità relativa): 35%

Il campione in PCL ha i seguenti riferimenti:

codice: 22007 – PCL
composizione: PCL 12%wt
UR (umidità relativa): 27-28%

Per praticità i campioni analizzati sono stati nominati attraverso una specifica codifica, in base a quanto riportato nella seguente tabella (*Tabella 1*):

Tabella 1 - Codifiche dei campioni

CAMPIONE	CODIFICA
PCL tal quale/bianco	PCL
PCL con sputtering di ZrO_2-Ag con potenze di 250 - 4W per 10 min	PCL_ZrO_2-Ag_10
PCL con sputtering di ZrO_2-Ag con potenze di 250 - 4W per 20 min	PCL_ZrO_2-Ag_20
PCL con sputtering di Ag con potenze di 250 - 4W per 10 min	PCL_Ag_10
PAN/PCL tal quale/bianco	PAN+PCL
PAN/PCL con sputtering di ZrO_2-Ag con potenze di 250 - 4W per 10 min	PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10
PAN/PCL con sputtering di ZrO_2-Ag con potenze di 250 - 4W per 10 min	PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20

Per motivi di praticità, in seguito nell'elaborato verranno usati gli acronimi per identificare i campioni. I parametri di processo sono spiegati al capitolo ***"3.1.2 – Tecnica di sputtering"***.

Invece solo i filtri PAN+PCL e PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 sono stati coinvolti nei test con un campione di acqua di scarico di un lanificio che ha al suo interno anche il reparto di finissaggio e di tintoria, per poter valutare la possibile differenza tra il filtro tal quale e quello con la deposizione, come definito nel capitolo ***3.2.4 – Tecnica di filtrazione – inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa".***

3.1.2 Tecnica di sputtering

Le membrane polimeriche costituite da PAN e PAN/PCL sono state rivestite con un rivestimento nanostrutturato composito formato da una matrice di zirconia con dispersi all'interno nanoclusters di argento.

La tecnica utilizzata è quella del co-sputtering (*Figura 2*) che permette la deposizione di rivestimenti anche su materiali termosensibili come le membrane polimeriche andando ad ottimizzare i parametri di processo.

Le deposizioni sono state effettuate per tempi brevi (10 e 20 min) in modo da evitare il deterioramento del substrato dovuto al vuoto in camera e al surriscaldamento del substrato stesso durante il processo.

Figura 2 - Sputtering

Gli atomi depositati sono stati rilasciati da due target, uno in argento e uno in zirconia che sono inseriti nei rispettivi catodi (*Figura 3*).

Sulla camera a vuoto si affacciano i 3 catodi (*Figura 3*), di cui uno è stato spento e protetto poiché non necessario per la deposizione e i target sono confocali al centro.

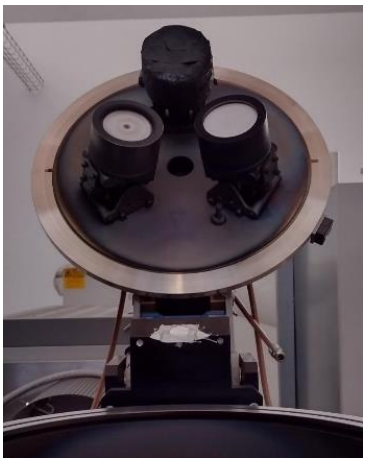


Figura 3 – In evidenza i 3 catodi presenti sul coperchio di chiusura della strumentazione

Come gas per la generazione del plasma, all'interno della camera di sputtering, è stato usato argon. Per questa tecnica di deposizione si potrebbero impiegare anche altri gas ma i vantaggi dell'utilizzo dell'argon sono di gran lunga maggiori infatti, il basso costo, la disponibilità, la dimensione, la sua alta massa atomica permettono di raggiungere un'efficienza di estrazione più elevata.

Oltre ad una bombola di Ar, allo sputtering sono anche collegate due pompe a vuoto:

- turbomolecolare con valvola (questa pompa raggiunge un vuoto di circa 10^{-5} mbar ma può arrivare anche a valori di vuoto di circa $10^{-6}/10^{-7}$ mbar). La velocità è di 800 Hz cioè 800 giri/s. Con questa pompa le particelle tendono ad uscire e grazie alla posizione delle eliche non riescono più a rientrare nel condotto, direzionandosi verso il substrato;
- rotativa con valvola collegata attraverso una tubazione in acciaio inox (raggiunge un vuoto di circa $10^{-2}/10^{-3}$ mbar). Questa valvola mette in comunicazione la pompa rotativa con la camera di sputtering.

Sul fondo della camera di sputtering è presente un portacampione in rame che durante la misura è posto in rotazione per aumentare l'omogeneità della deposizione.

In più sono presenti 3 sensori di pressione che sono dei sensori di vuoto:

- Full range – misura da P amb a P minima
- Pirani – usato per pressioni più basse
- Baratron – usato per pressioni ancora più basse

Il primo target è alimentato in radiofrequenza (RF), ed è usato per ospitare materiali non conduttivi, nel caso in esame zirconia ZrO_2 (*Figura 4*).

Invece nel secondo target è stata inserita la piastra di materiale conduttivo, nel caso in esame abbiamo utilizzato argento. Quindi abbiamo messo Ag in DC (direct current) e ZrO_2 in RF.

Per entrambe le deposizioni (10 o 20 min) sono stati applicati 250 W al catodo in zirconia e 4W a quello in argento.

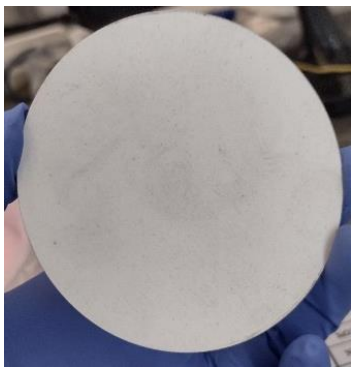


Figura 4 – Target in zirconia

La potenza in Watt da applicare è impostata secondo una scala crescente all'aumentare dei minuti, nello specifico da un valore di 50 W fino a 250 W per evitare lo shock termico che può danneggiare i campioni se termosensibili. Invece servono circa 30 minuti per permettere alla camera di raggiungere il livello di vuoto desiderato.

Di importante rilevanza è necessario sottolineare che abbiamo ottimizzato i parametri di processo, dato che i substrati sono termosensibili e di ridotto spessore. Nella prima prova svolta, il tempo di raffreddamento non è stato sufficientemente lungo da impedire l'accartocciamento dei bordi del filtro, sia per il PCL che, in misura più lieve, per il PAN+PCL. Ciò verrà descritto nel dettaglio nel capitolo ***"3.2.1 - Deposizione dei rivestimenti sulle membrane".***

3.1.3 Caratterizzazione morfologica, strutturale e composizionale (FESEM, EDS)

Una volta effettuata la deposizione, i campioni (PCL, PCL_ZrO_2-Ag_10, PCL_ZrO_2-Ag_20, PAN+PCL, PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10, PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20) sono stati analizzati al microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FESEM) e attraverso la spettroscopia ad analisi dispersiva (EDS).

La morfologia superficiale delle membrane tal quali e delle membrane rivestite è stata osservata con il FESEM invece grazie all'EDS si ricava la composizione elementare dei campioni in particolare la % atomica degli elementi principali (Ag, Zr, C, O). L'analisi viene eseguita a bassi ingrandimenti su tre aree per ottenere valori validi da un punto di vista statistico.

3.1.4 Test di antibattericità

Per testare l'efficacia del rivestimento da un punto di vista antibatterico sono stati effettuati preliminarmente dei test qualitativi di alone di inibizione, nei confronti di due ceppi batterici, *S. Epidermidis* e *E. Coli*, seguendo un protocollo standard [NCCLS M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests" (Approved Standard, 9th Edn, NCCLS, Villanova, PA, USA 2003)].

Lo scopo dell'alone di inibizione è quello di valutare l'effetto antibatterico da un punto di vista qualitativo del rivestimento rispetto alla membrana tal quale.
La presenza dell'alone stabilisce la capacità della membrana di inibire la crescita batterica e maggiore è il raggio dell'alone, maggiore è l'effetto antibatterico del rivestimento.

La soluzione fisiologica contaminata da batteri è stata preparata grazie all'utilizzo di 2 piastre di agar sangue sulle quali sono state fatte crescere delle colonie di *S. Epidermidis* per il primo ciclo di esperimenti su una piastra, e di *E. Coli* per il secondo ciclo, sull'altra (*Figura 5*).

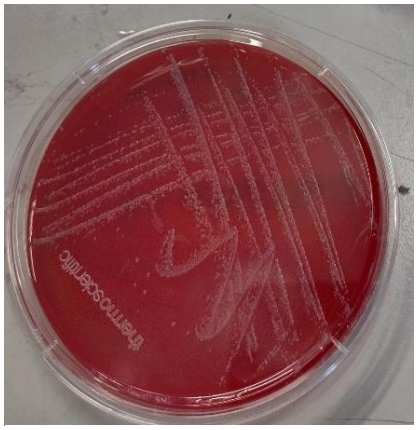


Figura 5 – Piastra di agar sangue con crescita di colonie batteriche di S. Epidermidis

Per la preparazione della piastra di Agar selettive - Mueller Hinton abbiamo utilizzato un brodo nutriente al quale sono state aggiunte poche colonie batteriche, prelevate a mano a mano tramite un cottonfioc dalla piastra di agar sangue, per raggiungere un determinato valore di 10^8 CFU/ml che soddisfa i criteri dello standard di prova utilizzato.

Per il calcolo dell'indice di McFarland bisogna confrontare i valori ottenuti tra la soluzione fisiologica e la soluzione batterica.
Per lo standard della prova, bisogna raggiungere un valore finale di 0.5 letto a schermo, partendo da un valore di 0.0 per la sola soluzione fisiologica. Il valore di 0.5 corrisponde ai 10^8 CFU/ml (*Figura 6*).

Figura 6 – Fotometro e banco di lavoro sotto cappa

Una volta raggiunto il valore di 0.5, è stato imbevuto un cottonfioc all'interno della soluzione contaminata e si è spatolata la

soluzione sulla piastra Agar selettive - Mueller Hinton, facendo attenzione a coprire in modo omogeneo tutta la superficie, compresi i bordi più esterni della piastra.

A questo punto con una pinzetta sono stati prelevati i campioni e depositati con la faccia della deposizione a contatto con l'agar, cercando di deporli a distanza sufficiente uno dall'altro per evitare la sovrapposizione degli aloni di due campioni vicini.

Abbiamo messo i campioni composti dallo stesso polimero PCL in una piastra agar mentre quelli in PAN+PCL nell'altra con l'obiettivo di appoggiare vicini i due campioni con la deposizione da 10 minuti, poi i due campioni da 20 min e infin il solo campione tal quale.

Una volta preparate le piastre, queste sono state poste in incubatore per 24 h a 35°C. Dopo le 24 h di attesa sono state prelevate dall'incubatore e visualizzate. Grazie alla crescita uniforme, a film dei batteri, è stato possibile visualizzare l'alone antibatterico formato.

Dal test è stato possibile confrontare come cambia la dimensione dell'alone antibatterico da campione a campione in base al differente tempo di deposizione. Per ipotesi è stato formulato che i campioni senza rivestimento possiedono un alone antibatterico quasi inesistente, mentre quelli con il massimo tempo di deposizione, un alone molto evidente e più largo in diametro.

I risultati sono descritti e riportati al capitolo "***3.2.3 – Test di antibattericità***".

3.1.5 Inoculazione su test di coltura - set up sperimentale per filtrazione

Per la tecnica di filtrazione e inoculazione su test di coltura è stato messo a punto un set up sperimentale adatto a tale serie di test (*Figura 7*). Tale strumentazione ha permesso di valutare l'effetto del rivestimento sulla filtrazione delle membrane in termini di proliferazione batterica sulla superficie della membrana stessa e di presenza di batteri nella soluzione filtrata.

La strumentazione è composta da una serie di elementi:

- Imbuto di filtrazione (parte in alto della *Figura 7*);
- Contenitore di raccolta (parte sottostante);
- Bottiglia di pirex sterile (messa dentro al contenitore di raccolta);
- Pompa a vuoto (a 40 KPa – 400 mbar);
- Pinza per chiudere e fissare il filtro tra il contenitore di raccolta e l'imbuto di filtrazione;
- Cappa a flusso laminare (Bio Activa VE – cabina di sicurezza contro i rischi biologici – Classe II tipo A/B3).

Figura 7 – Set up sperimentale impiegato nei test di filtrazione

Il test si suddivide nei seguenti passaggi fondamentali:

- filtrazione (attraverso l'utilizzo della strumentazione sopra descritta);
- inoculazione (prelievo di un piccolo quantitativo di soluzione contaminata da batteri e sparsa sulla piastra contenente il terreno di crescita);
- incubazione a 30°C (nell'incubatore);
- conteggio delle colonie cresciute (CFU- unità formanti colonia) dopo 24 h su tutte le piastre create.

Il terreno di coltura (agar) usato è il Tryptic Soy Agar (TSA) (EP) [15] con la seguente composizione:

- Peptone da caseina: 15.0 [g/l]
- Peptone di soia: 5.0 [g/l]
- Cloruro di sodio: 5.0 [g/l]
- Agar: 15.0 [g/l]

La soluzione è stata preparata in laboratorio con acqua arricchita con composizione particolare. Il diluente usato è il Maximum Recovery Diluent (MRD-3X3 L) [16] con le seguenti caratteristiche:

- Peptone: 1.0 [g/l]
- Cloruro di sodio: 8.5 [g/l]

È un diluente isotonico per il massimo recupero di microrganismi stressati secondo gli standard ISO.

Per ogni ciclo di test, anche in base al batterio impiegato, è stata preparata una bottiglietta da 100 ml. I batteri utilizzati sono di tre famiglie differenti:

- **famiglia *Bacillaceae***
  Nome completo: *Bacillus Subtilis Subsp. Spizizenii* [17]
  Dimensione batterio: 0,4 – 0,5 µm
  Gram positivo

- **famiglia *Listeriaceae***
  Nome completo: *Listeria Monocytogenes* (serotype 4b) [18]
  Dimensione batterio: 1 µm
  Gram positivo

- **famiglia *Enterobacteriaceae***
  Nome completo: *Escherichia Coli* [19]
  Dimensione batterio: 1-2 µm
  Gram negativo

Il *Bacillus Subtilis Subsp. Spizizenii,* di seguito *Bacillus,* genera una colonia di medie dimensioni, con bordo largo, irregolare, piatto, ondulato, grigio e rugoso. Da questo batterio possono comparire beta emolisi e le colonie visualizzate su piastra agar, possiedono una leggera colorazione gialla.

La *Listeria Monocytogenes* possiede un tipo di colonia grande, circolare, rialzata con un doppio bordo, uno intero e l'altro eroso, pallido, bianco, luccicante, debolmente beta emolitico.

Il batterio *L. Monocytogenes* è stato ottenuto da una pallina rossa precedentemente contaminata e che, di seguito, è stata immersa nel diluente. Dopo 24 ore è stato prelevato circa 1 cl e diluito con acqua distillata attraverso una diluizione 1:100 che consiste in 1ml di soluzione madre (listeria) con 99 ml di acqua distillata.

Invece il batterio *E. Coli* è l'unico batterio Gran negativo che è stato impiegato per l'esecuzione dei test, necessari a valutare la validità della filtrazione. Gli altri batteri, *Bacillus* e *L. Monocytogenes*, sono Gram positivi.

L'*E. Coli* possiede una colonia piccola e circolare mentre, al microscopio, ha una figura leggermente allungata.

La differenza principale tra Gram positivo e Gram negativo sono principalmente strutturali e riguardano le diverse componenti della parete cellulare che le avvolge. Oltre a questa differenza, spesso sono distinti anche in base alla patogenicità e al meccanismo di azione nelle cellule bersaglio.

In sintesi i batteri Gram positivi hanno una parete cellulare ricca di peptidoglicano presente in alte quantità a formare il primo strato esterno che è composto anche da diversi acidi sottoforma di catena incastonata nello strato, mentre quello più interno è formato da una membrana plasmatica.

Mentre il batterio Gram negativo è composto da una membrana esterna (composta da un doppio strato di fosfolipidi e lipopolisaccaridi), seguita da uno strato di peptidoglicano di dimensione ridotta rispetto a quello del Gram positivo. Infine è ancorato verso l'interno ad una membrana plasmatica. Infatti a livello strutturale i batteri Gram negativi sono più complessi dei Gram positivi.

I batteri, *Bacillus* ed *E. Coli*, per gli esperimenti, sono stati ottenuti da piccole sferette, MICROBANK™, con una certa porosità, che attraverso un trattamento precedente hanno incastonato nei loro pori, il batterio. Tale pallina immersa nei 100 ml di soluzione, ha permesso il rilascio dei batteri nella soluzione stessa. Dopo qualche minuto è stato possibile utilizzare la soluzione così preparata per poter svolgere i test.

Le sferette MICROBANK™, conservate in Microbank Storage Box, cioè in un sistema per il mantenimento e il trasporto dei ceppi microbici, possiedono una porosità tale da permettere ai microrganismi di aderire prontamente sulla superficie sferica. Per una conservazione prolungata, dopo inoculazione, le provette Microbank™ sono mantenute a -70°C. Quando è necessario disporre di una coltura fresca, una singola sferetta può esser facilmente rimossa dalla provetta e usata direttamente per inoculare il terreno adatto [20].

Sono stati effettuati i seguenti test nell'ordine riportato in seguito:

- PCL
- PCL_ZrO_2-Ag_10
- PCL_ZrO_2-Ag_20
- PAN+PCL
- PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10
- PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20

Tali test sono stati ripetuti per i tre batteri (*Bacillus Subtilis Subsp. Spizizenii, Listeria Monocytogenes, E. Coli)*.

Per il test sono state utilizzate tre piastre agar:

1. la prima per verificare che la soluzione usata sia stata veramente contaminata andando a spatolare 100 µl di soluzione contaminata;
2. la seconda, nella quale abbiamo spalmato 100 µl di soluzione filtrata;
3. la terza, per depositare il campione una volta che è stato sottoposto a filtrazione.

In seguito le tre piastre agar preparate sono state fatte riposare per almeno 24 ore in incubatore a 30°C, presso il laboratorio chimico e microbiologico di CRAB Medicina Ambiente.

In conclusione sono stati aggiunti due test con una soluzione contaminata e uscente da un impianto di depurazione industriale di un lanificio tessile. I campioni utilizzati sono descritti al capitolo ***"3.1.1 - Materiali utilizzati".***

Non conoscendo nel dettaglio la composizione dell'acqua di scarico ma sapendo i processi svolti dall'azienda in questione e provenendo da un finissaggio e tintoria in pezza, il campione può risultare attendibile. Tale campione è stato analizzato anche all'ICP-MS per valutarne la composizione e la concentrazione dei diversi metalli presenti in soluzione.

Il dettaglio è descritto al capitolo **"*3.2.4 – Tecniche di filtrazione – inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa***".

3.1.6 Spettrometria ICP-MS

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) (*Figura 8*), in inglese Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, è una tecnica che ha permesso di analizzare le soluzioni ottenute a seguito della filtrazione, in particolare si è voluto rilevare la concentrazione di Ag e Zr in soluzione.

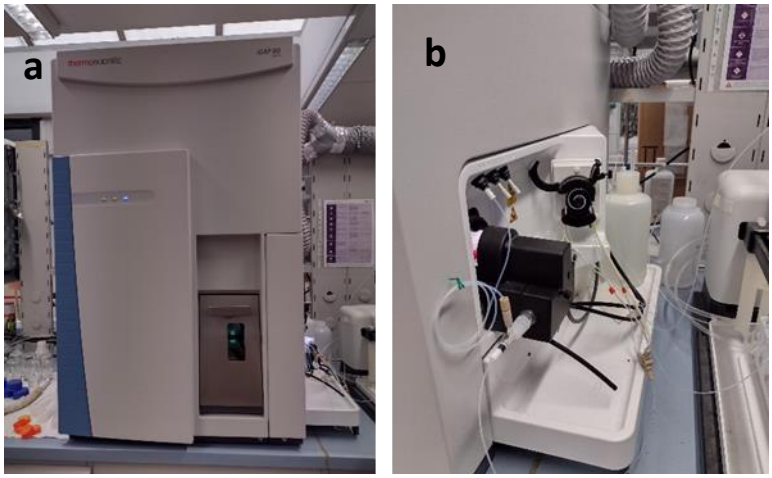


Figura 8 – ICP-MS
a) Immagine frontale dello strumento
b) *Sezione laterale di collegamento della soluzione da analizzare*

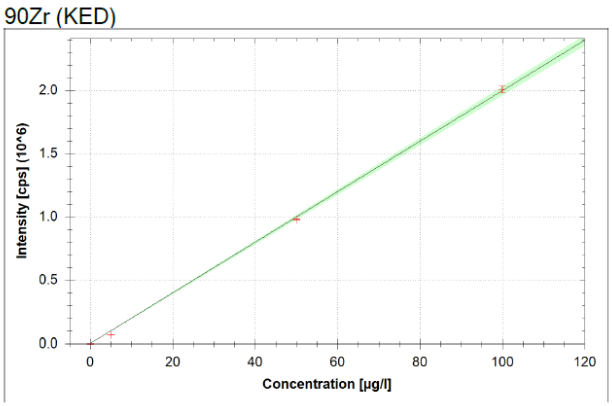
Il valore misurato, al di sotto dei 5 µg/l, è considerato ND – not detected – quindi i valori misurati di Ag o Zr che sono al di sotto dei 5 µg/l, stanno a significare che il rivestimento non ha rilasciato ioni in soluzione e quindi che questo resiste bene al processo. Mentre valori superiori a 10 µg/l indicano un leggero rilascio in soluzione e valori superiori a 50 µg/l un elevato rilascio.

Per poter calibrare in modo adeguato i valori, è necessario generare una curva di taratura prima di sottoporre ad analisi i campioni.

La curva di taratura è un'analisi di tipo quantitativo che permette di tracciare una retta in base alla concentrazione di un determinato composto in più soluzioni proprio per la valutazione della concentrazione di un analita in un campione incognito.

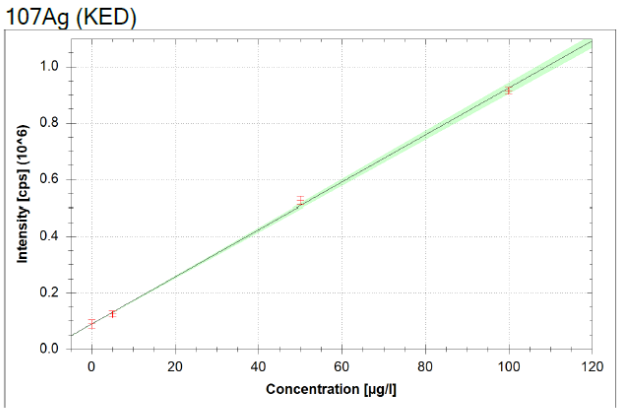
La curva di taratura si crea attraverso un'analisi degli standard di riferimento dai quali vengono rilevati i punti:

- limit of quantification (LOQ) - limite di quantificazione
- limit of detection (LOD) - limite di rilevabilità
- un terzo punto a più alta concentrazione per validare anche i valori ad alta concentrazione.



f(x) = 19967.6379*x + 1187.3816
R^2 = 0.9994
BEC = 0.059 µg/l
LoD = 0.0128 µg/l

Grafico 1 – Curva di taratura Zr



f(x) = 8354.7803*x + 89012.2764
R^2 = 0.9989
BEC = 10.654 µg/l
LoD = 5.2779 µg/l

Grafico 2 – Curva di taratura Ag

La curva di calibrazione è il grafico di come la risposta strumentale cambi al variare della concentrazione dell'analita (*Grafico 1*, *Grafico 2*).

3.1.7 Angolo di contatto

Per testare la natura idrofila/idrofoba del campione e del rivestimento sul substrato è stata svolta un'analisi del calcolo dell'angolo di contatto.

La strumentazione utilizzata nel laboratorio del Politecnico di Torino (*Figura 9*) ha permesso di poter valutare e confrontare i diversi angoli Θ ottenuti.

Per tale valutazione sono stati testati 6 diversi filtri:

- PCL
- PCL_ZrO_2-Ag_10
- PCL_ZrO_2-Ag_20
- PAN+PCL
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

I campioni, uno alla volta sono stati posizionati sul portacampione, grazie all'impiego di una siringa con un ago apposito, è stato possibile far cadere sul filtro una goccia di acqua distillata (*Figura 10*).

A questo punto, dopo aver posizionato correttamente i marker per l'identificazione del piano, è stata fatta partire la misura. I valori sono stati letti a schermo e sono state ottenute delle immagini significative, riportate al capitolo "***3.2.5 – Angolo di contatto***".

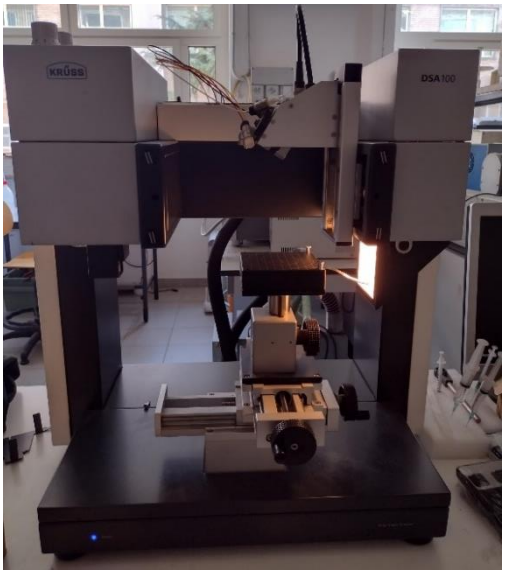


Figura 9 – Strumentazione KRUSS DSA 100 per il calcolo dell'angolo di contatto

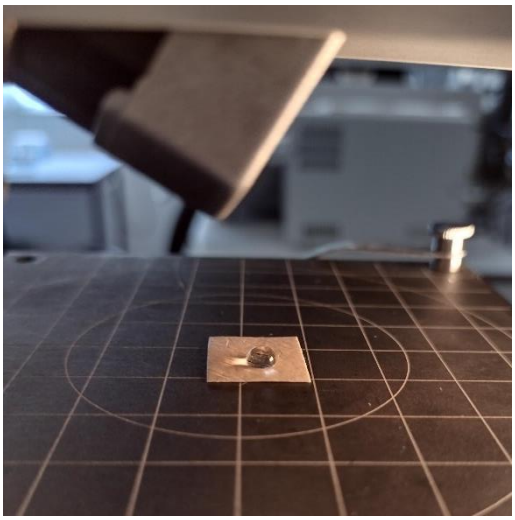


Figura 10 – Goccia di acqua distillata fatta cadere sul filtro in PCL per il calcolo dell'angolo di contatto

3.2 Risultati ottenuti e discussione

3.2.1 Deposizione dei rivestimenti sulle membrane

I filtri in PAN/PCL e PCL sono stati rivestititi da un rivestimento composito costituito da una matrice di zirconia e nanocluster di argento, ben dispersi nella matrice. Il rivestimento è stato depositato via co-sputtering.

In *Figg. 11 e 12* si riportano le fotografie dei campioni dopo la deposizione del rivestimento. Il rivestimento comporta una modifica del colore che da bianco, tende a diventare marrone scuro.

Figura 11 – Membrana PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10
a) lato con la deposizione
b) lato senza deposizione

In particolare, si è notato che la membrana in PAN+PCL (*Figura 11*) cambia il colore solo sul lato rivestito mentre la faccia non rivestita rimane bianca.

Il campione in PCL invece, non presenta una differenza sostanziale di colore tra il lato depositato e quello tal quale (*Figura 12*).

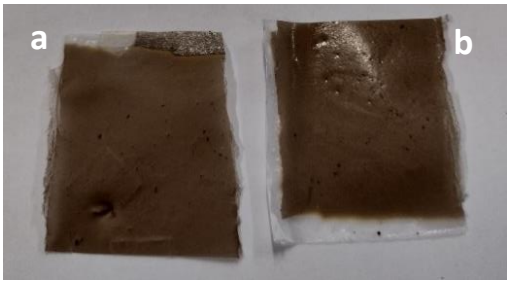


Figura 12 – Membrana PCL_ ZrO_2-Ag_10
a) lato con la deposizione
b) lato senza deposizione,

Sono riportate le fotografie al termine del primo ciclo di test allo sputtering:

Figura 13 – Membrana PCL_ZrO_2-Ag_20 sul portacampione in uscita dallo sputtering

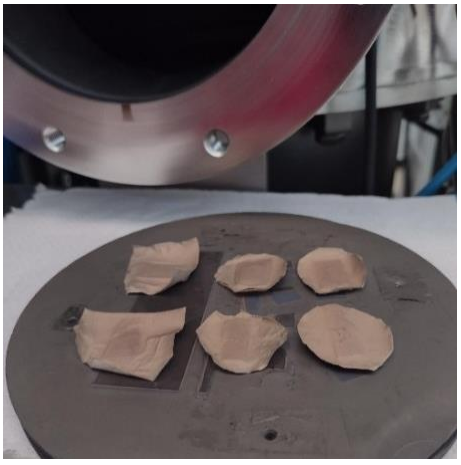


Figura 14 – Membrana PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20 sul portacampione in uscita dallo sputtering

È stato verificato che il PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Figura 13*) a seguito della deposizione si è accartocciato, invece i campioni PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Figura 14*) non hanno riscontrato questa problematica.

A seguito di questi risultati si è deciso di svolgere un altro ciclo di test allo sputtering sugli stessi substrati ma lasciandoli in camera di deposizione solo per 10 minuti.

Da entrambi i substrati si è rilevata una buona deposizione, però si è notato un cambio dell'intensità del colore. Infatti con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 15*) si è ottenuta una colorazione leggermente dorata anche dal lato non depositato, ma il ritiro dei bordi è diminuito notevolmente quindi la situazione è migliorata rispetto ai 20 minuti. Il campione tende leggermente ad accartocciarsi ma avendolo fissato meglio al portacampione è rimasto più disteso.

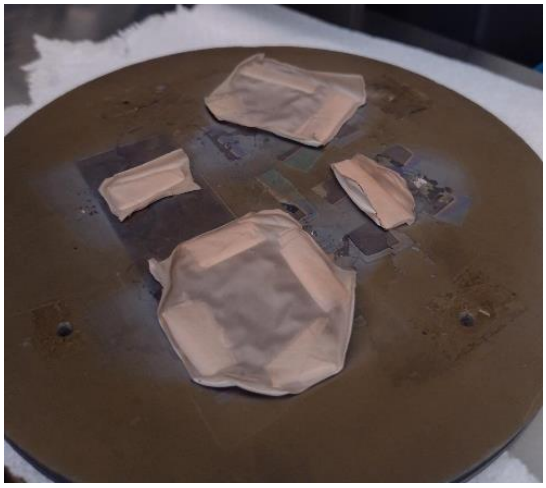


Figura 15 - Membrana PCL_ZrO_2-Ag_10 sul portacampione in uscita dallo sputtering

In seguito, sempre per la preparazione di altri campioni da testare, il rivestimento è stato depositato direttamente sul filtro come ci è stato fornito e successivamente è stato tagliato per evitare il sollevamento e l'arricciamento dei brodi e per ottenere una deposizione più uniforme(*Figura 16*).

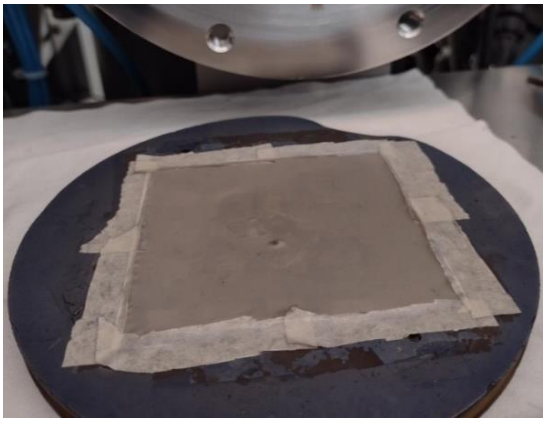


Figura 16 - PCL_ZrO2-Ag_10 sul portacampione dopo sputtering

In aggiunta, per comprendere se la zirconia è utile a tener saldi gli atomi di argento al substrato, abbiamo provato a depositare solo Ag sul campione PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 17*). L'esperimento di filtrazione non è andato a buon fine, come descritto nel capitolo ***"3.2.4 – Tecnica di filtrazione–inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa".***

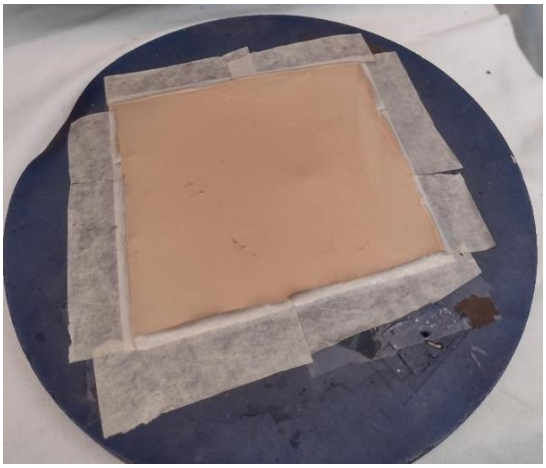


Figura 17 – PCL_Ag_10 sul portacampione dopo sputtering

Il campione in PCL con argento ha un colore sul dorato chiaro (*Figura 17*), molto differente dal PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 16*) e dal PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 11*).

È stata riscontrata anche una difficoltà al taglio per il campione in PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_20. In questo caso la possibile variazione di cristallinità del polimero all'interno della camera di sputtering sembra che abbia portato ad una alterazione della resistenza meccanica al taglio.

3.2.2 FESEM ed EDS

Attraverso il FESEM, all'ingrandimento di 500x, i campioni PCL e PAN+PCL sono differenti per sovrapposizione e aggrovigliamento delle fibre ottenute dall'electrospinning, come si può vedere dalle figure riportate in seguito (*Figura 18*, *Figura 19*).

Dall'analisi si può valutare la struttura di porosità e notare un intreccio di porosità aperte.

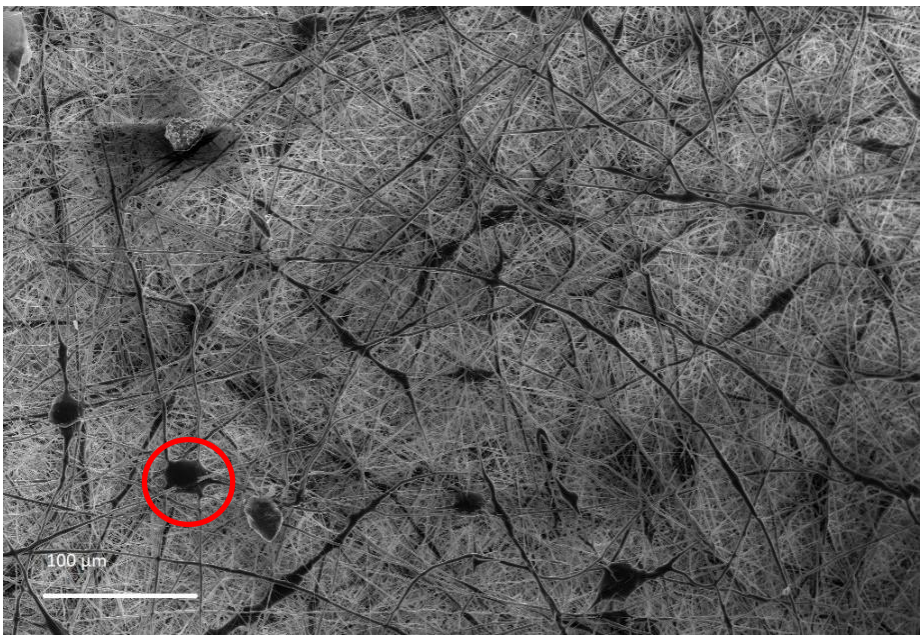


Figura 18 – Immagine al FESEM della membrana in PCL ad ingrandimento 500x

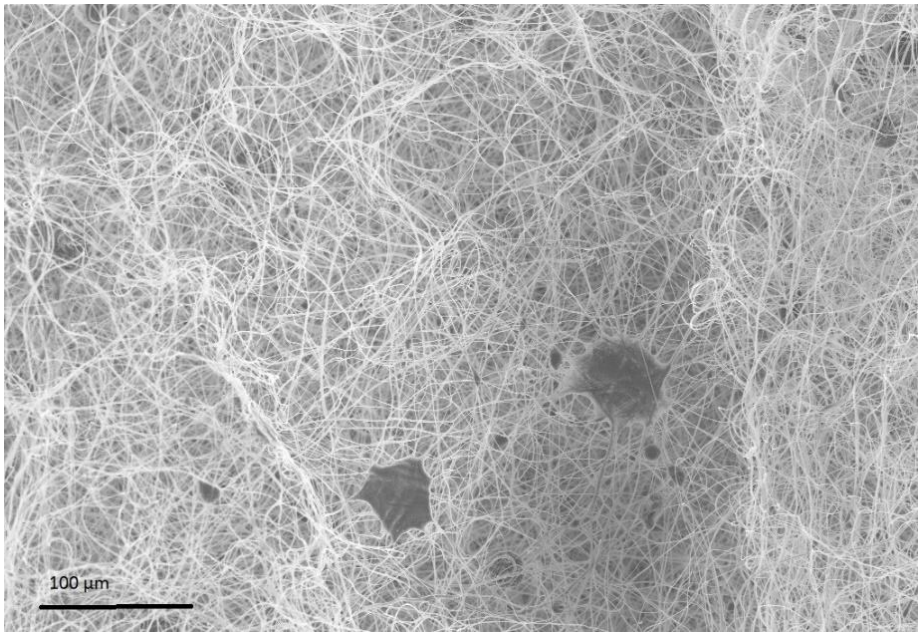


Figura 19 – Immagine al FESEM della membrana in PAN+ PCL ad ingrandimento 500x

Dalle immagini appena visualizzate, il campione PCL (*Figura 18*) possiede più nodi evidenti nella sua struttura mentre nel campione PAN+PCL (*Figura 19*), le fibre sembrano avere meno nodi di notevole dimensione e più zone di vuoto. Con il termine "nodo" si intende l'intreccio di fibre come evidenziato dal cerchio in rosso in *Figura 18*.

Immagini al FESEM – campione PCL con e senza rivestimento

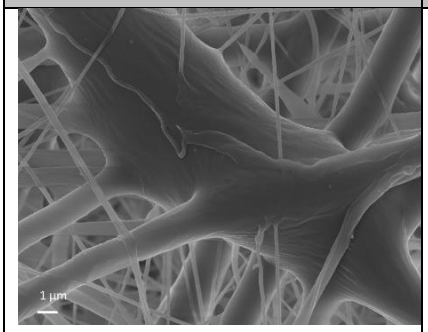
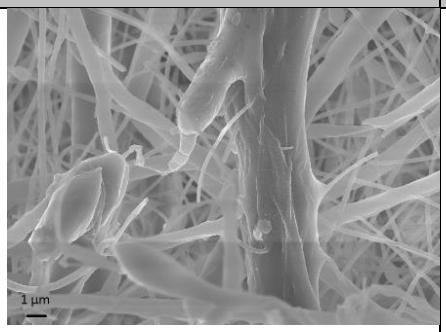
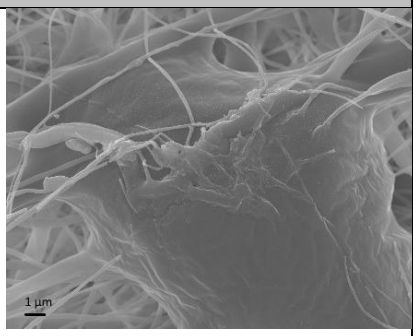
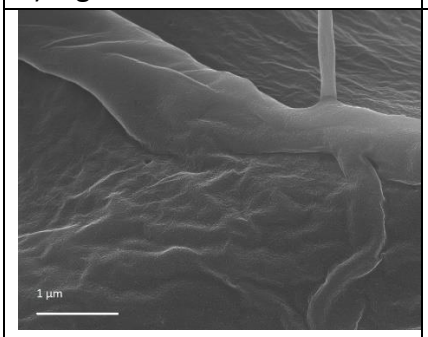
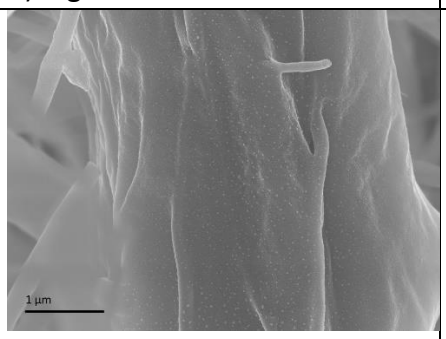
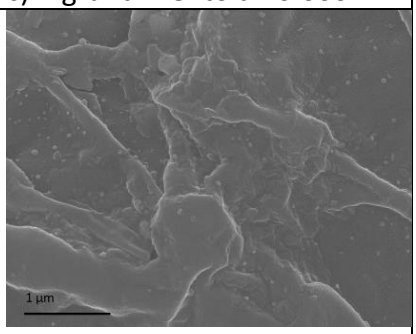
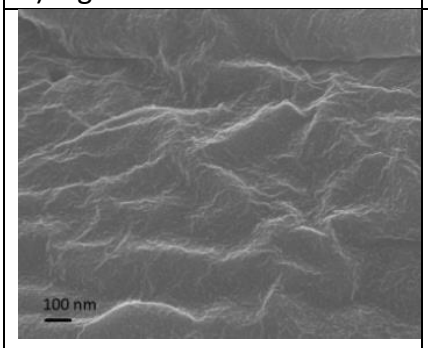
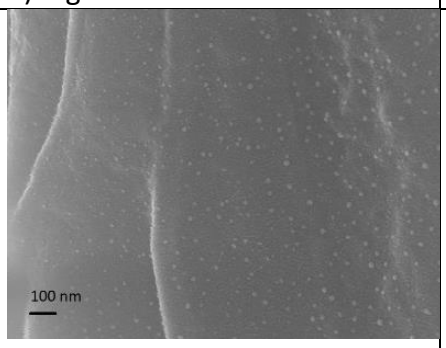
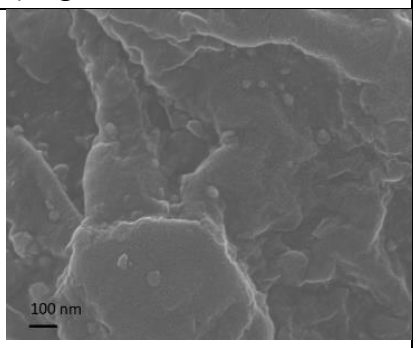
PCL	PCL_ZrO_2-Ag_10	PCL_ZrO_2-Ag_20
 a) Ingrandimento a 10.000x	 b) Ingrandimento a 10.000x	 c) Ingrandimento a 10.000x
 d) Ingrandimento a 50.000x	 e) Ingrandimento a 50.000x	 f) Ingrandimento a 50.000x
 g) Ingrandimento a 100.000x	 h) Ingrandimento a 100.000x	 i) Ingrandimento a 100.000x

Figura 20 – Immagini al FESEM delle membrane
a), d), g) PCL; b), e), h) PCL_ZrO_2-Ag_10; c), f), i) PCL_ZrO_2-Ag_20
a diverso ingrandimento

La differenza sostanziale delle immagini al FESEM, tra il campione rivestito e il tal quale, è la presenza ben evidente del rivestimento, infatti si nota come cambia la morfologia del rivestimento.

Dalla *Figura 20 – g), h), i),* si comprende come la superficie della fibra sia più o meno liscia in base alla presenza del rivestimento composito depositato. Nella *Figura 20 – h), i),* sono evidenti i nanoclusters superficiali.

Dalle immagini appena visualizzate, si stima in modo approssimativo che la dimensione dei pori presenti sia sicuramente superiore ad 1 µm. Infatti si nota che l'intreccio delle fibre non permette di raggiungere una stima precisa ma si può ipotizzare che, se la membrana PCL (*Figura 20 - a)Ingrandimento a 10.000x*), non riesce a trattenere i batteri, usati per l'analisi, allora possiede almeno un poro di dimensione tale da permetterne il passaggio.

I batteri impiegati nei test hanno dimensioni da 0,4 µm a 1 micrometro, e come verrà riportato nel capitolo "***3.2.4 - Tecniche di filtrazione – inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa***", la soluzione passa attraverso il filtro in PCL tal quale da dei vuoti interconnessi.

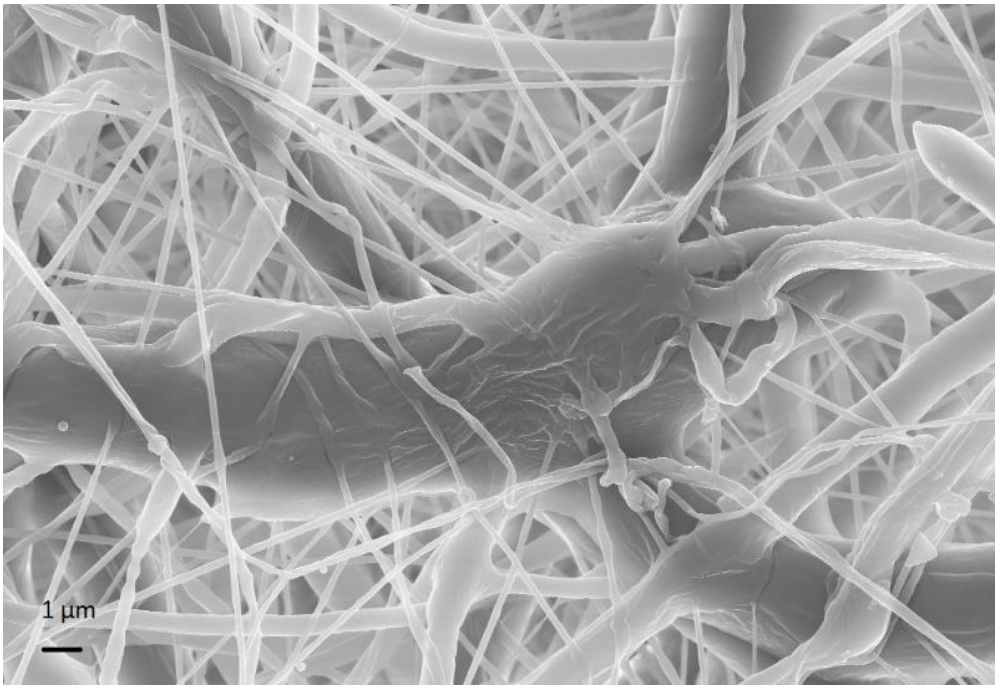


Figura 21 – Immagine al FESEM del PCL_ZrO_2-Ag_20, Ingrandimento a 10.000x

Anche il campione PCL_ZrO_2-Ag_20 ad ingrandimento 10.000x (*Figura 21*) si presenta con una buona percentuale di vuoti e gli intrecci delle fibre e la loro variabilità dimensionale sono ben evidenti.

Mentre dall'immagine al FESEM (*Figura 20 – h)*) ad ingrandimento 100.000x del campione PCL_ZrO_2-Ag_10 si vedono bene i nanoclusters depositati sulle fibre ottenute dall'electrospinning.

Immagini al FESEM – campione PAN+PCL con e senza deposizione

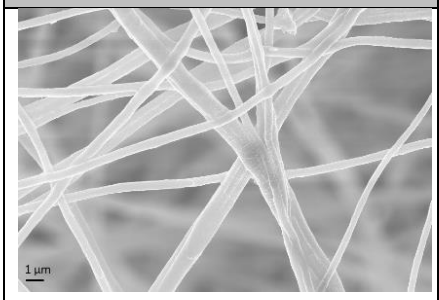
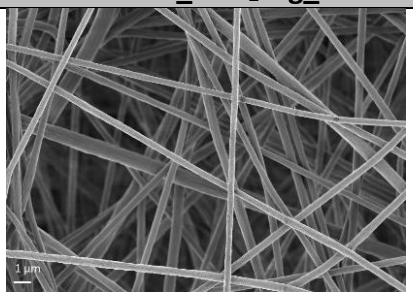
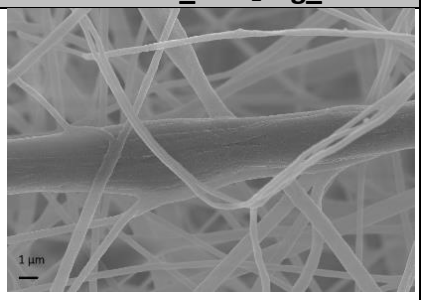
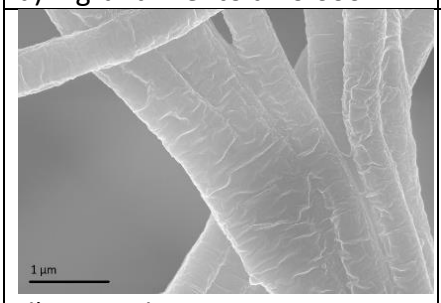
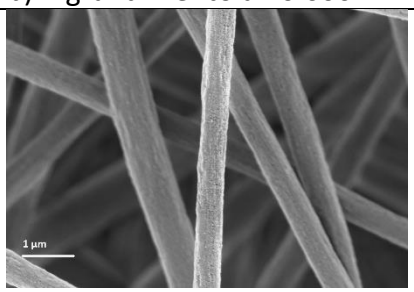
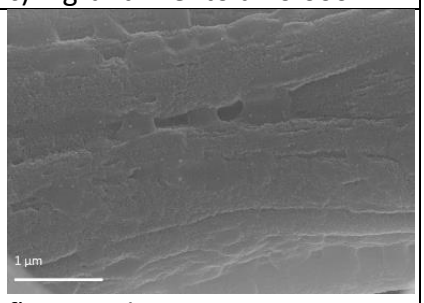
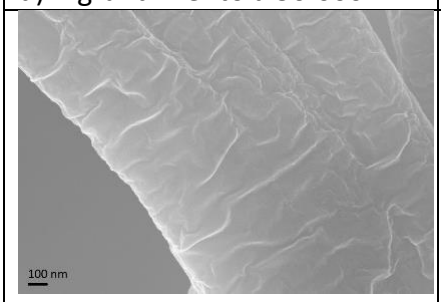
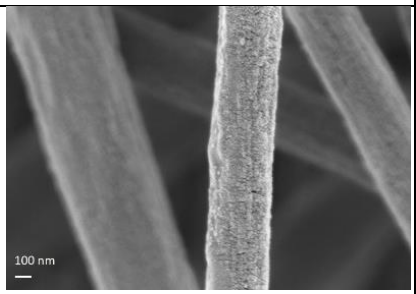
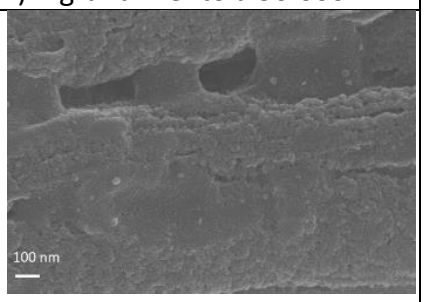
PAN+PCL	PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10	PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20
		
a) Ingrandimento a 10.000x	b) Ingrandimento a 10.000x	c) Ingrandimento a 10.000x
		
d) Ingrandimento a 50.000x	e) Ingrandimento a 50.000x	f) Ingrandimento a 50.000x
		
g) Ingrandimento a 100.000x	h) Ingrandimento a 100.000x	i) Ingrandimento a 100.000x

Figura 22 – Immagini al FESEM della membrana
a), d), g) PAN+PCL; b), e), h) PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10; c), f), i) PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20
a diverso ingrandimento

Le immagini presenti ad ingrandimento a 100.000x (*Figura 22 – g), h), i)*) servono per identificare la superficie della fibra e la sua rugosità.

Nel campione PAN+PCL la fibra, dall'ingrandimento a 100.000x, possiede un aspetto rugoso che viene modificato a causa del rivestimento come si vede dai campioni PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 22 – h)*) o PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Figura 22 – i)*). In tali immagini si nota come il rivestimento abbia un aspetto a sferette unite assieme. Tra un accumulo e l'altro è possibile che si verifichino delle zone nanometriche di vuoto, non rivestite.

Dalle immagini del campione PAN+PCL tal quale si nota come le fibre siano molto più ordinate, quasi a formare una rete, rispetto alle immagini viste in precedenza del PCL tal quale. Anche questo può influire sulla capacità di filtrazione.

Dal campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20, all'ingrandimento a 100.000x (*Figura 23*) è ben visibile che ci possono essere delle situazioni in cui più fibre sono unite assieme per formare la maglia del filtro. Il rivestimento è visibile in modo molto chiaro all'ingrandimento a 150.000x (*Figura 24*) e non occlude i pori.

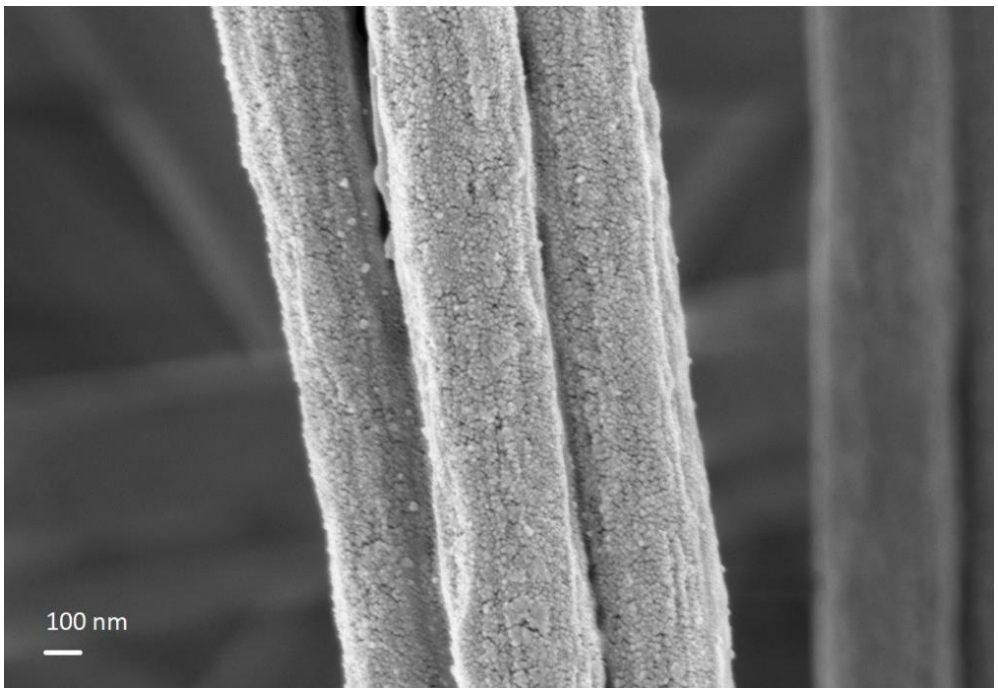


Figura 23 - Immagine al FESEM della membrana in PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20, ingrandimento a 100.000x

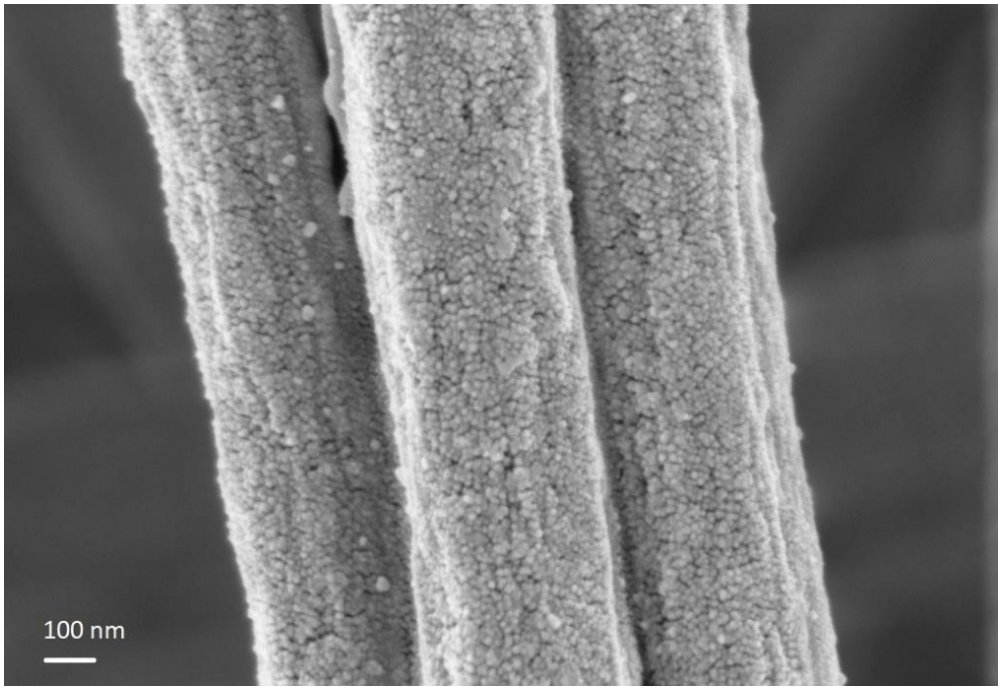


Figura 24 - Immagine al FESEM della membrana in PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20 con ingrandimento a 150.000x

Per la dimensione delle fibre, dal FESEM si calcolano circa 3 µm per il filtro in PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20 (*Figura 24*). Per questo tipo di filtro il diametro della fibra è un po' più semplice da calcolare perché l'intreccio delle fibre possiede un diametro più costante rispetto al campione in PCL, nel quale il diametro è talmente vario da impedirne la stima, proprio osservando le immagini ottenute al FESEM di alcune aree della membrana.

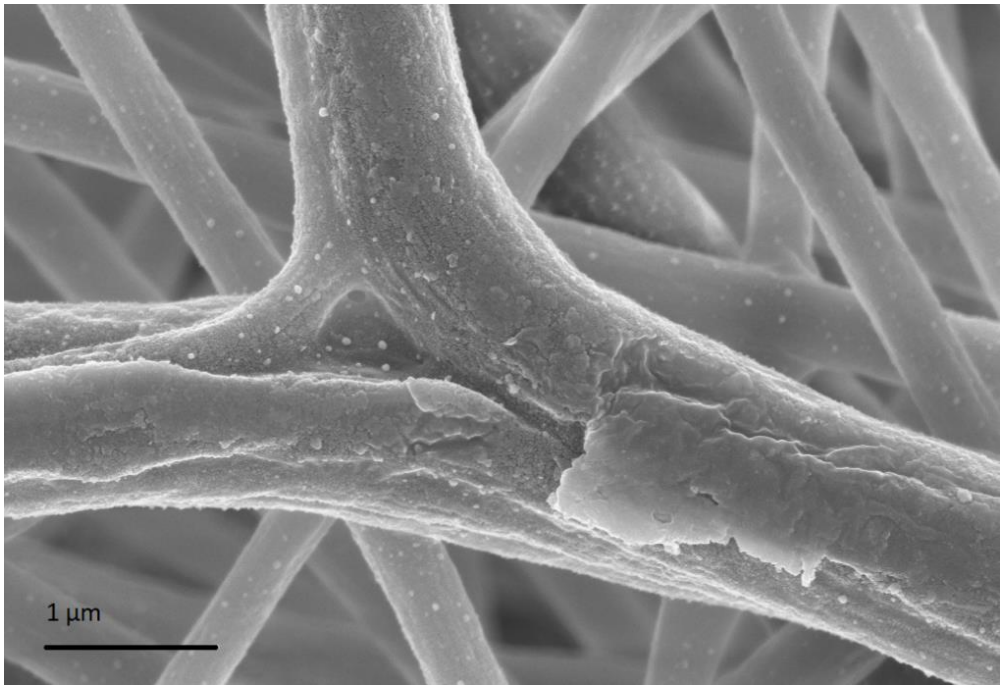


Figura 25 – Immagine al FESEM della membrana in PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 – ingrandimento a 50.000x

Come si può vedere dalla *Figura 25*, considerata la caduta a pioggia delle fibre nell'impianto di electrospinning, è naturale che ci siano anche delle fibre con diametri diversi e con diramazioni. Dall'immagine si può anche valutare la presenza dei nanoclusters del rivestimento e in base al marker si può comprendere che questi derivano dal target in zirconia.

Inoltre, per il calcolo della % atomica degli elementi presenti sul filtro con la deposizione, si sono considerate tre aree diverse di una faccia scelta del campione e si è calcolata la media in % atomica degli elementi presenti e la deviazione standard per capire quale è l'incertezza o meglio, la variazione % tra un'area e l'altra del rivestimento.

Come esempio è stato preso il campione PCL tal quale. All'EDS per ogni area si sono ottenuti valori specifici in %atomica.

I valori letti sono i seguenti (*Tabella 2*):

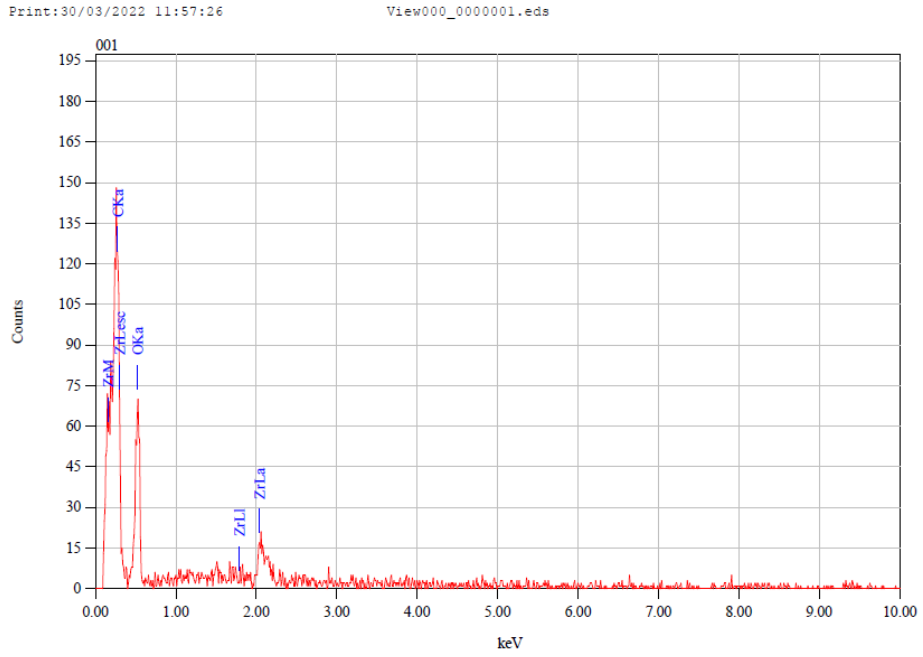
Tabella 2 – Analisi EDS delle tre aree

CAMPIONE	% at				
	AREA	C	O	Zr	Ag
PCL bianco	1	76,4	19,36	4,23	0
PCL bianco	2	82,38	17,62	0	0
PCL bianco	3	80,92	19,08	0	0
MEDIA		*79,90*	*18,69*	*1,41*	*0*

Per ogni elemento è stata calcolata la media dei valori rilevati nelle tre aree. Per Zr il valore riscontrato è insignificante dunque, si è deciso di considerare la media delle tre aree nulla, dato che la contaminazione è presente solo in un'area.

I dati sono stati letti dalla scheda seguente (*Tabella 3*), ad esempio per l'area 1:

Tabella 3 – Grafico e Tabella EDS per l'area 1



Thin Film Standardless Standardless Quantitative Analysis
Fitting Coefficient : 0.5178

Element	(keV)	Mass%	Counts	Sigma	Atom%	Compound	Mass%	Cation	K
C K* (Ref.)	0.277	56.87	440.35	1.57	76.40				1.0000
O K	0.525	19.20	384.51	1.02	19.36				0.3866
Zr L	2.042	23.94	138.64	2.66	4.23				1.3369
Total		100.00			100.00				

Per i campioni analizzati sono stati ottenuti i seguenti dati:

Tabella 4 – Analisi EDS considerando le % atomiche degli elementi principali

CAMPIONE	%at.			
	C	O	Zr	Ag
PAN+PCL	91,76 ± 0,59	5,14 ± 0,24	ND	ND
PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10	88,10 ± 0,24	5,91 ± 0,15	4,62 ± 0,01	1,37 ±0,09
PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20	87,88 ± 2,00	6,52 ± 1,13	4,13 ± 0,12	1,46 ± 0,75
PCL	79,90 ± 3,12	18,69 ± 0.93	ND	ND
PCL_ZrO_2-Ag_10	77,46 ± 2,57	18,19 ± 1,13	3,31 ± 1,60	1,04 ± 0,16
PCL_ZrO_2-Ag_20	76,35 ± 4,65	17,49 ± 3,93	4,76 ± 0,82	1,40 ± 0,90

Il campione PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Tabella 4*) ha il rivestimento distribuito in modo più uniforme per quanto riguarda la disposizione dei nanoclusters di Ag. Mentre il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 è il campione nel quale la deposizione è avvenuta nel modo migliore.

Aumentando il tempo, si ha un aumento dei valori ottenuti dall'analisi EDS, come si può vedere dalla *Tabella 4*, confrontando lo stesso substrato a diverse deposizioni. Infatti si vede che il valore di Zr e Ag aumenta leggermente dal campione PCL_ZrO_2-Ag_10 al PCL_ZrO_2-Ag_20 e dal campione PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_10 a PAN+PCL_ ZrO_2-Ag_20. Si conclude che la deposizione è uniforme su tutti i campioni.

3.2.3 Test di antibattericità

Dai test qualitativi di alone di inibizione effettuati presso il Politecnico di Torino, si è visto come l'alone antibatterico fosse più evidente e grosso per il campione PCL e PAN+PCL con il maggior tempo di deposizione e inesistente per i tal quale.

Per il test di antibattericità testato con *S. Epidermidis*, in senso orario a partire dall'alto a sinistra (*Figura 26, Figura 27*) si hanno in sequenza i seguenti campioni:

- PAN+PCL (a)
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 (due campioni – b, c)
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 (d)

La *Figura 26* è stata scattata prima dell'incubazione della piastra con i campioni di PAN+PCL all'interno dell'incubatore.

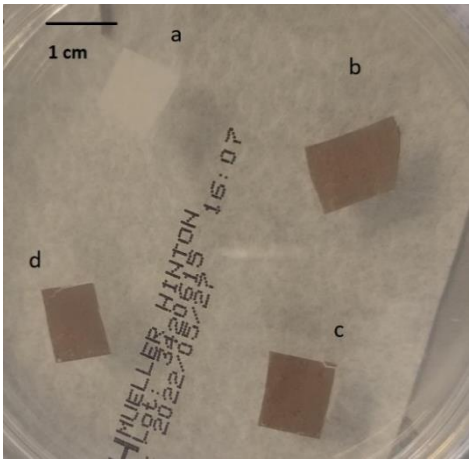


Figura 26 – Piastra Agar con campioni in PAN+PCL a diverso tempo di deposizione testati con S. Epidermidis prima dell'incubazione

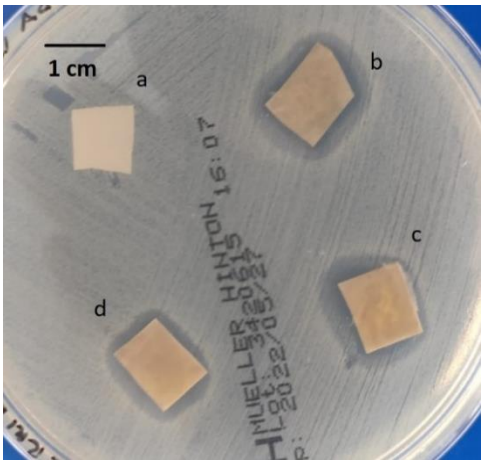


Figura 27 – Piastra Agar con campioni in PAN+PCL a diverso tempo di deposizione testati con S. Epidermidis dopo incubazione

Dopo aver aspettato il tempo di incubazione adeguato di circa 24 ore, come si può vedere dalla fotografia (*Figura 27*), il campione PAN+PCL non ha un alone (*Figura 28*), cioè non ha bloccato la proliferazione dei batteri attorno alla zona di appoggio. Invece lo stesso substrato con una deposizione ha portato alla formazione visibile di un alone di qualche mm (*Figura 29* e *Figura 30*).

L'alone è tanto più grande, tanto più è stata efficace l'azione battericida svolta dal filtro. Ciò è stato notato dopo 24 h in incubatore.

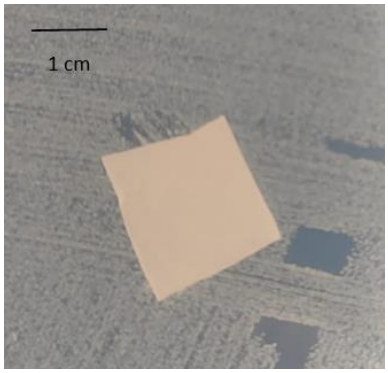


Figura 28 – Zoom dell'alone sul campione PAN+PCL

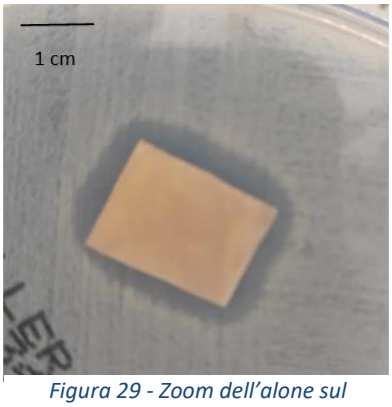


Figura 29 - Zoom dell'alone sul campione PAN+PCL_ZrO2-Ag_10

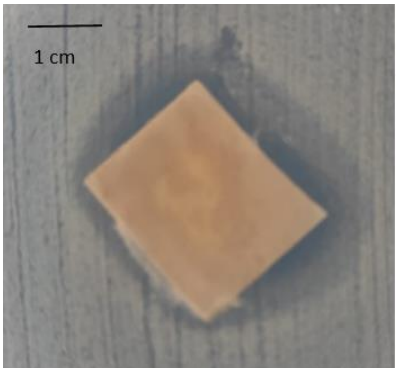


Figura 30 - Zoom dell'alone sul campione PAN+PCL_ZrO2-Ag_20

Sempre con il batterio *S. Epidermidis*, dei campioni in PCL con diversa deposizione (*Figura 31, Figura 32*), è stata usata una piastra di agar nutriente e dal campione PCL tal quale (*Figura 31 - a*), andando in senso orario sono presenti:

- PCL_ZrO_2-Ag_10 (due campioni - b, c)
- PCL_ZrO_2-Ag_20 (due campioni - d, e)

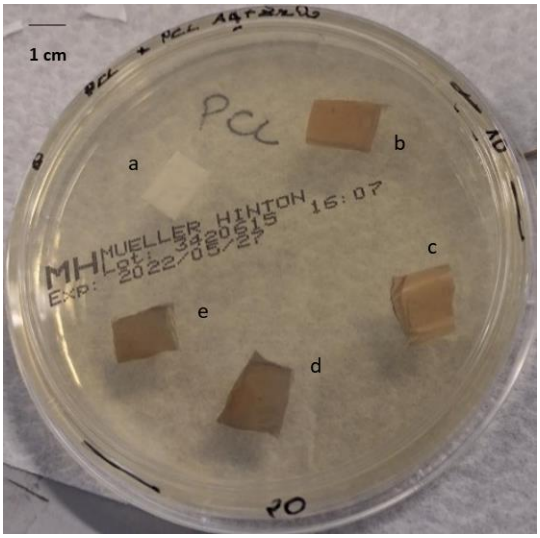


Figura 31 – Piastra Agar con campioni in PCL testati con S. Epidermidis prima dell'incubazione

Dopo il tempo di incubazione, i campioni in PCL si sono presentati come visualizzato in *Figura 32*.

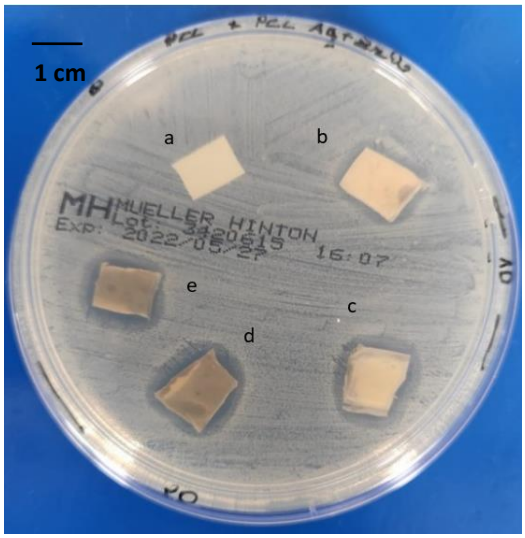


Figura 32 - Piastra Agar con campioni in PCL a diverso tempo di deposizione testati con S. Epidermidis dopo incubazione

Confrontando gli aloni dei diversi campioni, è evidente che l'alone è maggiore nel filtro sottoposto a più tempo di sputtering (*Figura 32 - e, d*), e si nota la differenza della grandezza dell'alone tra il PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 32 - b, c*) e il PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Figura 32 - e, d*) mentre non è presente per il campione tal quale, senza rivestimento (*Figura 33*).

Attorno al PCL_ZrO_2-Ag_10 si ha un alone di circa 2 mm mentre attorno al PCL_ZrO_2-Ag_20 di 4 o 5 mm (*Figura 34*).

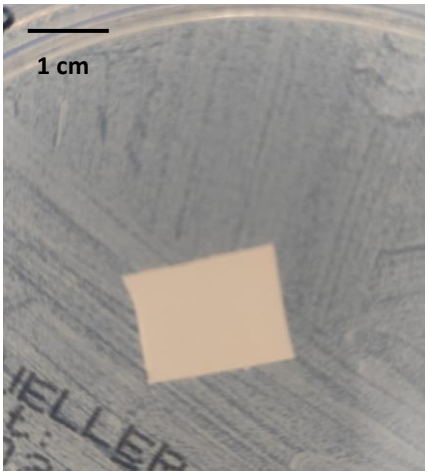


Figura 33 – Zoom dell'alone sul campione PCL dopo incubazione

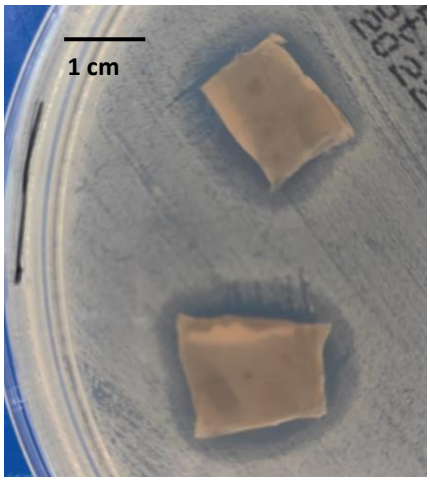


Figura 34 – Zoom dell'alone sui campioni PCL_ZrO2-Ag_20 dopo incubazione

Sia il filtro in PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10/20 che quello in PCL_ZrO_2-Ag_10/20 possiedono una buona capacità antibatterica poiché la differenza tra gli aloni è minima. Nello specifico, i campioni (PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 e PCL_ZrO_2-Ag_20) possiedono un alone di grandezza superiore e confrontabile rispetto ai campioni che sono stati sottoposti a soli 10 minuti di deposizione (PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_10).

Entrambi i campioni tal quali, cioè PAN+PCL o PCL, non sono antibatterici quindi tale proprietà è confermato che sia data dal rivestimento depositato attraverso sputtering.

Per quanto riguarda i test effettuati su piastra agar con il batterio *E. Coli*, precedentemente spatolato, nella *Figura 35* in senso orario si distinguono i seguenti campioni:

- PAN+PCL (a)
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 (b, c)
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 (d, e)

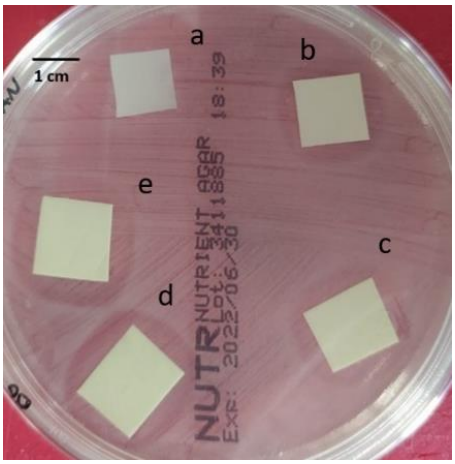


Figura 35 – Piastra agar con E. Coli con campioni in PAN+PCL dopo incubazione

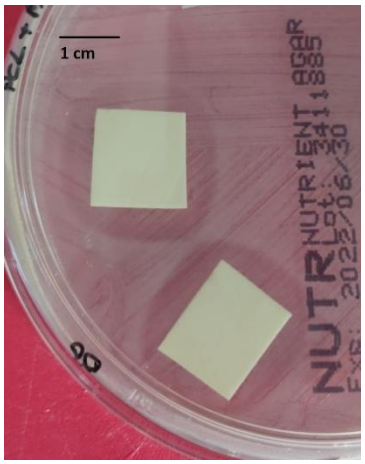


Figura 36 – Zoom sui campioni PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 testati con E. Coli su piastra agar

L'alone ha una dimensione maggiore attorno ai due campioni in PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Figura 36*), leggermente meno evidente per i campioni PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 35 – b, c*) e assente per il campione PAN+PCL (*Figura 35 – a*).

Nella *Figura 37* si distinguono i seguenti campioni:

- PCL (a)
- PCL_ZrO_2-Ag_10 (b, c)
- PCL_ZrO_2-Ag_20 (d, e)

Rispetto al test con PAN+PCL, per i campioni in PCL (PCL, PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_20) il test non ha ottenuto i risultati sperati.

A causa della non perfetta planarità dei filtri PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_20 abbiamo ottenuto un leggero alone solo per uno dei campioni PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Figura 37 - d*), cioè su quello che ha maggiormente aderito alla piastra agar.

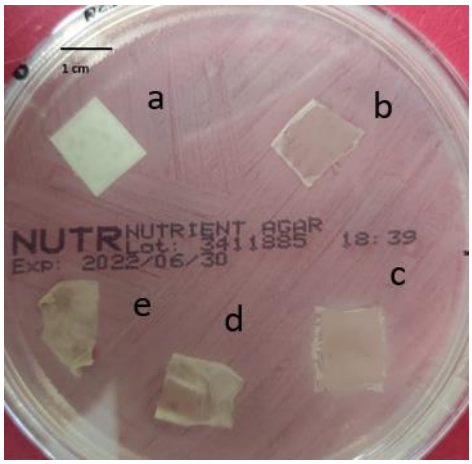


Figura 37 - Piastra agar con campioni in PCL testati con E. Coli dopo incubazione

Nel PCL_ZrO_2-Ag_10 l'alone è molto debole (*Figura 38*), invece resta assente sul PCL come desiderato (*Figura 39*).

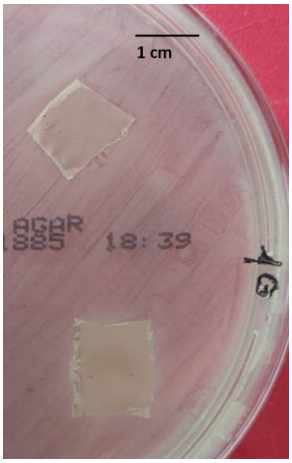


Figura 38 – Zoom dell'alone sul campione PCL_ZrO_2-Ag_10 dopo incubazione

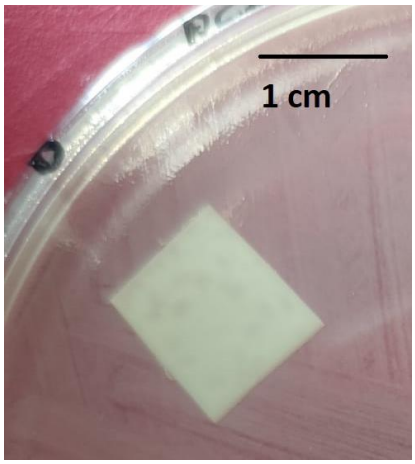


Figura 39 – Zoom dell'alone sul campione PCL dopo incubazione

3.2.4 Tecnica di filtrazione – inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa

I test sono stati effettuati usando tre batteri differenti, come riportato nel capitolo ***"3.1.5 - Inoculazione su test di coltura - set up sperimentale per filtrazione"***, per avere un confronto delle colonie cresciute e dell'antibattericità del filtro anche in base al tipo di contaminazione.

Sono stati confrontati i campioni in PCL e quelli in PAN+PCL, con e senza deposizione, per comprendere quale membrana ha le più elevate proprietà filtranti.

Il primo ciclo di test è stato effettuato usando il batterio *Bacillus Subtilis Subsp. Spizizenii* e con questo abbiamo testato le 6 tipologie di campioni, come definite nel capitolo "***3.1.5 – Inoculazione su test di coltura – set up sperimentale per filtrazione".***

Per il campione PCL si è riscontrata una filtrazione di circa 10 minuti, più lenta rispetto al filtro in PAN+PCL. La soluzione una volta versata sul campione all'interno della strumentazione apposita, passa lentamente al di là del filtro e può essere raccolta in una boccetta di vetro per l'analisi su piastra agar e quella successiva all'ICP-MS per la ricerca dei metalli in soluzione.

In seguito sono riportate alcune immagini delle piastre agar per il campione PCL tal quale (*Figura 40*).

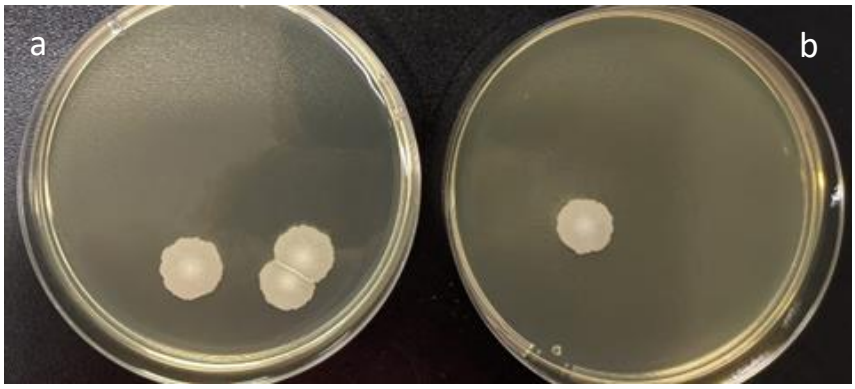


*Figura 40 – Immagine **dopo 3 giorni** di incubazione*
a) soluzione analizzata su piastra agar prima della filtrazione con campione PCL
b) soluzione analizzata su piastra agar dopo filtrazione con campione PCL

Come si può vedere dall'immagine (*Figura 40*), dopo 3 giorni dall'incubazione delle piastre, la colonia di *Bacillus*, si presenta con bordo largo, irregolare, piatto, ondulato e rugoso. Molto differente dalla colonia di *L. Monocytogenes* e *E. Coli* come si vedrà in seguito. Già dopo 24 h erano presenti delle colonie ma di piccola dimensione.

La soluzione analizzata prima della filtrazione e quella dopo filtrazione risultano differenti per numero di colonie cresciute sulle piastre. Prima si vedono tre colonie (*Figura 40 – a*) mentre nella soluzione filtrata è cresciuta una sola colonia (*Figura 40 – b*). Sul filtro PCL tal quale (*Figura 41*) sono presenti delle piccole colonie evidenziate con dei cerchietti rossi, usati per identificarle.

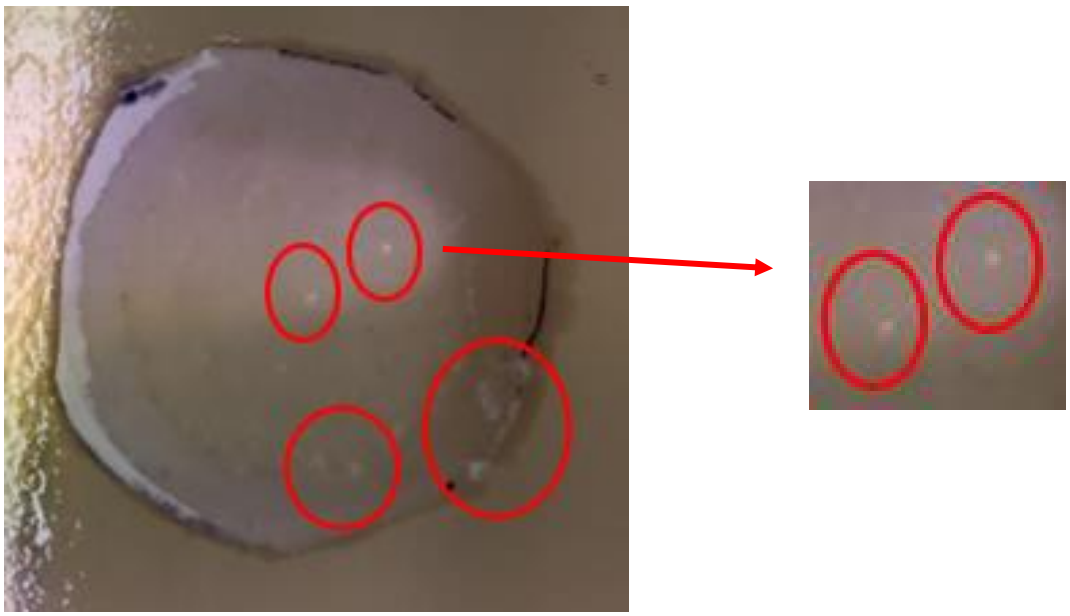


Figura 41 – Piastra agar su campione PCL con crescita batterica sul filtro
a destra zoom della zona centrale contaminata

Il test effettuato con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 42*), è stato uno dei pochi test con il rivestimento che ha permesso di raccogliere un quantitativo minimo di soluzione post filtrazione. Lo stesso filtro, utilizzato in altri test, con le stesse condizioni di deposizione, non ha filtrato la soluzione, come si vedrà in seguito.

In questo test sono cresciute 4 colonie nella piastra con la soluzione contaminata da *Bacillus* prima della filtrazione (*Figura 42 – a*) e 3 colonie in quella post filtrazione (*Figura 42 – b*).

Sul filtro posizionato su agar e sottoposto ad un processo di incubazione a 30°C non sono cresciute colonie batteriche. Il filtro risulta essere tale e quale a prima della filtrazione.

Figura 42 – Piastre agar con
a) soluzione analizzata prima di essere sottoposta a filtrazione con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_10
b) soluzione dopo filtrazione con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_10

Successivamente per l'analisi del campione in PCL_ZrO_2-Ag_20, la velocità di filtrazione è stata di circa 15 minuti e sono stati raccolti solo 5 ml di soluzione a seguito della filtrazione. Con tale quantitativo sono stati prelevati 100 µl da distribuire sulla piastra agar, i restanti sono stati usati per l'analisi ICP-MS, dalla quale non sono state evidenziate anomalie, infatti i valori misurati di argento o zirconio erano entrambi attorno a 0 µg/l.

Rispetto alla serie di test effettuata per lo stesso campione PCL con sputtering di 20 minuti, la prova effettuata con *Bacillus* su PCL_ZrO_2-Ag_20 è stata l'unica che ha permesso di ottenere dei risultati accettabili ma non validi da permettere di poter utilizzare questo filtro per tale applicazione.

Sulla piastra agar sono cresciute circa 10 colonie per la soluzione contaminata prima che venga filtrata e 8 colonie evidenti e 1 molto piccola nella soluzione analizzata dopo filtrazione (*Figura 43*).

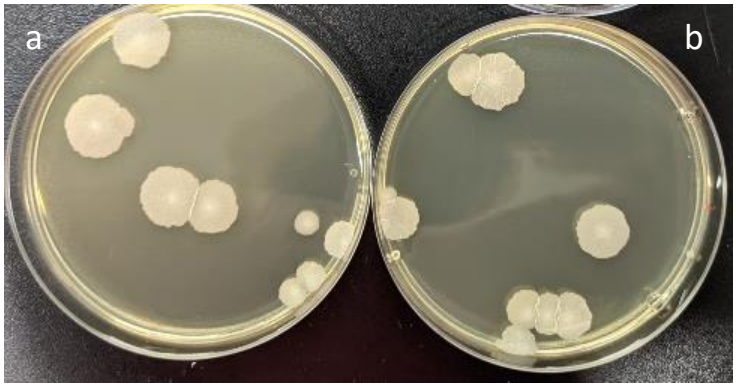


Figura 43 – Piastre agar con
a) soluzione contaminata testata prima della filtrazione con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_20
b) soluzione testata dopo filtrazione con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_20

A livello di crescita batterica non si è ottenuta una riduzione delle colonie presenti su piastre agar perché, in questo caso il filtro non ha trattenuto i batteri presenti nella soluzione da filtrare. Però grazie al rivestimento depositato sul filtro, non c'è stata crescita di colonie sullo stesso. Ciò è positivo e conferma l'antibattericità del filtro data dalla presenza dell'argento.

Proseguendo con la serie di test, dopo 24 h, nel campione PAN+PCL (*Figura 44*) sono cresciute 88 colonie di *Bacillus* per la soluzione non ancora sottoposta a filtrazione. Invece per la soluzione post filtrazione è cresciuta una sola colonia visibile (*Figura 45*).

Tale risultato è stato particolarmente interessante perché non si è mai ottenuto il 99 % di riduzione batterica da nessun altro filtro.

Figura 44 – Piastra agar con la soluzione contaminata da Bacillus prima che sia sottoposta a filtrazione con la membrana PAN+PCL

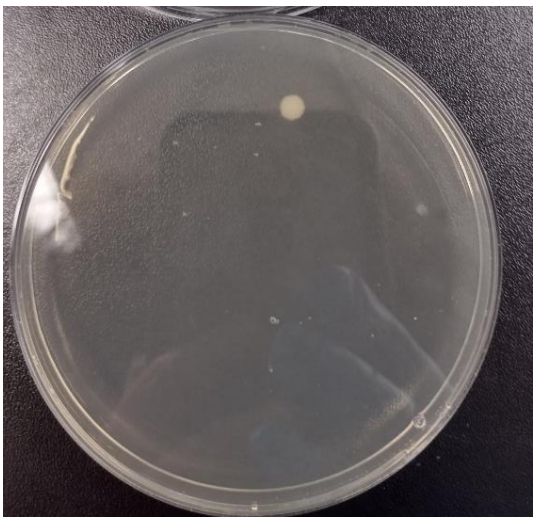


Figura 45 – Piastra agar con la soluzione contaminata da Bacillus dopo che è stata sottoposta a filtrazione con la membrana PAN+PCL

Figura 46 – Zoom sulla crescita di colonie di Bacillus su PAN+PCL su piastra agar

A sostegno di quanto appena descritto, il filtro PAN+PCL (*Figura 46*) ha presentato già dopo 24 h una forte crescita batterica su tutta la sua superficie. Il segno circolare presente sul filtro è dato dalla compressione dello stesso all'interno della strumentazione, presente tra i due contenitori in vetro che permettono di mantenere il filtro in posizione durante l'analisi e non permettere la fuoriuscita della soluzione. Quindi il cerchio rappresenta il perimetro della luce di passaggio della soluzione.

Mentre per quanto riguarda il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10, è risultato che dopo 24 h di incubazione(*Figura 47*) il filtro non presenta colonie sulla sua superficie mentre dopo 3 giorni in incubatore (*Figura 48*), si ha una rilevante crescita batterica sui bordi, invece all'interno si ha una patina continua e ciò dimostra che la crescita batterica è incontrollabile dopo alcuni giorni in incubatore nonostante il rivestimento. Quindi il rivestimento, anche se mantenuto in condizioni adatte alla proliferazione dei batteri, è efficace per più di 24 ore ma non oltre le 48 ore, impedendo la crescita di colonie.

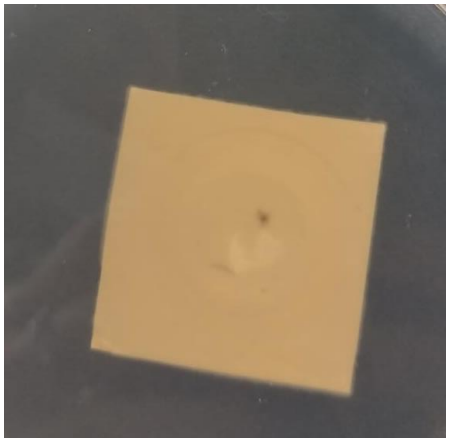


*Figura 47 – Zoom sulla membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 su agar **dopo 24 h** in incubatore*

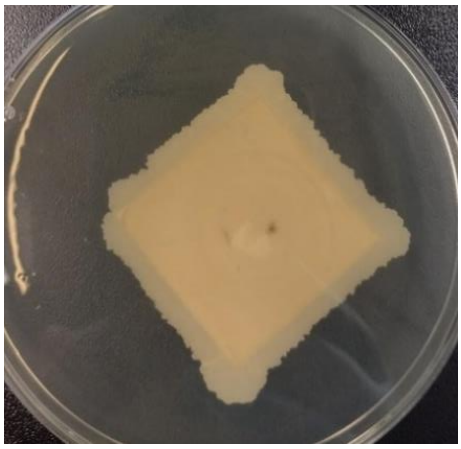


*Figura 48 – Zoom sulla membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 su agar **dopo 3 giorni** in incubatore*

Avendo diluito eccessivamente la soluzione di partenza rispetto alla concentrazione ipotetica di batteri presenti, abbiamo ottenuto solo 1 colonia nella piastra con la soluzione prima della filtrazione e non c'è stata crescita di colonie nella piastra con la soluzione filtrata.

Anche all'ICP-MS non c'è stato rilascio di ioni dal rivestimento. Come si può vedere dalla *Figura 49*, la concentrazione rilevata è addirittura negativa.

LabBook	LabBook Path
25-05-22 Michela.imexp	_Application Data\Workspace\LabBooks\2022\5-Maggio

Analysis index:	9	Amount	
Analysis label:	PCL+PAN 10' dopo bacillus 24-05	Evaluate	True
User name:	BIELLA\strumenti	Standard	

90Zr (KED)	107Ag (KED)
-0.014 µg/l	-0.596 (<LOQ)
-0.015 µg/l	-0.583 µg/l
-0.016 µg/l	-0.622 µg/l
-0.013 µg/l	-0.584 µg/l
11.7 %	3.8 %

Figura 49 – Risultati analisi ICP-MS della soluzione dopo filtrazione usando il filtro PAN+PCL_ZrO2-Ag_10

Passando ad un altro test, per il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20, sempre analizzato con il *Bacillus*, la differenza di crescita delle colonie batteriche è risultata molto evidente. Nella soluzione contaminata da batteri prima della filtrazione sono cresciute circa 86 colonie (*Figura 50*), mentre per la soluzione filtrata si sono sviluppate circa 10 colonie (*Figura 51*).

Abbiamo ottenuto circa un 90% di riduzione delle colonie batteriche e nessun rilascio dal rivestimento.

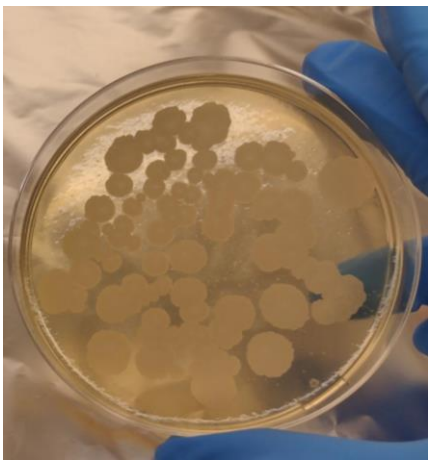


Figura 50 - Piastra agar testata con la soluzione preparata per la filtrazione con la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

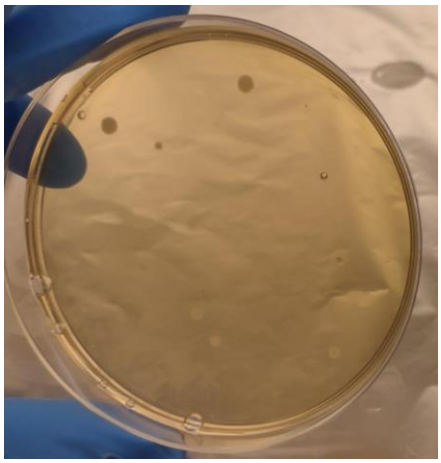


Figura 51 - Piastra agar testata con la soluzione filtrata con la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

Il secondo ciclo di test è stato effettuato usando il batterio *Listeria Monocytogenes* e abbiamo testato tutte le tipologie tranne il PCL_ZrO_2-Ag_20, poiché è già stato appurato che il PCL_ZrO_2-Ag_10 non permette di filtrare la soluzione. Il PCL_ZrO_2-Ag_10 è stato testato solo per ulteriore conferma.

Il campione PCL tal quale può essere usato per la filtrazione ma non possiede capacità antibatteriche come è ben noto poiché non è stato sottoposto al trattamento di sputtering. Il campione permette di ridurre dell' 1 % la crescita di colonie batteriche.

Infatti sono state calcolate 34 colonie per la soluzione pre-filtrazione (*Figura 52*) e 33 per la soluzione post-filtrazione (*Figura 53*).

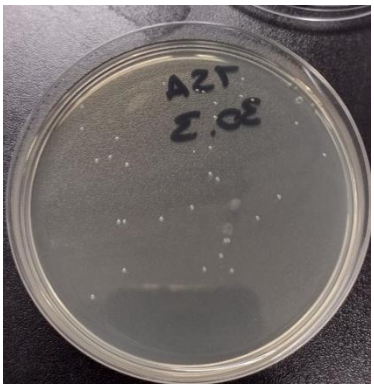


Figura 52 – Piastra agar effettuata prima della filtrazione per il test con la membrana in PCL

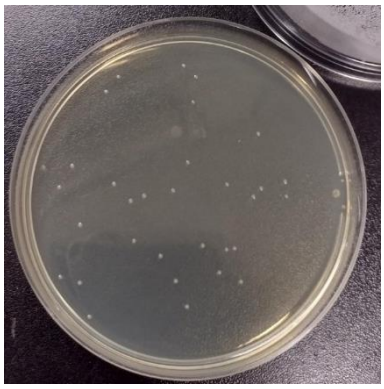


Figura 53 – Piastra agar effettuata dopo filtrazione con la membrana PCL

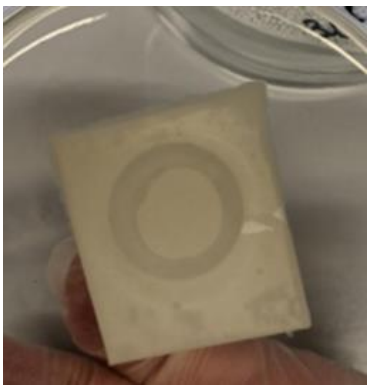


*Figura 54 – PCL su piastra agar già sottoposto a filtrazione, **dopo 24 h** in incubatore*

Sul filtro (*Figura 54*) sono cresciute delle colonie sul bordo esterno ma a 24 ore non sembra esserci stata crescita nella zona della luce di passaggio della soluzione. Il test su questo campione è stato ripetuto e si sono ottenuti gli stessi risultati, cioè:

- una lieve crescita batterica sul filtro;
- una minima riduzione delle colonie formate sull'agar.

È utile riportare anche la situazione del filtro PCL tal quale dopo tre giorni in incubatore a 30°C. In questo caso c'è stata una spinta crescita anche sulla parte del filtro che è stata a contatto con la soluzione contaminata (*Figura 55*).

Ciò conferma che sul filtro senza deposizione la crescita batterica è costante e continua nel tempo.

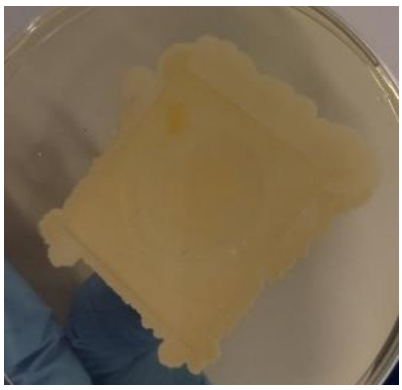


Figura 55 – Zoom su PCL su piastra agar ***dopo tre giorni*** *in incubatore*

Non essendo presente il rivestimento sul substrato è corretto aver ottenuto circa 0 µg/l dall'analisi ICP-MS (*Figura 56*).

LabBook	LabBook Path
20-04-22 Michela.imexp	_Application Data\Workspace\LabBooks\2022\4-Aprile

Analysis index:	13	Amount		Sample Type
Analysis label:	PCL BIANCO 31-03	Evaluate	True	
User name:	BIELLA\strumenti	Standard		

90Zr (KED)	107Ag (KED)
0.324 µg/l	0.436 (<LOQ)
0.333 µg/l	0.462 µg/l
0.328 µg/l	0.351 µg/l
0.313 µg/l	0.495 µg/l
3.2 %	17.4 %

Figura 56 – PCL - Analisi ICP-MS

Invece per il campione in PCL_ZrO_2-Ag_10 con il batterio *L. Monocytogenes* sono state fatte due prove per avere la conferma dei risultati. In realtà si sono verificate due situazioni differenti.

Nel primo campione la soluzione non è riuscita a passare dall'altro lato del filtro in modo consistente ma si è riusciti a raccogliere solo 1 ml di soluzione.
Mentre nel secondo test la soluzione non è proprio stata filtrata, anche dopo aver aspettato un tempo di circa 15 min per ottenere un passaggio, anche minimo, di qualche ml di soluzione ma quello che è risultato è stato un comportamento completamente idrofobo.

Per questo motivo non si consiglia l'uso di questo tipo di filtro in applicazioni industriali, data la variabilità dei risultati ottenuti.

Con la poca soluzione ottenuta dal primo test ho deposto 100 µl sull'agar per il calcolo delle CFU ed effettuato l'analisi all'ICP-MS.

Per quanto riguarda le CFU per il primo test, sono state contate 23 colonie (*Figura 57*), per la soluzione posta su agar prima della filtrazione e 9 colonie (*Figura 58*) per la soluzione dopo filtrazione.

Figura 57 - Piastra agar con la soluzione di L. Monocytogenes pre filtrazione da filtrare con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_10

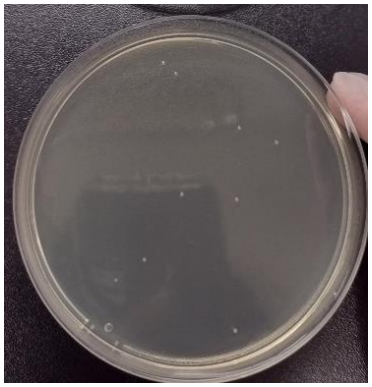


Figura 58 - Piastra agar con la soluzione di L. Monocytogenes post filtrazione con la membrana PCL_ZrO_2-Ag_10

Anche in questo caso non c'è stata crescita di colonie sul filtro in PCL_ZrO_2-Ag_10 (*Figura 59*).

La superficie è pulita e non presenta colorazione diversa. Anche il cambio di colore è un indice del possibile rilascio di ioni in soluzione.

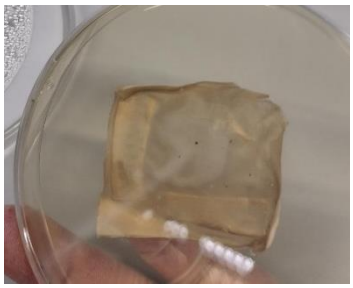


Figura 59 – Zoom sul campione PCL_ZrO_2-Ag_10 su piastra agar

Oltre a testare il passaggio della soluzione contaminata con *L. Monocytogenes* (*Figura 60*), abbiamo provato a far passare solo acqua distillata (*Figura 61*) per escludere il fatto che il problema della viscosità e del non passaggio attraverso le fibre del filtro fosse dovuto al batterio in soluzione. Tale tipologia di membrana non ha permesso il passaggio nemmeno dell'acqua distillata.

Figura 60 – Membrana PCL_ZrO_2-Ag_10 – testata con la soluzione batterica con L. Monocytogenes

Figura 61 – Membrana PCL_ZrO_2-Ag_10 testata con acqua distillata

Per quanto riguarda il test effettuato con *L. Monocytogenes* del campione PAN+PCL, c'è stata una crescita batterica elevata che non ha permesso il conteggio delle colonie. Dopo 24 h erano già presenti le colonie ma di piccola dimensione. Dopo 32 h (*Figura 62*) invece le colonie erano ben visibili e si sono ingrandite dopo due giorni (*Figura 63*) in incubatore a 30°C.

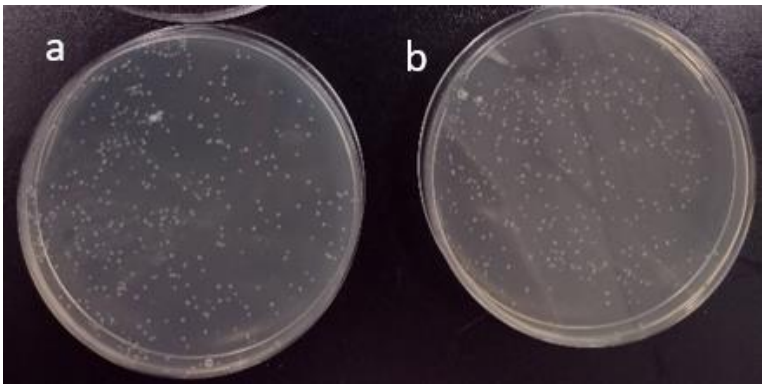


*Figura 62 – Piastre agar dopo **24 h***
a) testata con la soluzione prima della filtrazione
b) testata con soluzione filtrata con la membrana PAN+PCL

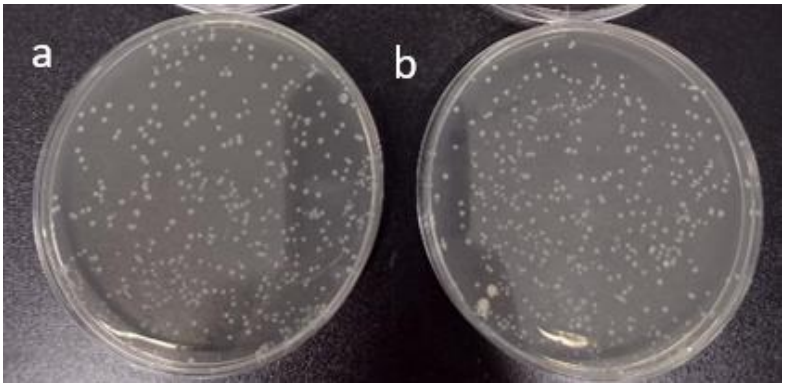


*Figura 63 – Piastre agar dopo **3 giorni***
a) testata con la soluzione prima della filtrazione
b) testata con la soluzione filtrata con la membrana PAN+PCL

Sul lato in cui è stata fatta passare la soluzione con il batterio *L. Monocytogenes*, è visibile la crescita batterica (*Figura 64*). Invece dall'altro lato del filtro non c'è stata proliferazione (*Figura 65*). Tale comportamento è già stato riscontrato in altri filtri tal quale. La crescita è avvenuta dopo 32 ore su tutte e due le facce del campione.

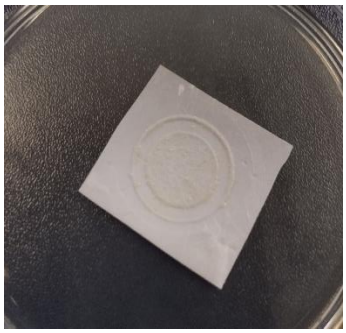


Figura 64 – Zoom su PAN+PCL
lato NON a contatto con agar

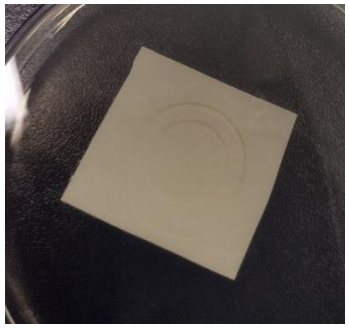


Figura 65 – Zoom su PAN+PCL
lato a contatto con agar

Invece con il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 si sono ottenuti due risultati che si discostano per il rilascio ionico proveniente dal rivestimento in soluzione. Il test effettuato con il PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 ha portato ad un rilascio di argento, infatti dalla *Figura 66* si nota un valore attorno ai 31 µg/l in soluzione. Tale valore è molto superiore ai 5 µg/l che ne determina l'assenza in soluzione, già il range 5-10 µg/l ne stabilisce una leggera presenza. Questa diventa rilevante al di sopra dei 10 µg/l e molto rilevante al di sopra dei 50 µg/l.

LabBook	LabBook Path
05-05-22 Michela bis.imexp	Application Data\Workspace\LabBooks\2022\5-Maggio

Analysis index:	9	Amount	Sample Type
Analysis label:	PCL+PAN 10' dopo 5/5/22	Evaluate	True
User name:	BIELLA\strumenti	Standard	

90Zr (KED)	107Ag (KED)
-0.019 µg/l	31.358 µg/l
-0.017 µg/l	32.956 µg/l
-0.019 µg/l	30.063 µg/l
-0.020 µg/l	31.054 µg/l
7.1 %	4.7 %

Figura 66 – Analisi ICP-MS delle soluzioni ricavate dal test con PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

Sulla piastra agar con la soluzione non ancora filtrata sono state contate 27 colonie, sull'altra circa 14 colonie. Il filtro dunque, ha una buona efficienza di filtrazione. L'area da considerare per il filtro (*Figura 67*) è la zona all'interno del cerchio dove non si vedono crescite batteriche, dunque si può concludere che il rivestimento ha conferito la giusta antibattericità al filtro.

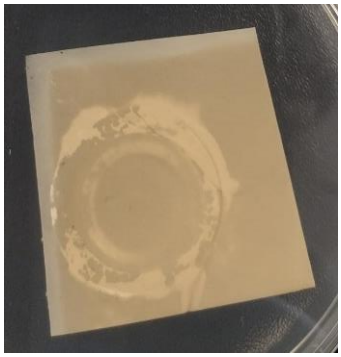


Figura 67 – Zoom su PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 su piastra agar

Un altro test che è stato effettuato è quello che ha come protagonista il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20. Sulle piastre agar dopo incubazione di 24 ore, sono state contate 26 colonie di piccola dimensione per la soluzione prima della filtrazione (*Figura 68*), mentre sono cresciute 18 colonie sull'agar che è stato contaminato dalla soluzione filtrata (*Figura 69*). Si nota come la crescita della *L. Monocytogenes* sia più lenta. La proliferazione delle colonie avviene a tempi più lunghi.

Sul filtro depositato su piastra agar, dopo che è stato utilizzato per il processo di filtrazione, non si vede una crescita di colonie dal lato del rivestimento (*Figura 70*).

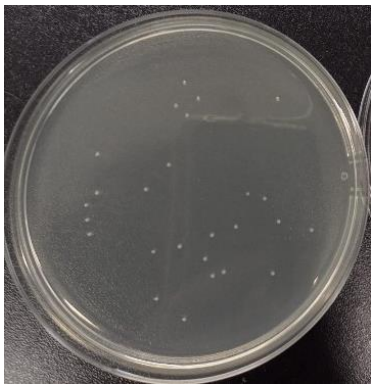


Figura 68 - Piastra agar con la soluzione non filtrata con PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

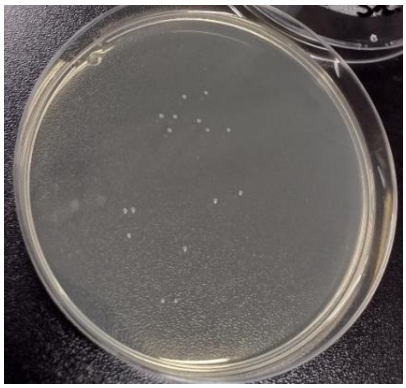


Figura 69 - Piastra agar con la soluzione filtrata con la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

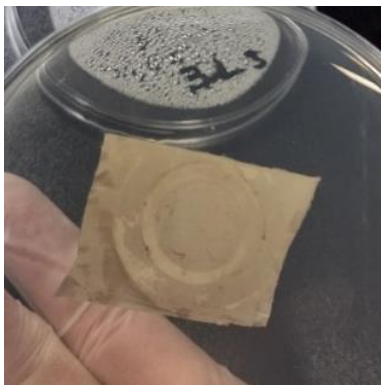


Figura 70 – Piastra agar con PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

Il terzo ciclo di test è stato effettuato usando il batterio *E. Coli*.

Per quanto riguarda il campione PCL si è passati da 37 colonie (*Figura 71*) a circa 35 colonie (*Figura 72*). Di seguito sono riportate le immagini ottenute dopo 3 giorni in incubatore. Le fotografie dopo 24 h non erano significative e le colonie erano ancora troppo piccole per poter essere contate.

Figura 71 – Piastra agar con la soluzione batterica non filtrata usando la membrana PCL

Figura 72 – Piastra agar con la soluzione filtrata con la membrana PCL

Per quanto riguarda la crescita batterica sul filtro, dopo 24 h era presente ma insignificante, rispetto al risultato ottenuto dopo 3 giorni.

L'immagine scattata è riportata in *Figura 73*, dalla quale si può apprezzare la crescita anomala di un batterio differente da quello inserito nella soluzione. Dalla forma a ragnatela che è cresciuta si comprende che si tratta di una contaminazione esterna.

Figura 73 – PCL su piastra agar dopo 3 giorni in incubatore

Nonostante ciò, il comportamento ottenuto da questo filtro rispetto allo stesso substrato testato con gli altri batteri è coerente coi risultati attesi.

Anche con la soluzione contaminata da *E. Coli*, il filtro PCL_ZrO_2-Ag_10 non filtra. Anche in questo caso il filtro idrofobo, dopo essere stato in contatto con la soluzione, risulta antibatterico (*Figura 74*).

Figura 74 – Zoom su campione PCL_ZrO_2-Ag_10 su piastra agar

Per concludere la serie di test, è stato testato il campione PAN+PCL tal quale con *E. Coli*.

La soluzione contaminata su agar ha fatto crescere 54 colonie mentre quella post filtrazione 39, quindi si è ottenuta una buona riduzione batterica e sul filtro non c'è stata crescita batterica (*Figura 75*).

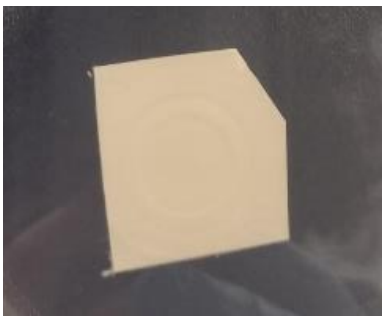


Figura 75 – Zoom su campione PAN+PCL su piastra agar

Per il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10, sempre testato con *E. Coli* sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- per la soluzione testata prima di essere filtrata: crescita di 46 colonie (*Figura 76*);
- per la soluzione dopo filtrazione: crescita di 44 colonie (*Figura 77*).

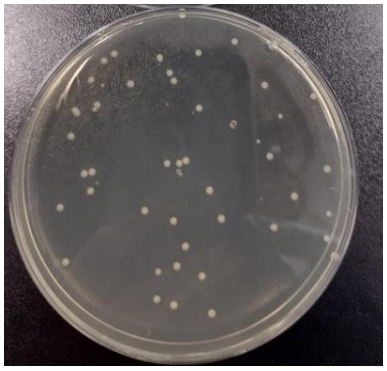


Figura 76 – Piastra agar con la soluzione prima della filtrazione testata con PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

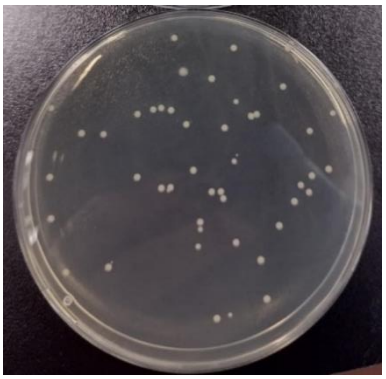


Figura 77 – Piastra agar con la soluzione post filtrazione con la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

Il filtro su agar non presenta nessuna proliferazione di colonie batteriche e non ha rilasciato parte del rivestimento composito in soluzione.

In conclusione, per quanto riguarda il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20, la crescita delle colonie è stata simile per entrambe le soluzioni. Per il test su agar nutriente si è passati da 55 colonie (*Figura 78*) a 54 colonie (*Figura 79*).

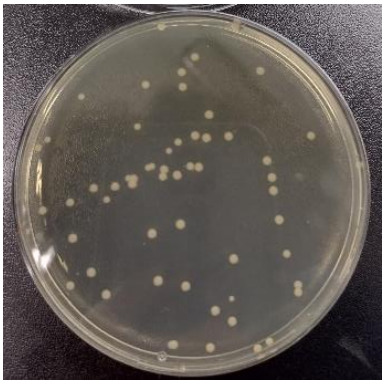


Figura 78 - Piastra agar con la soluzione prima della filtrazione testata con la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

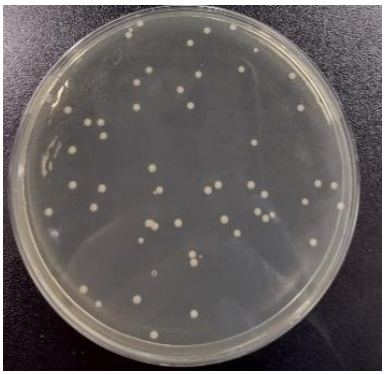


Figura 79 - Piastra agar con la soluzione post filtrazione testata con la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20

Il filtro non è efficace nel trattenere i batteri ma mantiene le sue capacità antibatteriche (*Figura 80*).

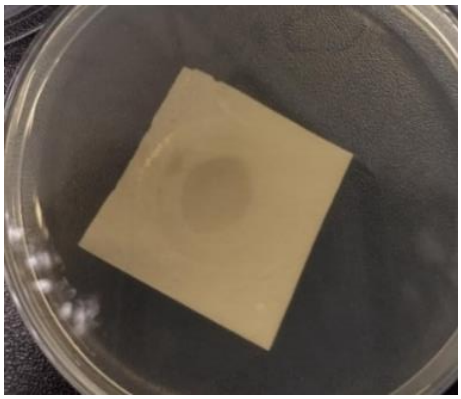


Figura 80 – Zoom su membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 su piastra agar dopo 24 ore

Per testare il filtro in PCL usando un fluido idrofobo quindi con caratteristiche chimico fisiche differenti dalla soluzione contaminata da batteri o dalla semplice acqua distillata, è stato effettuato un test con olio di oliva extra vergine.

Figura 81 – Zoom su membrana in PCL a seguito del test con olio

Considerando la natura idrofoba del filtro PCL (*Figura 81*), a contatto con una goccia o più di olio, abbiamo accertato il fatto che il filtro tal quale fa passare il fluido in modo rapido. Dopo aver testato qualche goccia abbiamo versato in modo più ingente l'olio proprio per capire la velocità di filtrazione. Mentre con il filtro PCL_ZrO_2-Ag_10 la velocità si è ridotta.

La strumentazione utilizzata è la stessa degli esperimenti precedenti (*Figura 82*).

Figura 82 - Strumentazione per test con olio di oliva extra vergine

Si nota però una riduzione sostanziale dell'angolo di contatto rispetto allo stesso filtro testato con la soluzione contaminata di batteri, qualunque sia il batterio impiegato.

Col passare di alcuni minuti è ben evidente l'allargamento della goccia di olio sul filtro, con la diminuzione dell'angolo di contatto (*Figura 83*).

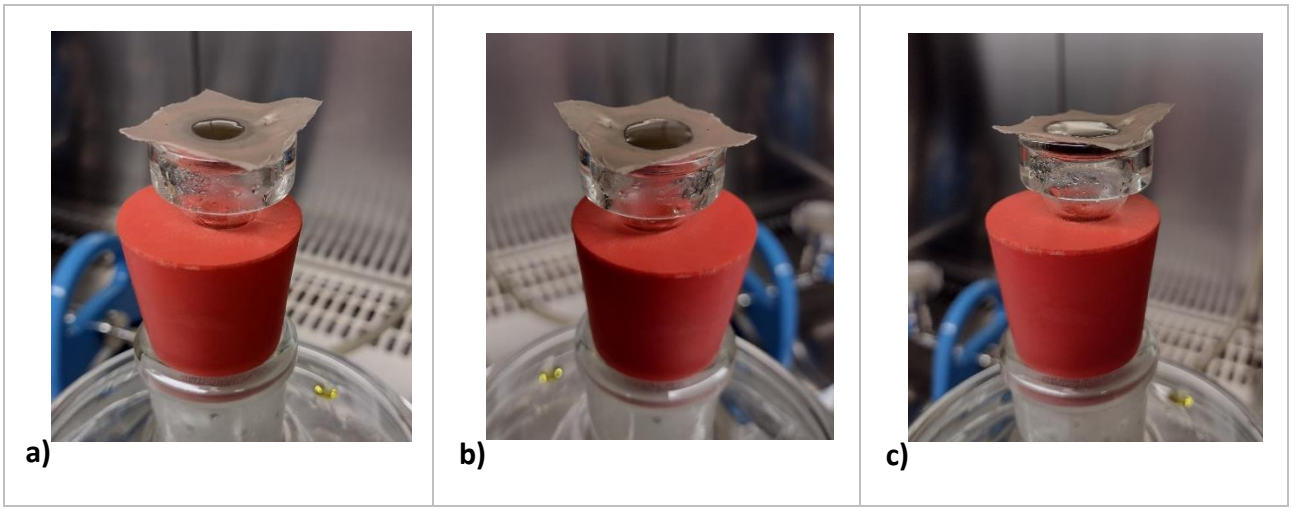


Figura 83 – Variazione dell'angolo di contatto all'aumentare del tempo (a,b,c)

Per ultimo è stato svolto anche un test di prova con una soluzione reale. Ciò è stato reso possibile grazie ad un campione fornito da CRAB Medicina Ambiente, il quale è stato campionato all'uscita di un depuratore biologico di un impianto tessile di finissaggio e tintoria.

Figura 84 – Campione acqua di scarico finissaggio/tintoria

L'acqua di scarico di colore violaceo (*Figura 84*) è stata utilizzata per ripetere i test di crescita batterica su agar e testare la soluzione post filtrazione all'ICP-MS.

È stato verificato che la velocità di passaggio della soluzione attraverso il filtro è diminuita all'aumentare del tempo di filtrazione e dopo alcuni minuti si è verificata un'occlusione dei pori anche a causa della presenza di una leggera percentuale di solidi sospesi.

I filtri impiegati sono:

- PAN+PCL
- PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

Da entrambi i campioni sono stati ottenuti dei buoni risultati. La crescita batterica è stata rapida e ben evidente sin da poche ore dopo l'incubazione. Dopo 24 h in incubatore, infatti, al di sopra delle piastre agar sono cresciute molto colonie.

Del campione PAN+PCL (*Figura 85*) si nota come sulla piastra con la soluzione non filtrata il numero di colonie sia visivamente superiore a quella dopo filtrazione e sul filtro siano presenti diverse colonie (*Figura 86*).

L'area del filtro (*Figura 86*) che è stata a contatto con l'acqua di scarico si è leggermente colorata ma ciò non ha permesso di ridurre l'intensità del colore della soluzione, questo infatti non è lo scopo del filtro.

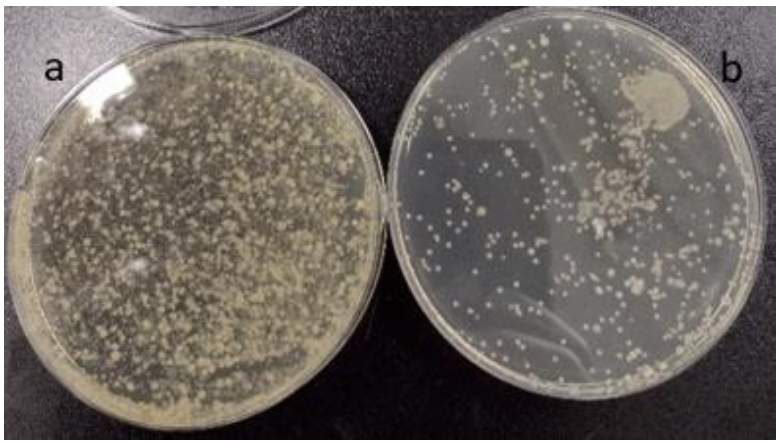


*Figura 85 – Piastre agar dopo **24 h***
a) con la soluzione prima della filtrazione
b) con la soluzione filtrata usando la membrana PAN+PCL

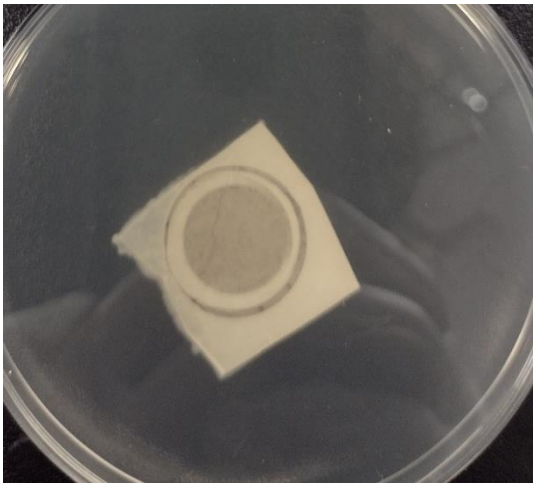


Figura 86 – Crescita di colonie sulla membrana PAN+PCL su piastra agar

Anche per il test effettuato su PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10, la crescita batterica su agar della soluzione prima e dopo filtrazione ha portato alla stessa conclusione (*Figura 87*). Infatti, non c'è stata una differenza sostanziale tra i due filtri per quanto riguarda questo comportamento.

La differenza principale è stata l'assenza di crescita di colonie sul filtro PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10, grazie alla presenza del rivestimento (*Figura 88*).

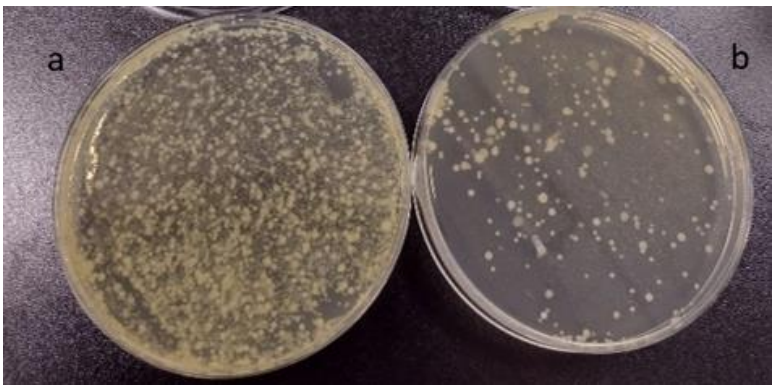


*Figura 87 - Piastre agar dopo **24 h***
a)) piastra agar con soluzione prima della filtrazione
b) piastra agar con soluzione filtrata PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

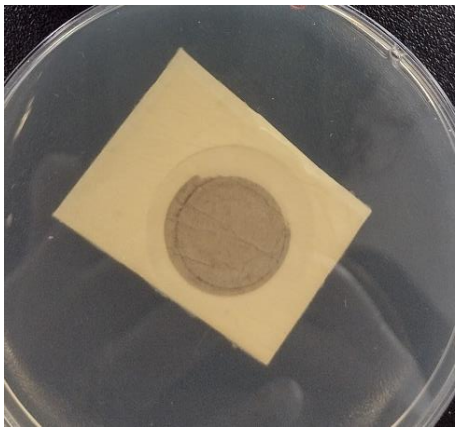


Figura 88 – Zoom su membrana
PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 su piastra agar

In conclusione l'antibattericità del filtro resta valida anche se a contatto si pone una soluzione molto contaminata e con presenza di svariati metalli.

Dopo due giorni sulle piastre agar era cresciuto un numero di colonie elevato (*Figura 89*), Queste erano di forma diversa e colore (sfumature del giallo e marrone). Anche i bordi della colonia cambiavano in base a quella considerata. Sono state individuate delle colonie di *L. Monocytogenes* e di *Bacillus*, identificati proprio dalla loro forma caratteristica.

In aggiunta il filtro PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10, non permettendo la crescita batterica sullo stesso, nel lungo termine ha una maggiore capacità filtrante poiché i pori non vengono otturati dalla crescita batterica, come invece è accaduto per il campione PAN+PCL.

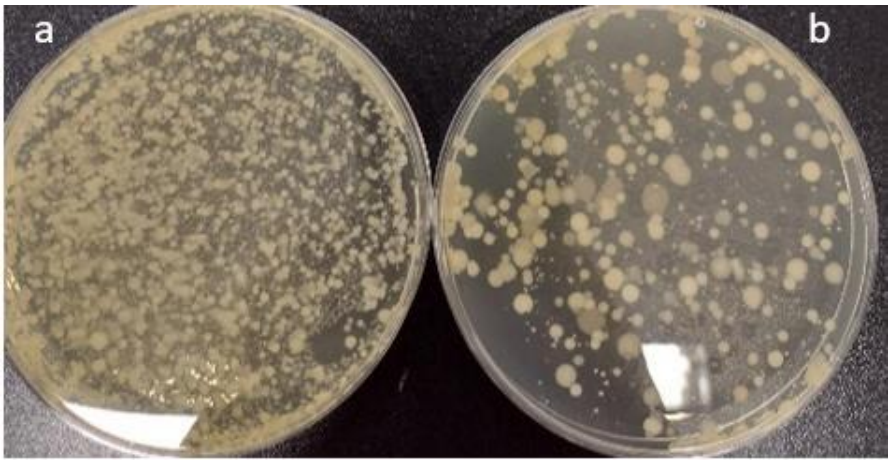


*Figura 89 – Piastre agar dopo **2 giorni***
a) con la soluzione non filtrata
b) con la soluzione filtrata con PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10

Il filtro non rilascia nulla in soluzione, come ricavato dall'analisi ICP-MS, infatti i valori degli elementi Ag e Zr si aggirano attorno al 0,536 µg/l e a 0,320 µg/l rispettivamente.

Dalla stessa è stata verificata la presenza di metalli nell'acqua di scarico con le seguenti concentrazioni (*Tabella 5*).

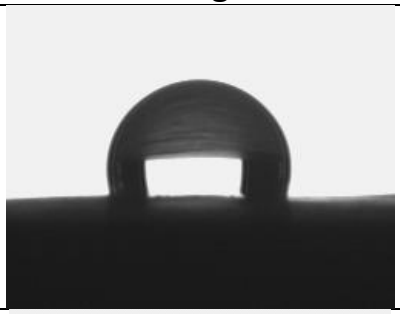
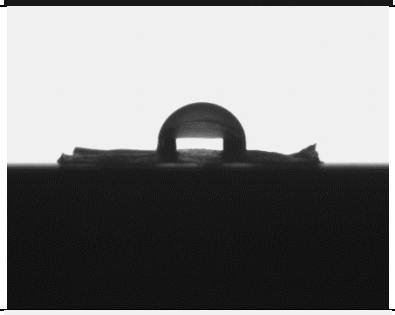
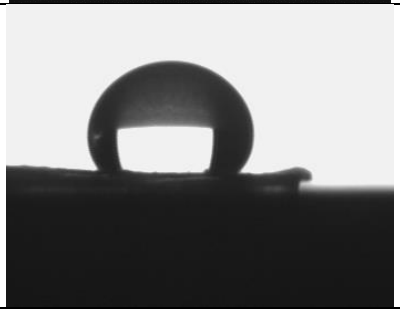
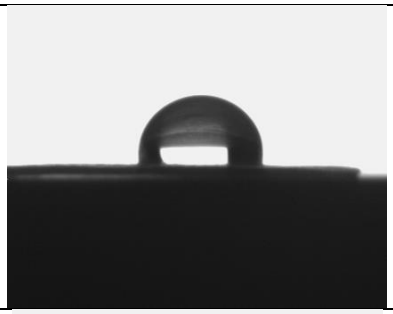
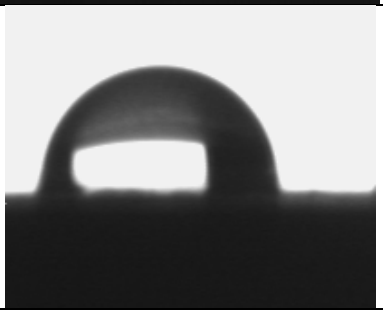
Tabella 5 – Elementi presenti nell'acqua di scarico

Elemento	Valore [µg/l]
Li	20,566
B	6,406
Mg	2337,402
Al	27,464
Si	6711,747
P	1106,614
Cr	40,948
Mn	16,403
Fe	58,368
Zn	19,306

3.2.5 Angolo di contatto

I risultati ottenuti dall'analisi dell'angolo di contatto sono inseriti nella *Tabella 6* sottostante.

Tabella 6 – Dati raccolti dall'analisi dell'angolo di contatto dei 6 campioni analizzati

Campione	Angolo di contatto	Immagine
a) PCL	Θ = 107.9° ± 1.98°	
b) PCL_ZrO_2-Ag_10	Θ = 97.4° ± 1.55°	
c) PCL_ZrO_2-Ag_20	Θ = 127.5° ± 2.10°	
d) PAN+PCL	Acqua distillata assorbita Nessun angolo di contatto misurabile	ND
e) PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10	Θ =98.4° ± 1.46°	
f) PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20	Θ = 88.9° ± 1.44°	

Dall'analisi è stato verificato che il valore dell'angolo di contatto cresce all'aumentare del tempo di deposizione sul filtro, in questo modo i campioni sono via via più idrofobi. Il range misurato va dagli 88.9° circa ai 127.5°. Sono stati calcolati 88.9° per il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Tabella 6 – punto a)*) e 127.5° per il campione PCL_ZrO_2-Ag_20 (*Tabella 6 – punto c)*), campione con il più elevato angolo di contatto.

I valori misurati fanno sì che tutti i campioni possano essere considerati come idrofobi, tranne il campione PAN+PCL tal quale, in cui è stato impossibile valutare l'angolo di contatto, poiché la goccia di acqua distillata è stata immediatamente assorbita dallo stesso. Ciò valida il fatto che il campione PAN+PCL permetta perfettamente il passaggio della soluzione da filtrare, come descritto e riscontrato nel capitolo "***3.2.4 - Tecnica di filtrazione – inoculazione su test di coltura e analisi ICP-MS connessa***".

L'anomalia si è presentata per il campione PCL_ZrO_2-Ag_10 sul quale è stato calcolato un valore di angolo non in linea con quanto ipotizzato, cioè non seguente il trend di crescita. Il valore infatti è di 97.4°, leggermente inferiore al valore del campione PCL ma comunque più basso.

Il valore ottenuto dal campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 è leggermente sceso rispetto a quello del PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 invece che aumentare ma resta molto vicino e quindi si può ipotizzare che l'andamento sia mantenuto dato che entrambi i campioni permettono la filtrazione. C'è anche da considerare il fatto che il test dell'angolo di contatto valuta il primo strato superficiale essendo un test di superficie.

I valori sul campione PCL con qualunque deposizione restano però più alti dei valori ottenuti per il PAN+PCL, infatti in generale si può affermare che il campione PCL con qualunque deposizione ha un angolo di molto superiore ai 90° e anche per questo può aver riscontrato una difficoltà nella filtrazione, impedendo il passaggio della soluzione.

3.2.6 Sintesi e confronto dei risultati

Riassumendo i risultati ottenuti dai diversi test, è possibile creare una legenda sintetica che contiene per ogni strumentazione, tipologia di filtro e condizioni di rivestimento, quali sono i comportamenti e le caratteristiche significative (*Tabella 7*).

Tabella 7 - Legenda

LEGENDA	
C	Conforme / Deposizione efficace
NC	Non Conforme / Deposizione non efficace
n/a	Non applicabile / Senza deposizione
+	Alone presente
++	Alone di dimensioni maggiori

Tali caratteristiche sono riportate nella tabella di seguito (*Tabella 8*):

Tabella 8

CAMPIONE	PCL	SPUTTERING	FESEM	EDS	ANTIBATTERICITA'	FILTRAZIONE	INOCULAZIONE SU AGAR	RILASCIO IONICO (ICP-MS)
TEMPO	0	n/a	Fibre accartocciate	n/a	NO	Sì	Sì	No
	10	C	Fibre accartocciate con rivestimento globulare non uniforme	Ag ben distribuito	+	No	n/a	n/a
	20	NC	Fibre accartocciate con rivestimento globulare più denso e uniforme	Nanoclusters di Zr dispersi e Ag disperso	++	NO	n/a	n/a
CAMPIONE	**PAN+PCL**	**SPUTTERING**	**FESEM**	**EDS**	**ANTIBATTERICITA'**	**FILTRAZIONE**	**INOCULAZIONE SU AGAR**	**RILASCIO IONICO (ICP-MS)**
TEMPO	0	n/a	fibre sovrapposte più ordinate - formano una rete	n/a	NO	SI	C	NO
	10	C	fibre come le precedenti ma rivestimento globulare denso e continuo	Nanoclusters di Zr ben dispersi e Ag ben disperso	+	SI	C	rilascio di Ag in alcuni test
	20	C	fibre con un film di rivestimento globulare	Nanoclusters di Zr dispersi e Ag disperso	++	SI	C	NO

I campioni tal quale sia in PCL che in PAN+PCL permettono il passaggio della soluzione contaminata e non sono antibatterici. La loro struttura formata da fibre incrociate in modo più o meno fitto permette di trattenere un numero basso e in alcuni casi, irrilevante, di batteri in soluzione ma come substrati sono ideali per essere sottoposti al trattamento di sputtering.

Durante il processo di sputtering la membrana in PAN+PCL non si è deteriorata per entrambe le deposizioni di 10 e 20 min, al contrario della membrana in PCL che tendeva ad accartocciarsi già durante la deposizione a tempi inferiori.

Il campione in PAN+PCL ha dimostrato caratteristiche più adatte a livello di filtrazione, di riduzione batterica in soluzione filtrata e anche di mantenimento delle proprietà antibatteriche con la presenza del rivestimento. La membrana in PCL durante il processo di deposizione si è deteriorata ed è stato difficile procedere con l'analisi soprattutto di filtrazione delle soluzioni.

Questo filtro sembrerebbe non adatto alla deposizione del rivestimento.
D'altro canto, entrambi i campioni in PAN+PCL con deposizione da 10 o 20 minuti sono più o meno efficaci per il processo, con qualunque tipo di batterio e soluzione testata.

Il comportamento dei diversi test ripetuti con lo stesso filtro è simile e valido. Solo nel caso del campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 si è verificato un ridotto rilascio di ioni argento dal rivestimento.
Invece non si è mai verificato nella serie di test effettuata un rilascio consistente di Zr in soluzione.

Attraverso l'analisi EDS è stato possibile controllare anche l'omogeneità del rivestimento depositato tramite sputtering. Dai risultati ottenuti sembra che il substrato in PCL_ZrO_2-Ag_10 abbia una deposizione di argento maggiormente distribuita rispetto agli altri rivestimenti sullo stesso tipo di polimero. Anche il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10, seguito dal PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20, possiede un rivestimento formato da una matrice in zirconia ben distribuita e una fase secondaria di nanoclusters di Ag ben dispersi.

Per la porosità del substrato, dalle immagini al FESEM si nota che esistono dei vuoti interconnessi dati da come le fibre si sono appoggiate sul piatto dell'electrospinning.

Per quanto riguarda il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 e PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20, dall'analisi di alcune aree con il FESEM, si ipotizza che la dimensione delle cosiddette porosità aperte sia maggiore della dimensione dei batteri presenti in soluzione, dato che alcuni permeano oltre il filtro. L'intreccio di fibre genera delle porosità dell'ordine del µm, se non maggiori in alcune zone e leggermente minori in altre, dato che il substrato con il rivestimento permette il passaggio dei batteri e non una filtrazione efficiente al 100%.

Sui campioni con il rivestimento si nota che la distanza tra le fibre non sembra essere stata ridotta a seguito della deposizione via sputtering. È però probabile che ci sia stata una lieve variazione della cristallinità del polimero che ha permesso di trattenere alcuni batteri ma comunque permettendo il passaggio della soluzione.

Una situazione diversa si è riscontrata per i campioni PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_20, sui quali non permea la soluzione. Dalle immagini al FESEM non si ritrova una differenza sostanziale nella distanza tra una fibra e l'altra dalla membrana tal quale a quella rivestita, ma è più probabile che a causa della deposizione in camera ci sia stato un problema legato al raffreddamento del substrato che ha fatto variare la cristallinità del polimero in modo significativo, impedendo il passaggio della soluzione e rendendo il substrato completamente idrofobico. A causa della variazione della tensione superficiale, la filtrazione è stata impossibile in questo caso.

Tale variazione di cristallinità del PCL si nota anche da una variazione dell'aspetto. Dopo aver effettuato la deposizione si nota in modo evidente che i campioni PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_20 dal lato non rivestito hanno cambiato colore.
Anche il lato non rivestito si è presentato marroncino/dorato, come se il rivestimento si fosse infilato tra una fibra e l'altra, fino a raggiungere l'altra faccia e fosse visibile anche dall'altro lato. Questo fenomeno non si è presentato sul campione in PAN+PCL con entrambe le deposizioni.

A livello di capacità antibatterica, i filtri PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 e PCL_ZrO_2-Ag_20 possiedono la maggiore antibattericità invece i campioni PAN+PCL e PCL non presentano tale capacità, attorno al filtro deposto su piastra agar in incubatore si ha crescita batterica. Questi risultati sono identici sia

per i test effettuati con *Epidermidis* che con *E. Coli*. Risultati intermedi sono stati ottenuti con entrambi i batteri per i filtri PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 e PCL_ZrO_2-Ag_10.

La percentuale maggiore di riduzione batterica, confrontando la soluzione prima della filtrazione e dopo filtrazione, si è verificata per il campione PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20, con il quale la riduzione si è aggirata attorno al 88 %, infatti si è passati da circa 86 colonie a 10.

Facendo un confronto in base alla tipologia di batterio utilizzata, si è riscontrato che:

- tra i batteri Gram positivi (*Bacillus*, *L. Monocytogenes*), le prestazioni migliori si sono ottenute con le membrane PAN+PCL rivestite sia per 10 che 20 min ;

- per il batterio Gram negativo (*E. Coli*), la membrana PAN+PCL ha permesso di raggiungere risultati accettabili ma non paragonabili a quelli ottenuti con gli altri batteri, in questo caso ha portato ad una riduzione post filtrazione del 28% di colonie. Mentre con il PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 e PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 si è ottenuta una leggera riduzione batterica e l'antibattericità è stata verificata;

- tra i batteri Gram positivi, il migliore risultato è stato ottenuto con il *Bacillus* e il filtro PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20 nel quale c'è stata una riduzione del 88% dopo 24 h e nessuna crescita batterica sul filtro deposto su piastra agar; mentre la membrana PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 testato con la *L. Monocytogenes* ha portato ad un massimo di riduzione del 45%: dopo due giorni sono state contate 87 colonie sulla piastra con la soluzione non filtrata e 48 sulla piastra con la soluzione filtrata.

In aggiunta il filtro PCL_ZrO_2-Ag_10 ha permesso il passaggio di qualche cl di olio di oliva poiché idrofobo come il filtro stesso.

Mentre con la prova effettuata con l'acqua di scarico uscente dal depuratore di un lanificio, i filtri PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 e PAN+PCL hanno svolto la loro funzione trattenendo alcuni batteri ma soprattutto il PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 si è dimostrato essere nuovamente antibatterico. In particolare, sullo stesso filtro, la proliferazione delle colonie batteriche è stata incontrollabile ed è stato difficile contare il numero effettivo di colonie presenti sulle piastre agar.

Si reputa interessante anche la velocità e il quantitativo di crescita dei batteri di famiglie diverse sui filtri. Le colonie di *L. Monocytogenes* crescono molto più lentamente di quelle di *E. Coli* e *Bacillus*. Mentre un'acqua di scarico di un lanificio, tintoria o finissaggio ben contaminata, impiega meno ore a far crescere i batteri presenti al suo interno su un terreno nutriente come il Tryptic Soy Agar, infatti nel giro di poche ore si sono già potute contare diverse colonie in entrambe le piastre.

L'angolo di contatto sui filtri è stato calcolato proprio per dare un'ulteriore spiegazione del fatto che il filtro in PCL con deposizione, non permette il passaggio della soluzione batterica.
In realtà ci si aspettava un angolo superiore a 90° come è stato verificato ma anche dei valori per i tre filtri (PCL, PCL_ZrO_2-Ag_10, PCL_ZrO_2-Ag_20) in scala crescente, in cui il filtro PCL_ZrO_2-Ag_20 possiede il valore più alto di Θ, poiché è anche il filtro che ha avuto più problemi nella filtrazione.
Quindi per il campione PCL_ZrO_2-Ag_10 il risultato è stato leggermente anomalo ma comunque vicino al PCL e superiore ai 90° che determinano l'idrofobicità della superficie.

Il campione PAN+PCL ha assorbito la goccia di acqua distillata depositata senza permettere di farla assestare e poter calcolare l'angolo e catturare la schermata. Infatti il campione filtra bene la soluzione e quindi è l'unico campione idrofilo.

Il PCL_ZrO_2-Ag_10 ha fatto ottenere un valore attorno ai 98° quindi in crescita rispetto al PCL ma per il campione PCL_ZrO_2-Ag_20 il valore è diminuito, di qualche grado ma diminuito.

4 Conclusioni

In questo lavoro di tesi, è stato sviluppato un rivestimento nanostrutturato composito costituito da nanoclusters di argento immersi in una matrice di zirconia depositato su membrane in PAN+PCL o PCL. Tali membrane sono state create con la tecnica di electrospinning e sottoposte a un processo di sputtering per 10 o 20 minuti e poi utilizzate per filtrare soluzioni batteriche acquose.

Dopo una serie di deposizioni e con analisi preliminari di composizione, sono stati ottimizzati i parametri di processo e anche le potenze applicate ai target per ottenere dei rivestimenti con una quantità di argento e zirconia bilanciata e idonea.

In generale, per ogni filtro studiato sottoposto a sputtering, la caratterizzazione morfologica (FESEM), l'analisi composizionale del rivestimento (EDS), l'analisi composizionale della soluzione (ICP-MS), il test di antibattericità, la tecnica di inoculazione su agar e il calcolo dell'angolo di contatto, hanno permesso di ottenere dei risultati concreti per comprendere la validità del filtro impiegato nella filtrazione di soluzioni acquose.

I vari campioni in PAN+PCL con i diversi tempi di deposizione sono quelli più adatti a tale applicazione. In particolare i migliori risultati sono stati ottenuti dai campioni in PAN+PCL rivestiti sia per 10 che per 20 min (PAN+PCL_ZrO_2-Ag_10 e PAN+PCL_ZrO_2-Ag_20), infatti:

- sono antibatterici rispetto a diversi batteri (*E.Coli, L. Monocytogenes , Bacillus*);
- permettono la filtrazione della soluzione e riducono la carica batterica in essa presente;
- in generale non rilasciano gli ioni del rivestimento in soluzione.

In conclusione, anche facendo riferimento alla ricerca bibliografica, esistono svariati studi sui materiali polimerici applicati in ambito filtrazione per la creazione di membrane, infatti i filtri a base metallica sono stati superati per alcune applicazioni dalle membrane polimeriche in PCL, PVDF, PAN,PP, PTFE, ….

Non solo questi substrati possono essere rivestiti con la tecnica di sputtering come in questo elaborato ma anche con una sua evoluzione il magnetron sputtering oppure con lo spray coating o la crescita sol-gel Infatti in futuro sarebbe interessante ampliare lo studio di queste membrane indagando con altre strumentazioni la loro natura e applicabilità, anche per quanto riguarda le tecniche di deposizione non solo in ambito filtrazione acqua ma anche per la filtrazione aria. In più l'effettuare altri test usando differenti batteri patogeni porterebbe ad un ulteriore valore aggiunto.

5 Riferimenti bibliografici

[1] I. Jahan e L. Zhang, «Natural Polymer-Based Electrospun Nanofibrous Membranes for Wastewater Treatment: A Review», *J. Polym. Environ.*, vol. 30, n. 5, pagg. 1709–1729, mag. 2022, doi: 10.1007/s10924-021-02312-1.

[2] R. K. Mishra *et al.*, «Electrospinning production of nanofibrous membranes», *Environ. Chem. Lett.*, vol. 17, n. 2, pagg. 767–800, giu. 2019, doi: 10.1007/s10311-018-00838-w.

[3] Y. Zhai, G. Liu, e W. G. J. van der Meer, «One-Step Reverse Osmosis Based on Riverbank Filtration for Future Drinking Water Purification», *Engineering*, vol. 9, pagg. 27–34, feb. 2022, doi: 10.1016/j.eng.2021.02.015.

[4] J. Li, D. Zhang, X. Ni, H. Zheng, e Q. Zhang, «Excellent hydrophilic and anti-bacterial fouling PVDF membrane based on ag nanoparticle self-assembled PCBMA polymer brush», *Chin. J. Polym. Sci.*, vol. 35, n. 7, pagg. 809–822, lug. 2017, doi: 10.1007/s10118-017-1944-3.

[5] O. K. Pereao, C. Bode-Aluko, G. Ndayambaje, O. Fatoba, e L. F. Petrik, «Electrospinning: Polymer Nanofibre Adsorbent Applications for Metal Ion Removal», *J. Polym. Environ.*, vol. 25, n. 4, pagg. 1175–1189, dic. 2017, doi: 10.1007/s10924-016-0896-y.

[6] N. Görgün, Ç. Özer, e K. Polat, «A new catalyst material from electrospun PVDF-HFP nanofibers by using magnetron-sputter coating for the treatment of dye-polluted waters», *Adv. Compos. Hybrid Mater.*, vol. 2, n. 3, pagg. 423–430, set. 2019, doi: 10.1007/s42114-019-00105-8.

[7] M. Ferraris, S. Perero, M. Miola, S. Ferraris, E. Verné, e J. Morgiel, «Silver nanocluster–silica composite coatings with antibacterial properties», *Mater. Chem. Phys.*, vol. 120, n. 1, pagg. 123–126, mar. 2010, doi: 10.1016/j.matchemphys.2009.10.034.

[8] Y. Yao, L. Shen, A. Wei, T. Wang, e S. Chen, «Facile synthesis, microstructure, photo-catalytic activity, and anti-bacterial property of the novel Ag@gelatin–silica hybrid nanofiber membranes», *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 89, n. 3, pagg. 651–662, mar. 2019, doi: 10.1007/s10971-018-04914-z.

[9] A. Chithra, R. Sekar, P. Senthil Kumar, e G. Padmalaya, «A review on removal strategies of microorganisms from water environment using nanomaterials and their behavioural characteristics», *Chemosphere*, vol. 295, pag. 133915, mag. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.133915.

[10] Y. L. Li, A. Deletic, e D. T. McCarthy, «Removal of E. coli from urban stormwater using antimicrobial-modified filter media», *J. Hazard. Mater.*, vol. 271, pagg. 73–81, apr. 2014, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.01.057.

[11] S. Kroll, L. Treccani, K. Rezwan, e G. Grathwohl, «Development and characterisation of functionalised ceramic microtubes for bacteria filtration», *J. Membr. Sci.*, vol. 365, n. 1, pagg. 447–455, dic. 2010, doi: 10.1016/j.memsci.2010.09.045.

[12] A. Cooper, R. Floreani, H. Ma, J. D. Bryers, e M. Zhang, «Chitosan-based nanofibrous membranes for antibacterial filter applications», *Carbohydr. Polym.*, vol. 92, n. 1, pagg. 254–259, gen. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.114.

[13] D. M. Mihut, A. Afshar, L. W. Lackey, e K. N. Le, «Antibacterial effectiveness of metallic nanoparticles deposited on water filter paper by magnetron sputtering», *Surf. Coat. Technol.*, vol. 368, pagg. 59–66, giu. 2019, doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.04.039.

[14] S. Fahimirad, Z. Fahimirad, e M. Sillanpää, «Efficient removal of water bacteria and viruses using electrospun nanofibers», *Sci. Total Environ.*, vol. 751, pag. 141673, gen. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141673.

[15] Scheda tecnica_Tryptic Soy Agar (TSA) (EP)_Scharlau
[16] Scheda tecnica_ Maximum Recovery Diluent MRD-3X3 L_Scharlau
[17] Certificate of Analysis_ *Bacillus Subtilis Subsp*. Spizizenii_Microbiologics
[18] Certificate of Analysis_ *Listeria Monocytogenes*_Scharlau
[19] Certificate of Analysis_*Escherichia Coli*_Microbiologics
[20] Scheda tecnica_MICROBANK™ IN MICROBANK STORAGE BOX_Sistema per il mantenimento e il trasporto dei ceppi microbici_Biolife Italiana S.r.l.

6 Ringraziamenti

Mi è doveroso dedicare questo spazio del mio elaborato alle persone che hanno contribuito, con il loro instancabile supporto, alla realizzazione dello stesso e che mi hanno accompagnata in questi anni di studio e di inizio attività lavorativa.

In primis, un ringraziamento speciale ai miei relatori, universitario ed aziendale, per aver accettato di avermi come tesista, tirocinante ed infine come collega. Ringrazio infinitamente Giulia ed Angelica per avermi saputo guidare con professionalità e con suggerimenti pratici durante tutti i test sostenuti.

Grazie a tutti i miei colleghi di laboratorio per avermi spronata a concludere in fretta questo percorso, per aver reso l'ambiente di lavoro piacevole e sereno e per avermi aiutata in casi di difficoltà nell'utilizzo delle strumentazioni.

Ringrazio principalmente i miei genitori, mio fratello e tutta la mia famiglia che mi hanno sempre sostenuta, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del mio percorso di studi e per esserci sempre stati soprattutto nei momenti di sconforto.

Un immenso grazie a mia nonna per avermi insegnato che nulla è impossibile se lo si desidera davvero e alle mie cugine preferite per aver sopportato le mie continue lamentele e paranoie.

Grazie alle mie amiche di infanzia e alle mie colleghe universitarie per essere state presenti anche durante quest'ultima fase del mio percorso di studi. Grazie per aver ascoltato i miei sfoghi e grazie per tutti i momenti di spensieratezza passati assieme.

Ed infine ringrazio Mattia, colui con cui vorrei condividere il resto della mia vita, per la sua immensa pazienza, per i suoi indispensabili consigli, per il supporto morale che mi ha fornito e che continua a darmi e per l'amore immenso che mi trasmette ogni giorno…

Grazie a me stessa per non aver mai mollato.

Michela