



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

2024/2025

Sessione di laurea ottobre 2025

Materiali avanzati per piattaforme ad alta resa nello studio di biofilm elettroattivi

Relatori:

Alessandra Vitale

Marzia Quaglio

Giulia Massaglia

Giacomo Spisni

Candidata:

Bianca Sorvillo

Indice

Abstract	5
1 Introduzione	7
1.1 Contesto generale	7
1.2 Formazione del biofilm	9
1.2.1 Fasi principali	9
1.2.2 Proprietà superficiali determinanti	12
1.3 Materiali oggetto di studio	15
1.3.1 Materiali a base grafite: carbon paper e rivestimenti polimerici	15
1.3.2 Materiali a base grafene: Laser-Induced Graphene (LIG) . .	19
1.4 Microbial Fuel Cells come strumento di analisi	20
1.4.1 Principio di funzionamento	21
1.4.2 Architettura	21
1.5 Tecniche di caratterizzazione elettrochimica dei biofilm	23
1.5.1 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)	24
1.5.2 Voltammetria a scansione lineare (LSV)	26
2 Materiali e metodi	29
2.1 Materiali	29
2.2 Preparazione degli elettrodi	30
2.2.1 Preparazione catodi	30
2.2.2 Preparazione anodi	31
2.3 Valutazione citotossica dei materiali	35
2.3.1 Prove su piastre agar	35
2.3.2 Optical Density (OD)	36
2.4 Assemblaggio delle MFC e monitoraggio dell'attività elettrica	37
2.4.1 Preparazione dei componenti strutturali delle celle e assem- blaggio	37
2.4.2 Preparazione dell'elettrolita	39
2.4.3 Avvio dell'esperimento MFC	39
2.4.4 Sistema di monitoraggio	40

2.5	Caratterizzazioni elettrochimiche sulle MFC	41
2.5.1	Linear Sweep Voltammetry (LSV)	42
2.5.2	Eletrochemical Impedance Spectroscopy	42
3	Risultati e discussione	45
3.1	Prove di citotossicità	45
3.1.1	Piastre agar	45
3.1.2	Optical Density	46
3.2	Monitoraggio potenziale nel tempo	47
3.2.1	Fase di colonizzazione iniziale	49
3.2.2	Fase di maturazione del biofilm	51
3.2.3	Fase di stabilizzazione a lungo termine	54
3.2.4	Modifica dei parametri operativi	56
3.3	Caratterizzazioni	57
3.3.1	Electrochemical Impedance Spectroscopy	57
3.3.2	Linear Sweep Voltammetry	59
4	Conclusioni	62

Elenco delle figure

1.1	Rappresentazione delle fasi di formazione del biofilm	10
1.2	Rappresentazione schematica dell'adesione batterica in funzione delle diverse proprietà superficiali, dai fattori ambientali e dalle condizioni intrinseche del sistema	13
1.3	Configurazione sperimentale dell'electrospinning e principio operativo	16
1.4	Polietilene ossido (PEO)	17
1.5	Alcol polivinilico (PVA)	18
1.6	Poli(3,4-etilendiositiofene):polistirene solfonato (PEDOT:PSS) . . .	19
1.7	Applicazioni di elettrodi a base grafenica per applicazioni farmaceutiche e biomedicali	20
1.8	Approcci di rilevamento che utilizzano il biofilm batterico come elemento di riconoscimento	21
1.9	Principio di funzionamento di una MFC	22
1.10	Meccanismi coinvolti nel trasferimento di elettroni	23
1.11	Circuito di Randles	25
1.12	Risposta in impedenza di un circuito elettrico equivalente	26
1.13	Rappresentazione di una curva di polarizzazione di una MFC	27
2.1	Campioni di inoculo batterico per le MFC.	30
2.2	Catodi di CP/Pt.	31
2.3	Electrospinning Nanon 01	32
2.4	Laser Veronese	34
2.5	Confronto tra elettrodi utilizzati nello studio.	35
2.6	Componenti costitutivi ogni MFC. Non sono mostrati gli elettrodi. .	38
2.7	Multimetro Agilent 34972A	41
2.8	Parametri impiegati durante le caratterizzazioni LSV.	42
2.9	Potenziostrato MultiPalmSens4	43
2.10	Parametri impiegati durante le caratterizzazioni EIS.	43
2.11	Set-up per LSV ed EIS a cella intera.	44
2.12	Set-up per EIS a semicella.	44
3.1	Piastre agar	45

3.2	Optical density	47
3.3	Monitoraggio tensione nel tempo	48
3.4	Fase di colonizzazione LIG	49
3.5	Fase di colonizzazione nanostrutturazioni polimeriche	50
3.6	Fase di maturazione LIG	51
3.7	Fase di maturazione nanostrutturazioni polimeriche	53
3.8	Andamento medio della tensione nel dettaglio per i materiali nano- strutturati e il controllo.	54
3.9	Fase di stabilizzazione	55
3.10	Confronto frequenza di refill	57
3.11	Diagrammi di Nyquist	60

Abstract

I biofilm batterici rappresentano una complessa forma di organizzazione microbica, con un impatto complessivo tanto benefico quanto dannoso. Da un lato, sono responsabili di rilevanti criticità dall'ambito industriale a quello sanitario, con un peso economico globale stimato di circa 5 trilioni di dollari l'anno; dall'altro, le loro peculiari proprietà aprono prospettive promettenti nella biosensoristica, nel biorisanamento ambientale, nel trattamento delle acque reflue e nella produzione di energia tramite sistemi bioelettrochimici. In questo contesto, i biofilm elettroattivi (comunità microbiche aderenti a superfici conduttive e capaci di trasferire elettroni in maniera collettiva) rivestono un ruolo cruciale per le applicazioni biotecnologiche. L'obiettivo di questa tesi è la valutazione e la selezione di materiali idonei allo sviluppo di una piattaforma ad alta resa per l'analisi di biofilm elettroattivi. Sono stati indagati materiali a base grafitica (carbon paper, sia nella forma nativa sia funzionalizzato con un rivestimento nanostrutturato polimerico ottenuto tramite electrospinning) e materiali a base grafenica (laser-induced graphene, LIG), scelti per la loro conducibilità elettrica, biocompatibilità e per la possibilità di modulare le proprietà superficiali. L'analisi comparativa di questi substrati ha permesso di investigare come parametri chimico-fisici quali composizione chimica, rugosità e distribuzione di carica modulino i processi di adesione microbica e il conseguente sviluppo delle comunità batteriche.

Dato che il lavoro si focalizza su biofilm caratterizzati dalla presenza di batteri elettroattivi, la loro crescita è stata monitorata mediante celle a combustibile microbiche (MFC), tecnologie generalmente impiegate per la produzione di energia e particolarmente adatte per il monitoraggio della crescita di biofilm, in quanto consentono di correlare direttamente il segnale elettrico prodotto dai microrganismi con il loro metabolismo e sviluppo. In questo lavoro di tesi sono state effettuate caratterizzazioni elettrochimiche mediante voltammetria a scansione lineare (LSV), per determinare le curve di polarizzazione e le prestazioni complessive del sistema, e spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) in configurazioni a cella intera e semicella, per analizzare la resistenza di trasferimento di carica, la capacità del doppio strato elettrico e fenomeni diffusivi.

Questo studio contribuisce allo sviluppo di piattaforme avanzate per la comprensione

delle basi della crescita dei biofilm su materiali conduttivi, con prospettive future indirizzate alla biosensoristica medica e alla medicina personalizzata, abilitando potenzialmente diagnosi precoci e analisi in tempo reale dello stato di salute, attraverso lo studio delle dinamiche del microbioma.

Bacterial biofilms are a complex form of microbial organization, with both beneficial and detrimental implications. On the one hand, they are responsible for severe challenges in industrial and healthcare settings, with a global economic impact estimated at around 5 trillion dollars for year. On the other hand, their unique properties open promising opportunities in biosensing, environmental bioremediation, wastewater treatment, and energy production through bioelectrochemical systems. Within this framework, electroactive biofilms (i.e., microbial communities that adhere to conductive surfaces and are capable of collective electron transfer) play a pivotal role in biotechnological applications.

The objective of this thesis is to evaluate and identify materials suitable for developing a high-throughput platform for the analysis of electroactive biofilms. To this end, both graphitic materials (carbon paper, in pristine form and functionalized with a nanostructured polymeric coating obtained through electrospinning) and a graphene-based material (laser-induced graphene, LIG) were investigated. These substrates were selected due to their electrical conductivity, biocompatibility, and the possibility to modulate surface properties. The comparative analysis enabled the investigation of how surface characteristics such as chemical composition, roughness, and charge distribution regulate microbial adhesion and the subsequent development of bacterial communities.

Since this work focuses on biofilms characterized by the presence of electroactive bacteria, their growth was monitored using microbial fuel cell (MFC) technology. This system, commonly employed in energy production, are particularly well suited for monitoring biofilm growth, allowing direct correlation between the electrical signal produced by microorganisms and their metabolism and development. Complementary electrochemical analyses were performed by linear sweep voltammetry (LSV), to obtain polarization curves and evaluate overall system performance, and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), in both full-cell and half-cell configurations, to analyze charge transfer resistance, double-layer capacitance, and diffusion-related phenomena.

Overall, this study contributes to the development of advanced platforms for understanding the mechanisms of biofilm growth on conductive materials, with future perspectives in biomedical sensing and personalized medicine, potentially enabling early diagnostics and real-time monitoring of health status through microbiome dynamics.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Contesto generale

I biofilm batterici rappresentano una delle forme più complesse e diffuse di organizzazione microbica: si stima che circa il 40–80% delle cellule batteriche presenti sulla Terra sia in grado di aderire a diversi substrati. Tali comunità proliferano, formando strutture tridimensionali stabilizzate da una matrice extracellulare autoprodotta (EPS), che conferisce al biofilm resistenza e coesione [1]. Questa strategia consente ai microrganismi di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli, colonizzare superfici complesse e coordinare le proprie funzioni metaboliche.

La formazione di biofilm è un processo che desta notevole interesse nella comunità scientifica per il suo carattere ambivalente. Per ciò che riguarda i suoi effetti negativi, ci sono diversi contesti in cui questi consorzi rappresentano attualmente una sfida. Per esempio nell'industria alimentare, data la loro capacità di insediarsi negli impianti di lavorazione, causando contaminazioni, deterioramento dei prodotti e potenziali rischi per la salute dei consumatori [2]; in ambito sanitario, dove la presenza di biofilm è stata correlata a contaminazione di dispositivi medici impiantabili e sviluppo di infezioni croniche [3]; nel campo industriale, in quanto sono numerosi i danni legati al biofouling di superfici [4], alla corrosione e alla contaminazione dei sistemi idrici; nel settore agricolo, per la riduzione della produttività [5]. L'impatto economico globale associato ai biofilm ambientali è stimato di circa 5 trilioni di dollari annui [6], dato che la loro resistenza intrinseca ai trattamenti antimicrobici e ai metodi di pulizia convenzionali rende difficile la loro eradicazione.

Tuttavia, i biofilm possono essere una risorsa in diversi contesti. In ambito biotecnologico e ambientale, essi trovano applicazione nel biorisanamento, permettendo di degradare o trasformare composti tossici in sostanze meno pericolose [7], mentre nel trattamento delle acque reflue offrono un supporto nella capacità di neutralizzare composti organici e inorganici, con conseguente tutela degli ecosistemi

acquatici [8]. In agricoltura, i biofilm formati da rizobatteri sono in grado di colonizzare stabilmente radici, foglie e fusti, esercitando un ruolo di biocontrollo nei confronti di fitopatogeni e migliorando al tempo stesso la crescita delle piante [9].

Anche il corpo umano ospita una importante comunità microbica, composta da 10-100 trilioni di cellule simbiotiche, facenti parte di oltre 10.000 specie [10]. Il microbioma umano rappresenta una fonte inesauribile di informazioni biologiche, potenzialmente cruciali per il monitoraggio della salute e la prevenzione delle malattie. I microrganismi del corpo umano fungono da vere e proprie "sentinelle biologiche", poichè capaci di rilevare e rispondere a cambiamenti nell'ambiente fisiologico dell'ospite. Studi recenti hanno identificato associazioni specifiche tra alterazioni microbiche e patologie [11].

Oltre a rappresentare un importante oggetto di indagine per comprenderne la composizione microbica nell'ottica di diagnosi preventive, la particolare struttura del biofilm, caratterizzata da elevata adesione e stabilità nel tempo, può essere sfruttata come biosensore naturali per lo sviluppo di tecnologie innovative.

Ci sono diversi metodi comunemente utilizzati per la valutazione della formazione del biofilm: un esempio è il saggio al crystal violet, basato sulla colorazione della biomassa batterica, che permette di correlare la quantità di colorante trattenuata dal biofilm alla sua estensione [12]; oppure la microscopia confocale a scansione laser (CLSM), che sfrutta l'utilizzo di un laser per eccitare coloranti o proteine fluorescenti presenti nel biofilm, producendo una immagine tridimensionale della struttura [13].

I batteri appartengono a una delle forme di vita più antiche del pianeta, diversificati tra migliaia di specie che hanno sviluppato adattamenti metabolici specifici in risposta agli ambienti in cui si sono evoluti. Tra queste caratteristiche comportamentali, particolarmente rilevante è la capacità di alcuni microrganismi di trasferire elettroni, prodotti durante la respirazione cellulare, verso accettori solidi esterni. Questi batteri, definiti **elettroattivi**, provengono principalmente da ambienti anossici come sedimenti marini, suoli sommersi e zone di transizione dove l'ossigeno disciolto è scarso o assente [14]. In questi habitat, i batteri elettroattivi hanno sviluppato meccanismi alternativi per completare la catena respiratoria, utilizzando ossidi metallici insolubili come ferro e manganese, presenti nei sedimenti, come accettori terminali di elettroni [15]. Per studiare questi biofilm sono state sviluppate diverse tecniche elettrochimiche [16], che includono:

- **Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica (EIS):** Tecnica che applica una piccola perturbazione sinusoidale di potenziale a diverse frequenze per caratterizzare le proprietà elettriche dell'interfaccia elettrodo-biofilm, fornendo informazioni sulla resistenza al trasferimento di carica, comportamenti capacitivi e processi di diffusione;

- **Cronopotenziometria:** Tecnica in cui viene applicata una corrente costante all'elettrodo di lavoro e si monitora la variazione del potenziale nel tempo, utile per studiare i processi di trasporto di massa nel biofilm;
- **Cronoamperometria:** Tecnica in cui viene applicato un potenziale costante all'elettrodo di lavoro e si registra la risposta in corrente nel tempo, permettendo di valutare l'attività elettrocatalitica del biofilm;
- **Voltammetria Ciclica:** Tecnica in cui il potenziale viene variato linearmente mentre si registra la corrente, consentendo l'identificazione di specie elettroattive e meccanismi di trasferimento elettronico;
- **Microscopia Elettrochimica a Scansione (SECM):** Tecnica di imaging elettrochimico che permette di mappare la topografia del biofilm.

Tra questi sistemi, una tecnologia particolarmente promettente per il monitoraggio di batteri elettroattivi sono **le celle a combustibile microbiche (MFC)**, dispositivi bioelettrochimici che hanno diffusa applicazione nell'impiego di biofilm elettroattivi per la conversione di energia chimica in energia elettrica. Grazie alla loro versatilità nella gestione delle condizioni di anaerobiosi e alla presenza di un elettrodo che funge da accettore di elettroni, permettono di ricreare un ambiente controllato che mantiene i batteri attivi, traducendo direttamente la loro attività metabolica in un segnale elettrico misurabile in tempo reale .

L'obiettivo di questo lavoro è utilizzare le celle a combustibile microbiche non nella loro funzione convenzionale di dispositivi per la conversione di energia chimica in energia elettrica, ma come piattaforme flessibili e adattabili per il monitoraggio e lo studio controllato della crescita di biofilm elettroattivi. Per fare ciò, è stata studiata l'interazione batterio-substrato con diversi materiali di origine carboniosa, utilizzati come elettrodi nelle MFC, analizzandone l'attività metabolica nel tempo tramite segnali elettrici e tecniche elettrochimiche (EIS e Linear Sweep Voltammetry).

1.2 Formazione del biofilm

1.2.1 Fasi principali

Il processo di formazione del biofilm da parte dei batteri è un evento molto complesso e altamente dinamico. La transizione di microorganismi planctonici (batteri in forma singola), verso un substrato, è influenzata da una serie di stimoli provenienti dall'ambiente circostante, come la presenza di radiazioni UV o di nutrienti limitati, temperature estreme, pH, alta pressione e agenti antimicrobici [17]. Nonostante ci siano numerose specie microbiche che si differenziano l'una dall'altra, si possono

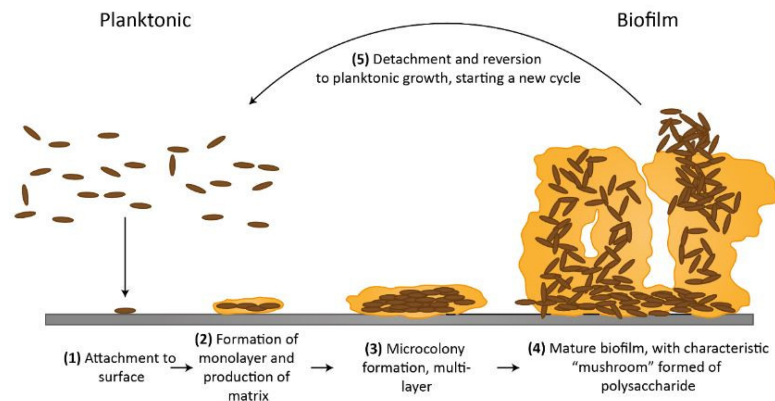


Figura 1.1: Rappresentazione delle fasi di formazione del biofilm [18].

individuare 5 fasi che definiscono la formazione del biofilm, come mostrato in Figura 1.1.

1. Adesione reversibile

Rappresenta lo step iniziale della formazione del biofilm e prende avvio con un insieme di interazioni tra pochi microrganismi in forma planctonica e la superficie del substrato. Questo movimento verso la superficie è mediato da una serie di meccanismi distinti, che sono generalmente *il moto browniano*, movimento casuale e irregolare delle particelle causato dalle collisioni con le molecole; *la convezione*, trasporto di massa dovuto al flusso del fluido; *la chemiotassi*, movimento diretto delle cellule batteriche verso una fonte di nutrienti o chemioattraenti (ad esempio, aminoacidi e zuccheri) lungo un gradiente di concentrazione in fluidi mobili.

Quando le cellule batteriche raggiungono la superficie del substrato, si stabilisce un equilibrio dinamico di forze fisico-chimiche che determina il carattere reversibile dell'adesione iniziale. Questo fenomeno è descritto dalla teoria di Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (XDLVO) [19], un modello che descrive l'adesione batterica caratterizzata da tre contributi fondamentali:

- **Interazioni di Lifshitz-van der Waals (LW)**, forze elettrodinamiche;
- **Interazioni del doppio strato elettrico (EL)**, repulsioni/attrazioni elettrostatiche basate sulle cariche superficiali;
- **Interazioni acido-base di Lewis (AB)**, interazioni polari che coinvolgono proprietà di donazione/acquisizione di elettroni.

La risultante di queste forze determina l'allontanamento o meno dalla superficie, rendendo questa fase critica nel processo di colonizzazione.

2. Adesione irreversibile

In questa fase i batteri iniziano a instaurare interazioni più stabili con il substrato. La superficie dei batteri è dotata di differenti adesine che si proiettano dalla superficie cellulare nell'ambiente extracellulare. Parallelamente, altri organelli di superficie quali flagelle, pili o fimbrie e adesioni non fimbriali, aiutano a consolidare il legame con il substrato [20] [21]. L'interazione fisica tra cellule batteriche e superficie non si limita al semplice contatto meccanico, ma coinvolge una complessa rete di forze molecolari che includono le interazioni dipolo-dipolo, legami idrogeno, legami covalenti ionici e interazioni idrofobiche.

Un ruolo determinante nel processo di formazione del biofilm è dato, in aggiunta, dal meccanismo di segnalazione cellula-cellula, noto come quorum sensing (QS). Tramite questo meccanismo di segnalazione, i batteri sono in grado di sintetizzare e rilasciare specifiche molecole segnale denominate autoinduttori (AIs). Tali prodotti orchestrano i processi di quorum sensing batterico in maniera densità-dipendente, regolando finemente le diverse fasi del ciclo di vita del biofilm, dalla formazione iniziale alla maturazione fino alla dispersione finale [22].

3. Produzione sostanze polimeriche extracellulari (EPS)

L'adesione irreversibile è rafforzata anche attraverso la produzione della *extracellular polymeric substances* (EPS). Si tratta di un prodotto secreto e sintetizzato dai batteri, che costituisce il componente principale della matrice del biofilm, formando la struttura tridimensionale che ingloba e protegge le cellule batteriche. La composizione dell'EPS include principalmente polisaccaridi, proteine, DNA extracellulare, lipidi e altri componenti polimerici, variando in base alla specie batterica e alle condizioni ambientali. La matrice svolge un ruolo multifunzionale e strategico nel processo di formazione del biofilm: da un lato serve a mediare la coesione tra i batteri e l'adesione del biofilm alla superficie, tramite interazioni idrofobiche; dall'altro, fornisce supporto strutturale all'architettura del biofilm, garantendo al contempo la protezione delle cellule batteriche dalle condizioni ambientali avverse e la regolazione dell'approvvigionamento e distribuzione dei nutrienti all'interno della comunità microbica.

Un elemento chiave nella produzione della matrice è rappresentato dal messaggero secondario ciclico c-di-GMP, riconosciuto come uno dei principali stimoli responsabili della transizione da un'adesione inizialmente reversibile a una forma definitivamente irreversibile. Questo meccanismo avviene attraverso l'induzione della produzione di EPS e la sintesi di specifiche strutture di superficie cellulare [23].

4. Maturazione del biofilm

Quando la concentrazione degli autoinduttori supera una certa soglia, i batteri, che continuano a moltiplicarsi all'interno della matrice di EPS, cominciano ad organizzarsi nella formazione di microcolonie, dando vita ad una complessa struttura tridimensionale a forma di fungo. La matrice EPS raggiunge in questa fase la sua massima complessità strutturale, costituendo oltre il 90% della massa secca totale del biofilm [24]. La sua architettura crea un microambiente tridimensionale che modula il trasporto di nutrienti, metaboliti e segnali chimici. Al suo interno sono presenti una serie di canali acquosi che fungono da sistema circolatorio, indirizzando i nutrienti alla comunità cellulare e rimuovendo i prodotti indesiderati. In più, sistemi di comunicazione intracellulare, anche tra specie batteriche diverse, permettono la secrezione e detezione di molecole di segnalazione per regolare l'espressione genica in funzione dei cambiamenti nella densità di popolazione microbica.

5. Dispersione e colonizzazione

Rappresentano il termine del processo appena descritto, e avvengono nel momento in cui le cellule batteriche lasciano il biofilm per iniziare un nuovo ciclo di colonizzazione. Per questo motivo si può parlare di un processo programmato, attivamente gestito dalle cellule, che può essere stimolato da variazioni delle condizioni ambientali, stress nutrizionali o segnali specifici di quorum sensing. Trattandosi di un meccanismo molto complesso, varia a seconda di una serie di fattori dipendenti dalle specie di batteri e dalle condizioni esterne. Tuttavia si possono distinguere generalmente 3 fasi: *distacco delle cellule dalle microcolonie*, *movimento delle cellule su un nuovo substrato*, *adesione delle cellule al nuovo substrato*. Durante la dispersione attiva, i geni coinvolti nella motilità cellulare, come la sintesi dei flagelli e la degradazione dell'EPS, tendono a essere prodotti in maniera maggiore, mentre, al contrario, i geni correlati alla produzione di EPS, all'adesione e alla sintesi delle fimbrie sono spesso regolati al ribasso [25]. Un altro modo efficace per disperdere il biofilm è inibire le vie di segnalazione del c-di-GMP, in quanto la riduzione dei livelli intracellulari del messaggero batterico inibisce lo sviluppo del biofilm [26].

1.2.2 Proprietà superficiali determinanti

Le caratteristiche chimico-fisiche della superficie del materiale svolgono un ruolo cruciale nell'interazione con i microorganismi. L'adesione cellulare è il primo passo per la formazione del biofilm, ed è governata da un complesso equilibrio di forze che agiscono su diverse scale e dimensioni. Nessuno dei modelli teorici sviluppati fino ad oggi riesce a descrivere accuratamente l'adesione microbica su differenti superfici, proprio per la complessità dei loro meccanismi, dei fattori extracellulari e delle

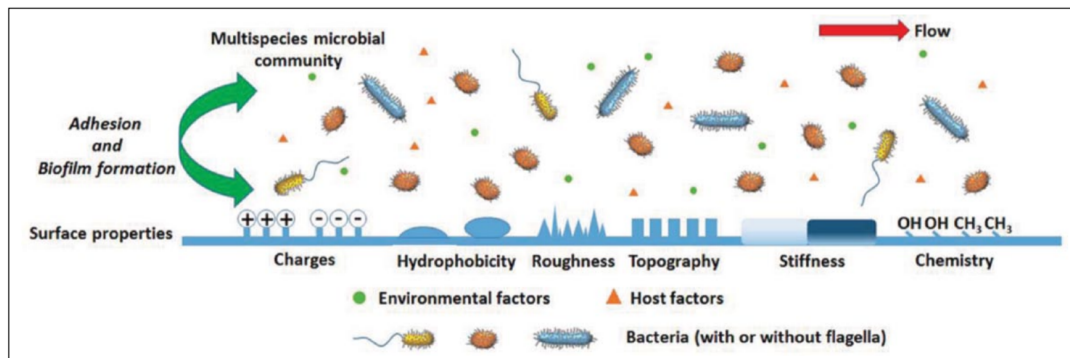


Figura 1.2: Rappresentazione schematica dell'adesione batterica in funzione delle diverse proprietà superficiali, dai fattori ambientali e dalle condizioni intrinseche del sistema [27].

strutture batteriche. Tuttavia, ci sono delle proprietà comunemente riconosciute, che influenzano tale interazione.

Energia superficiale

L'energia superficiale è una proprietà fisica di un materiale, e misura l'energia di legame delle sue molecole superficiali e la loro tendenza ad interagire con altre sostanze. Questo parametro, determinato dalle forze intermolecolari presenti all'interfaccia solido-vapore, governa direttamente le proprietà di bagnabilità del materiale, influenzando il modo in cui l'acqua e altri liquidi polari interagiscono con la superficie.

Le superfici con elevata energia superficiale generalmente presentano forti interazioni con molecole polari come l'acqua, caratterizzandosi come materiali idrofilici con angoli di contatto inferiori a 90° . Al contrario, superfici a bassa energia superficiale mostrano deboli interazioni con l'acqua, manifestando un comportamento idrofobico con angoli di contatto superiori a 90° . Questa relazione tra energia superficiale e proprietà di bagnabilità assume particolare rilevanza nel contesto dell'adesione batterica, poiché l'idrofobicità o l'idrofilicità della superficie influenza direttamente i meccanismi iniziali di interazione tra cellule microbiche e substrato.

Le superfici idrofobiche tendono a favorire l'adesione batterica riducendo le forze repulsive all'interfaccia batterio-materiale. Tuttavia, questa relazione non è universale: l'adesione dipende da un complesso equilibrio tra le proprietà superficiali del substrato (idrofobicità, rugosità, carica) e le caratteristiche specifiche del microrganismo (specie, velocità di crescita, strutture di superficie). La preferenza per substrati idrofobici o idrofilici risulta quindi dalla combinazione delle proprietà fisico-chimiche e biologiche di entrambi i componenti del sistema, rendendo ogni interazione un caso specifico che richiede valutazione sperimentale.

Ricerche recenti hanno dimostrato che sia le superfici superidrofobiche che quelle superidrofiliche possono prevenire la formazione di biofilm. Un esempio in natura è la foglia di loto, caratterizzata da un angolo di contatto con l'acqua di 170° e notevoli proprietà autopulenti, dovute alla specifica rugosità superficiale presentata da microsporgenze e nanopeli, fattori determinanti per la superidrofobicità [28]. Oltre alle superfici superidrofobiche, anche le superfici superidrofiliche hanno buone proprietà anti-fouling dovute alla formazione di uno strato denso di molecole d'acqua, che indebolisce l'interazione tra la superficie cellulare e il materiale del substrato, riducendo così l'adesione cellulare.

Carica superficiale

Un altro fattore determinante è la carica superficiale. In generale, la maggior parte delle cellule batteriche è caratterizzata da una carica superficiale negativa, dovuta alla presenza di gruppi carbossilici, amminici e fosfato. Le superfici cariche positivamente, di conseguenza, risultano particolarmente favorevoli per la formazione del biofilm. Tuttavia, alcuni gruppi cationici, come l'ammonio quaternario e le polietilenimine, presentano delle proprietà antimicrobiche che promuovono la morte delle cellule adese [29]. Inoltre, anche in questo caso, la carica superficiale dei batteri e l'interazione con il substrato differisce a seconda delle diverse specie batteriche, ed è influenzata dall'età del batterio, dal pH, dall'ambiente di crescita.

Rugosità e topografia superficiale

La rugosità superficiale influenza l'adesione batterica attraverso meccanismi multipli che dipendono dalla scala dimensionale del materiale. E' stato dimostrato che un incremento della rugosità può promuovere l'adesione batterica, in quanto crea maggiori siti di contatto con i microrganismi, e permette una protezione dalle forze di taglio [30]. Gli effetti specifici della rugosità superficiale nell'adesione batterica e nella formazione di biofilm variano in funzione delle dimensioni e della forma delle cellule batteriche e di altri fattori ambientali. Pertanto, non esiste una rugosità universalmente ottimale in grado di promuovere l'adesione di tutte le specie batteriche [31]. Inoltre, non si può parlare solo di rugosità secondo la definizione convenzionale di ampiezza media di picchi e valli, ma è necessario includere anche la topografia, cioè la distribuzione di elementi superficiali che possono regolare la formazione microbica.

1.3 Materiali oggetto di studio

1.3.1 Materiali a base grafite: carbon paper e rivestimenti polimerici

Carbon paper: substrato di controllo

Il carbon paper rappresenta uno dei materiali più utilizzati come substrato nei sistemi bioelettrochimici, grazie alle sue proprietà fisico-chimiche e strutturali. Si tratta di un materiale commerciale composto da fibre carboniose di diametro micrometrico, ottenute a partire da fibre polimeriche di PAN (poliacrilonitrile) sottoposte a trattamenti termici in ambiente inerte per la conversione in carbonio. La struttura continua viene ottenuta mediante pressatura delle fibre di carbonio, conferendo conducibilità elettrica e resistenza meccanica. Dal punto di vista delle proprietà superficiali, il materiale presenta una rugosità multiscala, tipicamente nell'ordine dei micrometri ($R_a=10-50 \mu\text{m}$), derivante dalla struttura fibrosa che offre potenzialmente numerosi siti di ancoraggio per i batteri. La carica superficiale risulta leggermente negativa in ambiente acquoso per la presenza di gruppi carbossilici e fenolici, mentre la superficie è idrofobica, ma facilmente modulabile attraverso trattamenti chimici o fisici.

L'efficacia del carbon paper come substrato per biofilm è supportata da studi che dimostrano elevati tassi di adesione per diversi ceppi batterici, inclusi *Cytophaga hutchinsonii*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* [32]. Il carbon paper viene largamente impiegato come anodo per le MFC in quanto mostra:

1. buona biocompatibilità per la proliferazione batterica;
2. alta conducibilità elettrica;
3. resistenza chimica;

Nonostante questo, diversi lavori in letteratura propongono l'impiego di nanostrutture polimeriche, depositate direttamente sulla superficie di carbon paper, con l'obiettivo di migliorare la proliferazione batterica grazie alle intrinseche proprietà delle nanofibre, quali elevata area superficiale e porosità [33] [34].

Modifiche superficiali tramite electrospinning

I processi elettroidrodinamici rappresentano una strategia versatile per la produzione di micro e nanostrutture, in quanto offrono numerosi vantaggi, incluso un migliore controllo sulla morfologia delle strutture, elevata produttività, basso consumo energetico e ridotte emissioni, oltre la capacità di processare un'ampia varietà di materiali [35] [36]. Tra queste tecniche, l'electrospinning e l'electrospray si basano sull'implementazione di un processo elettroidrodinamico che, partendo da una soluzione polimerica iniziale, e attraverso l'applicazione di un campo elettri-

co, permette di ottenere la deposizione di nanostrutture differenti a seconda del processo implementato. Il campo elettrico viene applicato tra due elettrodi: un ago metallico collegato ad una siringa contenente la soluzione polimerica di interesse, e un controelettrodo collegato a terra. L'applicazione del campo elettrico induce la formazione di cariche che, interagendo tra loro, generano una forza elettrostatica con direzione e verso opposti alla forza correlata alla tensione superficiale della soluzione polimerica. Questa interazione provoca la deformazione della goccia sospesa all'estremità dell'ago fino alla formazione del caratteristico cono di Taylor. Quando il potenziale raggiunge un valore critico, dove la forza elettrostatica supera la tensione superficiale, dalla punta del cono viene eiettato un getto polimerico carico. Durante il percorso verso il controelettrodo le continue interazioni elettrostatiche generano instabilità fluidodinamiche (*bending instabilities*) che, insieme all'evaporazione del solvente per effetto Joule, determinano la morfologia finale delle nanofibre, nel caso dell'electrospinning. Nell'electrospray la minore viscosità della soluzione polimerica non garantisce la formazione di un getto carico continuo, ma si generano gocce dette *nanodrops*, che si depositano sul substrato [37].

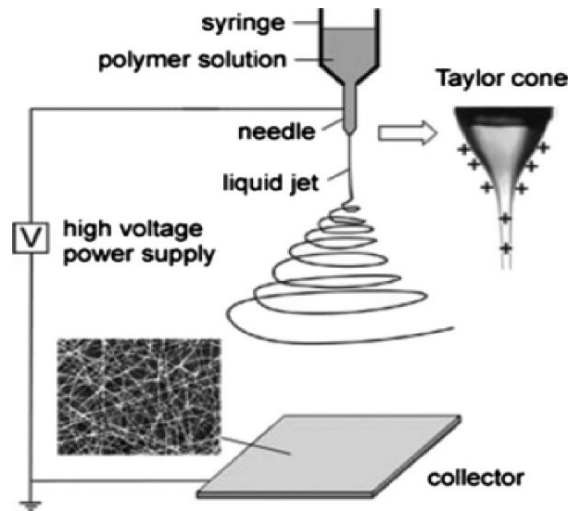


Figura 1.3: Configurazione sperimentale dell'electrospinning e principio operativo [38].

In entrambi i casi, la morfologia finale dipende da un ampio insieme di fattori, che include le caratteristiche intrinseche della soluzione (tipo di polimero e solvente, viscosità, concentrazione, conducibilità elettrica, tensione superficiale), le condizioni operative (intensità del campo elettrico, distanza ago-collettore, velocità di erogazione) e i parametri ambientali come umidità e temperatura [39] [40]. L'ottimizzazione dei parametri di processo risulta quindi fondamentale in entrambe le tecniche per ottenere le caratteristiche morfologiche e funzionali desiderate. Questa versatilità, unita alla possibilità di operare in condizioni ambientali e di processare un'ampia

gamma di materiali, rende queste tecnologie di grande interesse per lo sviluppo di applicazioni nei settori elettronico, ambientale e biomedico. In questo studio sono stati impiegati tre polimeri per l'elettrodeposizione su substrati di carbon paper.

Il **polietilene ossido (PEO)** è un polimero sintetico appartenente alla famiglia dei polieterei, caratterizzato da una struttura lineare con unità ripetitiva ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) lungo la catena polimerica. Questa configurazione molecolare conferisce al materiale spiccate proprietà idrofile e ottima biocompatibilità, data la capacità dei gruppi etere di formare facilmente legami idrogeno con molecole d'acqua. Dal punto di vista elettrostatico, il PEO presenta carica superficiale neutra o leggermente negativa, poiché i gruppi etere non sono ionizzabili a pH fisiologico, e una conducibilità elettrica intrinsecamente bassa (costante dielettrica $\epsilon \approx 5$) [41]. L'ampio range di pesi molecolari in cui è disponibile (da 300 g/mol fino a 10.000.000 g/mol) modula le proprietà fisiche del materiale, rendendolo ampiamente utilizzato in applicazioni biomediche, farmaceutiche e alimentari. La possibilità di deporre nanofibre di PEO tramite electrospinning genera una struttura tridimensionale porosa che modifica significativamente le proprietà del substrato. Le nanofibre, con diametri tipici di 100-500 nm, creano una rugosità nanometrica che si sovrappone alla microrugosità del carbon paper, incrementando l'area superficiale specifica disponibile e fornendo numerosi siti di nucleazione per l'adesione batterica iniziale. I legami a idrogeno con l'acqua favoriscono la diffusione di nutrienti e metaboliti attraverso il biofilm, e creano un microambiente favorevole alla crescita microbica. D'altra parte, la peculiare resistenza alle proteine esercitata dal PEO [42], dovuta alla sua elevata idrofilicità e flessibilità, può rappresentare un ostacolo per l'adesione batterica e la conseguente formazione del biofilm [43].

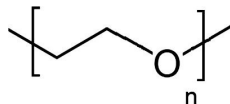


Figura 1.4: Polietilene ossido (PEO).

L'**alcol polivinilico (PVA)** è un polimero sintetico appartenente alla famiglia dei polimeri vinilici. Le sue proprietà dipendono strettamente dal peso molecolare e dal grado di idrolisi dei gruppi acetato, parametri che ne modulano la solubilità e le caratteristiche meccaniche. La struttura molecolare è ricca di gruppi ossidrilici, che conferiscono al polimero una elevata affinità per l'acqua, mentre la carica superficiale è neutra, con possibili siti leggermente positivi dovuti a gruppi acetato residui non completamente idrolizzati durante la sintesi. E' caratterizzato da un bassissimo livello di tossicità, alta flessibilità e proprietà viscoelastiche modulabili, che lo rendono un materiale versatile per diverse tecniche di fabbricazione [44]. Anche il PVA è considerato un isolante elettrico, con una costante dielettrica di $\epsilon \approx 5 - 8$ [45]. Il PVA, quando elettrofilato, riesce a formare fibre di 200-800 nm, generando

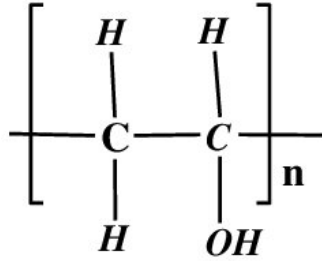


Figura 1.5: Alcol polivinilico (PVA).

una rete interconnessa che aumenta la rugosità superficiale e potenzialmente l'area disponibile per l'adesione microbica. Tuttavia, alcuni studi riportano l'utilizzo del PVA come coating per l'inibizione batterica su impianti biomedicali, dimostrando che la porosità del materiale può impattare sulla diffusione batterica, soprattutto per specie di grandi dimensioni come *E. coli* and *S. aureus* [46].

Il **poli(3,4-etilendiositifene):polistirene solfonato (PEDOT:PSS)** è un complesso polimerico conduttivo, costituito da due componenti sinergiche che combinano proprietà elettroniche e processabilità. Il PEDOT è un polimero π -coniugato basato sul politiofene, che presenta cariche positive distribuite lungo la catena polimerica. E' un materiale ecocompatibile, stabile e con ottima conducibilità elettrica, ma insolubile in acqua e in alcuni solventi organici. Il PSS è un polielettrolita solfonato, che bilancia con le sue cariche negative il PEDOT, conferendone la disperdibilità in mezzi acquosi e facilitandone la processabilità. I suoi numerosi vantaggi lo rendono un ottimo candidato per la realizzazione di dispositivi elettronici flessibili [47], anche se la fragilità meccanica del PEDOT:PSS puro rimane una limitazione che richiede strategie di rinforzo strutturale.

Il PEDOT:PSS è difficilmente processabile per electrospinning, ma l'impiego dell'electrospray permette di generare gocce molto sottili di materiale che si depositano sul substrato in maniera uniforme, consentendo di ottenere film con rugosità molto bassa e spessori controllabili.

Nel contesto dei sistemi bioelettrochimici, l'elevata conducibilità elettrica del complesso PEDOT:PSS facilita il trasferimento elettronico diretto tra i microrganismi elettroattivi e il substrato, riducendo potenzialmente la resistenza di trasferimento di carica all'interfaccia. La natura polimerica del materiale può fornire una matrice flessibile che si adatta alle variazioni morfologiche del biofilm durante la sua crescita, mantenendo un contatto elettrico efficiente. Ricerche recenti si sono incentrate sull'interazione tra il PEDOT:PSS e batteri elettroattivi, sia tramite funzionalizzazioni [48], sia con polimeri coniugati [49].

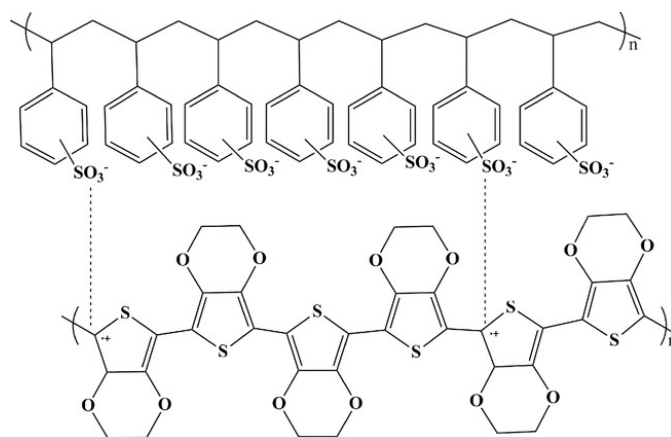


Figura 1.6: Poli(3,4-etilendiositifene):polistirene solfonato (PEDOT:PSS).

1.3.2 Materiali a base grafene: Laser-Induced Graphene (LIG)

Il LIG si ottiene attraverso l'irradiazione laser di un substrato polimerico, tipicamente il *poliimide* (polimero termoplastico noto per stabilità, resistenza alle alte temperature e flessibilità), in condizioni ambiente, e senza l'impiego di sostanze chimiche tossiche. Il processo di formazione del LIG, in base al meccanismo di interazione tra laser e polimero, può seguire due meccanismi principali [50]:

- pirolisi polimerica a dominanza fototermica;
- pirolisi polimerica combinata fototermica e fotochimica.

Durante l'irradiazione, il polimero assorbe l'energia luminosa determinando la decomposizione del materiale nella zona colpita. Nella zona irradiata si generano condizioni estreme di elevata temperatura e alta pressione che determinano la rottura e successiva ricombinazione delle catene polimeriche in una struttura grafenica. Dal punto di vista delle proprietà superficiali, il LIG presenta una struttura porosa tridimensionale con porosità gerarchica (macro-micro-nanopori) che fornisce un'elevata rugosità superficiale e numerosi siti di ancoraggio per l'adesione batterica. La carica superficiale è dipendente dai gruppi funzionali formati durante la pirolisi laser, ed è generalmente neutra o negativa per la presenza di gruppi carbossilici e fenolici generati durante il processo di conversione termica. Le proprietà di bagnabilità sono variabili, da idrofobiche a moderatamente idrofiliche, in base ai parametri laser utilizzati e ai gruppi funzionali superficiali risultanti dal processo di formazione. Nelle prime fasi di studio del LIG, la sorgente laser più comunemente impiegata è il laser a biossido di carbonio (CO_2), utilizzato sia in modalità ad onda continua che con impulsi. I parametri del laser, inclusi potenza, velocità di scansione e numero di passaggi, influenzano criticamente la morfologia finale e le proprietà elettroniche del LIG ottenuto, consentendo un controllo preciso delle

caratteristiche del materiale [51].

Questa tecnica si distingue per l'elevata precisione e alta efficienza, ottenendo un materiale con promettenti proprietà che lo pongono al centro di diversi impieghi tecnologici [52].

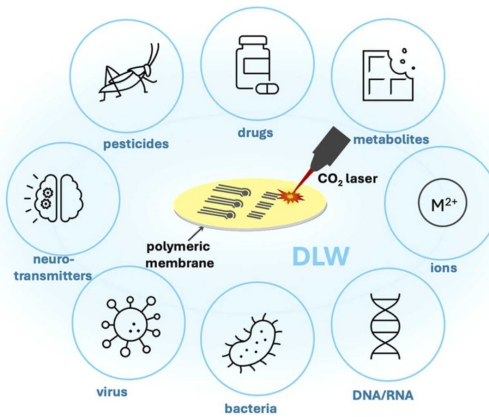


Figura 1.7: Applicazioni di elettrodi a base grafenica per applicazioni farmaceutiche e biomedicali [53]

Queste proprietà potrebbero potenzialmente creare un ambiente ideale per la crescita e l'attecchimento dei biofilm microbici, tuttavia, diversi studi presenti in letteratura riconoscono una capacità intrinseca del materiale nel prevenire l'adesione batterica indesiderata, ed esercitare invece una azione antimicrobica selettiva [54].

1.4 Microbial Fuel Cells come strumento di analisi

Le Microbial Fuel Cells rappresentano una tecnologia bioelettrochimica che sfrutta l'attività metabolica di batteri elettroattivi per convertire l'energia chimica contenuta in substrati organici direttamente in energia elettrica. Oltre all'applicazione nella conversione energetica, le MFC hanno dimostrato un notevole potenziale come biosensori per il monitoraggio della qualità dell'acqua, consentendo la rilevazione in tempo reale di parametri quali il BOD (biochemical oxygen demand) e la presenza di contaminanti tossici [55] [56]. In questi contesti, il materiale anodico riveste un ruolo critico, fungendo da interfaccia tra il biofilm batterico e il circuito elettrico esterno. La composizione, la morfologia e le proprietà superficiali dell'elettrodo influenzano significativamente l'adesione batterica, la formazione del biofilm e l'efficienza del trasferimento elettronico. Grazie alle caratteristiche del sistema MFC, che consente di correlare l'attività metabolica dei batteri elettroattivi a segnali elettrici, senza compromettere l'integrità della struttura biologica, è possibile

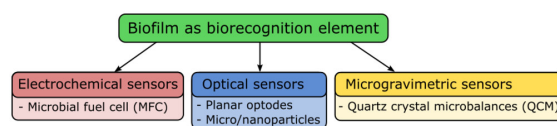


Figura 1.8: Approcci di rilevamento che utilizzano il biofilm batterico come elemento di riconoscimento [55].

esplorare la risposta elettrochimica del sistema in funzione delle diverse proprietà del materiale anodico selezionato.

1.4.1 Principio di funzionamento

Il principio di funzionamento si basa sul trasferimento, verso l'anodo, di elettroni prodotti dai batteri elettroattivi durante le reazioni di ossidazione del substrato organico, fornito come fonte di carbonio ed energia necessario per il metabolismo batterico (tipicamente acetato, glucosio o altri composti organici). Gli elettroni vengono poi trasportati attraverso un circuito esterno, verso il catodo, dove avviene la reazione di riduzione. Nella maggior parte delle MFC, gli elettroni che raggiungono il catodo si combinano con i protoni che diffondono dall'anodo attraverso una membrana di separazione, e reagiscono con l'ossigeno fornito dall'aria, producendo acqua come prodotto finale. Le MFC sono realizzate utilizzando un'ampia varietà di materiali e di configurazioni. Le condizioni di funzionamento sono molteplici, e includono differenze di temperatura, pH, scelta dell'accettore di elettroni, superficie degli elettrodi e dimensioni del reattore. Lo schema di funzionamento è riassunto nella Figura 1.9.

1.4.2 Architettura

Microorganismi

Il cuore biologico delle MFC è costituito da biofilm elettroattivi (EABs), strutture tridimensionali costituite da batteri elettroattivi capaci di trasferire elettroni tra la cellula e l'ambiente esterno. I consorzi misti di microrganismi elettrogeni contribuiscono più efficacemente alla produzione di corrente rispetto alle colture pure, grazie alle interazioni sinergiche tra specie microbiche sintrofiche [58], tra queste le specie più studiate appartengono principalmente ai generi *Geobacter*, *Shewanella* e *Rhodospirillum rubrum*, spesso predominanti in sistemi operativi a pH neutro, temperature moderate e con inoculi derivanti da sedimenti marini o acque reflue.

Il trasferimento di elettroni tra i batteri nel biofilm e l'elettrodo può avvenire in due modi:

- **trasferimento elettronico diretto (DET)**, che prevede che ci sia un diretto contatto tra la membrana esterna del batterio e la superficie dell'elettrodo.

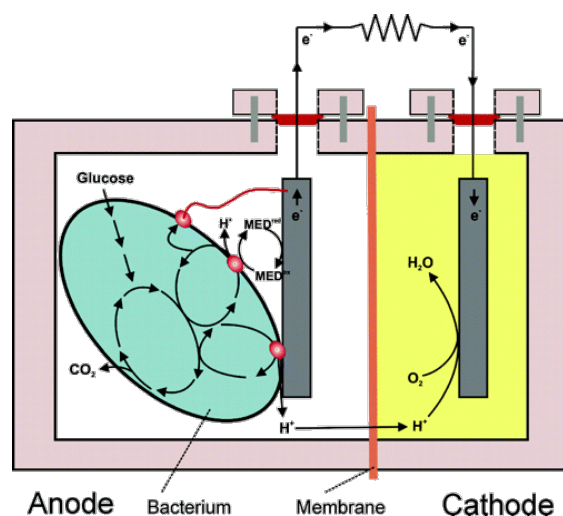


Figura 1.9: Principio di funzionamento di una MFC [57]. I batteri nell'anodo decompongono il substrato organico (glucosio) liberando elettroni e protoni. Gli elettroni fluiscono attraverso il circuito esterno generando corrente elettrica, mentre i protoni attraversano la membrana. Al catodo, elettroni, protoni e ossigeno si combinano formando acqua.

Lo scambio può avvenire attraverso le proteine di membrana citocromo c presenti sulla superficie dei batteri, o attraverso connessioni extracellulari conduttive chiamate pili conduttivi o nanowires batterici;

- **trasferimento elettronico indiretto (IET)**, che comprende mediatori chimici (flavine, fenazine, chinoni) o shuttle di elettroni che vengono secreti dai batteri o aggiunti dall'esterno.

I batteri elettroattivi sono in grado di formare il biofilm direttamente sulla superficie dell'elettrodo, senza aver bisogno di sostanze chimiche o tossiche per essere immobilizzati. La matrice, di conseguenza, risulta estremamente robusta, capace di automantenersi e autoripararsi, consentendo così operazioni a lungo termine.

Elettrodi

L'architettura di base delle MFC comprende due compartimenti: il compartimento anodico, dove avviene l'ossidazione del substrato organico ad opera dei microrganismi, e quello catodico, dove si verifica la riduzione dell'ossigeno. I due compartimenti sono tipicamente separati da una membrana a scambio cationico (CEM), che permette il passaggio dei protoni ma impedisce la diffusione dell'accettore di elettroni, che in molti casi è rappresentato dall'ossigeno.

L'**anodo** è l'elemento più critico del sistema, in quanto funge da superficie per la crescita del biofilm e da collettore di corrente. Di conseguenza, i materiali impie-

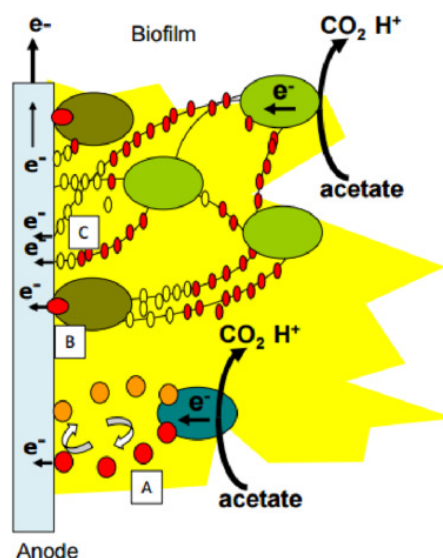


Figura 1.10: Meccanismi coinvolti nel trasferimento di elettroni [59]: (A) trasferimento indiretto tramite mediatori; (B) trasferimento diretto tramite proteine citocromo; (C) trasferimento diretto tramite pili conduttivi.

gati come anodi devono consentire le interazioni con i batteri elettroattivi, perciò essere elettricamente conduttivi, resistenti alla corrosione, con un'alta resistenza meccanica, una area superficiale ben definita, biocompatibili e se possibile a basso costo. In generale nessun materiale riesce a rispettare tutte queste caratteristiche, ma ci sono molti materiali a base carboniosa e a base metallica che si avvicinano molto.

Il **catodo**, invece, costituisce il sito dove avviene la reazione di riduzione dell'ossigeno (ORR), ed è un fattore spesso limitante nelle prestazioni complessive della cella. In ambiente neutro, questa reazione può essere catalizzata da enzimi, microrganismi o catalizzatori abiotici, tra cui i più utilizzati sono materiali a base di platino, materiali carboniosi privi di metalli e catalizzatori privi di metalli del gruppo del platino (PGM-free) supportati su carbonio. L'ossigeno risulta l'accettore di elettroni più adatto per applicazioni pratiche, sebbene la lenta cinetica della reazione richieda spesso l'impiego di catalizzatori per ottimizzare le prestazioni [59].

1.5 Tecniche di caratterizzazione elettrochimica dei biofilm

Le principali tecniche di caratterizzazione elettrochimica dei biofilm elettroattivi si basano sull'analisi del trasferimento di carica tra i microrganismi e l'elettrodo. Tra

queste, esistono diverse tecniche in grado di valutare ed analizzare i processi redox caratteristici e le proprietà resistive e capacitive dell'interfaccia biofilm/elettrodo. La caratterizzazione elettrochimica dei biofilm in questo studio è stata condotta utilizzando due tecniche complementari: l'*Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)* e la *Linear Sweep Voltammetry (LSV)*. Entrambe le tecniche utilizzano configurazioni elettrochimiche standardizzate basate su sistemi multi-elettrodo, che permettono il controllo preciso dei parametri sperimentali e l'analisi dei diversi contributi elettrochimici del sistema. I componenti del sistema sono:

- Elettrodo di lavoro, costituito dal substrato su cui si sviluppa il biofilm
- Elettrodo di riferimento, tipicamente costituito da un elettrodo Ag/AgCl in una soluzione di KCl, che fornisce un potenziale stabile di riferimento per le misure elettrochimiche
- Controelettrodo, che sostiene le reazioni elettrochimiche complementari mantenendo l'equilibrio del sistema.

1.5.1 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)

L'*Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)* è una tecnica non faradica che misura la risposta di un sistema a una piccola perturbazione sinusoidale di tensione su un ampio intervallo di frequenze (generalmente da 100 kHz a 0.01 Hz). L'impedenza elettrochimica $Z(\omega)$ [Ω] è definita come il rapporto tra la perturbazione sinusoidale di potenziale applicata $E(t)$ [V] e la corrente risultante $I(t)$ [A]:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = |Z|e^{j\phi} \quad (1.1)$$

dove $|Z|$ rappresenta il modulo dell'impedenza, ϕ l'angolo di fase e ω la frequenza angolare.

Sono presenti due possibili configurazioni per l'analisi impedimetrica, a seconda di ciò che si interessa osservare:

- Configurazione a **cella completa**, costituita da elettrodo di lavoro e contro-elettrodo. Questa configurazione risulta utile per caratterizzare le performance complessive del sistema bioelettrochimico;
- Configurazione a **semi-cella**, che incorpora l'elettrodo di riferimento per analizzare le risposte di impedenza degli elettrodi di lavoro e dei contro-elettrodi.

L'EIS rappresenta una tecnica di riferimento per l'impedimetria microbiologica, ovvero la misurazione della variazione di impedenza elettrica di un campione in presenza di microrganismi. Come descritto da Ameer et al. [60], l'EIS offre numerosi vantaggi per il monitoraggio dei biofilm, fornendo dati in tempo reale sulla crescita e attività dei microrganismi. Infatti, l'eventuale presenza di attività microbica modifica le proprietà elettriche del mezzo, permettendo così di rilevare e quantificare

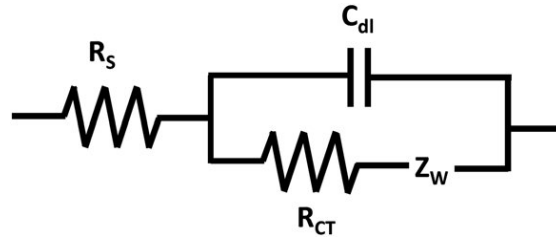


Figura 1.11: Circuito di Randles [61]. Sono presenti la resistenza della soluzione R_s , la resistenza del trasferimento di carica R_{ct} , e l'impedenza di Warburg Z_w

microrganismi in modo rapido e non distruttivo. La variazione complessiva di impedenza è composta da contributi osservabili in diversi range di frequenza:

- Alta frequenza (>10 kHz), dove è evidente la variazione di impedenza della soluzione elettrolitica
- Frequenza intermedia (1 Hz-10 kHz), causata dai processi di trasferimento di carica e fenomeni interfacciali
- Bassa frequenza (<1 Hz), governata dai processi diffusivi.

L'impedenza elettrochimica dei biofilm è prodotta dalla matrice extracellulare (ECM) e le cellule all'interno del biofilm agiscono come materiali dielettrici, la cui risposta cambia in base allo stato metabolico, alla composizione e al tempo. È possibile, quindi, modellare i biofilm batterici, sviluppatisi sulla superficie degli elettrodi, come un circuito elettrico.

Il circuito equivalente più semplice per rappresentare l'interfaccia elettrodo-biofilm è il circuito di Randles, costituito dalla resistenza della soluzione elettrolitica (R_s), in serie con il parallelo della resistenza di trasferimento di carica (R_{ct}) e della capacità del doppio strato elettrico (C_{dl}). Tuttavia, per i sistemi più complessi, questo modello viene esteso per includere gli elementi specifici della matrice biologica. La resistenza della soluzione R_s rappresenta la resistenza ohmica dell'elettrolita, e include la resistenza ionica del mezzo, la resistenza intrinseca del materiale dell'elettrodo e la resistenza di contatto, mentre R_{ct} quantifica la cinetica delle reazioni elettrochimiche all'interfaccia elettrodo-biofilm. La capacità C_{dl} modella l'accumulo di carica nel doppio strato elettrico, ma nei biofilm viene spesso sostituita da un elemento a fase costante (CPE) per tenere conto della rugosità superficiale e della distribuzione non uniforme della reattività. Questi elementi possono essere modificati in configurazioni serie o parallelo a seconda della complessità del sistema. Esistono due rappresentazioni grafiche standard utilizzate per le analisi EIS. I diagrammi di Nyquist, che riportano la parte reale dell'impedenza ($R_e Z$) in funzione del negativo della parte immaginaria ($-I_m Z$); e i diagrammi di Bode, rappresentazioni in funzione della frequenza su scala logaritmica.

Nel diagramma di Nyquist la componente immaginaria dell'impedenza è associata al comportamento capacitivo del campione, mentre la componente reale riflette l'aspetto resistivo.

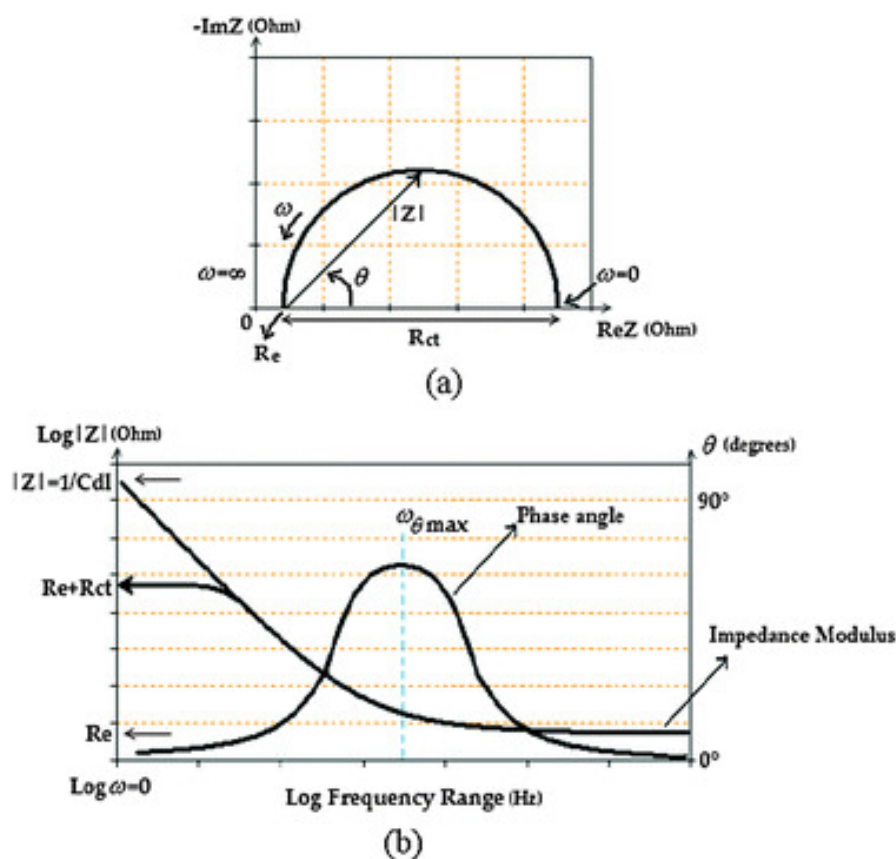


Figura 1.12: Risposta in impedenza di un circuito elettrico equivalente, con R_e resistenza dell'elettrolita in serie con il parallelo C_{dl}/R_{ct} . Nella rappresentazione (a) il diagramma di Nyquist; (b) il diagramma di Bode in funzione dell'angolo di fase θ e il modulo dell'impedenza $|Z|$ [62].

1.5.2 Voltammetria a scansione lineare (LSV)

La Linear Sweep Voltammetry è una tecnica voltammetrica faradaica che misura la corrente generata da reazioni redox, mentre il potenziale applicato all'elettrodo di lavoro varia linearmente nel tempo, con una velocità di scansione controllata. La scansione parte tipicamente dal valore di potenziale a circuito aperto (OCV), consentendo di caratterizzare l'intera finestra operativa dell'elettrodo. Partire dall'OCV permette di osservare la risposta del sistema dalla sua condizione naturale, quando non fluisce corrente netta, garantendo che la successiva polarizzazione rifletta solo i processi elettrochimici indotti dalla scansione di potenziale controllata [63]. L'LSV risulta particolarmente utile e diffusa nei sistemi bioelettrochimici in

quanto fornisce una caratterizzazione completa delle performance della cella, che include:

- *potenziale a circuito aperto (OCV)*, rappresentativo del potenziale termodinamico del sistema
- *densità di corrente massima* raggiungibile dalla cella;
- *la resistenza interna complessiva del sistema*, calcolabile dalla pendenza della regione lineare;
- *densità di potenza massima*, parametro fondamentale per valutare l'efficienza energetica;
- *regioni di perdite di potenziale*.

Un esempio rappresentativo di curva di polarizzazione ottenuta mediante LSV è mostrato in Figura 1.13, dove si possono identificare le tre regioni caratteristiche dell'andamento di tensione. I tratti non lineari della curva dipendono dai meccanismi

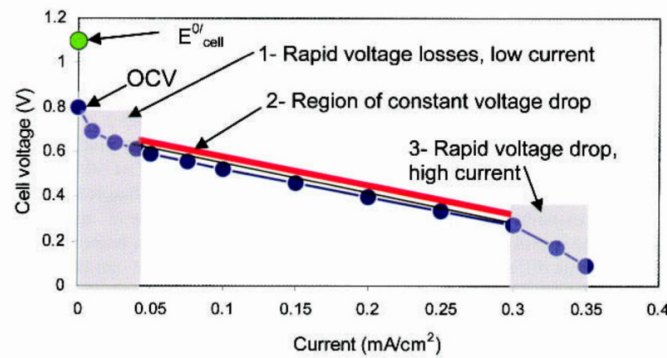


Figura 1.13: Rappresentazione di una curva di polarizzazione di una MFC [64]. Sono messe in evidenza la regione di rapida riduzione di tensione; la regione a decrescita costante; la regione di caduta di tensione.

di perdita di potenziale, che limitano le performance globali della cella. Queste sono dovute a:

- Perdite di attivazione, dovute alle reazioni di ossido-riduzione degli elettrodi, e al trasferimento degli elettroni all'elettrodo. Sono evidenti soprattutto per bassi valori di corrente;
- Perdite dovute al metabolismo batterico, conseguenza dell'energia derivante dall'ossidazione del substrato e dipendenti strettamente dal tipo di microrganismi;
- Perdite di concentrazione (o mass transfer), originate dall'accumulo o da una mancanza di specie ad un elettrodo. Sono dovute a differenti cinetiche di processo all'interno del sistema, che generano un flusso insufficiente di reagenti o di prodotti verso gli elettrodi;

- Perdite ohmiche, legate all'architettura delle MFC, e comprendono la resistenza della conduzione di ioni attraverso l'elettrolita, la resistenza della membrana di separazione (quando presente) e la resistenza legata al flusso di elettroni nei punti di contatto tra materiali.

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Materiali

I catodi sono stati fabbricati a partire da carbon paper (AvCarb GDS2240, Fuel Cell Earth, Woburn, MA, USA), catalizzatore di platino su carbonio (Pt/C, 10% Pt on Carbon, Fuel Cell Store, Bryan, TX, USA), Nafion (concentrazione del 5% wt in miscela di alcoli e acqua, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania), acqua deionizzata, isopropanolo. Per gli anodi è stato impiegato carbon paper (AvCarb P75, Fuel Cell Earth, Woburn, MA, USA).

Per le modifiche superficiali polimeriche sono stati utilizzati PEO (peso molecolare di 600 kDa, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), PEDOT:PSS (rapporto PEDOT:PSS [0,625:1], concentrazione del 1,3 % wt in acqua, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania), PVA (peso molecolare 130 kDa, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania).

Come substrato per la generazione del LIG è stato utilizzato un film di poliimmide commerciale (Kapton ®, Fuel Cell Store, Bryan, TX, USA).

Per le prove di citotossicità sono stati impiegati anche nitrato d'argento (AgNO_3), benzofenone ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}$) come fotoiniziatore, agar.

La soluzione elettrolitica, impiegata anche nelle MFC, conteneva acetato di sodio (CH_3COONa), cloruro di ammonio (NH_4Cl), cloruro di potassio (KCl) e fosfato monosodico (NaH_2PO_4), tutti forniti da Sigma Aldrich.

L'inoculo batterico era costituito da un consorzio microbico misto, prelevato da sedimenti marini e miscelato con una soluzione elettrolitica come fonte energetica.

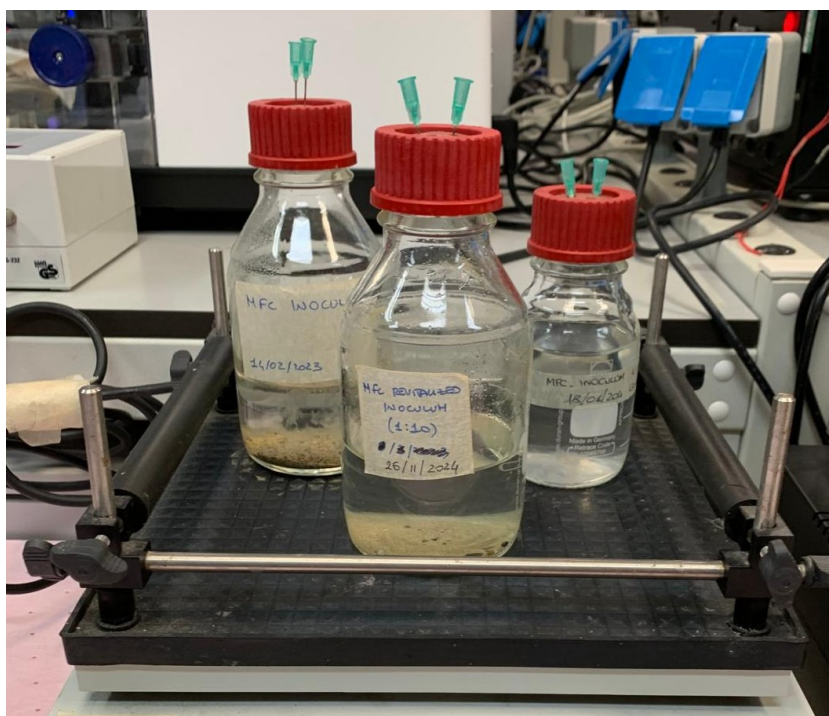


Figura 2.1: Campioni di inoculo batterico per le MFC.

2.2 Preparazione degli elettrodi

2.2.1 Preparazione catodi

Per la realizzazione dei catodi sono stati utilizzati, per tutte le celle, elettrodi di dimensioni $3 \times 3 \text{ cm}^2$, ottenuti a partire da fogli di carbon paper (AvCarb GDS2240). La composizione del materiale ha previsto due strati funzionali: un lato, caratterizzato da fibre di carbonio trattate con politetrafluoroetilene (PTFE), rappresentante lo strato di diffusione gassosa (GDL) per facilitare lo scambio di ossigeno con l'aria; l'altro lato caratterizzato da uno strato microporoso (MPL), per migliorare l'idrofobicità del materiale, minimizzando gli effetti di *flooding* dell'elettrodo, che comprometterebbero le prestazioni, limitando direttamente l'efficienza della reazione di riduzione dell'ossigeno.

Su quest'ultimo lato è stata applicata una pasta di catalizzatore a base di platino per promuovere la reazione di riduzione dell'ossigeno. Per la preparazione della pasta si è proceduto a partire dalla pesatura della polvere di platino su carbonio, nella quale la concentrazione in massa del platino era pari al 10 %. Successivamente, in ordine, sono stati aggiunti acqua deionizzata, Nafion e isopropanolo. Il Nafion assicura l'adesione del catalizzatore Pt/C al substrato e ottimizza l'attività catalitica fornendo protoni per la riduzione dell'ossigeno. Le quantità di ogni componente da miscelare in riferimento alla superficie catodica di un singolo elettrodo sono

riportate nella Tabella 2.1:

Tabella 2.1: Composizione del catalizzatore catodico.

Reagente	Quantità
Pt/C	4,5 mg/cm ²
Acqua deionizzata	0,83 μ L/cm ²
Nafion TM	6,67 μ L/cm ²
Isopropanolo	3,33 μ L/cm ²

Le quantità dei singoli componenti sono state moltiplicate in funzione del numero di catodi da preparare. Un volume target è stato poi prelevato e applicato uniformemente su ciascun elettrodo mediante un pennello. I catodi a base di carbon paper e platino (CP/Pt) sono stati in seguito lasciati asciugare sotto cappa chimica per 24 ore (Figura 2.2).

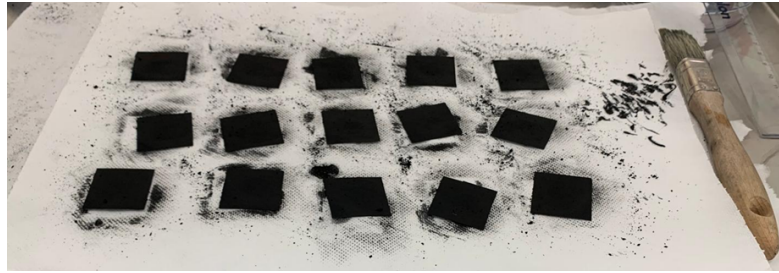


Figura 2.2: Catodi di CP/Pt.

2.2.2 Preparazione anodi

Mentre gli elettrodi CP/Pt sono stati impiegati come catodi in tutte le celle sottoposte ad analisi, per il comparto anodico sono stati selezionati cinque diversi materiali, al fine di confrontare l'effetto del materiale anodico sulla formazione del biofilm, e conseguentemente sulle prestazioni elettrochimiche complessive delle celle.

I materiali selezionati comprendevano:

- Elettrodi a base di carbon paper non modificato (**CP**);
- Elettrodi a base di carbon paper decorati con PEDOT:PSS (**CP/PEDOT:PSS**);
- Elettrodi a base di carbon paper decorati con PEO (**CP/PEO**);
- Elettrodi a base di carbon paper decorati con PVA (**CP/PVA**);
- Elettrodi a base di grafene laser-indotto (**LIG**).

Carbon paper non modificato

Gli elettrodi sono stati ricavati da fogli di carbon paper commerciali con una dimensione finale di $3 \times 3 \text{ cm}^2$ (AvCarb P75). Il carbon paper è stato utilizzato come substrato di controllo per valutare l'effetto delle modifiche superficiali polimeriche influenzino le prestazioni elettrochimiche, parametri che forniscono indicazioni indirette sulla crescita batterica e sull'effetto delle nanostrutture sulla formazione del biofilm.

Carbon paper con modifiche superficiali polimeriche

Setup sperimentale: l'elettrospinning, come descritto nella sezione 1.3.1, permette la deposizione controllata di strati nanostrutturati direttamente sulla superficie del carbon paper tramite l'applicazione di un campo elettrico ad alta tensione. La tecnica è stata eseguita utilizzando un sistema di elettrospinning (Nanon 01 – Mecc Co. Ltd., Giappone, Figura 2.3) configurato con geometria ago-collettore verticale. I quadrati di carbon paper $3 \times 3 \text{ cm}^2$ sono stati posizionati sul collettore piano in modo da ottenere una distribuzione uniforme della soluzione polimerica su una sola faccia dell'elettrodo. Le deposizioni sono state condotte in ambiente controllato a temperatura ambiente, secondo i parametri operativi descritti in seguito.



Figura 2.3: Electrospinning Nanon 01– Mecc Co. Ltd., Giappone.

PEO: per la preparativa del substrato CP/PEO è stata impiegata una soluzione di PEO preparata in acqua deionizzata alla concentrazione del 5% in peso. La dissoluzione del polimero è avvenuta mediante agitazione magnetica a temperatura

ambiente. L'impiego di questa soluzione tramite la tecnica di deposizione elettrospinning ha permesso di ottenere uno strato di nanofibre di PEO direttamente sulla superficie del carbon paper.

PEDOT:PSS: il PEDOT:PSS non è processabile in forma pura mediante la tecnica di elettrospinning a causa delle sue proprietà reologiche, richiedendo pertanto l'aggiunta di un co-polimero come il polietilene ossido. È stata preparata una miscela aggiungendo PEO all'1% in peso della soluzione di PEDOT:PSS, optando per la tecnica di elettrospray anziché electrospinning. Questa scelta ha consentito di impiegare una concentrazione inferiore di PEO, minimizzando interferenze con le proprietà elettrochimiche del PEDOT:PSS, pur garantendo una deposizione stabile su substrati di carbon paper sotto forma di nanogocce.

PVA: per la preparazione del substrato CP/PVA è stata impiegata una soluzione di PVA disciolto in acqua deionizzata alla concentrazione del 10% in peso. La dissoluzione è stata condotta mediante agitazione magnetica per garantire il completo scioglimento del polimero e l'ottenimento di una soluzione omogenea. Come nel caso del PEO, l'impiego della tecnica di deposizione elettrospinning ha permesso di ottenere uno strato di nanofibre di PVA direttamente sulla superficie del carbon paper.

Parametri del processo di deposizione: i parametri del processo di deposizione sono stati ottimizzati per la realizzazione di nanostrutture uniformi e continue. Per ciascuna soluzione, la durata del processo è stata scelta in maniera da ottenere una quantità di materiale depositato confrontabile, in funzione delle diverse concentrazioni. La Tabella 2.2 riassume i valori identificati per ciascuna formulazione.

Tabella 2.2: Parametri del processo di deposizione. I valori *height*, *width* e *spinneret speed* si riferiscono rispettivamente alla distanza tra ago metallico e collettore, alla distanza orizzontale spaziata dall'ago metallico e alla velocità dello stesso.

Parametri	PEO	PEDOT:PSS	PVA
<i>Working distance</i>	110 mm	110 mm	150 mm
<i>Voltage</i>	19 kV	22,5 kV	25 kV
<i>Feed rate</i>	0,3 ml/h	0,3 ml/h	0,1 ml/h
<i>Width</i>	80 mm	80 mm	80 mm
<i>Spinneret speed</i>	80 mm/s	80 mm/s	80 mm/s
<i>Deposition duration</i>	1 h	1 h	30 min

Elettrodi a base di Laser Induced Graphene (LIG)

La tecnica LIG, illustrata nella sezione 1.3.2, converte selettivamente la superficie del film di poliimmide in grafene poroso tridimensionale, attraverso l'impiego di un laser. Il film polimerico è stato tagliato per ottenere una dimensione finale di qualche millimetro più grande rispetto a quella degli elettrodi impiegati nelle celle ($3 \times 3 \text{ cm}^2$), al fine di facilitare la procedura di ritaglio.

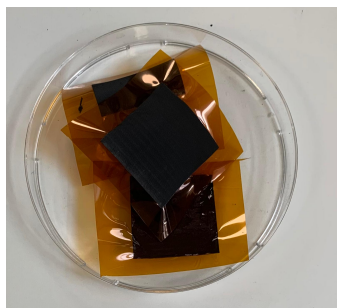
Parametri di processo: la conversione del Kapton in LIG è stata effettuata utilizzando un marcatore laser pulsato a CO_2 (Laser Veronese, Italia, Figura 2.4) con i parametri di processo indicati in Tabella 2.3. La geometria disegnata sui fogli di poliimmide era quella di un quadrato pieno $3 \times 3 \text{ cm}^2$, eseguita su un lato del film.

Tabella 2.3: Parametri di processo di marcatura laser. I parametri *frequency* e *power* sono riferiti rispettivamente alle pulsazioni della sorgente laser e alla sua potenza rispetto al valore nominale (10 W). I parametri *loop count* e *speed* sono riferiti rispettivamente al numero di ripetizioni del pattern scelto e alla velocità di scansione dello spot laser sulla superficie.

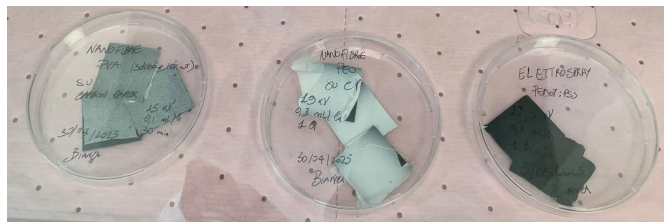
Parametro	Valore
<i>Frequency</i>	4 kHz
<i>Power</i>	85 %
<i>Loop Count</i>	1
<i>Speed</i>	125 mm/second



Figura 2.4: Marcatore CO_2 , Laser Veronese, Italia



(a) Elettrodi LIG.



(b) Elettrodi di carbon paper con decorazione polimerica. Da destra CP/PVA, CP/PEO, CP/PEDOT:PSS.

Figura 2.5: Confronto tra elettrodi utilizzati nello studio.

2.3 Valutazione citotossica dei materiali

Per verificare la compatibilità dei materiali selezionati a contatto diretto con i microorganismi, sono state svolte delle prove preliminari di citotossicità su piastra agar, affiancate da analisi della densità ottica (Optical Density, OD) per la valutazione della crescita batterica sui diversi substrati. Durante queste prove sono stati impiegati gli stessi materiali e inoculo microbico utilizzati anche per l'esperimento nelle MFC. Questo ha permesso di analizzare l'interazione tra microorganismi e campioni sperimentali nelle medesime condizioni.

2.3.1 Prove su piastre agar

La tecnica delle piastre agar per l'analisi della citotossicità consiste nel coltivare microorganismi su uno strato di agar sovrapposto a un campione da testare (ad esempio un materiale o una sostanza chimica), permettendo la diffusione di eventuali agenti tossici rilasciati dal campione verso le cellule. Il principio si basa sulla valutazione della vitalità cellulare al trascorrere del tempo: la formazione di aloni di inibizione o la riduzione della proliferazione cellulare intorno al campione indica citotossicità dello stesso. Per ciascun materiale impiegato come anodo sono state realizzate delle triplette di campioni, in modo da rendere affidabili e statisticamente rilevanti i risultati ottenuti. I campioni per le prove di citotossicità sono stati preparati seguendo le medesime procedure e condizioni, precedentemente descritte, adottate per la realizzazione degli elettrodi.

Le prove sono state condotte inserendo i campioni in piastre Petri contenenti agar, con successiva deposizione di inoculo batterico.

La preparativa delle piastre è avvenuta in quattro step, basandosi sulla metodologia generale riportata in letteratura [65], ottimizzata per questo studio specifico:

1. Versamento dell'agar nelle piastre (temperatura superiore a 40°C);
2. Inserimento nelle piastre dei campioni;

3. Raffreddamento a temperatura ambiente, con conseguente solidificazione dell'agar;
4. Stesura dell'inoculo batterico sulla superficie dell'agar (quantità in rapporto 1:50 rispetto al volume di agar);

Parallelamente è stato incluso un campione di controllo negativo, costituito da carbon paper funzionalizzato con nanoparticelle d'argento, materiale noto per le sue proprietà battericide. Le nanoparticelle sono state realizzate a partire da una soluzione fotoindotta tramite lampada UV di nitrato d'argento (0.01 mol/L) e benzofenone come fotoiniziatore in rapporto 1:2500. Inoltre, sono state predisposte delle piastre di controllo positivo, riempite unicamente con agar e inoculo batterico, per verificare l'effettiva vitalità dell'inoculo batterico utilizzato. Le piastre sono state successivamente inserite in incubatore a temperatura controllata di 25 °C. La Tabella 2.4 riporta tutti i materiali citati nel paragrafo per la preparativa di agar:

Tabella 2.4: Composizione della soluzione di agar.

Reagente	Quantità
Acetato di sodio	1 g/L
NaH ₂ PO ₄	2,45 g/L
KCl	0,13 g/L
NH ₄ Cl	0,31 g/L
Agar	10 g
Acqua deionizzata	1 L

Per garantire la coerenza sperimentale, il terreno di coltura delle piastre agar è stato preparato mantenendo la stessa composizione di sali dell'elettrolita operativo delle MFC, descritto nel dettaglio nelle prossime sezioni.

2.3.2 Optical Density (OD)

Per la valutazione della crescita microbica, congiuntamente alle prove su piastre agar, è stata condotta un'analisi spettrofotometrica basata sulla misura della densità ottica a 600 nm. Questa lunghezza d'onda minimizza l'assorbimento da parte dei componenti del terreno di coltura e dei metaboliti batterici, permettendo alla misura di riflettere prevalentemente la torbidità cellulare con elevata sensibilità e specificità [66]. Questa tecnica di analisi sfrutta il principio per il quale la densità ottica (OD_{600}) è proporzionale alla concentrazione di cellule microbiche in sospensione: maggiore è la torbidità del campione, maggiore è la quantità di luce assorbita o dispersa dalle cellule, permettendo così una stima indiretta della proliferazione batterica [67]. La misura viene effettuata utilizzando uno spettrofotometro, che confronta l'assorbanza del campione con un bianco (mezzo di coltura sterile), fornendo un'indicazione quantitativa della crescita microbica nel tempo. Questa

tecnica è particolarmente utile a conferma e integrazione dei risultati qualitativi ottenuti dall'analisi delle piastre agar. Per lo svolgimento dell'attività sperimentale, sono state preparate delle triplette di provette Falcon: una per ciascuno dei cinque materiali testati e una di controllo negativo (privo di materiale da testare). Ogni provetta è stata riempita con 30 mL di una soluzione costituita da inoculo batterico ed elettrolita, in rapporto volumetrico 1:20, e successivamente vi è stato inserito il rispettivo campione di materiale da testare, ad eccezione della tripletta di controllo. Per la misura di densità ottica, sono stati prelevati 2 mL di soluzione da ogni Falcon e trasferiti in cuvette in polistirene. Il tempo zero è stato considerato dopo 30 minuti dall'inizio del contatto tra il materiale e la soluzione. Per ciascun campione è stato eseguito un monitoraggio della crescita attraverso misure di assorbanza ripetute: la prima al tempo zero, la seconda dopo 4 ore. I prelievi per le misure sono stati fatti con cadenza giornaliera per tre giorni consecutivi, al fine di confrontare la risposta dei diversi materiali testati. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis in assorbanza (Evolution™ One/One Plus, Thermo Fisher Scientific, USA), utilizzando i parametri mostrati in Tabella 2.5.

Tabella 2.5: Parametri di controllo per la spettroscopia UV-Vis.

Parametro	Valore
<i>Wavelength</i>	595-605 nm
<i>Integration time</i>	0.29 sec
<i>Scan speed</i>	200 nm/min
<i>Bandwidth</i>	2 nm

2.4 Assemblaggio delle MFC e monitoraggio dell'attività elettrica

2.4.1 Preparazione dei componenti strutturali delle celle e assemblaggio

Le parti strutturali delle celle a combustibile microbiche utilizzate in questo studio sono state realizzate mediante stampa 3D (Object 3D, Stratasys, Israele) o fresatura di polimetilmetacrilato (PMMA), secondo una architettura a camera singola con catodo esposto all'aria. Questa configurazione è comunemente utilizzata per i vantaggi prestazionali documentati in letteratura, che includono la riduzione della resistenza interna, l'incremento della densità di potenza rispetto ai sistemi a doppia camera, e la diminuzione dei costi di fabbricazione [68] [69]. Ogni MFC è stata composta dai seguenti elementi, nel dettaglio in Figura 2.6:

- alloggiamenti catodico ed anodico in polimetilmetacrilato (PMMA);

- finestra a griglia in plastica da apporre nel lato catodico per fornire protezione meccanica e permettere un il passaggio d'aria;
- piastra di intermezzo in PMMA per la separazione dei componenti;
- due cornici quadrate in plastica per il contatto elettrico;
- due guarnizioni in gomma per garantire la tenuta idraulica;
- otto viti di fissaggio per l'assemblaggio. La scelta di questi materiali è supportata da precedenti applicazioni in sistemi bioelettrochimici che ne hanno documentato la compatibilità con i processi metabolici batterici, senza effetti negativi sulla vitalità dei biofilm [70] [70].

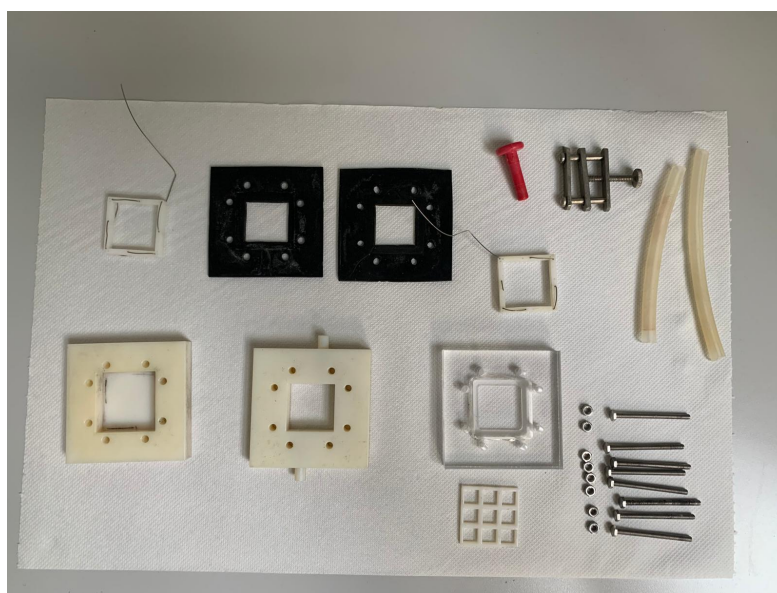


Figura 2.6: Componenti costitutivi ogni MFC. Non sono mostrati gli elettrodi.

In questo studio è stata assemblata una tripletta di celle MFC per ogni tipologia di anodo presentata in precedenza, al fine di aumentare la significatività statistica delle analisi svolte. Ciascuna cella è stata assemblata inserendo un elettrodo anodico e catodico, precedentemente preparati, negli appositi alloggiamenti. Per effettuare i collegamenti elettrici all'esterno della cella e mantenere gli elettrodi in posizione, è stata realizzata una cornice in plastica intrecciata con un filo di titanio. Infine, si è proceduto serrando i diversi componenti attraverso le guarnizioni, la piastra di intermezzo e le 8 viti per garantire la tenuta idraulica. Le celle presentavano dimensioni esterne di $6 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$, e un volume interno totale di circa 12,5 mL. Data l'assenza di membrana di separazione, l'elettrolita all'interno della cella era condiviso tra anodo e catodo.

2.4.2 Preparazione dell'elettrolita

In questo studio è stato utilizzata una soluzione elettrolitica (medium) contenente acetato di sodio come fonte di nutrimento, soluzione molto comune nei sistemi MFC [71]. Sono stati aggiunti, inoltre, sali minerali essenziali per promuovere il metabolismo cellulare, e per garantire una buona conducibilità dell'elettrolita. La composizione finale del medium è riportata in Tabella 2.6.

Tabella 2.6: Composizione del medium di impiegato per il funzionamento delle MFC.

Reagente	Quantità
Acetato di sodio	1 g/L
NaH_2PO_4	2,45 g/L
KCl	0,13 g/L
NH_4Cl	0,31 g/L
Acqua deionizzata	1 L

La soluzione preparata è stata sterilizzata in autoclave (CertoClav MultiControl, CertoClav GmbH, Germania) a 125°C per 2 ore.

2.4.3 Avvio dell'esperimento MFC

Ogni cella è stata disposta su un sostegno verticale, quindi collegata elettricamente a un multimetro multicanale (per il monitoraggio continuo dell'attività elettrica) e a una resistenza esterna. Il funzionamento delle celle si è svolto in modalità *fed batch*, che prevede la sostituzione periodica, parziale o totale, di substrato fresco, solitamente quando il segnale elettrico scende sotto una soglia prestabilita [59]. L'avviamento delle celle a combustibile microbiche richiede tempi prolungati per permettere l'attecchimento microbico e la formazione di un biofilm elettroattivo maturo, processo che può richiedere da settimane a diversi mesi a seconda del consorzio microbico utilizzato, delle condizioni operative e dell'architettura del reattore [64]. Per questo motivo, lo sviluppo delle celle microbiche è stato suddiviso in due fasi operative: una fase iniziale di inoculo per favorire l'insediamento microbico e l'attecchimento primario, e una seconda fase di stabilizzazione per la maturazione del biofilm e l'ottimizzazione delle prestazioni elettriche a lungo termine.

Fase inoculo

La fase iniziale di inoculo, della durata di circa 40 giorni, ha previsto l'alimentazione delle MFC tramite una miscela di inoculo microbico e medium fresco (in rapporto

di volumi 1:10). Questo approccio mirava all'introduzione di un consorzio microbico insieme all'elettrolita, per favorire la formazione primaria del biofilm anodico. Il riempimento delle celle è stato eseguito attraverso il tubicino di ingresso delle celle, utilizzando una siringa, e prestando particolare attenzione all'eliminazione di bolle d'aria per minimizzare la contaminazione di ossigeno all'anodo. In architetture di questo tipo con catodo all'aria, e senza la presenza di una membrana di separazione, la contaminazione di ossigeno all'anodo è tuttavia inevitabile, ed influenza i processi elettroattivi. L'ossigeno, fluendo dal catodo verso il compartimento anodico, può agire come accettore di elettroni alternativo, in competizione con l'elettrodo, riducendo la corrente generata e l'efficienza complessiva del sistema [72]. Inoltre, la presenza di ossigeno può ridurre la selettività per i batteri elettroattivi anaerobi, favorendo la crescita di specie aerobiche, alterando la composizione del biofilm anodico [73]. Una volta riempite le celle, sono state applicate clip di blocco al tubicino di uscita per prevenire fuoriuscite indesiderate. Durante questa fase è stata collegata elettricamente una resistenza esterna di 470 Ω , valore ottimizzato per indurre l'insediamento microbico senza creare stress eccessivi al sistema biologico emergente [74]. Il *refill* di inoculo-elettrolita è stato effettuato 2-3 volte a settimana, per compensare l'evaporazione attraverso il catodo esposto all'aria, aggiungendo il substrato organico fresco fino a ripristinare il volume operativo iniziale delle celle.

Fase post inoculo

Successivamente, per la maturazione e stabilizzazione del biofilm anodico, la procedura di *refill* è stata modificata, prevedendo lo svuotamento completo di ciascuna cella, e il riempimento con medium fresco, in modo da garantire un'alimentazione uniforme per tutte le MFC. La frequenza di *refill* è stata mantenuta a 2 volte a settimana, cambiando il substrato quando il segnale di potenziale scendeva al di sotto di una soglia critica, in virtù di mantenere il medium fresco rispetto alla cinetica di degradazione batterica. La resistenza esterna è stata incrementata a 1 k Ω per avvicinare l'impedenza del carico a quella interna del sistema, ottimizzando il trasferimento di carica. Questa modifica è stata basata sui risultati delle analisi voltammetriche preliminari che hanno fornito una stima della resistenza interna delle celle.

2.4.4 Sistema di monitoraggio

L'acquisizione dati sull'attività elettrica delle MFC è stata realizzata attraverso il collegamento di ogni cella a un canale del multimetro (Agilent 34972A, Agilent Technologies, USA, Figura 2.7) tramite morsetti dedicati per anodo e catodo. Il sistema è stato interfacciato con un computer per l'acquisizione e visualizzazione in tempo reale dei dati sperimentali. Il monitoraggio ha previsto la registrazione

automatica, ogni 10 minuti, della differenza di potenziale misurata ai capi della resistenza esterna applicata, permettendo così il calcolo della corrente generata dalla MFC. La relazione che lega tali variabili è la seguente:

$$E = I \cdot R_{ex} \quad (2.1)$$

Dove:

- E è il potenziale della cella [V]
- I è la corrente [A]
- R_{ex} è la resistenza esterna [Ω]

L'acquisizione continua, della durata di 120 giorni, ha permesso di caratterizzare la variabilità intrinseca dei sistemi microbiologici, sui differenti materiali anodici investigati.



Figura 2.7: Multimetro Agilent 34972A, Agilent Technologies, USA

2.5 Caratterizzazioni elettrochimiche sulle MFC

Durante la loro attività, le celle MFC sono anche state caratterizzate tramite tecniche di analisi elettrochimica. Le due tecniche di indagine utilizzate sono state la voltammetria lineare (*linear sweep voltammetry*, LSV) e la spettroscopia d'impedenza elettrochimica (*electrochemical impedance spectroscopy*, EIS). La LSV applicata ad una Microbial Fuel Cell permette di valutare le prestazioni elettrochimiche del sistema, misurando la corrente generata in funzione del potenziale applicato (ovvero della resistenza esterna). Questo permette di determinare la curva di polarizzazione, da cui si ricavano parametri come la densità di potenza massima e la resistenza interna della cella. Tali informazioni sono utili per identificare eventuali limitazioni cinetiche o di trasferimento di carica tra i microrganismi, l'anodo e il catodo, fornendo informazioni utili per migliorare il design del reattore o la composizione degli elettrodi. La EIS permette di analizzare le resistenze interne di un sistema elettrochimico sistema (come resistenza ohmica, di trasferimento di carica e di

diffusione), consentendo di identificare i principali fattori che limitano le prestazioni elettrochimiche. Applicata alle MFC, questa tecnica fornisce informazioni sui meccanismi di trasferimento elettronico alle interfacce tra microorganismi, elettrodi ed elettrolita, aiutando a distinguere tra perdite legate alla cinetica microbica, alla conducibilità degli elettrodi o alla diffusione degli ioni.

2.5.1 Linear Sweep Voltammetry (LSV)

La tecnica di Linear Sweep Voltammetry è stata eseguita per tutte le celle in due momenti distinti, dopo 2 e 4 mesi dall'avvio del monitoraggio. Le misurazioni sono state effettuate tramite un potenziostato multicanale (MultiPalmSens4, PalmSens BV, Paesi Bassi 2.9), previo mantenimento delle celle in circuito aperto per circa 24 ore, al fine di stabilizzare il valore di open circuit voltage (OCV).

Il set up di analisi ha previsto il collegamento del working electrode del potenziostato all'anodo, e i counter-reference electrodes al catodo, il tutto scollegando il multimetro per evitare interferenze con lo strumento. I parametri impostati sono elencati nella Figura 2.8:

Parameters	Values
t equilibration	2 s
E begin	(OCV)
E end	0.0 V
E step	0.01 V
Scan rate	0.01 V/s
Current range	10nA - 10 mA

Figura 2.8: Parametri impiegati durante le caratterizzazioni LSV.

2.5.2 Eletrochemical Impedance Spectroscopy

Analogamente alla LSV, anche l'Eletrochemical Impedance Spectroscopy ha seguito lo stesso protocollo di preparazione (24 ore in circuito aperto) per tutte le celle. Le caratterizzazioni EIS sono state svolte contestualmente a quelle LSV, utilizzando lo stesso strumento (MultiPalmSens4), con due differenti configurazioni sperimentali:

1. **Analisi a semicella**, utilizzando un elettrodo di riferimento di Ag/AgCl e collegando l'anodo al working electrode e il catodo al counter electrode;
2. **Analisi a cella intera**, utilizzando la stessa configurazione adottata per la LSV, collegando l'elettrodo di riferimento direttamente al catodo.



Figura 2.9: MultiPalmSens4, PalmSens BV, Paesi Bassi

Similmente a quanto detto per l'LSV la misura è stata eseguita dopo 2 e 4 mesi, secondo i parametri in Figura 2.10:

Parameters	Values
t equilibration	3 s
Scan type	Fixed
E dc	0.00 V (OCV)
E ac	0.01 V
Max. frequency	100000.0 Hz
Min. frequency	0.1 Hz
n frequencies	61 (10 /decade)
Current range	10 nA - 10 mA

Figura 2.10: Parametri impiegati durante le caratterizzazioni EIS.

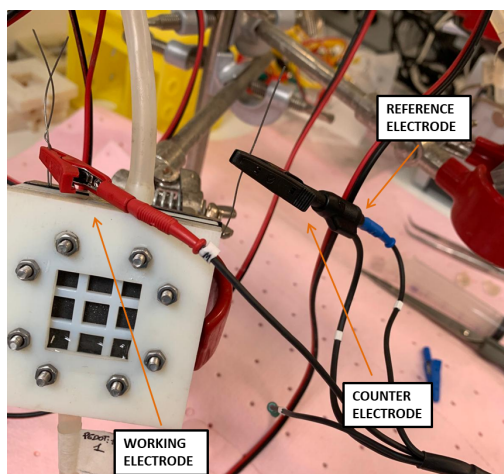


Figura 2.11: Set-up per LSV ed EIS a cella intera.

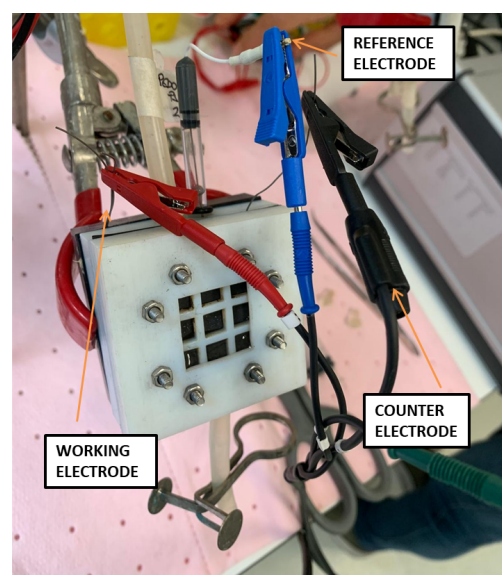


Figura 2.12: Set-up per EIS a semi-cella.

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Prove di citotossicità

3.1.1 Piastre agar

Le prove su piastre agar sono state condotte su tutti i materiali impiegati come elettrodi nelle MFC, sia anodi che catodi.

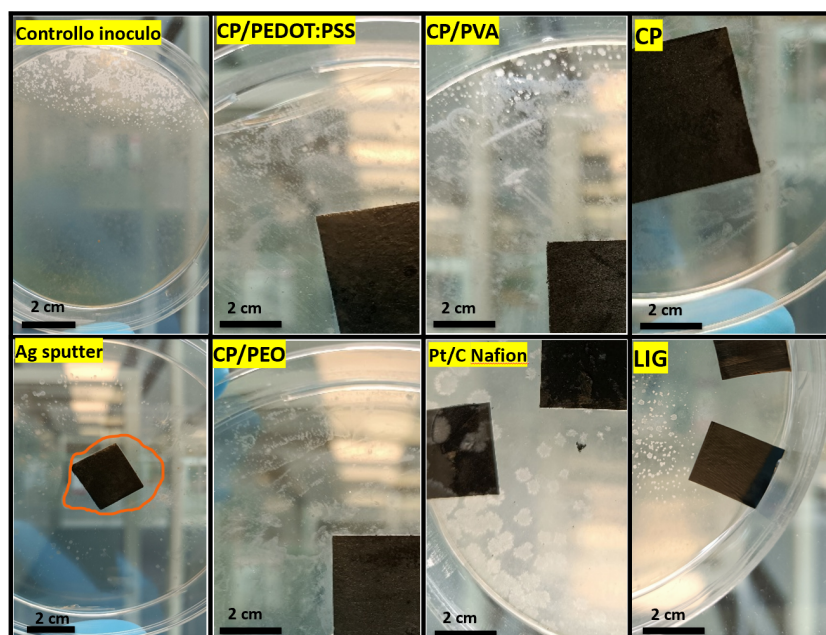


Figura 3.1: Immagini fotografiche delle piastre agar dopo 4 mesi dall'inoculo batterico. Sono riportati i campioni di indagine con due controlli per garantire la sensibilità del test.

Le immagini in Figura 3.1 mostrano i risultati delle piastre dopo 4 mesi dall'inoculo.

Tutti i campioni di materiale hanno permesso di osservare una crescita batterica distribuita uniformemente su tutta la superficie, dalla zona periferica fino al contatto diretto con l'elettrodo, senza evidenti zone di inibizione. Al contrario, la piastra contenente le nanoparticelle d'argento, utilizzata come controllo negativo, ha mostrato un anello di citotossicità intorno al campione, coerentemente con le proprietà antimicrobiche dell'argento. La presenza di proliferazione microbica nella piastra con solo inoculo ha validato la sensibilità del test, confermando l'utilizzo dei materiali di carbon paper, carbon paper modificati e LIG negli esperimenti successivi, dimostrando l'assenza di effetti citotossici.

3.1.2 Optical Density

Le prove di optical density hanno evidenziato, durante il periodo di osservazione di tre giorni, una crescita del valore di assorbanza per tutti i campioni testati. Il valore di OD è stato calcolato dalla Equazione 3.1 [75]:

$$OD = -\log \frac{I_0}{I} \quad (3.1)$$

dove:

I_0 intensità della luce incidente;

I intensità della luce trasmessa attraverso il campione.

La fase iniziale di crescita, durante la quale i microrganismi si adattano alle nuove condizioni ambientali senza mostrare un aumento significativo della densità ottica, si estende per la maggior parte dei materiali dalle 0 alle 24 ore. La fase successiva è caratterizzata da una crescita differenziale dipendente dal tipo di condizione analizzata, in cui è possibile apprezzare maggiormente l'interazione batterio-substrato. In regimi di bassa densità cellulare, la densità ottica segue la legge di Beer-Lambert ed è direttamente correlata al numero di cellule presenti, purché i microrganismi siano ben dispersi nella soluzione e presenti in concentrazioni limitate [67]. La diminuzione di OD_{600} osservata per alcuni campioni dopo 48 ore potrebbe essere attribuita a fenomeni di aggregazione cellulare sul materiale o a interazioni specifiche tra i batteri e il substrato, che alterano le proprietà di misura del sistema e modificano la relazione tra densità ottica e concentrazione cellulare effettiva.

Questa analisi, affiancata ai test su piastre agar, aveva l'obiettivo di confermare la non citotossicità dei materiali selezionati per poter condurre l'esperimento. Tale obiettivo viene confermato da tutti i materiali testati, seppur con le rispettive differenze comportamentali. In Figura 3.2 è possibile osservare l'andamento appena descritto.

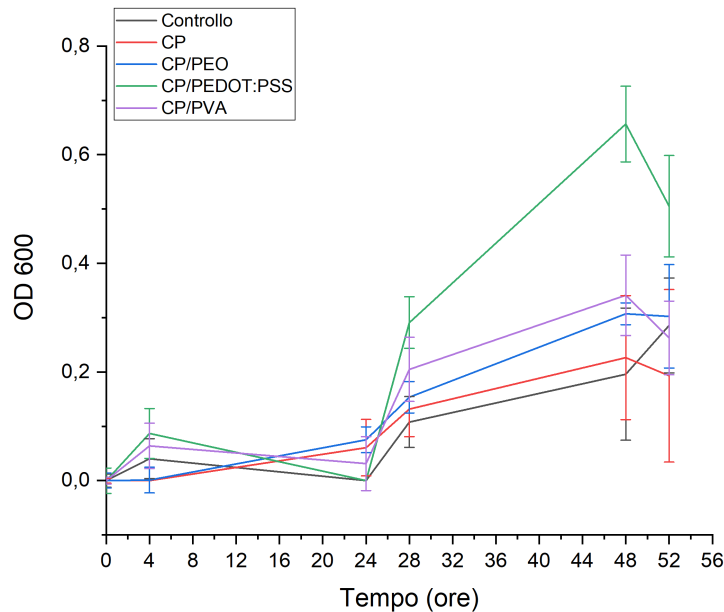


Figura 3.2: Andamento grafico del valore di densità ottica calcolato per tutti i campioni durante i 3 giorni di osservazione.

3.2 Monitoraggio potenziale nel tempo

Il grafico in Figura 3.3 mostra il monitoraggio dei potenziali medi nel tempo delle MFC, per la durata di 4 mesi.

Il periodo di osservazione è suddivisibile in tre fasi.

- 1. FASE DI COLONIZZAZIONE Identificabile dal giorno 0 al giorno 40, racchiude il periodo di colonizzazione batterica. Durante questa fase iniziale, i microrganismi si adattano alle condizioni ambientali della cella. Il segnale è caratterizzato da elevata variabilità, coerentemente con i processi di adesione batterica e formazione della matrice polimerica extracellulare. La curva di tensione mostra una crescita lenta e irregolare, partendo da valori molto bassi e raggiungendo gradualmente valori di tensioni più elevati dopo circa una settimana, seppur con notevoli fluttuazioni. Questo è reso possibile grazie all'impiego di una resistenza esterna bassa (470Ω) che favorisce l'adattamento della comunità microbica non ancora sviluppata, e di un'alimentazione a base di elettrolita e inoculo batterico;
- 2. FASE DI MATURAZIONE Dal giorno 40 al giorno 100, dove si osserva una crescita della struttura del biofilm, associata ad una stabilizzazione della tensione prodotta dalle MFC attorno ad un valore medio, specifico per ogni materiale analizzato;

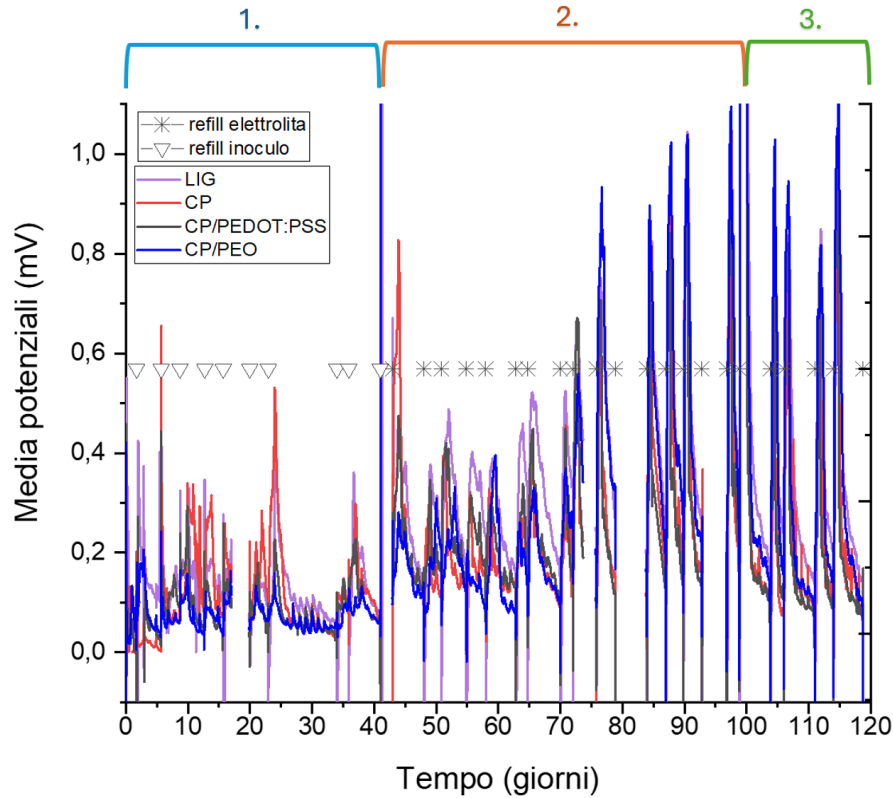


Figura 3.3: Monitoraggio della tensione nel tempo. Le curve rappresentano gli andamenti medi per ciascun materiale, mentre i simboli definiscono le due diverse modalità di refill. In alto sono evidenziate le tre fasi elettrochimiche caratteristiche.

- 3. FASE DI STABILIZZAZIONE Dal giorno 100 al giorno 120, periodo durante il quale continua la selezione e l'adattamento microbico e le celle assumono un andamento sempre più definito e ciclico.

Queste ultime due fasi sono caratterizzate da una ottimizzazione del carico resistivo esterno (incrementato a $1\text{ k}\Omega$), e dalla sostituzione della soluzione inoculo ed elettrolita con elettrolita puro. La transizione tra le 3 fasi è evidenziata da una interruzione temporanea dell'acquisizione dati, necessaria per l'esecuzione delle caratterizzazioni elettrochimiche (LSV ed EIS). Durante queste misure, il multimetro viene scollegato per evitare interferenze esterne e il circuito viene mantenuto aperto.

Nei paragrafi successivi verrà analizzata nel dettaglio ciascuna fase elettrochimica, evidenziando le curve di tensione dei materiali nanostrutturati (CP/PEDOT:PSS e CP/PEO) e del LIG rispetto al substrato di controllo (CP), correlando l'andamento elettrico con i processi di formazione del biofilm.

3.2.1 Fase di colonizzazione iniziale

LIG

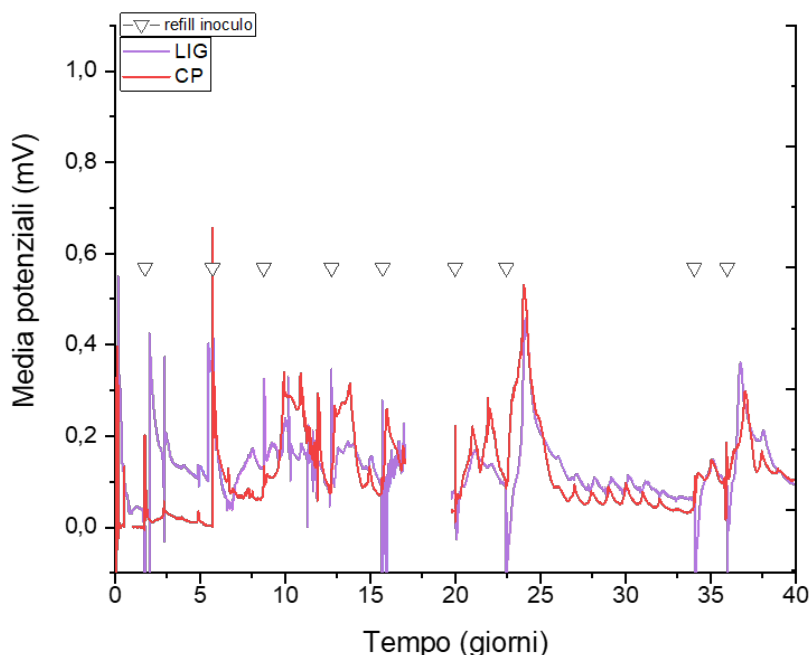


Figura 3.4: Fase di colonizzazione. In dettaglio l'andamento medio del LIG rispetto al controllo (CP).

Analizzando la fase di colonizzazione iniziale, si osserva come dalla prima settimana il controllo mostri profili di tensione compatibili con la fase di adesione del processo di formazione del biofilm, evidenziati da picchi di potenziale successivi alle operazioni di refill. Questo comportamento si stabilizza nel tempo, con curve più definite e valori di potenziale crescenti. Il LIG, nonostante le diverse proprietà superficiali del materiale, evidenzia una notevole convergenza nelle prestazioni elettriche con il controllo, particolarmente evidente dopo il giorno 20. Sebbene questo substrato presenti una fase di startup più prolungata, probabilmente dovuta alle diverse caratteristiche di adesione batterica, il segnale risulta comparabile con quello del carbon paper, differenziandosi principalmente nella morfologia dei picchi di tensione. In tabella sono riassunti i valori medi dei parametri caratteristici per ciascun materiale: i picchi di tensione massima successivi all'operazione di cambio del medium e l'intervallo temporale tra il refill e il raggiungimento del massimo (t_{peak}).

Tabella 3.1: Parametri monitorati durante la fase di colonizzazione per CP e LIG.

Materiali	T_{peak} [h]	Potenziale max. [V]
CP	30	0.286
LIG	24.5	0.279

Rivestimenti polimerici

L'analisi comparativa degli elettrodi di carbon paper nanostrutturati rivela profili di risposta elettrica distintivi per ciascun materiale, anch'essi graficamente differenziabili per ampiezza e morfologia dei picchi.

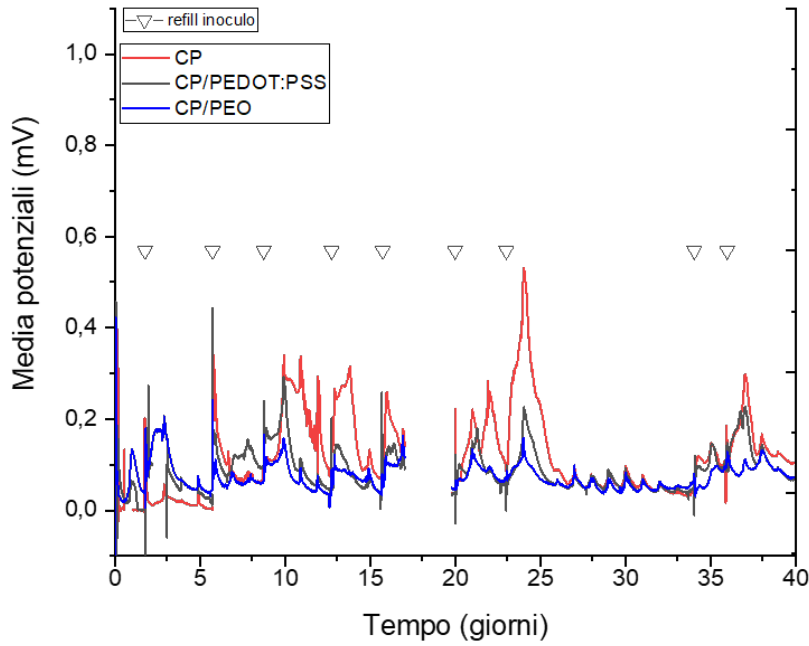


Figura 3.5: Fase di colonizzazione. In dettaglio l'andamento medio delle decorazioni polimeriche rispetto al controllo (CP).

Durante la fase di colonizzazione, sia il CP/PEO che il CP/PEDOT:PSS raggiungono una stabilizzazione entro la prima settimana, con valori di potenziale caratteristici delle rispettive proprietà elettrochimiche. Il CP/PEO presenta valori di tensione significativamente inferiori al controllo, comportamento attribuibile alle proprietà isolanti del polietilene ossido che, pur essendo biocompatibile e favorevole all'adesione batterica, limita intrinsecamente il trasferimento elettronico tra i microrganismi e l'elettrodo. Al contrario, il CP/PEDOT:PSS dimostra prestazioni più vicine al CP nudo, beneficiando delle eccellenti proprietà di conducibilità

elettrica. I parametri quantitativi riportati in Tabella 3.2 confermano queste osservazioni qualitative, evidenziando come la nanostrutturazione con polimeri diversi influenzi significativamente le prestazioni, pur mantenendo la funzionalità biologica del sistema.

Tabella 3.2: Parametri monitorati durante la fase di colonizzazione per CP e nanostrutturazioni polimeriche.

Materiale	T_{peak} [h]	Potenziale max. [V]
CP	30	0.286
CP/PEDOT:PSS	26.5	0.187
CP/PEO	26.3	0.128

3.2.2 Fase di maturazione del biofilm

LIG

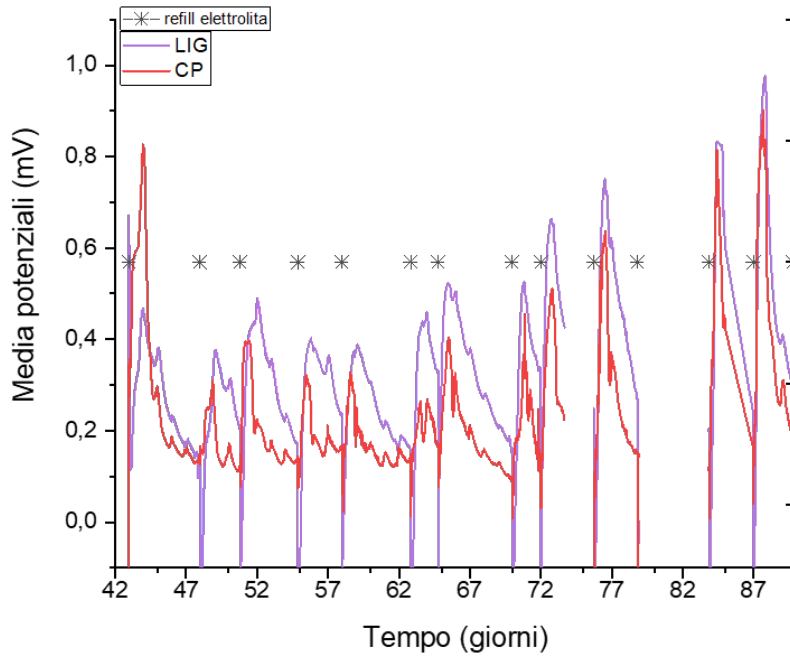


Figura 3.6: Fase di maturazione. In dettaglio l'andamento medio del LIG rispetto al controllo (CP).

Nelle fasi successive, caratterizzate da una diversa modalità di alimentazione e carico esterno, emergono curve risultanti dalla maturazione del biofilm. In questo periodo, dove la comunità microbica ha raggiunto una maggior stabilità strutturale e funzionale, correlabile alle fasi di adesione irreversibile e di produzione della matrice EPS, il segnale di potenziale riflette un trend evolutivo per entrambi i materiali. I valori di tensione massima e i tempi di raggiungimento del picco (t_{peak}) mostrano un miglioramento progressivo nel tempo. Risulta particolarmente significativo che il LIG mostri prestazioni non solo comparabili ma spesso superiori al carbon paper, dimostrando inequivocabilmente la sua idoneità come materiale anodico per MFC. Tuttavia, emergono alcuni aspetti che richiedono ulteriori approfondimenti, come la caratteristica decrescita di potenziale dopo ogni refill, e il mantenimento di valori negativi per numerose ore prima del raggiungimento del picco massimo. Quest'ultimo fenomeno rappresenta un limite conoscitivo del presente studio che meriterebbe investigazioni elettrochimiche più approfondite.

Rivestimenti polimerici

L'ottimizzazione dei parametri si riscontra anche per le nanostrutturazioni polimeriche, seppur con aspetti differenti.

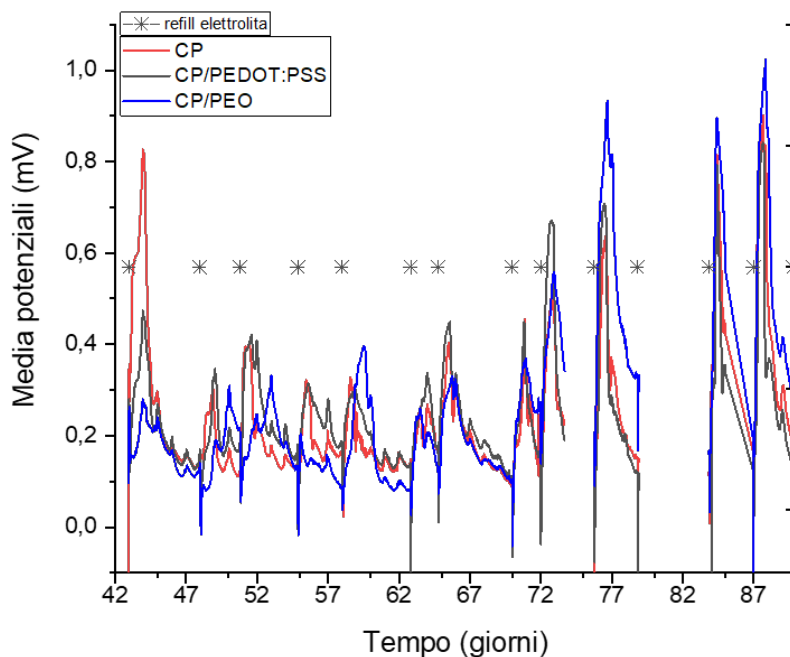


Figura 3.7: Fase di maturazione. In dettaglio l'andamento medio delle nanostrutture polimeriche rispetto al controllo (CP).

Il CP/PEO, tra la fase di colonizzazione e la fase di maturazione presenta dei picchi secondari di minore intensità che precedono e seguono il picco principale. Sebbene questo pattern non costituisca un'evidenza statistica robusta data la variabilità intrinseca del sistema e la durata complessiva del monitoraggio, rappresenta una caratteristica osservata prevalentemente su questo substrato.

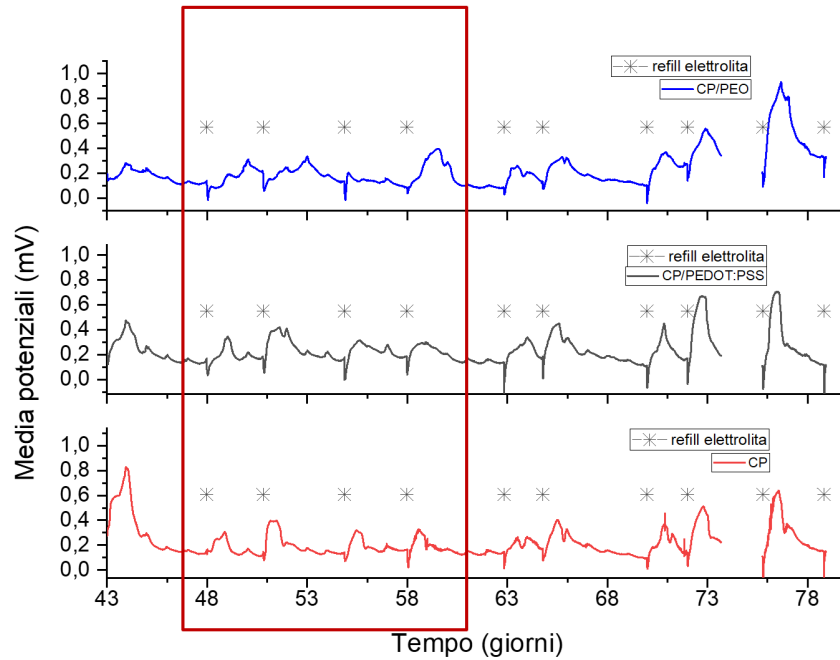


Figura 3.8: Andamento medio della tensione nel dettaglio per i materiali nano-strutturati e il controllo.

E' riconosciuto in letteratura l'utilizzo del PEO nell'ambito del tissue engineering e nel supporto della crescita cellulare [76][77], così come precedenti lavori hanno supportato l'uso di nanofibre di PEO su CP [34]. Le proprietà igroscopiche del polimero potrebbero influenzare la dinamica di risposta del biofilm, inducendo potenzialmente una distribuzione non uniforme dei microrganismi, con attivazione metabolica asincrona in risposta al cambio di elettrolita. Questo fenomeno tenderebbe ad attenuarsi nella seconda metà della fase di maturazione (dopo il giorno 75), a seguito di una formazione maggiore del biofilm e della matrice polimerica extracellulare. Tuttavia questa interpretazione rimane di natura speculativa in assenza di caratterizzazioni dirette del biofilm e della sua morfologia.

Al contrario, il CP/PEDOT:PSS mantiene sin dall'inizio un profilo più regolare grazie alla stabilità strutturale del PEDOT in ambiente acquoso e alle proprietà elettrostatiche del PSS che possono favorire l'adesione batterica.

3.2.3 Fase di stabilizzazione a lungo termine

Nell'ultimo periodo di osservazione la risposta microbica raggiunge una stabilità ottimale su tutti i substrati, evidenziando come le differenze nelle curve di tensione

siano ormai esclusivamente attribuibili alle caratteristiche intrinseche dei materiali elettrodi.

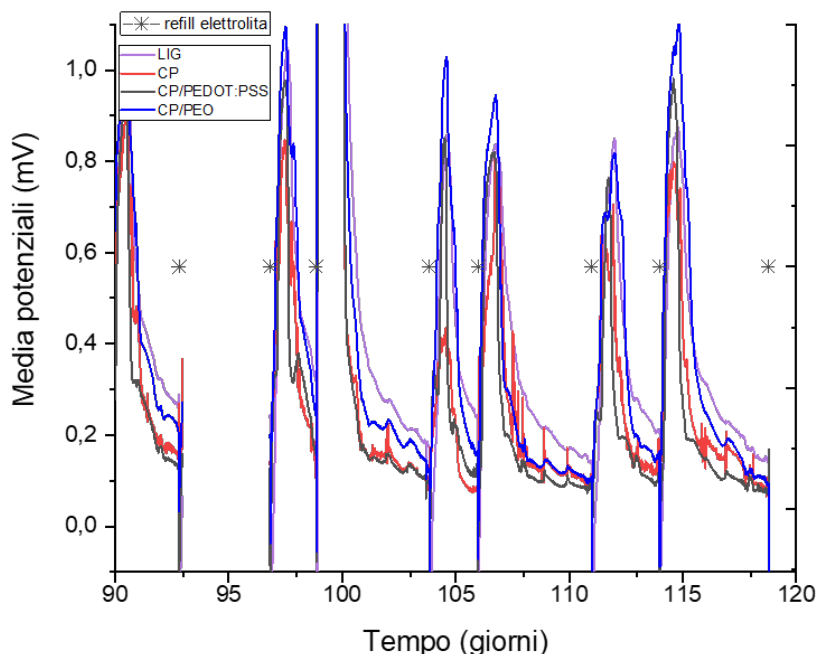


Figura 3.9: Fase di stabilizzazione. In dettaglio l'andamento medio per tutti i materiali.

Il periodo temporale analizzato corrisponderebbe alle fasi finali del processo di formazione del biofilm, che comprendono la maturazione e l'inizio della fase di dispersione, caratterizzata dal distacco di microrganismi in forma planctonica e dalla continua ricolonizzazione della superficie. La formazione del biofilm rappresenta infatti un processo dinamico e ciclico: anche dopo il raggiungimento della maturità strutturale, il sistema continua a evolversi attraverso cicli di crescita, morte cellulare e rinnovamento, mantenendo un equilibrio tra proliferazione batterica e dispersione. Per i materiali nanostrutturati (CP/PEO e CP/PEDOT:PSS), si osserva una convergenza delle prestazioni elettrochimiche, con una riduzione delle specificità distintive rilevate nelle fasi iniziali. Questo comportamento suggerisce che entrambi i substrati supportano in modo comparabile lo sviluppo di un biofilm maturo e metabolicamente attivo. L'incremento dei valori di potenziale osservato per il CP/PEO può essere attribuito alla conducibilità ionica del polietilene ossido, che favorisce il trasporto degli ioni coinvolti nei processi metabolici microbici, migliorando l'efficienza del trasferimento elettronico extracellulare.

Il LIG si conferma come materiale dalle caratteristiche uniche, distinguendosi per il maggior recovery time, caratterizzato da una spalla pronunciata nella curva di decadimento. La media dei parametri di interesse caratteristici di questa fase sono riassunti in Tabella 3.3.

Tabella 3.3: Parametri monitorati durante la fase stabilizzazione a lungo termine

Materiale	T_{peak} [h]	Potenziale max. [V]
CP	17.1	0.865
CP/PEDOT:PSS	16.2	0.847
CP/PEO	20.2	0.972
LIG	19.8	0.847

Tutti i materiali testati dimostrano di sostenere efficacemente la formazione di biofilm elettroattivi maturi, differenziandosi per caratteristiche prestazionali specifiche che li rendono potenzialmente idonei per diverse applicazioni biotecnologiche.

3.2.4 Modifica dei parametri operativi

I risultati del monitoraggio della tensione hanno dimostrato come il biofilm elettroattivo risponda in maniera specifica a ciascun substrato di contatto, suggerendo che la scelta del materiale anodico possa essere modulata in funzione dell'applicazione target desiderata. In quest'ottica, ci sono diversi parametri che possono influenzare le prestazioni di una MFC, tra cui l'architettura e la configurazione del sistema, la composizione dell'elettrolita e i parametri operativi, come la frequenza di alimentazione. Per validare l'impatto di quest'ultima, mantenendo invariate le condizioni esterne, è stato condotto un esperimento parallelo con un protocollo di refill accelerato. Il setup sperimentale ha previsto il monitoraggio di una nuova tripletta di CP/PEO insieme ad elettrodi nanostrutturati con PVA, ottenuti mediante elettrospinning. Il PVA è stato selezionato per la sua processabilità, biocompatibilità e versatilità applicativa, caratteristiche che lo rendono uno dei polimeri più utilizzati nell'elettrospinning per membrane nanofibrose [78] [79], inoltre studi precedenti hanno esplorato diverse morfologie del polimero per massimizzare la densità di microrganismi immobilizzati [80]. Le sue affinità chimico-fisiche con il PEO, infine, consentono confronti diretti sulla risposta a diverse modalità di alimentazione. I risultati, visibili in Figura 3.10 hanno confermato l'impatto significativo della frequenza di refill: accelerando l'alimentazione durante la fase di inoculo, già al terzo giorno si osserva una stabilizzazione del segnale elettrico su valori di tensione maggiori rispetto al protocollo standard del CP/PEO. Similmente, il CP/PVA manifesta il picco caratteristico in sincronia con l'altro substrato, evidenziando che l'ottimizzazione temporale dell'alimentazione ha un effetto sistemico su tutti i materiali elettroattivi testati. Il sovraccarico nutrizionale controllato ha consentito di

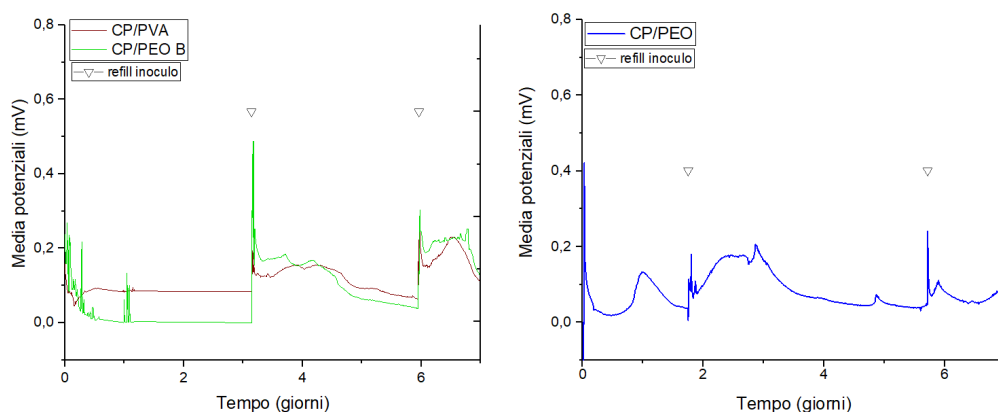


Figura 3.10: Confronto frequenze di refill. Sulla sinistra il refill standard, sulla destra le nuove celle con la procedura di cambio elettrolita accelerata.

ridurre la fase di inoculo da 30 a 20 giorni, dimostrando la possibilità di accelerare significativamente i tempi di startup del sistema.

Il monitoraggio temporale della tensione ha fornito una panoramica macroscopica del comportamento dei diversi materiali elettrodi e della loro interazione con il biofilm elettroattivo. Per approfondire i meccanismi elettrochimici sottostanti e quantificare le proprietà specifiche di ciascun substrato, sono state condotte caratterizzazioni elettrochimiche mirate mediante spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) e voltammetria lineare (LSV).

3.3 Caratterizzazioni elettrochimiche

3.3.1 Electrochemical Impedance Spectroscopy

La spettroscopia di impedenza elettrochimica è stata eseguita dopo la fase di colonizzazione iniziale e dopo la fase di maturazione del biofilm, consentendo di confermare gli andamenti osservati nel monitoraggio temporale per ciascun materiale e fornire informazioni aggiuntive specifiche dell'interfaccia biofilm-elettrodo. Le misure sono state condotte in configurazione a semicella per focalizzare l'analisi sul compartimento anodico di interesse, mentre i dati dell'analisi a cella intera sono stati utilizzati per confermare l'andamento globale delle misurazioni. I dati sperimentali sono stati interpretati utilizzando il circuito equivalente di Randles. I parametri estratti dall'analisi sono riportati nella tabella 3.4, dove per ciascun materiale è stato selezionato un campione rappresentativo.

FASE COLONIZZAZIONE				
Materiale	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	$Q1$ (μT)	α
CP 1	41.62 ($\pm 0.4\%$)	64.70 ($\pm 0.8\%$)	120.6 ($\pm 5.2\%$)	0.782 ($\pm 1.1\%$)
LIG 1	85.54 ($\pm 0.5\%$)	139.7 ($\pm 1.1\%$)	80.31 ($\pm 5.7\%$)	0.791 ($\pm 1.2\%$)
CP/PEDOT:PSS 1	66.74 ($\pm 0.2\%$)	42.30 ($\pm 2.4\%$)	155.1 ($\pm 7.3\%$)	0.747 ($\pm 1.1\%$)
CP/PEO 2	42.89 ($\pm 0.8\%$)	17.67 ($\pm 5.8\%$)	308.2 ($\pm 30.8\%$)	0.696 ($\pm 8.3\%$)

Tabella 3.4: Parametri EIS - Fase di colonizzazione

FASE MATURAZIONE				
Materiale	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	$Q1$ (μT)	α
CP 1	65.79 ($\pm 0.2\%$)	71.65 ($\pm 1.4\%$)	82.54 ($\pm 5.8\%$)	0.842 ($\pm 1.1\%$)
LIG 1	65.72 ($\pm 1.5\%$)	203.0 ($\pm 1.3\%$)	103.2 ($\pm 5.1\%$)	0.772 ($\pm 1.2\%$)
CP/PEDOT:PSS 1	80.82 ($\pm 0.2\%$)	69.21 ($\pm 1.1\%$)	139.1 ($\pm 5.5\%$)	0.764 ($\pm 1.5\%$)
CP/PEO 2	50.38 ($\pm 0.7\%$)	23.41 ($\pm 6.8\%$)	231.2 ($\pm 21.9\%$)	0.733 ($\pm 6.9\%$)

Tabella 3.5: Parametri EIS - Fase di maturazione.

L'elemento R_s rappresenta la resistenza ohmica del sistema ed è dipendente da fattori esterni alla presenza dei microrganismi, quali elettrolita e contatti elettrici. Pertanto, questo parametro non è stato considerato nell'analisi comparativa, se non per verificare che tutti i materiali presentassero valori di R_s in un range simile, confermando la validità del confronto. La R_{ct} è invece associata all'interfaccia elettrodo-biofilm, dove avviene il contatto diretto tra il materiale e la matrice biologica, e biofilm-elettrolita, dove il biofilm è a contatto con la soluzione.

I dati mostrano che gli elettrodi basati su carbon paper con nanostrutturazioni polimeriche sono caratterizzati dai valori più bassi di R_{ct} , sia durante la fase di colonizzazione che in quella di maturazione del biofilm, e presentano valori di alfa relativamente simili, indicando comportamenti elettrochimici simil resistivi. Questo effetto è attribuibile alla presenza dello strato polimerico depositato sul carbon paper, che ricopre uniformemente le micro-protuberanze della superficie conduttiva del controllo, modificandone l'interfaccia elettrodo-biofilm.

La deposizione di nanogocce di **PEDOT:PSS** sul carbon paper permette di ottenere un rivestimento uniforme sulle fibre di carbonio, creando una nanostrutturazione altamente conduttiva che facilita il trasferimento elettronico e supporta la crescita microbica. Tale comportamento è confermato da una R_{ct} relativamente bassa ($69.21 \pm 1.1\% \Omega$) e un valore di α che si stabilizza a $0.764 \pm 1.5\%$, evidenziando un comportamento leggermente più resistivo rispetto al CP controllo. Anche l'alto valore di $Q1$ ($139.1 \pm 5.5\% \mu T$), legato alla capacità non ideale, suggerirebbe un maggior accumulo di carica all'interfaccia, che può essere correlata ad una maggior

crescita del biofilm. Lo stesso comportamento si osserva nella fase di maturazione del biofilm, con un leggero incremento della resistenza al trasferimento di carica, comune però a tutti i materiali analizzati.

Il **CP/PEO** mostra l'evoluzione più marcata verso un comportamento resistivo. La R_{ct} è la più bassa sia fase di colonizzazione ($17.67 \pm 5.8\% \Omega$) sia in quella di maturazione ($23.41 \pm 6.8\% \Omega$), così come il valore di α di $0.733 \pm 6.9\%$. Questo è attribuibile alla combinazione tra trasporto elettronico e conducibilità ionica del PEO, che crea un'interfaccia ottimizzata per il trasferimento di carica. L'elevato valore di Q_1 ($231.2 \pm 21.9\% \mu T$) conferma l'aumento dell'area elettricamente attiva. Questi risultati confermano quanto osservato nel monitoraggio temporale, evidenziando come i materiali polimerici accelerino e supportino le fasi di inizializzazione microbica.

Il **LIG** presenta un comportamento elettrochimico distintivo, caratterizzato da elevata rugosità superficiale e porosità che facilitano l'adesione batterica. Tuttavia, questo materiale mostra una resistenza al trasferimento di carica consistentemente elevata (da $139.7 \pm 1.1\% \Omega$ a $203.0 \pm 1.3\% \Omega$) e un valore di α che rimane relativamente alta (da $0.791 \pm 1.2\%$ a $0.772 \pm 1.2\%$), indicando un comportamento più vicino a un condensatore ideale.

In questo caso il biofilm sembrerebbe formare una barriera uniforme tra l'elettrodo e l'elettrolita, favorendo un accumulo di carica, ma riducendo il trasferimento elettronico. Nella fase di maturazione questo effetto capacitivo diminuisce rispetto al carbon paper, e aumenta nel tempo il valore di Q_1 , indice del fatto che probabilmente per lunghi periodi di osservazione, l'alta porosità del LIG consente al biofilm di espandersi di più di quanto riesce a fare con il carbon paper.

Le Figure 3.11a e 3.11b riportano i diagrammi di Nyquist acquisiti durante il periodo di analisi. I materiali a base polimerica mostrano archi semicircolari, dovuti al parallelo R_{ct}/CPE , più piccoli del CP, che tendono a ridursi nel tempo sviluppando interfacce più efficienti. Il LIG invece mostra un arco semicircolare estremamente ampio, confermando il contributo dell'elevata R_{ct} . Nella regione delle basse frequenze è possibile osservare il comportamento diffusivo dei materiali.

3.3.2 Linear Sweep Voltammetry

La Linear Sweep Voltammetry ha permesso di ricavare parametri fondamentali per la caratterizzazione delle prestazioni delle MFC, in particolare la **corrente di cortocircuito (ISC)** e la **tensione di circuito aperto (OCV)**, che forniscono indicazioni sullo stato e l'attività del biofilm anodico.

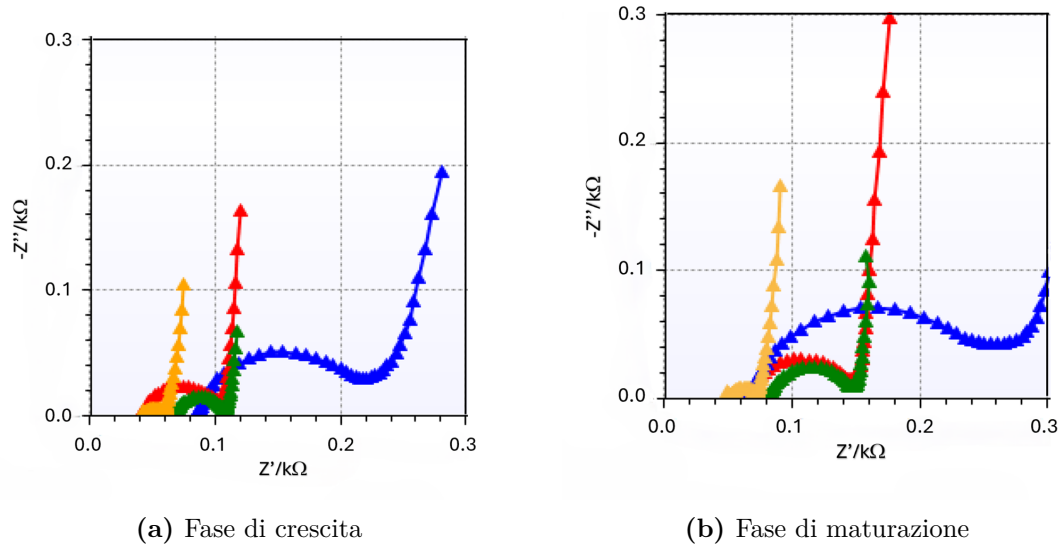


Figura 3.11: Diagrammi di Nyquist durante le diverse fasi di sviluppo del biofilm. In blu il LIG, in rosso il CP, in verde il CP/PEDOT:PSS e in giallo il CP/PEO.

La tensione di circuito aperto rappresenta il potenziale elettrochimico massimo generabile dal sistema in assenza di carico esterno. Durante la maturazione del biofilm, l'OCV aumenta progressivamente, raggiungendo valori massimi quando la comunità microbica è densa e ricca di batteri elettroattivi [81].

La corrente di cortocircuito riflette invece la capacità massima del biofilm di trasferire elettroni all'anodo quando la resistenza esterna è nulla. In diversi studi, la crescita e maturazione del biofilm sono spesso associati ad un aumento di ISC nel tempo [82]. Tuttavia, è importante sottolineare che entrambi i parametri sono influenzati non solo dal biofilm, ma anche dalla composizione dell'elettrolita e soprattutto dal materiale e dall'architettura degli elettrodi stessi.

L'analisi comparativa dei valori misurati ha confermato le tendenze osservate nel monitoraggio temporale della tensione. La maggior parte dei materiali ha mostrato un incremento di ISC e OCV tra le due fasi di analisi, indicando una progressiva formazione del biofilm elettroattivo. In tabella sono riportati i valori di ISC e OCV calcolati durante le due caratterizzazioni elettrochimiche, coincidenti con la fine della fase di colonizzazione (fase inoculo), e la fine del primo periodo di maturazione del biofilm (fase post- inoculo).

Il CP rappresenta un'eccezione significativa, essendo l'unico materiale a mostrare una diminuzione di entrambi i parametri. Questo comportamento potrebbe essere correlato a modificazioni della superficie del materiale durante il lungo periodo sperimentale o variazioni complessive delle performance delle celle. Il carbon paper con nanostrutturazioni polimeriche si conferma essere il materiale con le prestazioni più elevate e il maggior incremento, confermando l'ottimizzazione della superficie

Tabella 3.6: LSV fase inoculo. Sono espressi i parametri ISC e OCV mediati per il numero n di campioni riportati.

Materiale	n	ISC (mA)	OCV (V)
LIG	3	0.036 ± 0.012	0.057 ± 0.021
CP	3	0.086 ± 0.020	0.400 ± 0.061
CP/PEDOT:PSS	2	0.135 ± 0.007	0.279 ± 0.059
CP/PEO	2	0.076 ± 0.001	0.258 ± 0.041

Tabella 3.7: LSV fase post inoculo. Sono espressi i parametri ISC e OCV mediati per il numero n di campioni riportati.

Materiale	n	ISC (mA)	OCV (V)
LIG	3	0.072 ± 0.011	0.226 ± 0.032
CP	3	0.069 ± 0.022	0.308 ± 0.061
CP/PEDOT:PSS	2	0.239 ± 0.022	0.427 ± 0.015
CP/PEO	2	0.195 ± 0.059	0.487 ± 0.103

dell'anodo, sia durante la fase di colonizzazione, che dopo la maturazione del biofilm. Il LIG mantiene incrementi costanti e moderati, confermando la sua affidabilità come substrato alternativo e la capacità di sostenere biofilm elettroattivi funzionali.

L'analisi complessiva del segnale elettrico durante i 120 giorni di monitoraggio ha rilevato pattern temporali compatibili con le fasi di formazione del biofilm. La transizione da un segnale variabile e di bassa intensità (fase di colonizzazione) a uno stabile e di elevata ampiezza (fase di maturazione), fino al raggiungimento di un equilibrio del segnale (fase di stabilizzazione), rispecchierebbe l'evoluzione del biofilm, dall'adesione batterica iniziale alla formazione di una struttura microbica tridimensionale e metabolicamente attiva. L'implementazione di caratterizzazioni elettrochimiche (EIS e LSV), condotte nella fase di colonizzazione e in quella di maturazione, ha permesso di validare ulteriormente le interpretazioni derivanti dal monitoraggio continuo, fornendo conferme sulla progressiva formazione del biofilm. È importante sottolineare che, nonostante questa convergenza tra dati di monitoraggio continuo e analisi elettrochimiche puntuali, queste correlazioni rappresentano ipotesi basate sull'interpretazione del segnale bioelettrochimico, che potrebbero essere ulteriormente confermate da caratterizzazioni microscopiche dirette del biofilm.

Capitolo 4

Conclusioni

Questo lavoro di tesi aveva l'obiettivo di valutare la risposta di biofilm elettroattivi a contatto con diversi materiali carboniosi, al fine di sviluppare una piattaforma flessibile e adattabile per il loro studio. Le celle a combustibile microbiche rappresentano una tecnologia consolidata che si adatta naturalmente alle condizioni di crescita dei microrganismi elettroattivi. Modificando il materiale anodico, è possibile esplorare come diverse proprietà superficiali influenzino l'interazione con il biofilm, lasciando una impronta distintiva sulla risposta bioelettrochimica del sistema. I risultati sperimentali hanno dimostrato che tutti i materiali testati supportano efficacemente la formazione di biofilm elettroattivi, differenziandosi per dinamiche di colonizzazione e prestazioni elettrochimiche. Gli elettrodi nanostrutturati mediante elettrodeposizione hanno accelerato significativamente la fase di insediamento microbico, con il CP/PEDOT:PSS che ha mantenuto prestazioni elevate durante tutto il periodo di osservazione grazie alla sua conducibilità elettrica superiore. Il CP/PEO, nonostante le proprietà isolanti del polimero, ha mostrato un'evoluzione progressiva verso prestazioni competitive, sollevando ipotesi riguardanti le sue proprietà igroscopiche e la modalità di interazione con i microrganismi che richiederebbe ulteriori investigazioni. Il Laser-Induced Graphene ha rappresentato la scoperta più rilevante di questo studio, confermando la sua idoneità come substrato anodico per MFC. Dopo una fase di startup più prolungata, il LIG ha raggiunto prestazioni comparabili o superiori al carbon paper, distinguendosi per tempi di recovery più estesi che suggeriscono un consumo del substrato organico più sostenuto nel tempo. Le caratterizzazioni elettrochimiche hanno confermato i risultati visti nel monitoraggio, individuando differenze sull'interfaccia elettrodo-biofilm. I materiali polimerici hanno mostrato resistenze al trasferimento di carica inferiori e comportamenti più resistivi, indicando interfacce ottimizzate per lo scambio elettronico. Il LIG, invece, ha manifestato resistenze elevate e comportamento più capacitivo, suggerendo che il biofilm forma una barriera uniforme che favorisce l'accumulo di carica ma limita il trasferimento elettronico diretto. L'ottimizzazione dei parametri

operativi rappresenta un ulteriore ambito di sviluppo. I risultati sulla frequenza di alimentazione hanno dimostrato la possibilità di ridurre significativamente i tempi di startup, suggerendo che protocolli di refill ottimizzati potrebbero migliorare ulteriormente le prestazioni. Analogamente, l'esplorazione di diverse composizioni dell'elettrolita, concentrazioni di substrato organico e valori di resistenza esterna potrebbe consentire di massimizzare l'output elettrico in funzione dell'applicazione target.

In conclusione, questo studio ha dimostrato la fattibilità di utilizzare le MFC come piattaforme versatili per lo studio dei biofilm elettroattivi. Il monitoraggio continuo del segnale elettrico ha fornito informazioni dirette sull'evoluzione temporale del biofilm, dalla fase iniziale di colonizzazione fino alla maturazione completa. L'integrazione di caratterizzazioni elettrochimiche (EIS e LSV) in momenti strategici ha consentito di approfondire le diverse dinamiche di comportamento e adattamento microbico, evidenziando come substrati con differenti proprietà fisico-chimiche e morfologiche possano indurre risposte specifiche nei processi di colonizzazione e trasferimento elettronico. I risultati ottenuti evidenziano come la scelta del materiale anodico possa essere strategicamente modulata per ottenere prestazioni mirate per applicazioni biosensoristiche avanzate.

Bibliografia

- [1] H.-C. Flemming and S. Wuertz, “Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 4, pp. 247–260, 2019.
- [2] S. Galie, C. García-Gutiérrez, E. M. Miguélez, C. J. Villar, and F. Lombó, “Biofilms in the food industry: health aspects and control methods,” *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 898, 2018.
- [3] K. Papenfort and B. L. Bassler, “Quorum sensing signal–response systems in gram-negative bacteria,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, no. 9, pp. 576–588, 2016.
- [4] A. Jayaraman, E. Cheng, J. Earthman, and T. Wood, “Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of sae 1018 steel by axenic aerobic biofilms,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 18, no. 6, pp. 396–401, 1997.
- [5] J. Ali, A. Sohail, L. Wang, M. Rizwan Haider, S. Mulk, and G. Pan, “Electro-microbiology as a promising approach towards renewable energy and environmental sustainability,” *Energies*, vol. 11, no. 7, p. 1822, 2018.
- [6] C. Highmore, G. Melaugh, R. Morris, J. Parker, S. Direito, M. Romero, F. Soukarieh, S. Robertson, and N. Bamford, “Translational challenges and opportunities in biofilm science: a brief for the future,” *NPJ biofilms and microbiomes*, vol. 8, no. 1, p. 68, 2022.
- [7] S. Irankhah, A. Abdi Ali, M. Mallavarapu, M. R. Soudi, S. Subashchandrabose, S. Gharavi, and B. Ayati, “Ecological role of acinetobacter calcoaceticus gsn3 in natural biofilm formation and its advantages in bioremediation,” *Biofouling*, vol. 35, no. 4, pp. 377–391, 2019.
- [8] S. Naidoo and A. O. Olaniran, “Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources,” *International journal of environmental research and public health*, vol. 11, no. 1, pp. 249–270, 2014.

- [9] Y.-H. Li and X. Tian, “Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms,” *Sensors*, vol. 12, no. 3, pp. 2519–2538, 2012.
- [10] Z. Ma, T. Zuo, N. Frey, and A. Y. Rangrez, “A systematic framework for understanding the microbiome in human health and disease: from basic principles to clinical translation,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, no. 1, p. 237, 2024.
- [11] L. Ngashangva and S. Chattopadhyay, “Biosensors for point-of-care testing and personalized monitoring of gastrointestinal microbiota,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, p. 1114707, 2023.
- [12] Z. Xu, Y. Liang, S. Lin, D. Chen, B. Li, L. Li, and Y. Deng, “Crystal violet and xtt assays on staphylococcus aureus biofilm quantification,” *Current microbiology*, vol. 73, no. 4, pp. 474–482, 2016.
- [13] C. Reichhardt and M. R. Parsek, “Confocal laser scanning microscopy for analysis of pseudomonas aeruginosa biofilm architecture and matrix localization,” *Frontiers in microbiology*, vol. 10, p. 677, 2019.
- [14] D. R. Lovley, “Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes,” *Environmental microbiology reports*, vol. 3, no. 1, pp. 27–35, 2011.
- [15] D. R. Lovley, “Bug juice: harvesting electricity with microorganisms,” *Nature reviews microbiology*, vol. 4, no. 7, pp. 497–508, 2006.
- [16] J. Zhang, S. Wang, and K. Ono, “Electrochemical impedance spectroscopy,” in *Microscopy and Microanalysis for Lithium-Ion Batteries*, pp. 301–350, CRC Press, 2023.
- [17] G. O’Toole, H. B. Kaplan, and R. Kolter, “Biofilm formation as microbial development,” *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 54, no. 1, pp. 49–79, 2000.
- [18] R. Vasudevan, “Biofilms: microbial cities of scientific significance,” *J Microbiol Exp*, vol. 1, no. 3, p. 00014, 2014.
- [19] C. J. van Oss, “The extended dlvo theory,” in *Interface Science and Technology*, vol. 16, pp. 31–48, Elsevier, 2008.
- [20] O. E. Petrova, J. R. Schurr, M. J. Schurr, and K. Sauer, “Microcolony formation by the opportunistic pathogen p pseudomonas aeruginosa requires pyruvate and pyruvate fermentation,” *Molecular microbiology*, vol. 86, no. 4, pp. 819–835, 2012.

- [21] C. Berne, A. Ducret, G. G. Hardy, and Y. V. Brun, “Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria,” *Microbial biofilms*, pp. 163–199, 2015.
- [22] K. Markowska, K. Szymanek-Majchrzak, H. Pituch, and A. Majewska, “Understanding quorum-sensing and biofilm forming in anaerobic bacterial communities,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 23, p. 12808, 2024.
- [23] M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, and N. Nomura, “Environmental factors that shape biofilm formation,” *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 80, no. 1, pp. 7–12, 2016.
- [24] H.-C. Flemming and J. Wingender, “The biofilm matrix,” *Nature reviews microbiology*, vol. 8, no. 9, pp. 623–633, 2010.
- [25] M. Kostakioti, M. Hadjifrangiskou, and S. J. Hultgren, “Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era,” *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 3, no. 4, p. a010306, 2013.
- [26] J. á. Kaplan, “Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses,” *Journal of dental research*, vol. 89, no. 3, pp. 205–218, 2010.
- [27] F. Song, H. Koo, and D. Ren, “Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation,” *Journal of dental research*, vol. 94, no. 8, pp. 1027–1034, 2015.
- [28] X. Zhang, L. Wang, and E. Levänen, “Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion,” *Rsc Advances*, vol. 3, no. 30, pp. 12003–12020, 2013.
- [29] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, “A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 34, pp. 8533–8554, 2013.
- [30] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, and M. Quirynen, “Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development,” *Clinical oral implants research*, vol. 17, no. S2, pp. 68–81, 2006.
- [31] L. D. Renner and D. B. Weibel, “Physicochemical regulation of biofilm formation,” *MRS bulletin*, vol. 36, no. 5, pp. 347–355, 2011.

- [32] S. Matsumoto, A. Ohtaki, and K. Hori, “Carbon fiber as an excellent support material for wastewater treatment biofilms,” *Environmental science & technology*, vol. 46, no. 18, pp. 10175–10181, 2012.
- [33] G. Spisni, G. Massaglia, C. F. Pirri, S. Bianco, and M. Quaglio, “Nanostructured layer based on intrinsically conductive polymers for optimising carbon electrodes’ surface: Electrospray and ultrasonic spray coating,” *Materials Proceedings*, vol. 14, no. 1, p. 53, 2023.
- [34] G. Massaglia, F. Frascella, A. Chiadò, A. Sacco, S. L. Marasso, M. Cocuzza, C. F. Pirri, and M. Quaglio, “Electrospun nanofibers: From food to energy by engineered electrodes in microbial fuel cells,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 3, p. 523, 2020.
- [35] B. Zhang, J. He, Q. Lei, and D. Li, “Electrohydrodynamic printing of sub-microscale fibrous architectures with improved cell adhesion capacity,” *Virtual and Physical Prototyping*, vol. 15, no. 1, pp. 62–74, 2020.
- [36] Y. Han and J. Dong, “Electrohydrodynamic printing for advanced micro/nanomanufacturing: Current progresses, opportunities, and challenges,” *Journal of Micro-and Nano-Manufacturing*, vol. 6, no. 4, p. 040802, 2018.
- [37] C. Cong, X. Li, W. Xiao, J. Li, M. Jin, S. H. Kim, and P. Zhang, “Electrohydrodynamic printing for demanding devices: A review of processing and applications,” *Nanotechnology Reviews*, vol. 11, no. 1, pp. 3305–3334, 2022.
- [38] D. Li and Y. Xia, “Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?,” *Advanced materials*, vol. 16, no. 14, pp. 1151–1170, 2004.
- [39] J. D. Schiffman and C. L. Schauer, “A review: electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications,” *Polymer reviews*, vol. 48, no. 2, pp. 317–352, 2008.
- [40] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, “Electrospinning and electrospun nanofibers: methods, materials, and applications,” *Chemical reviews*, vol. 119, no. 8, pp. 5298–5415, 2019.
- [41] M. Kumar and S. Sekhon, “Role of plasticizer’s dielectric constant on conductivity modification of peo-nh4f polymer electrolytes,” *European Polymer Journal*, vol. 38, no. 7, pp. 1297–1304, 2002.
- [42] B. K. D. Ngo and M. A. Grunlan, “Protein resistant polymeric biomaterials,” 2017.

- [43] A. Roosjen, J. de Vries, H. C. van der Mei, W. Norde, and H. J. Busscher, “Stability and effectiveness against bacterial adhesion of poly (ethylene oxide) coatings in biological fluids,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 73, no. 2, pp. 347–354, 2005.
- [44] R. Parhi, “Fabrication and characterization of pva-based green materials,” in *Advanced Green Materials*, pp. 133–177, Elsevier, 2021.
- [45] B. C. Shekar, V. Veeravazhuthi, S. Sakthivel, D. Mangalaraj, and S. K. Narayandass, “Growth, structure, dielectric and ac conduction properties of solution grown pva films,” *Thin Solid Films*, vol. 348, no. 1-2, pp. 122–129, 1999.
- [46] Z. Lei, H. Liang, W. Sun, Y. Chen, Z. Huang, and B. Yu, “A biodegradable pva coating constructed on the surface of the implant for preventing bacterial colonization and biofilm formation,” *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol. 19, no. 1, p. 175, 2024.
- [47] Y. Wen and J. Xu, “Scientific importance of water-processable pedot–pss and preparation, challenge and new application in sensors of its film electrode: a review,” *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 55, no. 7, pp. 1121–1150, 2017.
- [48] Abdullah, S. Shakibania, T. Patel, D. Y. Shyntum, and K. Krukiewicz, “Surface-functionalized pedot: Pss interfaces for improved adhesion, viability, and extracellular charge transfer of shewanella oneidensis mr-1,” *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 12, no. 52, pp. 18508–18521, 2024.
- [49] K. Krukiewicz *et al.*, “Development of electrically-conducting biohybrid materials based on electroactive bacteria and conjugated polymers: review and perspectives,” *Electrochimica Acta*, vol. 468, p. 143191, 2023.
- [50] H. Yu, M. Gai, L. Liu, F. Chen, J. Bian, and Y. Huang, “Laser-induced direct graphene patterning: from formation mechanism to flexible applications,” *Soft science*, vol. 3, no. 1, pp. N–A, 2023.
- [51] P. Zaccagnini, Y. Tien, L. Baudino, A. Pedico, S. Bianco, and A. Lamberti, “Optimization of laser-induced graphene electrodes for high voltage and highly stable microsupercapacitors,” *Advanced Materials Technologies*, vol. 8, no. 23, p. 2300833, 2023.

- [52] J. Lin, Z. Peng, Y. Liu, F. Ruiz-Zepeda, R. Ye, E. L. Samuel, M. J. Yacaman, B. I. Yakobson, and J. M. Tour, “Laser-induced porous graphene films from commercial polymers,” *Nature communications*, vol. 5, no. 1, p. 5714, 2014.
- [53] A. Rabti, S. Baachaoui, M. Zouari, and N. Raouafi, “Laser-induced graphene electrodes obtained by direct laser writing for pharmaceutical and biomedical analysis,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Open*, p. 100069, 2025.
- [54] S. P. Singh, Y. Li, A. Be’er, Y. Oren, J. M. Tour, and C. J. Arnusch, “Laser-induced graphene layers and electrodes prevents microbial fouling and exerts antimicrobial action,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 9, no. 21, pp. 18238–18247, 2017.
- [55] R. Funari and A. Q. Shen, “Detection and characterization of bacterial biofilms and biofilm-based sensors,” *ACS sensors*, vol. 7, no. 2, pp. 347–357, 2022.
- [56] J. M. Sonawane, C. I. Ezugwu, and P. C. Ghosh, “Microbial fuel cell-based biological oxygen demand sensors for monitoring wastewater: state-of-the-art and practical applications,” *ACS sensors*, vol. 5, no. 8, pp. 2297–2316, 2020.
- [57] B. E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, and K. Rabaey, “Microbial fuel cells: methodology and technology,” *Environmental science & technology*, vol. 40, no. 17, pp. 5181–5192, 2006.
- [58] D. M. Hodgson, A. Smith, S. Dahale, J. P. Stratford, J. V. Li, A. Grüning, M. E. Bushell, J. R. Marchesi, and C. Avignone Rossa, “Segregation of the anodic microbial communities in a microbial fuel cell cascade,” *Frontiers in microbiology*, vol. 7, p. 699, 2016.
- [59] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, and I. Ieropoulos, “Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. a review,” *Journal of power sources*, vol. 356, pp. 225–244, 2017.
- [60] S. Ameer, H. Ibrahim, M. U. Yaseen, F. Kulsoom, S. Cinti, and M. Sher, “Electrochemical impedance spectroscopy-based sensing of biofilms: A comprehensive review,” *Biosensors*, vol. 13, no. 8, p. 777, 2023.
- [61] N. O. Laschuk, E. B. Easton, and O. V. Zenkina, “Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry,” *RSC advances*, vol. 11, no. 45, pp. 27925–27936, 2021.

- [62] X. Dominguez-Benetton, S. Sevda, K. Vanbroekhoven, and D. Pant, “The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems,” *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 21, pp. 7228–7246, 2012.
- [63] A. K. Manohar, O. Bretschger, K. H. Nealsen, and F. Mansfeld, “The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell,” *Electrochimica acta*, vol. 53, no. 9, pp. 3508–3513, 2008.
- [64] B. E. Logan, *Microbial fuel cells*. John Wiley & Sons, 2008.
- [65] G. Schmalz, “Agar overlay method.,” *International endodontic journal*, vol. 21, no. 2, 1988.
- [66] S. E. McBirney, K. Trinh, A. Wong-Beringer, and A. Armani, “Wavelength-normalized spectroscopic analysis of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa growth rates.,” *Biomedical optics express*, vol. 7 10, pp. 4034–4042, 2016.
- [67] K. Stevenson, A. F. McVey, I. B. Clark, P. S. Swain, and T. Pilizota, “General calibration of microbial growth in microplate readers,” *Scientific reports*, vol. 6, no. 1, p. 38828, 2016.
- [68] R. Rossi and B. E. Logan, “Impact of reactor configuration on pilot-scale microbial fuel cell performance,” *Water Research*, vol. 225, p. 119179, 2022.
- [69] Y. Fan, H. Hu, and H. Liu, “Enhanced coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration,” *Journal of Power Sources*, vol. 171, no. 2, pp. 348–354, 2007.
- [70] G. Massaglia, I. Fiorello, A. Sacco, V. Margaria, C. F. Pirri, and M. Quaglio, “Biohybrid cathode in single chamber microbial fuel cell,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 1, p. 36, 2018.
- [71] J. Lee, N. T. Phung, I. S. Chang, B. H. Kim, and H. C. Sung, “Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16s rdna analyses,” *FEMS microbiology letters*, vol. 223, no. 2, pp. 185–191, 2003.
- [72] H. Liu and B. Logan, “Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane.,” *Environmental science technology*, vol. 38 14, pp. 4040–6, 2004.
- [73] A. Salvian, D. Farkas, M. Ramirez-Moreno, C. A. Rossa, J. Varcoe, and S. Gadkari, “Impact of air-cathodes on operational stability of single-chamber microbial fuel cell biosensors for wastewater monitoring,” *Energies*, 2024.

- [74] T. Liu, Y.-y. Yu, D. Li, H. Song, X. Yan, and W. N. Chen, “The effect of external resistance on biofilm formation and internal resistance in shewanella inoculated microbial fuel cells,” *Rsc Advances*, vol. 6, no. 24, pp. 20317–20323, 2016.
- [75] C. Begot, I. Desnier, J. D. Daudin, J. C. Labadie, and A. Lebert, “Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 25, no. 3, pp. 225–232, 1996.
- [76] D. Ridolfi, A. P. Lemes, S. de Oliveira, G. Z. Justo, M. V. Palladino, and N. Durán, “Electrospun poly(ethylene oxide)/chitosan nanofibers with cellulose nanocrystals as support for cell culture of 3t3 fibroblasts,” *Cellulose*, vol. 24, pp. 3353–3365, 2017.
- [77] Q. Yang, J. Guo, S. Zhang, F. Guan, Y. Yu, S. Feng, Q. Yao, and D. Bao, “Improved biomedical bioactivity of polyvinyl alcohol/polyethylene oxide composite system-based nanofiber membranes via incorporating antarctic krill protein,” *European Polymer Journal*, 2023.
- [78] Y. Mao, W. Shen, S. Wu, X. Ge, F. Ao, Y. Ning, Y. Luo, and Z. Liu, “Electrospun polymers: Using devices to enhance their potential for biomedical applications,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. 186, p. 105568, 2023.
- [79] J.-C. Park, T. Ito, K.-O. Kim, K.-W. Kim, B.-S. Kim, M.-S. Khil, H.-Y. Kim, and I.-S. Kim, “Electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibers: effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability,” *Polymer journal*, vol. 42, no. 3, pp. 273–276, 2010.
- [80] X. Bai, Z.-f. Ye, Y.-f. Li, L.-c. Zhou, and L.-q. Yang, “Preparation of crosslinked macroporous pva foam carrier for immobilization of microorganisms,” *Process Biochemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 60–66, 2010.
- [81] S. Gadkari, M. Shemfe, and J. Sadhukhan, “Microbial fuel cells: a fast converging dynamic model for assessing system performance based on bioanode kinetics,” *International Journal of hydrogen energy*, vol. 44, no. 29, pp. 15377–15386, 2019.
- [82] C. Yuvraj and V. Aranganathan, “Mfc—an approach in enhancing electricity generation using electroactive biofilm of dissimilatory iron-reducing (dir) bacteria,” *Arabian Journal for Science and Engineering*, vol. 42, no. 6, pp. 2341–2347, 2017.