

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Analisi delle prestazioni di MFC impiegate come sensori per il monitoraggio di BTEX



Relatori

Prof. Pirri Candido

Prof. Bianco Stefano

Dott.ssa Quaglio Marzia

Prof. Bestetti Massimiliano

Candidato

Giulio Matarazzo



POLITECNICO DI MILANO | POLITECNICO DI TORINO

in collaborazione con



**ISTITUTO
ITALIANO DI
TECNOLOGIA**

Indice

1. Introduzione	1
1.1 <i>La tecnologia</i>	1
1.2 <i>MFC-based sensors</i>	1
1.3 <i>Il contesto ambientale</i>	3
1.4 <i>I BTEX</i>	4
1.5 <i>Lo scopo della tesi</i>	7
2. Microbial Fuel Cell	9
2.1 <i>Il principio di funzionamento</i>	9
2.2 <i>L'architettura di una MFC</i>	10
2.2.1 <i>I microrganismi</i>	10
2.2.2 <i>L'anodo</i>	12
2.2.3 <i>Il Catodo</i>	14
2.2.4 <i>MFC a singolo comparto VS doppio comparto</i>	15
2.3 <i>MFC come sistema sensore</i>	16
2.3.1 <i>Considerazioni generali sul sistema sensore</i>	16
2.3.2 <i>La cinetica batterica</i>	19
2.4 <i>Le prestazioni di una MFC</i>	22
2.4.1 <i>La potenza elettrica</i>	22
2.4.2 <i>L'efficienza coulombica ed energetica</i>	25
2.4.3 <i>La sensibilità</i>	27
2.4.4 <i>Tasso di inibizione</i>	27
2.4.5 <i>Tempo di risposta</i>	27
2.4.6 <i>Concentrazione massima tollerabile</i>	28
2.4.7 <i>Il range dinamico</i>	28
2.4.8 <i>La robustezza</i>	29
3. Procedure e protocolli sperimentali	31
3.1 <i>Configurazione e impostazione delle MFC</i>	31
3.1.1 <i>La preparazione del catodo</i>	32
3.1.2 <i>La preparazione dell'anodo</i>	33
3.2 <i>L'avviamento delle celle</i>	35
3.3 <i>La raccolta dei dati</i>	38
3.3.1 <i>Rendimento energetico</i>	38
3.3.2 <i>La curva di polarizzazione</i>	41

3.3.4 Protocollo di esposizione al toluene e metodi di analisi dei dati.....	44
4. Analisi dei dati.....	47
4.1 <i>L'andamento della tensione e della corrente nel tempo.....</i>	<i>47</i>
4.2 <i>La Linear Sweep Voltammetry.....</i>	<i>49</i>
4.3 <i>L'andamento della corrente nei sistemi esposti al toluene.....</i>	<i>50</i>
4.4 <i>Il tempo di risposta</i>	<i>53</i>
4.5 <i>L'efficienza di conversione e l'efficienza coulombica</i>	<i>55</i>
5. Conclusioni e sviluppi futuri.....	61
6. Appendice	63
6.1 <i>Simbologia utilizzata.....</i>	<i>63</i>
6.2 <i>Grafici aggiuntivi.....</i>	<i>66</i>
7. Bibliografia e sitografia.....	69
8. Ringraziamenti.....	75

1. Introduzione

1.1 La tecnologia

Le Microbial Fuel Cells (MFC) sono celle a combustibile microbiche, in grado di generare energia elettrica grazie all'attività di particolari classi di batteri denominati *exoelettrogeni*, che lavorano come "bio-catalizzatori" ai loro anodi. I batteri *exoelettrogeni* in condizioni anaerobiche sono infatti in grado di catabolizzare, ossidandole, molecole contenenti carbonio trasformandole in prodotti più semplici, protoni e liberando elettroni all'esterno della loro membrana, all'anodo, chiudendo così la loro respirazione. Al catodo avviene una reazione di riduzione che coinvolge i protoni, che fluiscono attraverso la soluzione, e gli elettroni, che dall'anodo raggiungono il catodo attraverso un circuito elettrico esterno. [1]

Le MFC sono nate come metodo di *energy harvesting* da acque reflue e terreni grazie alla loro abilità di sfruttare particolari batteri anaerobi (e anaerobi facoltativi) per convertire direttamente l'energia elettrica presente nella materia organica in energia elettrica durante la loro attività metabolica. La versatilità dei sistemi MFC ha consentito di immaginare nel corso dell'ultimo decennio diversi possibili contesti di impiego [2]. Il principale campo di applicazione individuato per le MFC riguarda l'utilizzo di questi sistemi nel trattamento delle acque, accoppiando la riduzione del BOD (domanda di ossigeno biochimico) presente nell'acqua da trattare alla simultanea produzione di energia elettrica. Purtroppo ad oggi tale tecnologia non è ancora competitiva sul mercato del trattamento acque, in quanto i costi sono ancora alti e la produzione è limitata a pochi Watt per metro cubo trattato [3][4]. Un altro campo di applicazione possibile riguarda lo sfruttamento del potenziale generato naturalmente nella cella come forza motrice per la desalinizzazione dell'acqua di mare [1]. Infine, è stata dimostrata con successo la possibilità di usare le MFC come sistemi di *bio-remediation* anche in casi di elevata tossicità delle sostanze rilasciate, come per gli sversamenti accidentali di petrolio [5]. Infatti alcuni batteri compatibili con il sistema MFC sono in grado di metabolizzare gli idrocarburi convertendoli parzialmente in energia elettrica.

Il quadro che si ricava dall'analisi della letteratura scientifica è incoraggiante, in quanto questa tecnologia potrebbe costituire una valida alternativa alle soluzioni attualmente presenti sul mercato che coinvolgono direttamente o indirettamente l'ausilio di fonti fossili nell'espletare la propria funzione nella filiera energetica.

Oltre che come tecnologia per la produzione di energia elettrica, un'altra interessante area di applicazione di questo sistema è quella denominata *MFC-based sensors*. che si basa sul fatto che se il sistema MFC viene sottoposto a disturbi esterni, a parità delle altre condizioni ambientali, il metabolismo dei batteri può essere modificato rispetto alle normali condizioni, generando una differenza nel segnale elettrico in uscita dalla cella che può essere correlata all'intensità del disturbo ricevuto.

1.2 MFC-based sensors

Come precedentemente anticipato, le MFC possono essere utilizzate come biosensore per il monitoraggio di analiti.

Un sensore che sfrutta la tecnologia MFC si basa sul fatto che la corrente generata dalla cella è correlata all'attività metabolica della popolazione batterica anaerobica che viene fatta crescere all'anodo, dove i batteri catalizzano la parziale ossidazione dei substrati organici.

Un'alterazione dei percorsi metabolici può quindi produrre una variazione nel segnale elettrico generato dal sensore. Questo può essere correlato, a parità di pH, temperatura e conducibilità della soluzione elettrolitica, all'intensità del disturbo applicato. [1]

I sensori MFC sono divisibili in due grandi categorie, 1) per la rilevazione di sostanze che agiscono come substrati per le specie batteriche, 2) per la misura della concentrazione di una sostanza tossica per i batteri. Per favorire la comprensione di come questi sistemi lavorano viene prima mostrato il funzionamento di un sensore MFC appartenente alla prima categoria.

Quando una MFC riceve in input un flusso di materia contenente un substrato, i batteri adesi sull'anodo inizieranno a degradare il substrato producendo un certo numero di elettroni in base al tipo di sostanza metabolizzata (il meccanismo verrà discusso in maggiore dettaglio nel paragrafo 2.1 *Il principio di funzionamento*).

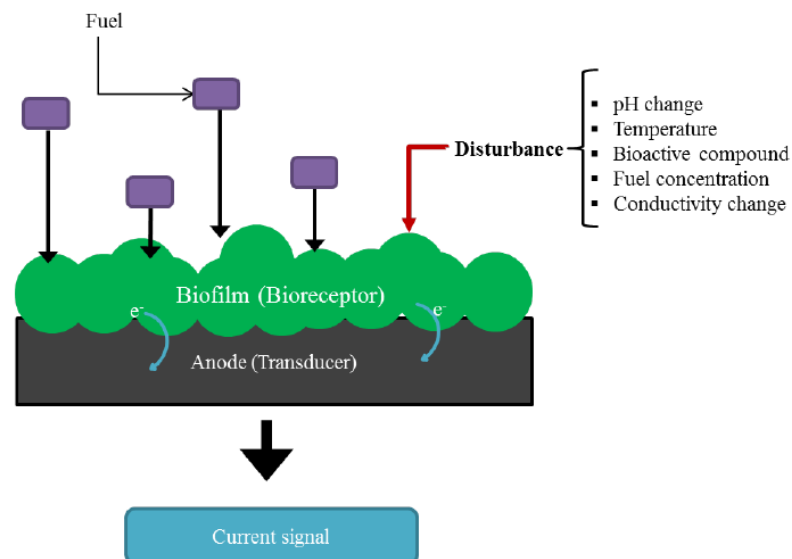


Figura 1.1: Schema di funzionamento di una MFC che correla l'intensità del segnale elettrico generato dall'anodo alla concentrazione di substrato [6]

Il vantaggio di un sensore MFC rispetto ai biosensori amperometrici ai quali per l'ossidazione di un analita è richiesta l'applicazione di un potenziale esterno, risiede nel fatto che -nelle MFC- la tensione di cella viene generata dalla coppia ossidoriduttiva costituita dall'ossidazione del combustibile (l'analita) all'anodo, e la riduzione dell'ossidante al catodo. Inoltre, a differenza di un biosensore tradizionale l'anodo di una MFC funge direttamente da trasduttore, convertendo l'energia elettrica prodotta direttamente in un segnale misurabile e correlabile alla concentrazione di analita.

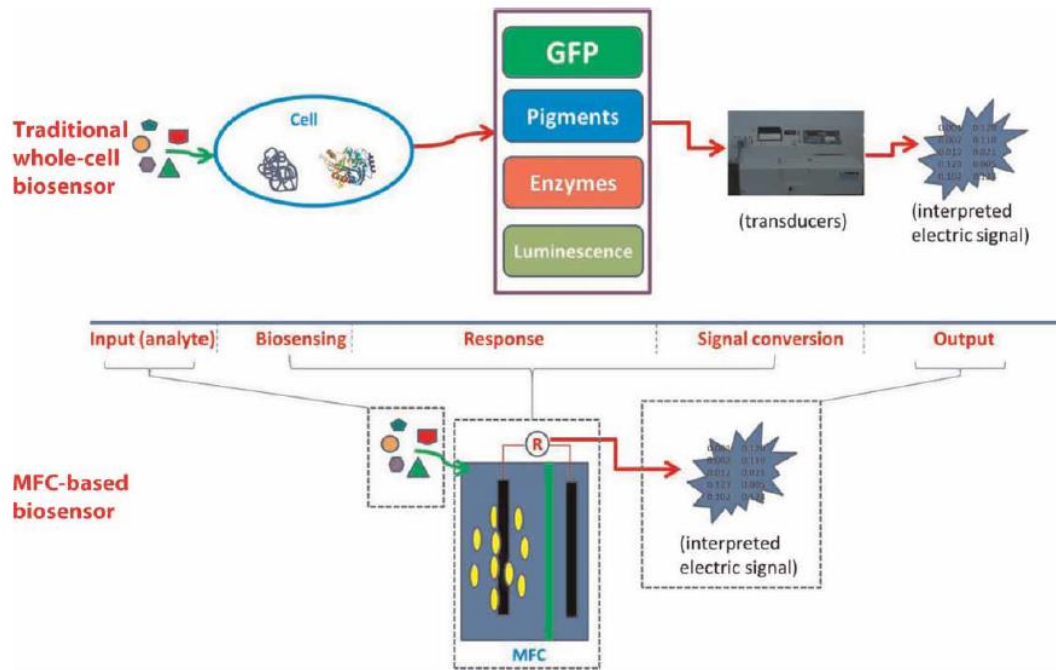


Figura 1.2: Comparazione nel funzionamento di un biosensore tradizionale (schema superiore) e un sensore MFC (schema inferiore). Un biosensore tradizionale tipicamente utilizza proteine a fluorescenza verde (GFP), o pigmenti, o l'attività enzimatica o luminescenza come indicatori [7]

Un sensore MFC che invece correla la variazione (in valore assoluto) dell'intensità di corrente alla concentrazione di analita, nel caso di analita composto da una sostanza tossica per i batteri, viene spesso utilizzato per la rilevazione di metalli pesanti o sostanze organiche inquinanti. Questo tipo di sensore potrebbe essere utilizzato come primo stadio di monitoraggio online della presenza di inquinanti nelle acque superficiali, in quanto il BOD naturalmente presente in tali ambienti rimane abbastanza costante nel tempo, e quindi la variazione negativa di corrente potrebbe essere correlata alla presenza di un *toxicant*. Per esempio, il sistema sensore MFC potrebbe venire installato in piattaforme *offshore* per l'estrazione di petrolio in modo da fungere da rilevatore di eventuali fuoriuscite di idrocarburi.

1.3 Il contesto ambientale

Nell'ottica di affrontare gli effetti dovuti dai cambiamenti climatici e di ridurre l'inquinamento ambientale, diversi sono stati gli accordi internazionali, in cui molti paesi hanno sottoscritto la loro intenzione di voler essere parte attiva del risanamento ambientale. Si portano come esempio il Protocollo di Kyoto, un accordo internazionale che si è fissato come scopo quello di ridurre le emissioni degli stati partecipanti, e l'Accordo di Parigi che ha l'obiettivo di limitare l'aumento della temperatura media terrestre a 1,5°C dal 2015 al 2021 [8].

La Commissione Europea ha avviato un imponente programma di finanziamento con la missione di sostenere e promuovere la ricerca (Horizon2020). In particolare, sono stati messi a bilancio oltre 2,6 miliardi di euro per il finanziamento della ricerca nel campo delle Tecnologie Future ed Emergenti [9]. Sotto questo appellativo si trovano le tecnologie di produzione di energia da fonti rinnovabili, tecnologie di *carbon capture* direttamente

dall'atmosfera o da fumi ricchi in CO₂, tecnologie atte all'incremento della compatibilità ambientale del settore *automotive*, come la ricerca nel campo delle batterie di nuova generazione o la riduzione delle concentrazioni di inquinanti emesse dal tubo di scarico, tecnologie per il *balance load* in ottica *smart grid* per regolare la produzione elettrica da fonti rinnovabili aleatorie, e molte altre.

Tra le tecnologie oggetto di finanziamento dal bando Horizon2020, ci sono le così dette “*Blue Energy*”, ovvero le tecnologie che estraggono energia elettrica direttamente dal mare [10]. Tra queste tecnologie vi è la possibilità di utilizzare le *Microbial Fuel Cells*, oggetto di studio della presente tesi. Infatti la tecnologia MFC si basa sullo sfruttamento di un particolare tipo di popolazione batterica, capace di estrarre elettroni dal loro metabolismo fermentativo. Pertanto questo sistema potrebbe essere utilizzato per convertire la sostanza organica (BOD) naturalmente presente nei mari e negli oceani in energia elettrica. E questa tecnologia potrebbe essere protagonista delle operazioni di combattimento dell'inquinamento dell'ambiente. Infatti con le *MFC based sensors* è possibile sfruttare l'effetto di variazione dell'energia elettrica prodotta quando questi sistemi sono posti in un certo ambiente in occasione di un danno ambientale.

Le *MFC based sensors* possono quindi fungere da primo livello di analisi economica, continua e *stand-alone* grazie alla loro abilità di generare energia elettrica dalla degradazione del BOD presente naturalmente nelle acque naturali. In questi sistemi, quindi, l'apporto energetico da fornire esternamente riguarderebbe solamente il costo del monitoraggio. Le *MFC based sensors* in definitiva sono sistemi che vengono lasciati nell'ambiente di misura, e, data la loro relativa bassa precisione nella misura, possono essere utilizzati come primo livello di analisi per individuare fuoriuscite di sostanze tossiche nell'ambiente.

1.4 I BTEX

Nel campo della sensoristica, un tipo di molecole il cui monitoraggio è importante per la salute dell'uomo e dell'ambiente, è costituito dagli idrocarburi aromatici. Tra questi vi sono i cosiddetti BTEX, acronimo che indica benzene, toluene, etilbenzene e xilene. Molecole di grande importanza in quanto ricoprono il ruolo di solventi industriali, oltre che reagenti per alcune reazioni petrolchimiche.

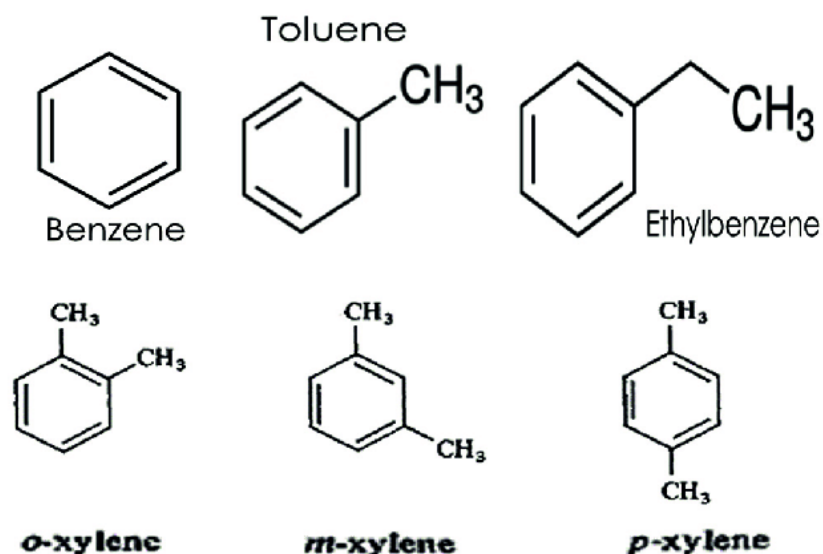


Figura 1.3: Formule di struttura dei BTEX [11]

I BTEX, al contrario di come si possa pensare, non sono ritrovabili solamente nelle fonti classiche di idrocarburi, ovvero negli impianti che trattano il petrolio, dall'estrazione, alla raffinazione fino ad arrivare alla petrolchimica; bensì sono stati trovati dei BTEX come inquinanti delle acque superficiali e potabili. Per questo motivo l'agenzia statunitense EPA (*Environmental Protection Agency*) ha classificato questi composti come inquinanti con alta priorità nella rilevazione [11]. Il motivo deriva dal fatto che questi composti risultano essere tossici ed infiammabili, il benzene inoltre risulta essere anche carcinogeno [12-17]. Come aggravante questi composti sono volatili, e quindi facilmente assimilabili per inalazione, e poco solubili in acqua, impedendone la formazione di una miscela che ne abbassi la tensione di vapore, e quindi la concentrazione in aria.

Le maggiori cause di contaminazione da BTEX derivano dalle perdite dei serbatoi sotterranei di benzina, da fuoriuscite da discarica o da perdite di processo durante la raffinazione o la trasformazione di petrolio [18].

Il problema più grave derivante dalla dispersione in ambiente di BTEX è quello di contaminare le falde acquifere e le acque superficiali. Ciò comporta un vero pericolo sia per gli animali sia per gli uomini, in quanto i batteri deputati alla degradazione del COD presenti sia nell'ambiente sia nelle vasche di ossidazione biologica degli impianti di trattamento di acque reflue non sono in grado di degradare queste molecole in un tempo relativamente breve. Infatti talvolta sono state misurate delle concentrazioni fino a 1000 mg/L di BTEX nelle acque superficiali [19]. Mentre le concentrazioni limite di queste sostanze in acqua potabile sono secondo la WHO (*World Health Organization*):

Composto	Soglia limite [$\mu\text{g/L}$] WHO DWG (1)	Soglia limite [$\mu\text{g/L}$] US NPDWS (2)	Soglia limite [$\mu\text{g/L}$] ADWG (3)
Benzene	10	5	1
Toluene	700	1000	800
Etilbenzene	300	700	300
Xileni	500	10000 (xileni totali)	600

Tabella 1.1: Soglie di concentrazione dei BTEX in acque potabili, secondo (1) la *World Health Organization Drinking Water Guidelines*; (2) la *United States National Primary Drinking Water Standards* (3) la *Australian Drinking Water Guidelines* [20]

I metodi più utilizzati di rilevamento dei BTEX sono i classici metodi chimico-fisici: la Gascromatografia accoppiata alla spettroscopia di massa, e la HPLC, spettroscopia di massa a trappola ionica e altri metodi. Un problema comune a tutti questi metodi è che, sebbene possano raggiungere alta precisione, sono tecniche costose, possiedono un tempo di analisi lungo (per via del trasporto dell'analita, il desorbimento, la pre-concentrazione e trasferimento dei dati) e le apparecchiature connesse sono ingombranti e pesanti [21]. Oltre a questi sistemi sono stati sviluppati bio-sensori per la rilevazione di BTEX, e in particolare toluene, utilizzando batteri o enzimi in grado di degradare il toluene e convertire parte dell'energia chimica in energia luminosa. Tra questi vengono individuati dei sistemi particolarmente performanti utilizzando l'enzima luciferasi, il cui gene codificante, insieme ai geni che producono proteine responsabili del degradamento dei BTEX (come per esempio la proteina TbuT e il promotore P_{tbuA1} per il toluene e la proteina XylR e il promotore P_U per lo xilene), viene aggiunto a popolazioni di *E. coli* o *Pseudomonas putida F1*. Quest'ultimo tipo di sensore genera una radiazione la cui intensità può essere misurata e correlata alla concentrazione di substrato degradato [22].

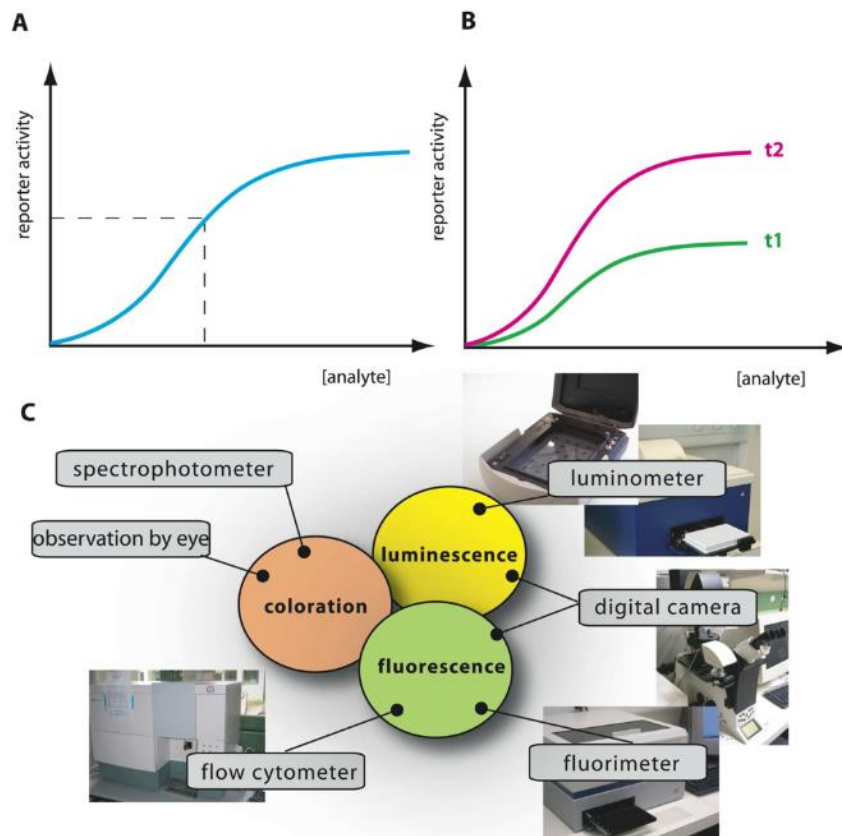


Figura 1.8: A) Curva di taratura qualitativa del segnale rispetto alla concentrazione di analita B) Segnali qualitativi al variare del tempo di incubazione dei microrganismi ($t_1 < t_2$) C) Possibili metodi di rilevazione del segnale generato da un biosensore microbiologico. [22]

Questo genere di sensore si è dimostrato efficace nella rilevazione dei BTEX anche a bassa concentrazione come mostrato, a titolo esemplificativo, nel grafico riportato in Figura 1.9.

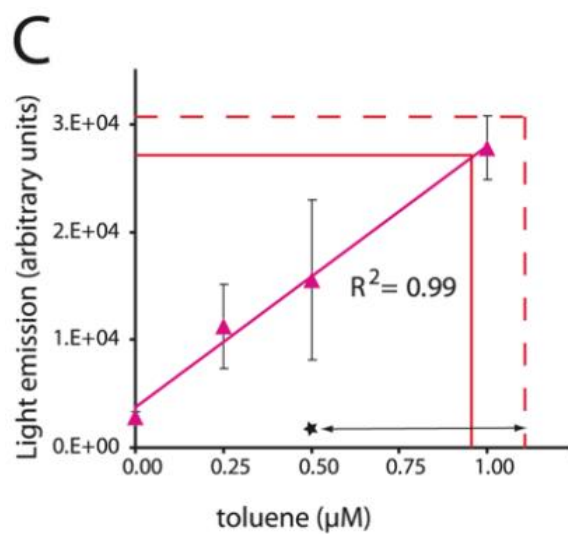


Figura 1.9: Curva di taratura di un biosensore microbiologico per la rilevazione di toluene contenente *E. coli*. [22]

Il problema più grande derivante dall'utilizzo di questo genere di sensore è che i microrganismi degradano preferibilmente substrati più semplici rispetto ai BTEX se posti in presenza di essi. Pertanto risulta non essere un sistema affidabile per la rilevazione di BTEX in ambienti acquosi in cui è presente del COD, come per esempio nelle acque superficiali o a valle degli impianti di trattamento di acque reflue. Inoltre, questo tipo di sensore non è perfettamente integrabile con l'ambiente poiché i sensori soffrirebbero di contaminazione dovuta ai microrganismi presenti nell'ambiente. Questi problemi sono risolvibili utilizzando un sistema MFC con batteri naturali, perfettamente integrabile con l'ambiente di misura.

1.5 Lo scopo della tesi

La presente tesi ha l'obiettivo di verificare la fattibilità tecnica della realizzazione di un sensore MFC utilizzato per la rilevazione di BTEX, ovvero idrocarburi aromatici tossici per l'uomo, gli animali e per i microrganismi, e di valutarne le prestazioni con un determinato tipo di configurazione reattoristica. In questo caso, ci si attende che il sistema sensore registri un decremento nel segnale elettrico quando i batteri sono in presenza di inquinante.

Lo studio delle MFC nel campo della sensoristica per la rilevazione di *toxicant* è un campo di relativamente recente indagine. In particolare le tossine analizzate nella ricerca scientifica ad oggi sono stati metalli pesanti e alcune sostanze organiche tra cui acetaldeide, diazinone, bifenili policlorurati, acefato, glifosato, p-nitrofenolo, levofloxacina [23]. Non sono stati trovati studi in letteratura che analizzassero la possibilità di rilevare BTEX, e toluene in particolare, tramite una *MFC-based sensors*. Il toluene viene scelto poiché risulta essere un composto intermedio tra benzene e gli altri BTEX. Inoltre presenta il vantaggio di non essere cancerogeno, e questo ne facilita la manipolazione in laboratorio.

Sistemi MFC per il monitoraggio online e a basso costo di BTEX potrebbero essere utilizzati come primo step di rilevazione di inquinanti, per esempio, nei settori industriali che coinvolgono l'utilizzo, la trasformazione o l'estrazione di petrolio.

La struttura della tesi è la seguente:

- nel capitolo 2 vengono spiegati i principi teorici che stanno alla base del funzionamento delle MFC, e i parametri che sono stati indagati sperimentalmente,
- nel capitolo 3 vengono presentate invece le procedure e i protocolli utilizzati in laboratorio,
- nel capitolo 4 vengono presentati i risultati ottenuti,
- infine il capitolo 5 riporta le considerazioni conclusive del lavoro sperimentale svolto.

2. Microbial Fuel Cell

2.1 Il principio di funzionamento

Le *Microbial Fuel Cells* sono delle pile a combustibile che utilizzano il metabolismo di microorganismi per ricavare energia elettrica da substrati. Lo schema generale di una MFC è rappresentato nella Figura 2.1.

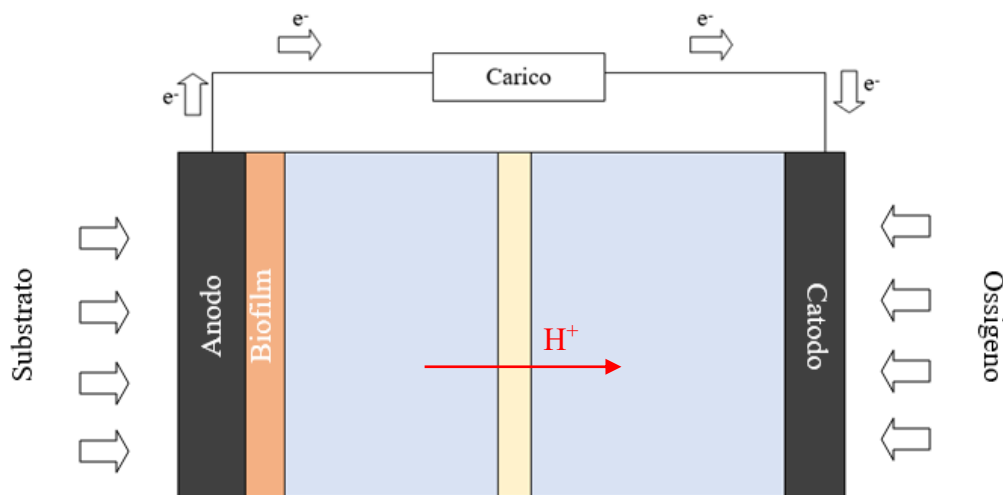


Figura 2.1: Schema di una *Microbial Fuel Cell*

In una MFC il biofilm adesivo all'anodo produce elettroni grazie all'ossidazione di un substrato carbonioso. Attraverso un circuito esterno essi vengono trasferiti al catodo dove avviene la reazione di riduzione, che nell'esempio illustrato e negli esperimenti condotti nel corso di questo studio, è la reazione di riduzione dell'ossigeno (ORR). Il biofilm deve contenere batteri detti "exoelettrogeni" (di tali batteri viene discusso in maniera più approfondita nella sezione 2.2.1 I microrganismi) i quali sono in grado di trasferire gli elettroni derivanti dai processi catabolici di degradazione del substrato ad un Accettore Terminale di Elettroni (TEA) in modo exogeno (ovvero all'esterno della propria membrana) [1].

Quando l'anodo viene collegato elettricamente al catodo, e quindi viene chiusa elettricamente la cella, gli elettroni dall'anodo viaggiano verso il catodo, e le specie ossidate a livello anodico raggiungono il catodo dove avviene la reazione di riduzione. Tipicamente le specie ossidate che viaggiano verso il catodo sono protoni. L'accettore di elettroni può essere costituito dall'ossigeno presente nell'aria, come nel caso delle MFC discusse in questa tesi e rappresentata in figura 2.1, oppure da altre sostanze chimiche ad uno stato di ossidazione elevato [1]. Anche da questa breve descrizione si possono immaginare diverse applicazioni della tecnologia, prima tra tutte la generazione di potenza elettrica da fonti rinnovabili (quali, gli scarti che formano la carica organica nelle acque reflue), poiché i batteri sono in grado di metabolizzare sostanze presenti nell'ambiente difficilmente sfruttabili dall'uomo. Un esempio può essere costituito dall'abbattimento del BOD derivante da acque reflue [24] o presente in acqua marina [25] o da acque di scarto in generale [24].

L'applicazione che si è deciso di analizzare in questa tesi è quella di utilizzare la MFC come sensore di sostanze tossiche, in particolare toluene. Tale applicazione potrebbe trovare

impiego, per esempio, come sensore online, a basso costo di monitoraggio di BTEX nella filiera produttiva del petrolio: dal rilevamento di rilascio di petrolio nell'estrazione *offshore*, all'eventuale sversamento di petrolio in acque superficiali dovuta alla cattiva gestione di impianti di trattamento acque degli impianti petrolchimici.

2.2 L'architettura di una MFC

In questa sezione vengono prese in considerazione e descritte le varie parti che compongono una MFC.

2.2.1 I microrganismi

Come anticipato, i batteri utili alla MFC per generare un potenziale elettrico sono i cosiddetti “*exoelettrogeni*”, batteri anaerobici in grado di rilasciare elettroni al di fuori della propria membrana cellulare. I meccanismi finora identificati con i quali tali batteri sono in grado di fare ciò sono 3: **trasferimento diretto** di elettroni, **trasferimento via *electron shuttling***, trasferimento tramite *nanowires* [1]. Essi sono rappresentati nella Figura 2.2.

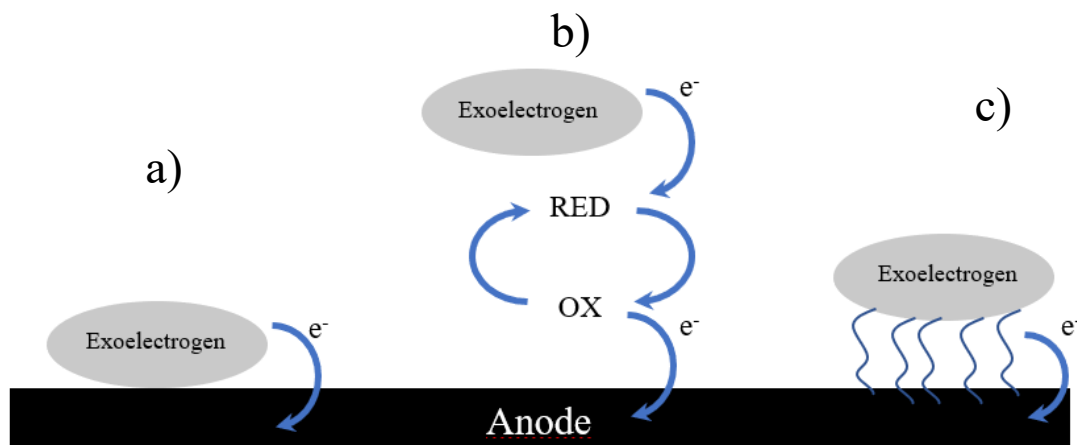


Figura 2.2: meccanismo di trasferimento di elettroni dei batteri *exoelettrogeni* in una MFC. a) trasferimento diretto di elettroni; b) trasferimento via *electron shuttling*; c) trasferimento tramite *nanowires*

Il meccanismo di trasferimento diretto di elettroni si ha quando c'è contatto fisico tra elettrodo e batterio (Figura 2.2.a), tipicamente tramite delle piccole protuberanze emesse dalla cellula [1]. Gli elettroni vengono prodotti dalla respirazione cellulare all'interno del batterio e vengono poi trasferiti all'esterno tramite l'emoproteina “citocromo” di tipo C [27]. Il citocromo di tipo C può trasferire gli elettroni direttamente all'elettrodo oppure trasferirli ad una sostanza intermedia che viene ridotta dagli elettroni stessi [28]. Il meccanismo di *electron shuttling* (Figura 2.2.b) si basa sullo sfruttamento di mediatori chimici come mezzo di trasporto di elettroni. Tali molecole possono ridursi in presenza di un ambiente riducente e ossidarsi per cedere elettroni. Inizialmente tali mediatori sono stati aggiunti alle MFC [29] per facilitare il trasferimento di elettroni da parte dei batteri exoelettrogeni. Le sostanze testate come “*electron shuttles*” sono state: antrachinone-2,6-disolfonico, tionina, ferrocianuro di potassio [30] e altre. Tuttavia, è stato dimostrato da uno studio che non è necessario aggiungere tali sostanze poiché gli *exoelettrogeni* sono in grado di produrle autonomamente [31]: come per esempio la piocianina che può fungere da *electron shuttle*, viene prodotta dalla specie *Pseudomonas aeruginosa* [31]. Non è tuttavia chiaro se il motivo per cui i batteri

producono tali mediatori sia puramente unicamente legato al trasferimento elettronico [1]. Ma, essendo la piocianina una sostanza avente anche azione antibiotica, i mediatori potrebbero essere prodotti dalle cellule per limitare la competizione di altre specie microbiologiche [32].

Infine, per quanto riguarda il terzo meccanismo di trasferimento elettronico (Figura 2.2.c), è riportato in letteratura che alcune specie batteriche, come le specie appartenenti ai generi *Geobacter* o *Shewanella*, sono in grado di generare delle appendici conduttive, chiamate “*nanowires* batterici” [33]. Queste appendici possono anche fungere da meccanismo di trasferimento di elettroni tra specie microbiologiche diverse, come per esempio i batteri fermentativi, i quali necessitano di rilasciare elettroni per rigenerare NADH, possono direttamente trasferire gli elettroni ai batteri metanogeni utilizzando un *nanowires* batterico. I batteri fermentativi che non generano tali appendici, producono invece idrogeno gassoso o altre specie ridotte come metodo per rilasciare elettroni all'esterno della membrana [34].

Il trasporto degli elettroni generati all'interno e all'esterno del microorganismo passa attraverso reazioni metaboliche enzimatiche che coinvolgono degli accettori/donatori di elettroni insolubili. I microrganismi ossidano il substrato organico per produrre equivalenti riducenti (protoni) e elettroni in forma di trasportatori redox chiamati coenzimi riduttivi: Nicotinammide Adenina Dinucleotide (NAD⁺), Flavin Adenin Dinucleotide (FAD), Flavinmononucleotide (FMN) ecc.

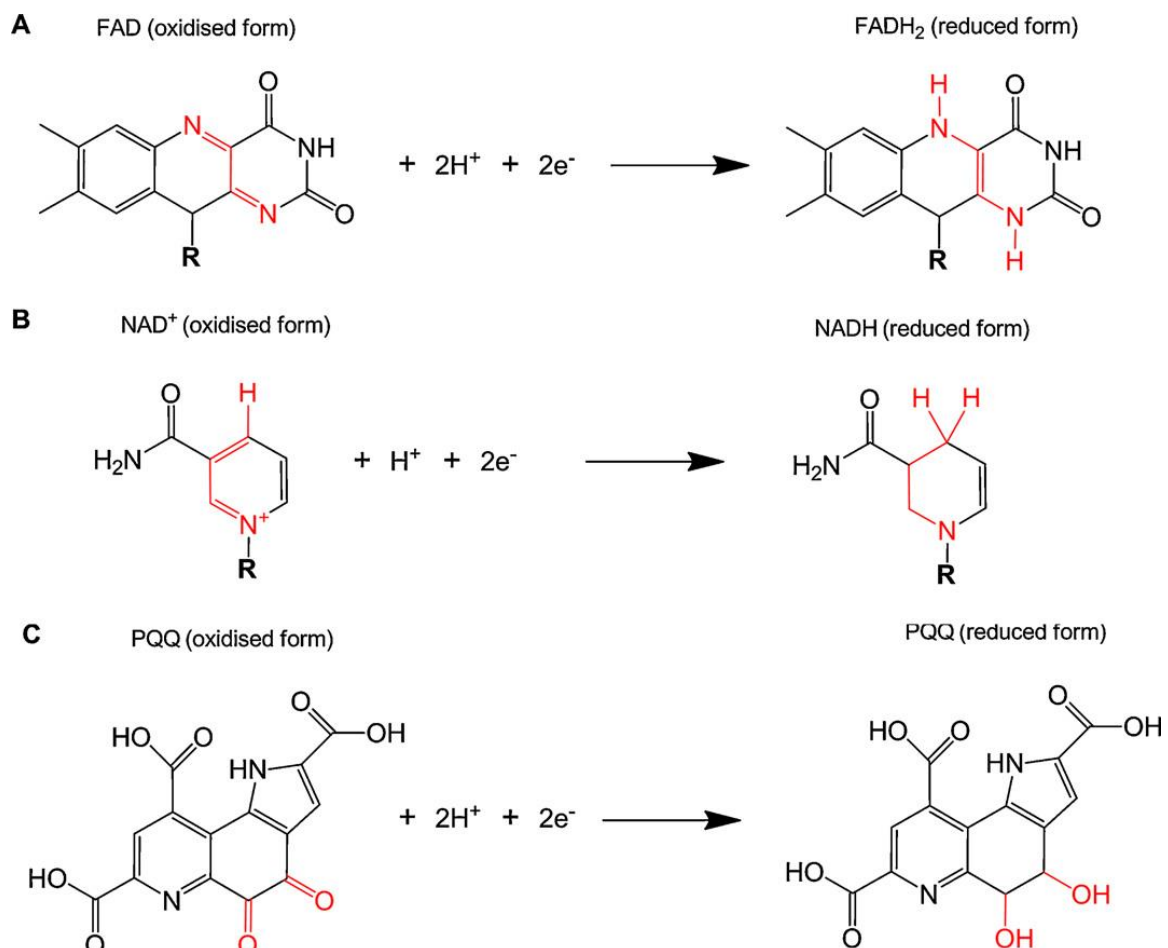


Figura 2.3: Reazioni di ossidoriduzione dei principali cofattori enzimatici [35]

Lo scopo di questi trasportatori redox è quella di permettere alla catena respiratoria di accumulare energia sotto forma di energia potenziale immagazzinata dal legame instaurato tra gruppi fosfato della molecola Adenosin Tri-Fosfato (ATP).

In un sistema fermentativo, quindi anaerobico, gli equivalenti riducenti seguono una serie di reazioni di ossidoriduzioni fino ad arrivare ad un accettore terminale di elettroni (TEA) disponibile. Ciò consente di creare un gradiente di protoni che, quindi, immagazzina energia potenziale, la quale può essere liberata per generare il legame di fosforilazione per formare la molecola di ATP [36].

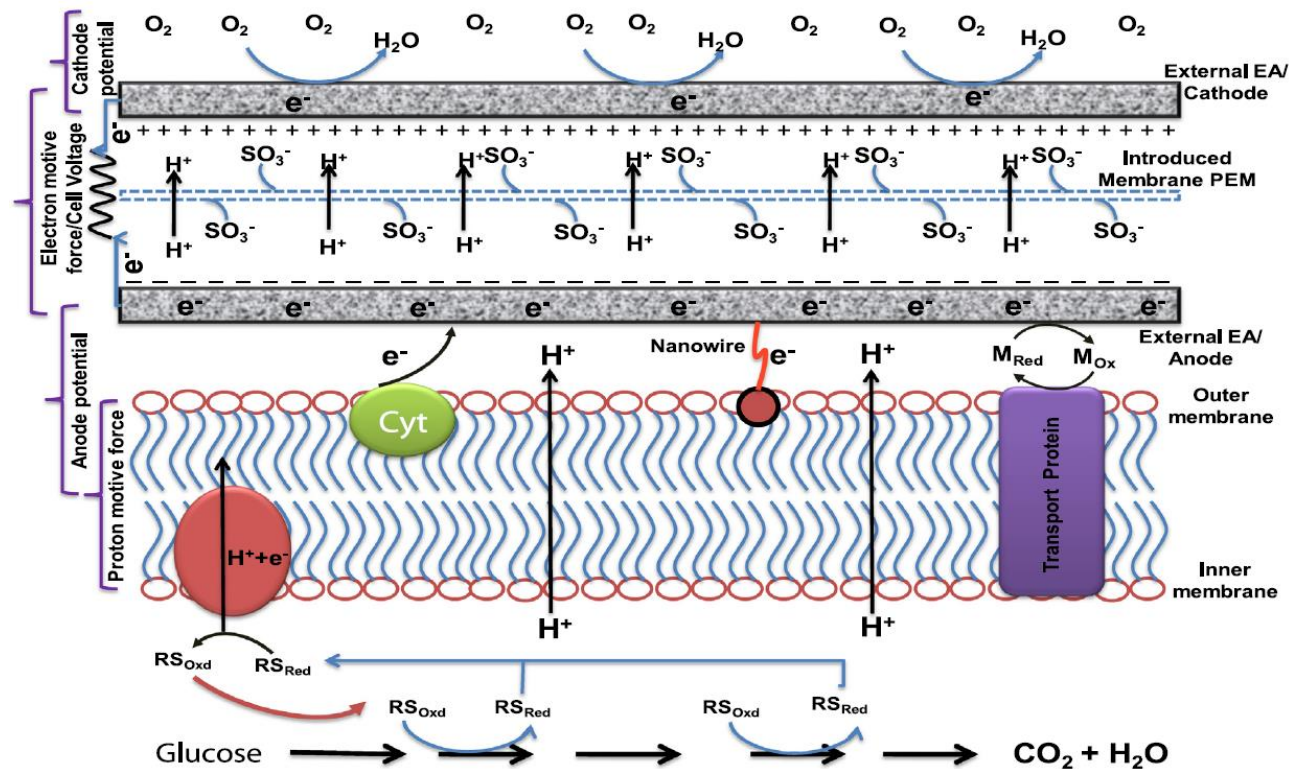


Figura 2.4: Schema generico di generazione di potenziale in una MFC partendo dalla ossidazione del substrato a livello anodico [37].

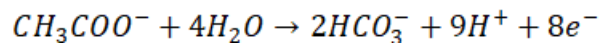
In condizioni anaerobiche diverse molecole possono fungere da accettori terminali di elettroni, come nitrati, solfati, perclorati, ioni metallici ecc. ma tra questi viene scelto quello con un potenziale redox maggiore, in quanto termodinamicamente porterebbe al maggiore abbassamento di energia libera del sistema. Quindi gli elettroni verranno veicolati in maniera gerarchica prima verso i TEA con potenziali redox maggiori [36].

Avendo la presenza di un elettrodo solido in una MFC, questo sarà a tutti gli effetti un TEA, il cui potenziale viene generato collegando elettricamente l'anodo al catodo, dove avverrà la reazione di riduzione dell'ossigeno o di altri composti ossidanti.

2.2.2 L'anodo

L'anodo è l'elemento più importante di un sistema MFC. Infatti, i batteri *exoelettrogeni* ossidano il substrato a livello del biofilm e gli elettroni derivanti da questo processo catabolico si accumulano sull'elettrodo, e vengono trasferiti al catodo tramite un circuito esterno.

Nei sistemi MFC più frequentemente studiati viene utilizzato l'acetato di sodio come substrato per i microrganismi. Tale molecola, infatti, risulta essere semplice da degradare per un batterio. La reazione di ossidazione di acetato che avviene all'anodo potrebbe essere sintetizzata dalla seguente:



Il potenziale di riduzione standard della reazione inversa (della coppia $HCO_3^-/Acetato$) è pari a $E_{An}^0=0,187$ V. Con la concentrazione di acetato di sodio utilizzata nel contesto di questa tesi per l'alimentazione delle celle (pari a 1g/L di CH_3COONa) e con un pH=7 e alcalinità definita dalla concentrazione di HCO_3^- pari a 5mM, si ottiene, applicando l'equazione di Nernst, un potenziale dell'anodo pari a:

$$E_{An} = E_{An}^0 - \frac{RT}{8F} \ln \frac{[CH_3COO^-]}{[HCO_3^-]^2[H^+]^9} = -0,298V \quad (2.1)$$

R: costante universale dei gas

T: temperatura assoluta (298K)

F: costante di Faraday

[x]: concentrazione molare della specie x

E_{An} : potenziale di anodo nelle condizioni definite

Si ottiene un potenziale leggermente più negativo se si utilizza la reazione di ossidazione del glucosio [1]. È stato provato che questo potenziale è molto simile a quanto determinato sperimentalmente in OCV su anodi di MFC alimentate da una soluzione 1g/L di acetato di sodio [1].

Ci sono evidenze sperimentali che dimostrano che tamponare il pH, o rimuovere l'acidità generata all'anodo sono delle ottime strategie per aumentare il potenziale prodotto dalla cella [1]. Il motivo deriva dal fatto che l'accumulo di protoni blocca le reazioni di ossidoriduzione.

Il materiale di cui è costituito l'anodo deve essere tale da accogliere un biofilm microbiologico, quindi non tossico per le specie microbiologiche, poroso, ad alta superficie specifica e il più conduttivo possibile. Solitamente il materiale anodico è costituito da grafite sotto varie forme:

- Carbon felt: un feltro di carbonio in cui le fibre di grafite sono intrecciate a formare una sorta di materiale spugnoso. Ottimo per l'insediamento dei microrganismi
- Carbon paper: simile al carbon felt ma le fibre vengono compresse e legate tra loro con un binder, in modo da formare uno strato sottile omogeneo
- Reticulated Vetrified Carbon (RVC): questo materiale è eccellente per la conduzione, molto poroso e facilmente insediabile dai microrganismi. Purtroppo, è molto fragile
- Aste in grafite: poca porosità ma alta conducibilità
- Fogli in grafite: generano un buon biofilm microbiologico ma non sono porosi
- Fibre di grafite o pennelli in grafite: sono materiali la cui superficie specifica è la più alta. La più alta porosità si ottiene quando all'anodo si usano i pennelli in grafite. Una potenza importante in una MFC con catodo a contatto con aria (2400

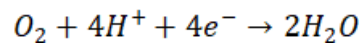
mW/m²) è stata ottenuta utilizzando un piccolo pennello in grafite in una MFC cubica [38]

Altri materiali, poco usati nella sperimentazione di MFC, sono polimeri conduttivi materiali metallici. [39]

2.2.3 Il Catodo

Al catodo avvengono le reazioni di riduzione e l'ossidante utilizzato in una MFC in modalità *a catodo aperto* è costituito dall'ossigeno atmosferico. Tuttavia, sono presenti delle configurazioni di MFC che utilizzano altre specie ossidanti come gli anioni ferrocianuro o permanganato [40] che non sono prese in esame nella presente tesi.

Quindi per una MFC utilizzante ossigeno atmosferico la reazione catodica è quella della riduzione dell'ossigeno (ORR):

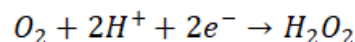


Il potenziale ottenibile a pH=0,7, valutato con l'equazione di Nernst è pari a $E_{Cat}=0,816V$.

Pertanto, per una cella operante a pH neutro, con 1g/L di acetato di Na e 5mM di HCO₃⁻ la *fem* è pari a:

$$E_{emf} = E_{Cat} - E_{An} = 0,816V - (-0,298V) = 1,11V \quad (2.2)$$

Tuttavia una MFC utilizzata per generazione di potenza raggiunge tipicamente tensioni a circuito aperto di circa 400 mV, con un potenziale catodico di circa 425 mV quando sul catodo non è applicato uno strato di NafionTM [1]. Questa precisazione è necessaria poiché tale strato riduce il potenziale di OCP. Questa differenza in potenziale di riduzione dell'ossigeno (0,816 V contro 0,425 V) può essere spiegata dal fatto che non sempre una molecola di ossigeno viene ridotta con 4 elettroni portando alla formazione di acqua, bensì può capitare che la reazione di riduzione dell'ossigeno porti alla formazione di perossido di idrogeno [1] secondo la reazione:



Il potenziale standard di questa reazione è pari a 0,695 V, ma nelle condizioni di lavoro della cella tale potenziale scende a circa 0,33 V, più vicino al potenziale catodico sperimentale.

La presenza di perossido di idrogeno potrebbe essere un problema in quanto, essendo fortemente ossidante, potrebbe causare danneggiamento al biofilm anodico. Contemporaneamente potrebbe arrecare vantaggi al funzionamento di una MFC in quanto limiterebbe la formazione di biofilm sul catodo.

La reazione catodica è avviene con difficoltà poiché gli elettroni (attraverso l'elettrodo portacorrente), l'ossigeno (dall'aria) e gli idrogenioni (attraverso la soluzione) devono reagire all'elettrodo in condizioni di contatto trifasico. Pertanto, diviene necessario l'ausilio di un catalizzatore o l'utilizzo di altri microrganismi aerobici. L'ossigeno potrebbe anche essere fornito come ossigeno disciolto, evitando il problema delle tre fasi in cui la reazione catodica avviene, ma la concentrazione di ossigeno in acqua a 25 °C è pari a solo 8,3 ppm.

Tra i migliori catalizzatori per l'ORR vi è il platino, il cui costo è la maggiore barriera per lo sviluppo di una MFC a basso costo. Altri catalizzatori testati in letteratura sono enzimi ossigeno-riduttori come catalasi e perossidasi [41]. Ma dato che le ossidasi terminali dei

sistemi di trasporto degli elettroni della respirazione aerobica dei microrganismi hanno un'affinità di gran lunga superiore ad ogni altro catalizzatore abiotico [40], si è optato di sperimentare l'utilizzo di batteri aerobici come strumenti di riduzione dell'ossigeno a livello catodico [42].

I materiali utilizzati come catodo sono gli stessi usati per l'anodo, con la differenza che un catalizzatore deve essere applicato su di essi qualora l'ossidante scelto sia l'ossigeno atmosferico.

2.2.4 MFC a singolo comparto VS doppio comparto

L'anodo delle MFC deve lavorare in condizioni in più possibile anaerobiche, e per questo motivo può essere inserita una membrana a scambio ionico che separa il compartimento anodico da quello catodico in modo da prevenire che l'ossigeno disciolto nell'elettrolita nella zona del catodo diffonda verso l'anodo [43]. L'ossigeno potrebbe costituire un problema per i batteri anaerobici presenti nel biofilm anodico, o comunque costituirebbe una perdita energetica per il sistema in quanto i batteri anaerobici facoltativi presenti nel biofilm potrebbero degradare il substrato aerobicamente, non generando potenziale sull'anodo.

In una *hydrogen fuel cell* (HFC) viene solitamente usata una *proton exchange membrane* (PEM) per evitare la miscelazione dei due gas reattivi H_2 e O_2 , ma permettendo il passaggio dei protoni per la chiusura del circuito. In una MFC l'elettrolita permette già il passaggio dei protoni, pertanto tale componente non è necessario. Si distinguono quindi due configurazioni generali di MFC: a singolo comparto (o single-chamber) e a doppio comparto [1].

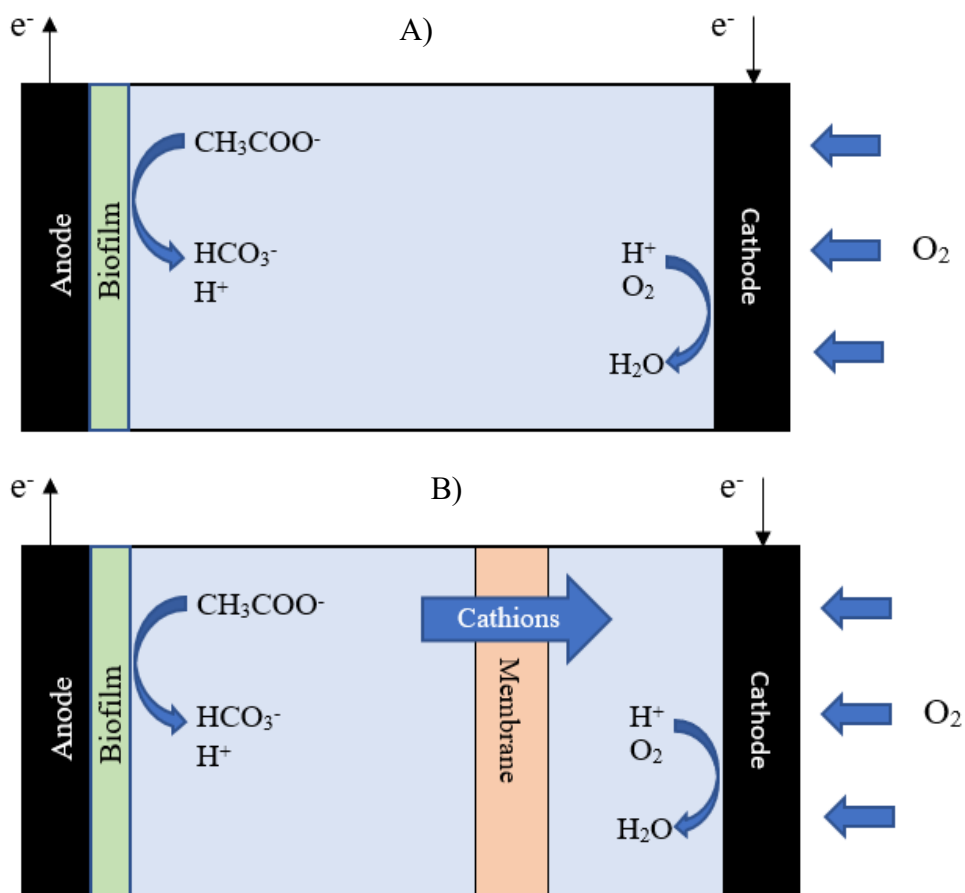


Figura 2.5: MFC A) a singolo comparto B) a doppio comparto

Il Nafion™ è una tipica membrana a scambio protonico utilizzata nelle MFC a doppio comparto. Sebbene la presenza di una membrana gioverebbe alla popolazione microbiologica, è dimostrato che le prestazioni di una MFC sono migliori nel caso di una *single-chamber*. Infatti, una PEM contribuisce ad aumentare significativamente la resistenza interna del sistema MFC [43], diminuendone la corrente prodotta. Per questo motivo è stato deciso di utilizzare una MFC *single-chamber* nel contesto di questa tesi.

2.3 MFC come sistema sensore

2.3.1 Considerazioni generali sul sistema sensore

Un'applicazione interessante delle MFC è il loro utilizzo come una particolare classe di biosensori. E' infatti stato dimostrato che quantità di elettroni generati, e quindi la corrente prodotta dalla cella, cambia al variare della concentrazione del substrato. E' quindi possibile utilizzare le MFC per rilevare la concentrazione di sostanze che possono fungere da substrato per il biofilm microbiologico. Questo descritto è uno dei due metodi operativi con i quali è possibile far lavorare i sensori MFC: il modo amperometrico, ovvero in cui il segnale di output è un segnale in corrente. C'è tuttavia un altro modo operativo: il modo potenziometrico, in cui il sistema viene fatto operare sotto controllo di corrente, ovvero misurando l'accumulo di carica all'anodo o il potenziale quando la corrente è nulla o comunque molto limitata. I due modi sono stati testati da Stein et al [44]. Ne risulta che buone prestazioni sono ottenute quando si opera a valori relativamente alti di potenziale, se il sistema lavora nel modo amperometrico, e a relativamente alti valori di corrente nel modo potenziometrico [44]. Nell'ambito di questa tesi, si è deciso di operare in modalità amperometrica in quanto, in condizioni normali, si ha un segnale di corrente base stabile quando si è in condizioni non di tossicità [7][44].

Ci sono diversi studi in letteratura che mostrano che esistono intervalli di concentrazione di sostanza degradabile, in corrispondenza dei quali il segnale elettrico risulta essere lineare [45-47]. Tale concentrazione deve essere inferiore alla concentrazione massima degradabile dai microrganismi, in modo da evitare al fenomeno della saturazione, ed evitare che la cinetica del processo di ossidazione divenga lo stadio limitante.

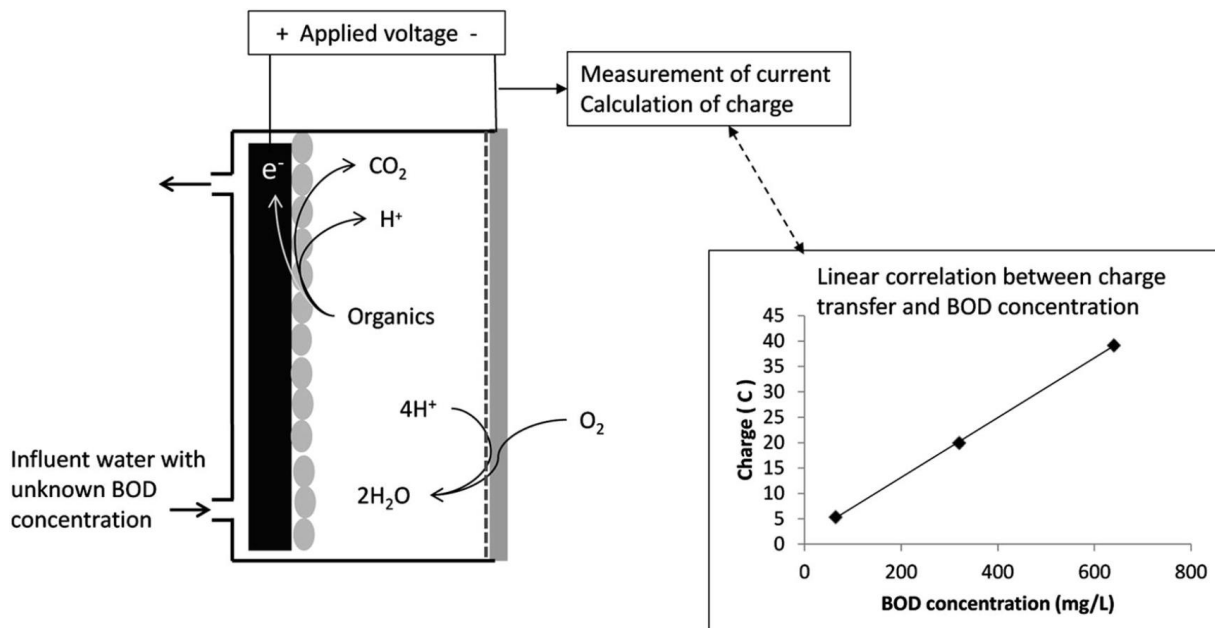


Figura 2.6: Schema di funzionamento di una MFC-based sensors utilizzata per la rilevazione di BOD [44]

Interessanti da citare sono le analisi del segnale elettrico derivante da un sensore MFC di COD testato da Di Lorenzo et al. [45]: questo sensore è applicabile per la rilevazione del carico ossidabile nelle acque di scarico. La correlazione riportata da questo tipo di sensori è pressoché lineare con la concentrazione di COD a cui i microrganismi vengono esposti.

È relativamente recente la scoperta della possibilità di utilizzo di una MFC-based sensor con lo scopo di rilevare delle sostanze tossiche [23]. Il principio di funzionamento si basa sul fatto che sostanze tossiche inibiscono parzialmente il metabolismo dei batteri, e quindi riducono l'intensità di corrente dovuta all'attività degli *exoelettrogeni* [23][45][48][49].

La diminuzione dell'intensità di corrente in caso di esposizione della MFC alla presenza di un *toxicant* può essere direttamente (correlata alla concentrazione della sostanza tossica stessa, e di qui l'idea di utilizzare le MFC come sensori di *toxicant*).

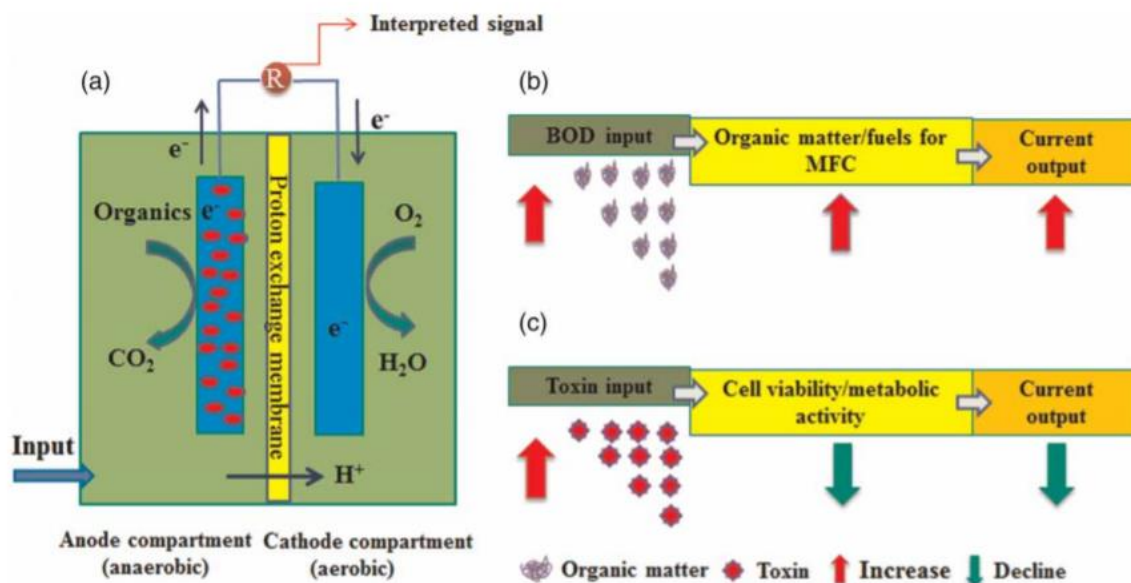


Figura 2.7: (a) schema costruttivo generale di una MFC-based sensors. Evoluzione dei parametri operativi della cella in caso di (b) BOD come analita, e (c) tossina come analita [7]

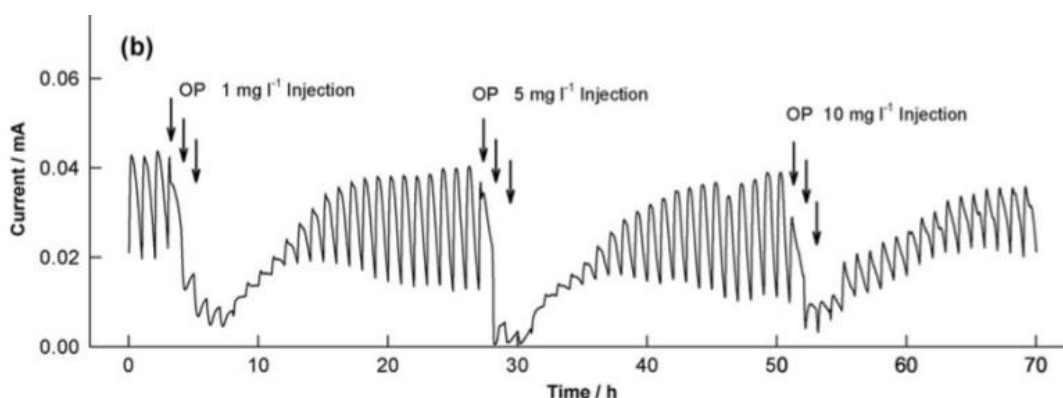


Figura 2.8: Andamento della corrente con le iniezioni di tossine OP (organo-fosforiche) nel sistema MFC [50]

E' stata dimostrata l'esistenza di una concentrazione massima cui possono essere esposte le MFC oltre la quale le celle non sono più funzionanti. La spiegazione è che la popolazione batterica del biofilm riesce a tollerare una massima esposizione agli agenti tossici, e oltre tale concentrazione la capacità ossidativa del biofilm è compromessa, con una sostanziale morte dei microorganismi presenti [45]. Ne risulta che talw concentrazione di *toxicant* massima tollerabile dalla MFC può essere considerata un parametro importante per caratterizzarne il funzionamento.

Le MFC utilizzate come sensori non discriminano il tipo di inquinante presente nel flusso, non sono cioè selettive. Ad ogni analita, nel caso di analiti ossidabili dalla popolazione microbiologica, può corrispondere un numero diverso di elettroni producibili in seguito alla sua degradazione da parte degli *exoelettrogeni*, ma non è possibile risalire solo dalla corrente prodotta al tipo particolare di analita processato dal sistema [1]. Quindi ad analiti diversi può corrispondere una pendenza della retta corrente-concentrazione diversa, ma non informazioni più specifiche. Questo vale anche per i *toxicant*, i quali possono al più rallentare il metabolismo dei batteri in maniera differenziata. Risulta quindi ipotizzabile che, qualora

venisse sviluppato una *MFC-based sensor* commerciale, questa potrà agire come primo livello di rilevazione online di inquinanti [51].

La maggioranza dei sistemi MFC operanti come sensori vengono utilizzati con una resistenza esterna applicata, ed è stato mostrato in letteratura che i circuiti con una bassa resistenza applicata, mostrano una variazione maggiore di intensità del segnale emesso in presenza di un evento tossico. Ciò comporta che con un basso carico applicato si riesca ad ottenere una maggiore sensibilità del sistema [52-54]. Tuttavia ad una grande variazione di corrente corrisponde un maggiore tempo per restaurare le condizioni normali di lavoro, e quindi per tornare alla corrente in condizioni normali [55]. Pertanto un'alta sensibilità influenza la robustezza del sensore, ed un buon compromesso tra sensibilità e robustezza può essere ottenuto scegliendo il carico esterno da applicarvi [52].

2.3.2 La cinetica batterica

Come detto nel paragrafo 2.2.1, i meccanismi di trasferimento elettronico da parte del batterio fino all'anodo sono 3. Comunque in ognuno di questi meccanismi è possibile distinguere due fasi principali di reazione anodica: 1) ossidazione biochimica del substrato e 2) trasferimento eterogeneo di elettroni all'elettrodo [56]. L'ossidazione biochimica avviene internamente al batterio e porta alla formazione dei prodotti ossidati e degli elettroni. La fase di trasferimento eterogeneo di elettroni coinvolge un intermedio redox, che permette il trasferimento degli elettroni all'elettrodo. Nel modello di cinetica batterica non viene fatta alcuna ipotesi su come avvenga il trasferimento di elettroni dal NADH all'elettrodo. Viene supposta che la reazione cineticamente controllante sia quella di ossidazione biochimica, o quella di trasferimento elettronico, o un mix delle due, ma si assume che le reazioni intermedie non influenzino considerevolmente le cinetiche [56].

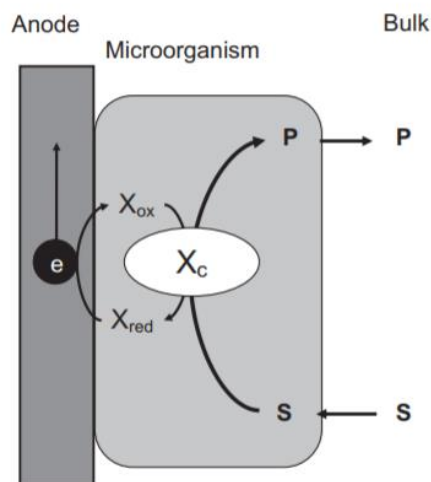
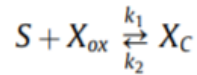


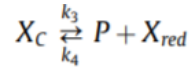
Figura 2.9: Schema cinetico del bio-anodo. Il substrato (S) diffonde nel microorganismo dove viene ossidato nella catena respiratoria formando il complesso X_C all'interno della cellula. Questo complesso viene poi convertito in prodotti ossidati (P) i quali diffondono verso il *bulk*. Gli elettroni sono invece rilasciati all'anodo tramite le sostanze redox X_{OX} e X_{RED} [56].

Si assume che l'intermedio redox che acquista elettroni dal substrato sia lo stesso che cede elettroni nella fase di trasferimento eterogeneo di elettroni all'elettrodo. Il modello si

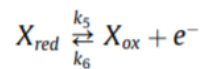
basa su tre reazioni principali. La prima è la reazione enzimatica che porta all'ossidazione del substrato (S) con l'agente ossidante (X_{OX}) per formare il complesso redox X_C:



Le due costanti presenti sono le costanti cinetiche della reazione diretta (k₁) e della reazione inversa (k₂). La seconda reazione invece è quella di formazione del prodotto ossidato (P) e dell'intermedio ridotto (X_{RED}):



Anche in questo caso definiamo le costanti cinetiche della reazione diretta (k₃) e della reazione inversa (k₄). La terza reazione è quella di trasferimento eterogeneo elettronico all'elettrodo:



In cui le costanti cinetiche diretta (k₅) e inversa (k₆) sono dipendenti dal potenziale anodico. Si ipotizza che gli enzimi che catalizzano le reazioni siano in eccesso rispetto alle altre specie. Si possono impostare le equazioni di bilancio di massa sapendo che la dipendenza delle costanti k₅ e k₆ dal potenziale di elettrodo anodico può essere descritta dal modello di Butler-Volmer [57].

Secondo il modello Butler-Volmer le costanti cinetiche sono date da:

$$k_5 = k_0 \exp\left[(1 - \alpha) \frac{F}{RT} (E_{An} - E_X^{0'})\right] \quad (2.3)$$

$$k_6 = k_0 \exp\left[-\alpha \frac{F}{RT} (E_{An} - E_X^{0'})\right] \quad (2.4)$$

k₀: costante cinetica eterogenea standard [s⁻¹]

α: coefficiente di trasferimento [-], è un parametro che varia tra 0 e 1 e tipicamente vale 0,5 [58]

F: costante di Faraday, 96500000 C kmol⁻¹

R: costante universale dei gas, 8310 J kmol⁻¹ K

T: temperatura assoluta [K]

E_{An}: potenziale anodico [V]

E_X^{0'}: potenziale standard di riduzione dell'intermedio redox [V]

La densità di corrente (I) deriva dalla reazione di generazione di elettroni da parte della ossidazione dell'intermedio ridotto X_{RED} (I_f) meno la corrente generata dal processo di riduzione dell'intermedio ossidato X_{OX} (I_b).

$$I = n \cdot F \cdot (k_5 \cdot X_{RED} - k_6 \cdot X_{OX}) \quad (2.5)$$

Dove n indica il numero di elettroni scambiati nella riduzione dell'intermedio ossidato. Per semplificare le prove sperimentali si introducono i parametri di affinità [56][59] seguenti:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.6)$$

$$K_P = \frac{k_2 + k_3}{k_4} \quad (2.7)$$

In cui K_m rappresenta la costante di affinità del substrato o costante di Michaelis-Menten [kmol m^{-3}], che descrive l'effetto del substrato sulla conversione biochimica. Viene determinato sperimentalmente come la concentrazione alla quale viene convertito metà del substrato [56]. Mentre K_P indica la costante di inibizione da prodotto [kmol m^{-3}], interpretabile come un valore che descrive quanto il prodotto inibisce il proseguire della reazione [56].

Viene definito sovratensione dell'anodo (η) la differenza del potenziale effettivo all'anodo (E_{An}) e il potenziale teorico di ossidazione del substrato che fornisce energia alle cellule (E_{sub}):

$$\eta = E_{An} - E_{sub} \quad (2.8)$$

Combinando le precedenti equazioni e osservazioni ne risulta che l'intensità di corrente prodotta dalla MFC è funzione del sovrapotenziale dell'anodo ed è rappresentabile dalla curva di polarizzazione dell'anodo [52]. Il modello predittivo che ne deriva è chiamato di Butler-Volmer-Monod (BVM) [52][56][60]:

$$I = I_{max} \frac{1 - e^{-\eta \frac{F}{RT}}}{K_1 e^{-(1-\alpha)\eta \frac{F}{RT}} + K_2 e^{-\eta \frac{F}{RT}} + \frac{K_m}{S} + 1} \quad (2.9)$$

K_1 : parametro che indica il rapporto tra costanti cinetiche delle reazioni biochimiche ed elettrochimiche [-]

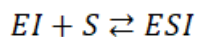
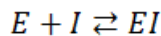
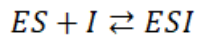
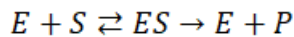
K_2 : parametro che indica il rapporto tra le costanti cinetiche diretta e inversa delle reazioni biochimiche [-]

Successivamente il modello BVM è stato modificato per tenere conto dell'effetto che le sostanze tossiche, ovvero gli analiti che si intendono monitorare, hanno sul metabolismo batterico [61].

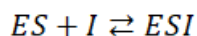
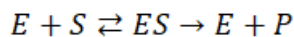
$$I = I_{max} \frac{1 - e^{-\eta \frac{F}{RT}}}{\beta_1 K_1 e^{-(1-\alpha)\eta \frac{F}{RT}} + \beta_2 K_2 e^{-\eta \frac{F}{RT}} + \frac{\beta_3 K_m}{S} + 1} \beta_4 \quad (2.10)$$

β_i : termini di inibizione [-], "i" si riferisce al tipo di inibizione enzimatica causata dal *toxicant*:

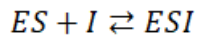
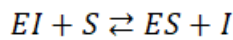
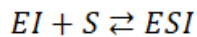
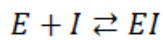
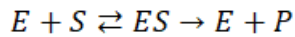
- $i=1$ – inibizione non competitiva, costituita da queste reazioni tra enzima, substrato e *toxicant*. Il *toxicant* è indicato con I:



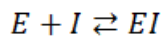
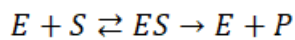
- $i=2$ – inibizione incompetitiva, le cui reazioni sono:



- $i=3$ – inibizione mista, composta dalle reazioni:



- i=4 – inibizione competitiva



In formule, i termini di inibizione sono definiti dalla (2.11):

$$\beta_i = \frac{K_i}{K_i + \chi_i} \quad (2.11)$$

K_i : costante di affinità del *toxicant* per la reazione che avviene con schema di inibizione *i*-esimo [kmol m^{-3}]

χ_i : concentrazione del *toxicant* [kmol m^{-3}]

Dalla (2.10) risulta evidente che il segnale in corrente è strettamente correlato alla concentrazione e al modo con cui l'analita interagisce con il metabolismo dei batteri.

2.4 Le prestazioni di una MFC

In questa sezione vengono analizzati i parametri caratterizzanti di un sistema MFC. La prima parte discuterà di parametri comuni sia alle MFC utilizzate come tecnica di *Energy harvesting* sia a quelle usate come sensori, per poi focalizzarsi, nell'ultima parte di questo paragrafo, sui parametri tipici unicamente delle MFC *based sensors*. Gli indicatori della prestazione delle MFC tipici delle MFC utilizzate per *Energy harvesting* sono utilizzati anche come indicazione di come varia il funzionamento del sistema MFC come sensore.

2.4.1 La potenza elettrica

La potenza istantanea di una MFC è data dalla corrente e dal potenziale generati in quel momento secondo la formula:

$$P = I \cdot E_{MFC} \quad (2.12)$$

I: intensità di corrente [A]

E_{MFC} : potenziale della MFC [V]

P: potenza generata [W]

Il potenziale e la corrente prodotti dipendono dalla resistenza esterna (R_{ext}) applicata all'anodo e al catodo:

$$P = \frac{E_{MFC}^2}{R_{ext}} \quad (2.13)$$

Solitamente la potenza viene normalizzata in base all'area superficiale dell'anodo (quest'area in genere è la geometria apparente dell'anodo), si definisce quindi la potenza per unità di superficie anodica:

$$P_{An} = \frac{E_{MFC}^2}{A_{An}R_{ext}} \quad (2.14)$$

A_{An} : area della proiezione dell'anodo (lunghezza per larghezza) in questa tesi [m^2]

P_{An} : potenza per unità di superficie anodica [W/m^2]

C'è però bisogno di puntualizzare il fatto che non sempre aumentare l'area dell'anodo genera un incremento di potenza [62]. Infatti, questo è valido solo quando la superficie di elettrodo limitante è l'anodo, e non quella del catodo come mostrano i due grafici:

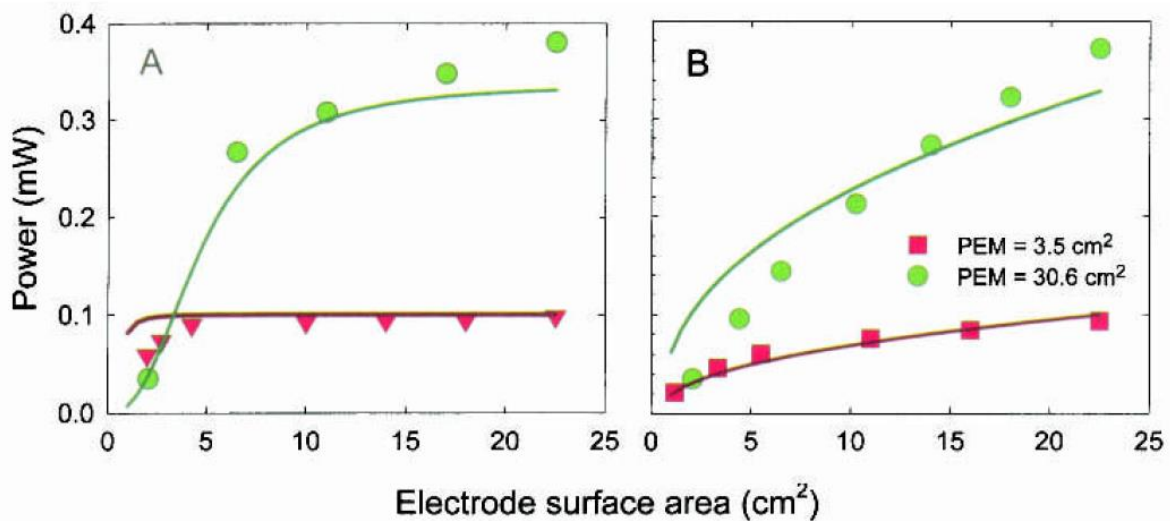


Figura 2.10: A) Potenza generata in funzione della superficie anodica quando la superficie del catodo è pari a $22,5 \text{ cm}^2$ B) Potenza generata in funzione della superficie catodica quando la superficie dell'anodo è pari a $22,5 \text{ cm}^2$ [62]

Nel caso in cui il catodo sia il limitante viene invece definita la potenza su superficie catodica, analogamente a quanto fatto nell'equazione (2.21).

La massima potenza teoricamente estraibile da una MFC ($P_{t,emf}$) dipende anche dal valore della resistenza interna della cella (R_{int}). Infatti, diverse configurazioni hanno diverse resistenze interne, e questa può essere vista come una resistenza messa in serie al carico esterno [1]. Componente importante della resistenza interna è data dalla resistenza interna dei materiali costituenti gli elettrodi della cella. Infatti tale resistenza ostacola il flusso di elettroni al collettore facendo incrementare il valore della resistenza interna della MFC. È pertanto importante scegliere la configurazione di MFC che ha un buon compromesso tra resistenza interna e altri parametri indicativi delle performance della cella.

La potenza massima teorica è anche dipendente dalla forza elettromotrice della cella (E_{emf}).

$$P_{t,emf} = \frac{E_{emf}^2}{(R_{ext} + R_{int})} \quad (2.15)$$

Come visto nel paragrafo precedente, la tensione di cella è sempre inferiore alla forza elettromotrice, ed è quindi possibile approssimare la potenza massima estraibile dalla MFC con la tensione di circuito aperto [1].

$$P_{t,ocv} = \frac{OCV^2}{(R_{ext} + R_{int})} \quad (2.16)$$

$P_{t,ocv}$: potenza massima possibile [W]

OCV: tensione a circuito aperto [V]

La potenza definita in questo modo però non è la potenza utile generata dal sistema MFC. Infatti, la potenza utile è quella che deriva dal passaggio di corrente attraverso la resistenza esterna, in quanto la potenza elettrica derivante dalla resistenza interna sarebbe più proprio chiamarla perdita energetica, in quanto non è sfruttabile. Definiamo quindi la potenza massima utile ottenibile da una certa forza elettromotrice ($P_{max,emf}$) come:

$$P_{max,emf} = \frac{E_{emf}^2}{(R_{ext} + R_{int})} \frac{R_{ext}}{(R_{ext} + R_{int})} = \frac{E_{emf}^2 R_{ext}}{(R_{ext} + R_{int})^2} \quad (2.17)$$

Però, come detto finora, la tensione massima ottenibile in una MFC risulta essere pari a quella di OCV, pertanto la vera potenza utile massima è:

$$P_{max,ocv} = \frac{OCV^2 R_{ext}}{(R_{ext} + R_{int})^2} \quad (2.18)$$

Dall'equazione (2.18) è possibile trovare il valore di resistenza esterna da applicare per permettere alla cella di lavorare alla massima produzione energetica, corrispondente alla potenza massima (P_{max}) generabile. È sufficiente derivare la (2.18) rispetto alla resistenza esterna:

$$\frac{dP_{max,ocv}}{dR_{ext}} = \frac{OCV^2}{(R_{ext} + R_{int})^2} - 2 \frac{OCV^2 R_{ext}}{(R_{ext} + R_{int})^3} = OCV^2 \frac{R_{int} - R_{ext}}{(R_{ext} + R_{int})^3} \quad (2.19)$$

Ponendo l'equazione (2.19) pari a zero, troviamo che la potenza massima si ottiene quando la resistenza esterna eguaglia la resistenza interna della cella. La potenza massima ottenibile in queste condizioni è pertanto pari a:

$$P_{max} = \frac{OCV^2}{4R_{int}} \quad (2.20)$$

La potenza massima ottenibile è quindi strettamente correlata alla resistenza interna della cella, ed è quindi necessario ridurla il più possibile, sia adottando delle architetture che minimizzino tale resistenze, sia scegliendo materiali molto conduttivi, specialmente per dispositivi usati per generazione di potenza. La potenza massima può essere confrontata con la potenza effettivamente generata dai sistemi MFC in esame in modo da avere un'idea della prestazione di conversione energetica della cella in esame.

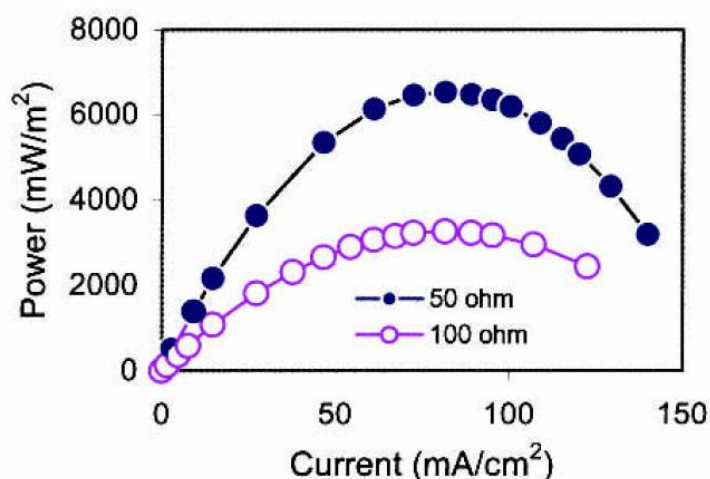


Figura 2.11: potenze massime generate da due dispositivi MFC: uno la cui resistenza interna è pari a 50 Ω e l'altro con resistenza interna pari a 100 Ω [1]

La differenza di potenza elettrica tra una MFC posta in ambiente privo di *toxicant* e una MFC posta in presenza di un *toxicant*, risulta essere un parametro che indica l'inibizione del metabolismo microbologico, e quindi la sensibilità del sistema sensore all'analita.

2.4.2 L'efficienza coulombica ed energetica

Un altro parametro utile per monitorare la degradazione del substrato e per contemporaneamente valutare come gli *exoelettrogeni* stanno lavorando all'interno del biofilm anodico è la quantità di elettroni, ovvero di corrente, estratta dal substrato.

Come detto nel paragrafo "2.2.2 L'anodo", spesso viene utilizzato acetato di sodio come substrato sia per l'avviamento delle celle, sia per monitoraggio delle caratteristiche del sistema. Da una molecola di acetato di sodio è possibile estrarre un massimo di 8 elettroni, derivanti dalla reazione di ossidazione di acetato a bicarbonato.

Tale ragionamento può però essere fatto su qualsiasi altro substrato presente nell'elettrolita e degradabile dall'anodo.

Si definisce il parametro che indica l'efficienza di estrazione di carica dal substrato come segue:

$$C_E = \frac{\text{Carica recuperata}}{\text{Carica totale estraibile dal substrato}} \quad (2.21)$$

Per un dispositivo *batch*-MFC, ovvero una cella che funziona introducendo una quantità di terreno (con terreno è inteso l'elettrolita contenente il substrato) in maniera discontinua, può essere derivato il grafico della corrente generata nel tempo: è sufficiente fare delle misurazioni di potenziale con un multimetro e, nota la resistenza esterna applicata al circuito, ricavare la corrente.

In questo modo è possibile ricavare la quantità di carica recuperata dal substrato semplicemente integrando i valori di corrente nel tempo con un metodo numerico:

$$\text{Carica recuperata} = \int_0^{t_b} I dt \quad (2.22)$$

t_b : tempo di un ciclo di batch [s]

I: corrente di output dal circuito [A]

Mentre la carica massima estraibile dal substrato di un ciclo batch è pari a:

$$\text{Carica totale estraibile dal substrato} = F b_{es} \frac{V_{An} \Delta c}{M_S} \quad (2.23)$$

F: costante di Faraday (valore assoluto della carica di una mole di elettroni) [C/mol e⁻]

b_{es} : numero di elettroni estraibile da una molecola di substrato [mol e⁻/mol]

V_{An} : volume del comparto anodico per una *double-chamber* MFC, o volume di terreno introdotto per una *single-chamber* MFC [L]

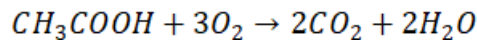
Δc : variazione di concentrazione del substrato in un ciclo batch (concentrazione del substrato prima della degradazione – concentrazione del substrato al tempo t_b) [g/L]

M_S : massa molare del substrato [g/mol]

Quindi combinando la (2.21) con la (2.22) e la (2.23) si ottiene la formula completa dell'efficienza coulombica [1]:

$$C_E = \frac{M_S \int_0^{t_b} I dt}{F b_{es} V_{An} \Delta c} \quad (2.24)$$

È possibile definire un rendimento termodinamico per il processo di conversione di energia chimica dal substrato in energia elettrica. Il processo globale di degradazione del substrato per una *air-cathode* MFC è equivalente alla combustione del substrato la cui reazione, nel caso di acetato come substrato, è rappresentabile da:



L'energia convertibile idealmente in lavoro utile prodotta dalla reazione è pari alla variazione di energia libera standard di tale reazione di combustione, considerando che l'acqua rimanga in fase liquida. Pertanto, la formula del rendimento diventa:

$$\eta_{MFC} = \frac{M_S \int_0^{t_b} E_{MFC} I dt}{\Delta G^0 V_{An} \Delta c} \quad (2.25)$$

E_{MFC} : tensione di cella [V]

ΔG^0 : variazione di energia libera molare standard della reazione di combustione dell'acido acetico [J/mol]

Alcune MFC utilizzate per generazione di potenza hanno un rendimento di conversione del substrato che può arrivare al 50% [43][63].

Per quanto riguarda il sistema sensore, entrambi i parametri, efficienza coulombica e rendimento termodinamico, decrescono quando il sistema MFC è in contatto dell'analita che funge da toxicant per il metabolismo microbiologico. Il loro decremento, in accordo con quanto detto per la potenza elettrica, può indicare quanto i microrganismi sono sensibili alla presenza di analita.

2.4.3 La sensibilità

La sensibilità viene definita per un sistema che funge da sensore. Questo parametro è definito come la variazione relativa di segnale elettrico ottenuta relativamente alla metabolizzazione dell'analita, quando il sensore è posto in presenza dell'analita [45]. Tradotto in formule:

$$S_{MFC} = \frac{\Delta I}{A_{An} \Delta C} \quad (2.26)$$

ΔI : variazione assoluta di corrente calcolata come differenza tra la corrente misurata in presenza di analita e in condizioni normali [A]

Δc : variazione di concentrazione dell'analita tra ingresso e uscita dello stream, se MFC continua, o variazione di analita in un ciclo *batch* [mol/L]

La variazione di corrente è presa in valore assoluto poiché l'analita potrebbe essere o una sostanza agente da substrato, che genererebbe in questo caso una variazione positiva di corrente, oppure l'analita potrebbe essere una sostanza tossica per i microrganismi, e questo produrrebbe un abbassamento della corrente elettrica generata dalla MFC [45][64]. Possono però essere prese in esame altre variabili oltre alla corrente, possibilmente scegliendo le grandezze che danno una risposta il più lineare e sensibile possibile.

Infatti una sensibilità alta è necessaria per evitare che il sensore produca dei falsi allarmi [52] oltre che per avere una precisione migliore.

La sensibilità può essere definita anche con altri parametri diversi dall'intensità di corrente, come la potenza generata, il massimo di tensione ecc.

2.4.4 Tasso di inibizione

Il tasso di inibizione viene valutato nel caso di sensori MFC realizzati per identificare la presenza di sostanze tossiche.

Il tasso di inibizione è definito come la variazione relativa dell'efficienza coulombica in presenza di *toxicant* e in condizioni normali [23].

$$I_n = \frac{|C_{E,TOX} - C_E|}{C_E} \quad (2.27)$$

$C_{E,TOX}$: efficienza coulombica quando è presente la sostanza tossica [-]

C_E : efficienza coulombica in condizioni di normale funzionamento [-]

Spesso il tasso di inibizione viene valutato in termini percentuali. E chiaramente questo valore dipenderà fortemente dalla tossicità dell'analita.

2.4.5 Tempo di risposta

Il tempo di risposta viene valutato come il tempo che intercorre dall'iniezione di analita e il raggiungimento del picco di corrente (picco positivo o negativo) [45].

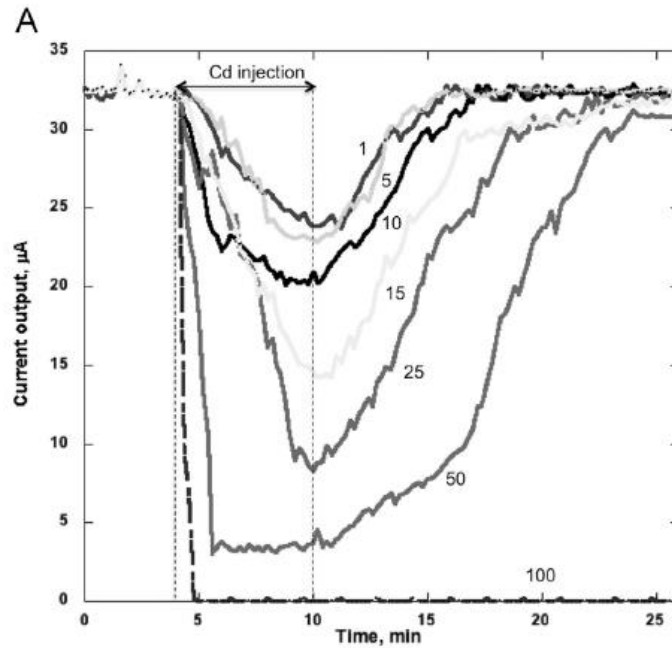


Figura 2.12: tempo di risposta di un sensore MFC all'iniezione di soluzioni di cadmio bivalente a diversa concentrazione (da 1 a 100 ppb) [45]

2.4.6 Concentrazione massima tollerabile

Le MFC-based sensors avranno un limite superiore di concentrazione di *toxicant*, dovuto alla resistenza dei microrganismi all'analita. Questa concentrazione viene valutata come la più bassa concentrazione di sostanza tossica che genera la morte della popolazione microbiologica anodica, ovvero quando si registrerà un potenziale nullo del sistema MFC anche in presenza di substrato.

È possibile notare nel grafico presente in figura 2.12 che la massima concentrazione di cadmio bivalente tollerabile dal sistema MFC analizzato da Di Lorenzo et al è compreso tra 50 e 100 ppb.

2.4.7 Il range dinamico

Il range dinamico è quell'intervallo di concentrazione di analita che produce una risposta del segnale elettrico lineare con la concentrazione stessa di analita [64]. Questo costituisce l'intervallo operativo nel quale il sensore può operare. Questo intervallo è dipendente dal tipo di analita e dalle condizioni ambientali in cui il sensore opera [45][64].

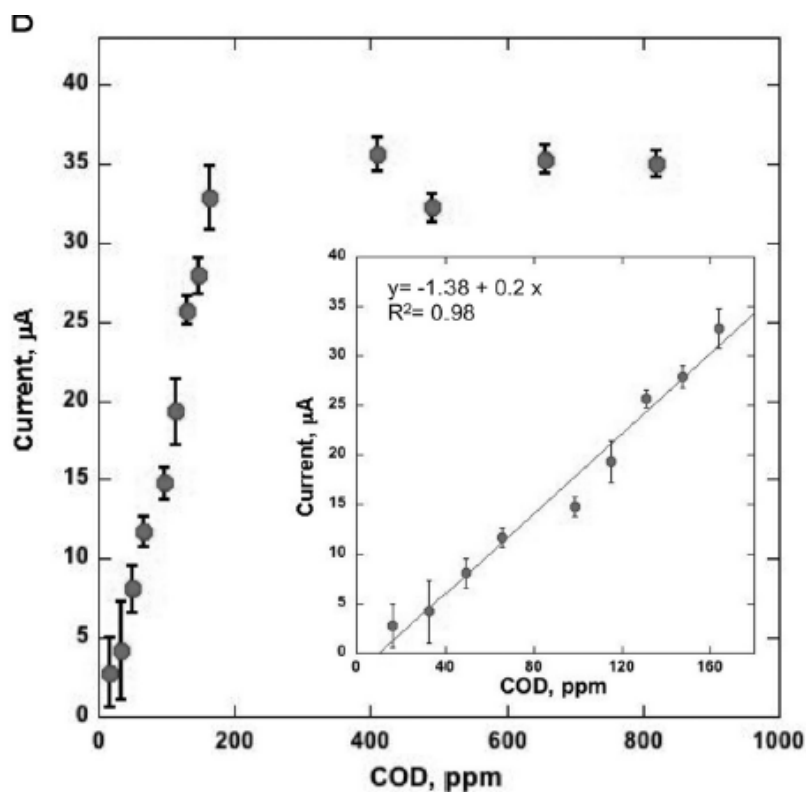


Figura 2.13: Andamento dell'intensità di corrente prodotta da una *continuous-MFC-based sensor* al variare della concentrazione di COD presente nell'elettrolita [45]

Dalla Figura 2.13 si può evincere il fatto che si ha una buona correlazione tra segnale e COD, producendo un coefficiente di determinazione di 0,98.

2.4.8 La robustezza

La robustezza in un sensore MFC è definita come il tempo che il sistema impiega per tornare alle condizioni di corrente normali. In quanto dopo l'iniezione di un *toxicant* i batteri dovrà avere il tempo di degradare, o smaltire per diffusione, la tossina che ha interagito con il suo metabolismo. Il tempo impiegato per ristabilire il normale livello di reazioni metaboliche è il parametro che viene utilizzato per definire la robustezza del sensore.

Tale parametro può anche essere valutato come multiplo del tempo di risposta.

Quando le MFC lavorano ad alte tensioni, una volta inserito il *toxicant*, il segnale riceve una diminuzione maggiore rispetto a quanto farebbe se il sistema avesse un potenziale basso. Ciò comporta un'alta sensibilità ma di contro una robustezza inferiore, ovvero il sistema impiegherà maggiore tempo per tornare allo stazionario in condizioni non tossiche [52-54].

3. Procedure e protocolli sperimentali

In questo capitolo verranno presentate le procedure sperimentali adottate nel contesto della tesi. Dal settaggio dei sistemi microbiologici alle misure sperimentali fatte.

3.1 Configurazione e impostazione delle MFC

Le MFC utilizzate in questa tesi sono costituite da un *case* ottenuto tramite stampante 3D, formato dalle seguenti parti:

- comparto anodico in polimetilmetacrilato inserito in una cavità della sezione inferiore del *case*;
- comparto catodico cavo per permettere al catodo di avere un contatto con l'aria, fatto in polimetil metacrilato;
- finestra in plastica per evitare che il catodo, essendo costituito da un sottile foglio di carbon paper, si pieghi;
- piastra di intermezzo in polimetil metacrilato, utile per tenere ad una certa distanza l'anodo dal catodo e dotato di fori per permettere all'elettrolita di entrare;
- cornice quadrata in plastica per tenere il catodo fisso sulla finestra del catodo;
- 2 guarnizioni in gomma per evitare perdite di elettrolita.

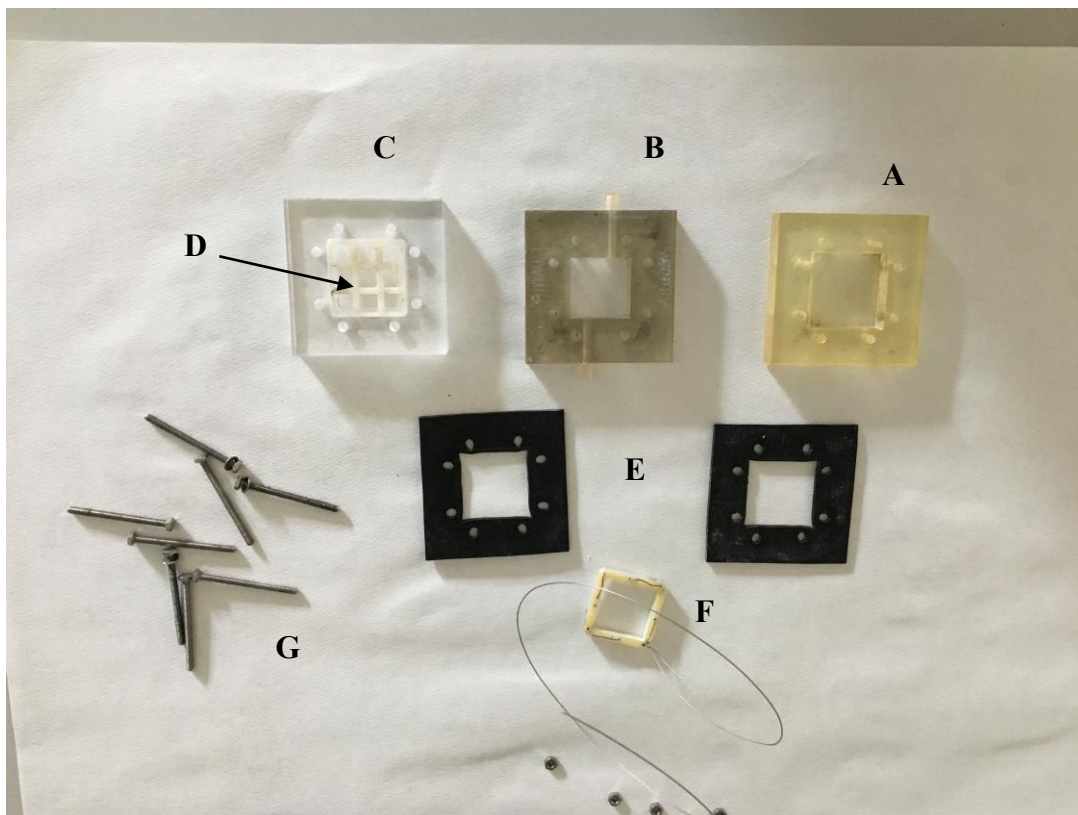


Figura 3.1: Componenti principale del *case* esterno di una MFC: A) compartimento anodico; B) piastra di intermezzo; C) compartimento catodico; D) finestra in plastica; E) guarnizioni in gomma; F) cornice quadrata dotata di filo di titanio; G) viti utilizzate per il fissaggio.

Questa configurazione MFC è di tipo *single-chamber* e pertanto non presenta il completo isolamento dell'anodo dall'ossigeno. Questo viene fatto per evitare di avere perdite ohmiche interne legate a una membrana di scambio protonico che, in questo tipo di sistemi, con i potenziali coinvolti, costituisce un importante ostacolo alla diffusione dei cationi.

Il foro in cui vengono inseriti l'anodo e il compartimento dove verrà inserito il catodo hanno una sezione di 9 cm².

Le misure del *case* sono pari a 6 cm di larghezza, 6 cm di lunghezza e 1 cm di profondità. Il comparto anodico possiede una cavità 3 cm x 3 cm profonda 0,8 cm.

3.1.1 La preparazione del catodo

Il materiale catodico scelto è un foglio 3 cm x 3 cm di carbon paper. È stato scelto carbon paper in quanto la sua resistenza al trasferimento elettronico è pari solamente a 0,8 Ω /cm [1]. Ad una faccia è stato applicato uno strato di politetrafluoroetilene (PTFE) che costituisce il gas diffusion layer (GDL) e la cui funzione è impedire il passaggio dell'elettrolita a base acqua all'esterno della cella, poiché il catodo è esposto all'ambiente esterno, ma permette il passaggio dell'ossigeno. Questo strato di PTFE risulta comunque costituire un ostacolo alla cinetica della reazione catodica di riduzione dell'ossigeno [65], ma per operare con questi sistemi risulta essere necessario introdurre questo strato per bloccare per l'elettrolita evitando perdite.

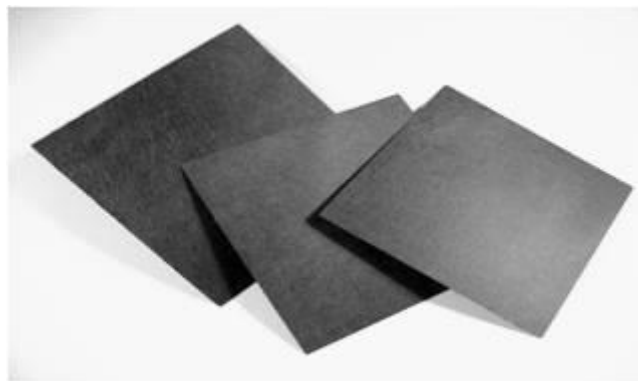


Figura 3.2: Carbon paper con strato di PTFE applicato su un lato [66]

Sul catodo deve essere depositato un catalizzatore di platino poiché la reazione di ORR è cineticamente lenta. Grazie alla presenza di platino, ad oggi il migliore catalizzatore per la riduzione dell'ossigeno, solitamente nei sistemi MFC la reazione catodica non è quella che controlla la cinetica [1][65].

Lo strato di catalizzatore al platino deve essere posizionato sullo strato del carbon paper a contatto con la soluzione elettrolitica, ovvero dal lato opposto allo strato di PTFE.

Il catalizzatore utilizzato è formato da nanoparticelle di Pt depositate su polvere di carbonio (indicato come Pt/C). La concentrazione in massa del platino in questa polvere è pari al 10%. È altresì presente del NafionTM che funge da *binder*, poiché è un polimero che facilita l'aggregazione di platino al carbon paper [67]. Le quantità di ogni componente da miscelare sono valutate in riferimento alla superficie catodica secondo la tabella seguente:

Composto Chimico	Quantità
Pt/C	0,5 mg/cm ²
Acqua deionizzata	0,83 µL/cm ²
Nafion™	6,67 µL/cm ²
Isopropanolo	3,33 µL/cm ²

Tabella 3.1: Composizione della miscela costituente il catalizzatore catodico.

L'acqua e l'isopropanolo sono aggiunti in modo da permettere la miscelazione della polvere con il Nafion™. Successivamente all'aggiunta del catalizzatore sugli elettrodi tramite pennello, vengono fatti evaporare l'isopropanolo e il Nafion™ per lasciare uno strato omogeneo solido sul catodo.

Per quanto riguarda il contatto elettrico al catodo per permettere al sistema di chiudere elettricamente il circuito, questo viene fatto posizionando un filo di titanio direttamente a contatto con la superficie del catodo a contatto con l'elettrolita. In particolare viene utilizzata la cornice (F) mostrata in Figura 3.1. Per realizzare il contatto elettrico viene fatto passare il filo di titanio all'interno dei fori della cornice in modo alternato per ottenere una buona porzione di filamento a contatto con la superficie esterna del catodo, come mostrato nella Figura 3.3.

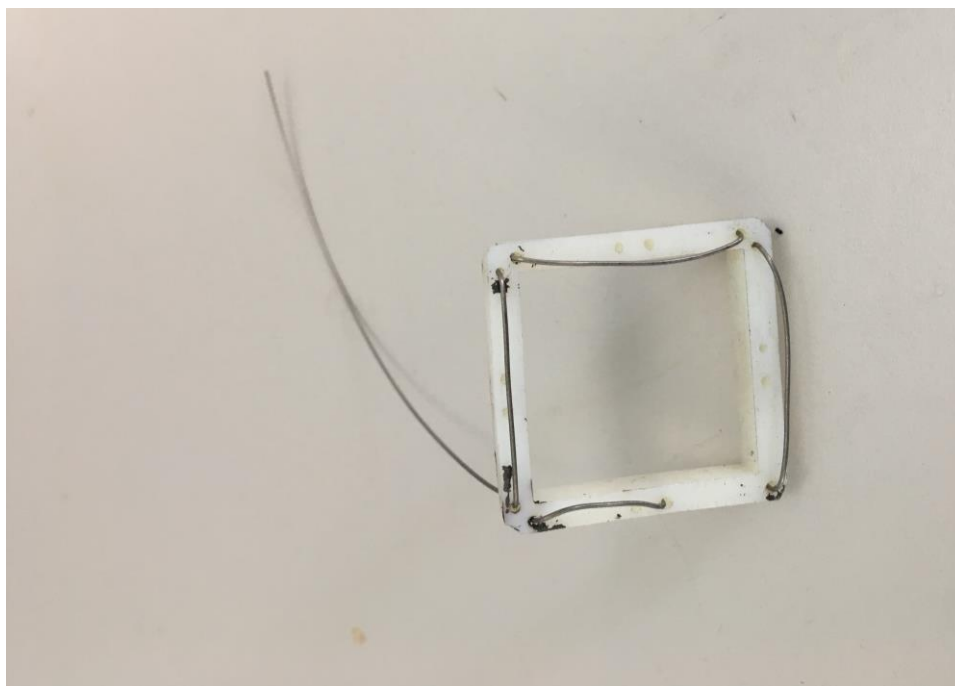


Figura 3.3: Cornice catodica con filo di titanio inserito nei fori per permettere la chiusura del circuito tramite il contatto diretto filo-catodo

3.1.2 La preparazione dell'anodo

Come materiale anodico è stato utilizzato del carbon felt, materiale molto poroso, adatto alla colonizzazione da parte della popolazione batterica, con relativa formazione di biofilm.

L'insediamento batterico (o inoculazione) viene fatto tramite l'utilizzo di una coltura mista di microrganismi provenienti da una *Sedimentary Microbial Fuel Cell*, sistema che

utilizza come anodo del *carbon felt* presente nel sedimento marino, e come elettrolita dell'acqua di mare. Pertanto l'inoculo microbiologico deriva da batteri naturalmente presenti in mare.

Questo costituisce un vantaggio per la robustezza del sistema MFC, infatti secondo uno studio condotto da Yi et al, è stato dimostrato sperimentalmente che l'utilizzo di colture miste rende il biofilm anodico più protettivo grazie ai meccanismi di simbiosi mutualistica che si sviluppano a livello dell'anodo [68]. Ciò nonostante, diversi microrganismi generano un tipo di biofilm differente [69], e quindi il tipo di Sostanze Polimeriche Extracellulari (EPS) costituenti il biofilm stesso varia. In genere i biofilm formati da colture miste sono più protettivi dei biofilm generati da colture pure e questo ha come conseguenza quello di far diminuire la sensibilità delle MFC utilizzate per sensoristica [68].

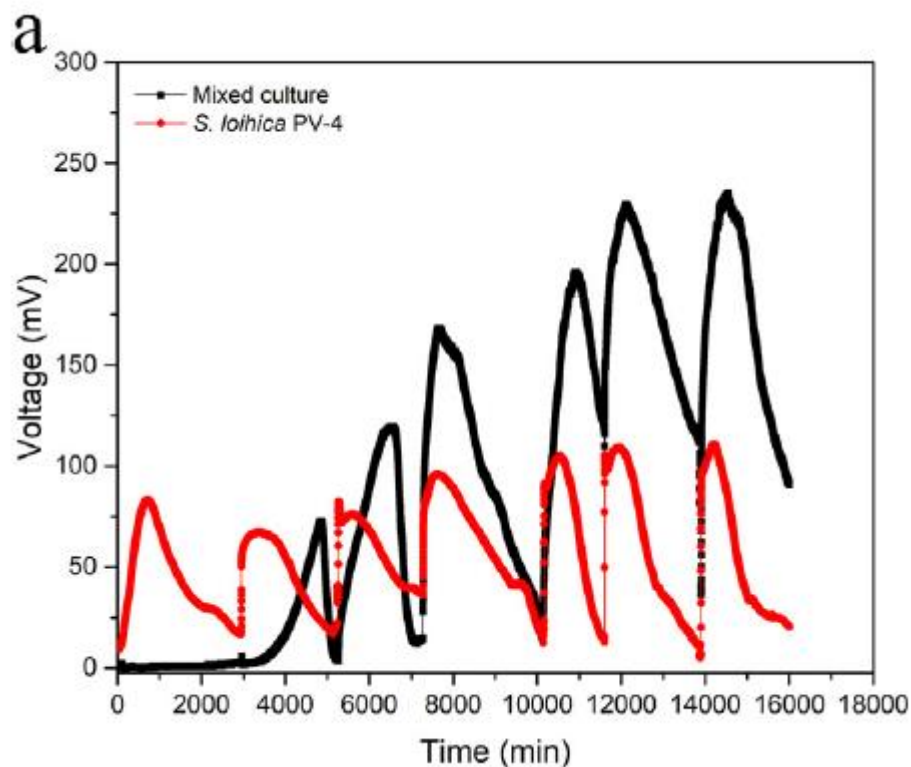


Figura 3.4: Differenze nella risposta all'iniezione ripetuta di substrato in presenza di biofilm anodico costituito da una coltura pura (in rosso) e di una coltura mista (nera). Si evince che le migliori performance in termini di efficienza coulombica e potenza utile generata sono migliori quando è utilizzata una coltura di microrganismi misti [68].

L'anodo costituito da carbon felt colonizzato dai batteri derivanti da una SMFC è stato quindi inserito già colonizzato, poiché la SMFC era già avviata, e inserito nel compartimento presente nel *case* anodico.

Per realizzare il contatto elettrico con il collettore (filo di titanio), viene inserito il filo a mo' di gancio in modo da tenerlo fisso e impedirne lo sfilamento durante le fasi di montaggio.

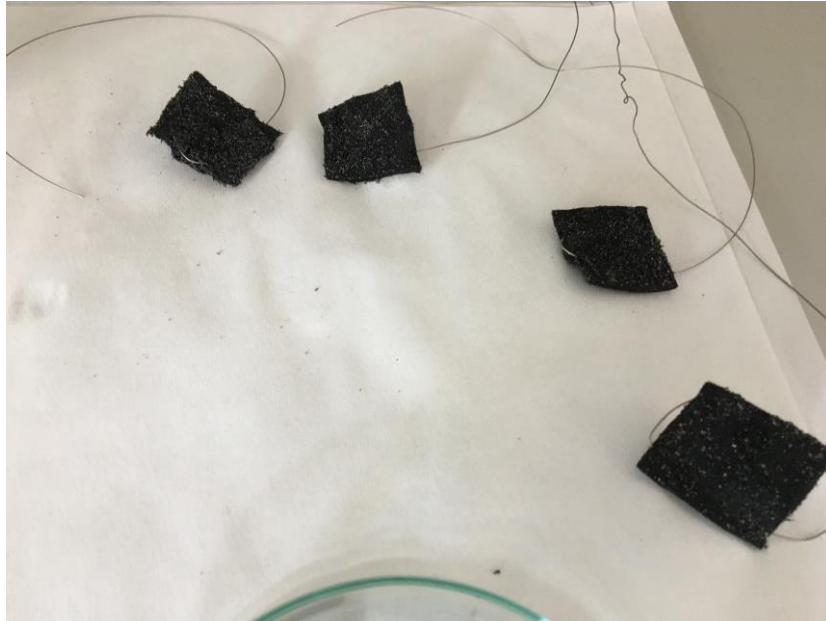


Figura 3.5: Anodi derivanti da una SMFC con filo di titanio inserito nel carbon felt

3.2 L'avviamento delle celle

Prima di passare al montaggio di tutte le componenti mostrate nel paragrafo 3.1 *Configurazione e impostazione delle MFC* si procede alla sterilizzazione dei componenti e del catodo.

La sterilizzazione viene operata tramite irraggiamento UV prodotta dalla cappa biologica di tipo VERTICAL 700 *Laminar Flow*.



Figura 3.6: cappa a flusso laminare [70]

L'irraggiamento viene fatto per almeno 15 minuti per lato e ha lo scopo di prevenire la contaminazione del sistema, e quindi del biofilm anodico, da parte di microrganismi provenienti dall'ambiente, i quali potrebbero attuare delle strategie per ridurre la densità microbologica dei batteri *exoelettrogeni* come quella di competizione o di predazione.



Figura 3.7: Componenti costitutive di quattro MFC *single chamber* durante la sterilizzazione tramite lampada UV in dotazione a una cappa biologica a flusso laminare

La cella viene chiusa elettricamente applicandovi esternamente una resistenza di 1000 Ω , questo valore è tipicamente vicino al valore di resistenza corrispondente all'estrazione di energia massima.

Per quanto riguarda le operazioni di avviamento delle MFC, esse vengono fatte somministrando ripetutamente una soluzione acquosa contenente dell'acetato di sodio come substrato. Tale soluzione viene chiamata terreno. Viene utilizzato acetato di sodio, in quanto esso costituisce un substrato semplice da degradare per i microrganismi. [71]

Il terreno viene utilizzato sia come substrato sia come elettrolita, in quanto possiede dei sali in soluzione, viene preparato con le seguenti specie in soluzione:

Composto Chimico	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

Tabella 3.2: Composizione della soluzione costituente il terreno o anolita

L'effetto dei sali inorganici aggiunti alla soluzione di acetato di sodio è quello di ridurre la resistenza interna del sistema MFC e il potenziale della cella viene incrementato oltre il 40%, come effetto della maggiore attività elettrochimica dovuta dagli *exoelettrogeni* presenti sull'anodo [72]. Essi risultano inoltre essere importanti fonti di azoto e fosforo per i microrganismi.

Per quanto riguarda il cloruro di ammonio, esso viene aggiunto in proporzione massica 0,31:1 rispetto all'acetato di sodio, in quanto favorisce il catabolismo del biofilm anodico.

Il terreno così preparato necessita di esser sterilizzato per evitare di contaminare le celle durante l'iniezione di tale terreno all'interno delle celle. Pertanto si utilizza l'autoclave CertoClav MultiControl (Figura. 3.7) per la sterilizzazione della soluzione. In particolare la sterilizzazione viene condotta a 125 °C per 2 ore.



Figura 3.8: Autoclave CertoClav MultiControl [73]

Una volta sterilizzata la soluzione, prima di riempire le celle con il terreno, ad esso vengono aggiunte l'1% in volume di vitamine in soluzione e l'1% in volume di una soluzione di sali minerali, questo per stimolare il metabolismo dei batteri.

Per introdurre la soluzione così preparata, si utilizza una siringa che preleva la soluzione e viene iniettata in uno dei due tubicini di ingresso nella cella. Una volta che la cella viene riempita di liquido, facendo attenzione a non creare delle bolle di aria all'interno dei compartimenti, vengono bloccati i tubicini con delle clips che non permettono la fuoriuscita del liquido dalle celle, come mostrato nella Figura 3.9

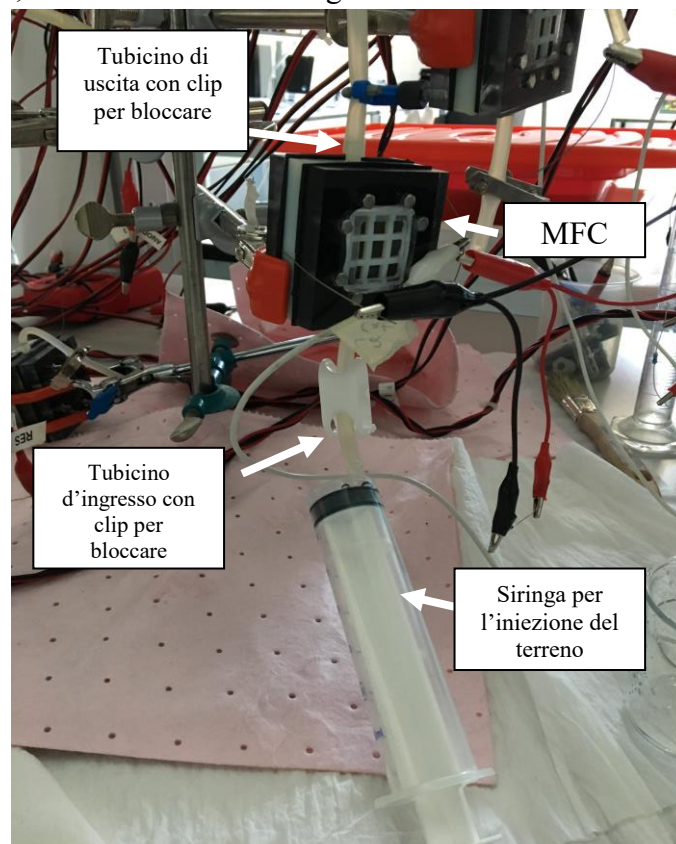


Figura 3.9: Schema della dinamica di un refill

Dato che la soluzione tende ad evaporare attraverso il catodo, ogni 2 o 3 volte a settimana viene aggiunto del terreno, preparato come descritto in precedenza, fino a riempire la cella. Le bolle di aria all'interno della cella corrispondono a perdite energetiche, in quanto i batteri anaerobi facoltativi ossidano l'acetato utilizzando l'ossigeno dell'aria anziché rilasciare elettroni all'anodo.

Le prime settimane viene mantenuta la cella idratata con il terreno. Dopodiché si passa ai cicli batch per l'analisi della potenza utile generata dal sistema MFC.

3.3 La raccolta dei dati

3.3.1 Rendimento energetico

Il sistema, una volta avviato, e quindi aver permesso ai microrganismi di aver sviluppato i meccanismi di simbiosi che caratterizzano il biofilm anodico, viene sottoposto a dei cicli di introduzione di substrato per monitorarne l'andamento della tensione.

Per fare ciò vengono collegate le celle ad un multimetro che ogni 10 minuti effettua la misurazione di differenza di potenziale misurata a cavallo della resistenza esterna applicata.



Figura 3.10: Multimetro Agilent 34972A [74]

Una volta effettuata l'introduzione della soluzione, si attende che l'anodo degradi la soluzione stessa, generando un andamento "a campana" della tensione. Ovviamente questo è un sistema microbiologico, e pertanto caratterizzato da una forte variabilità della popolazione microbiologica anodica, e ciò comporta che i meccanismi di degradazione del substrato possano essere diversi a seconda della cella.

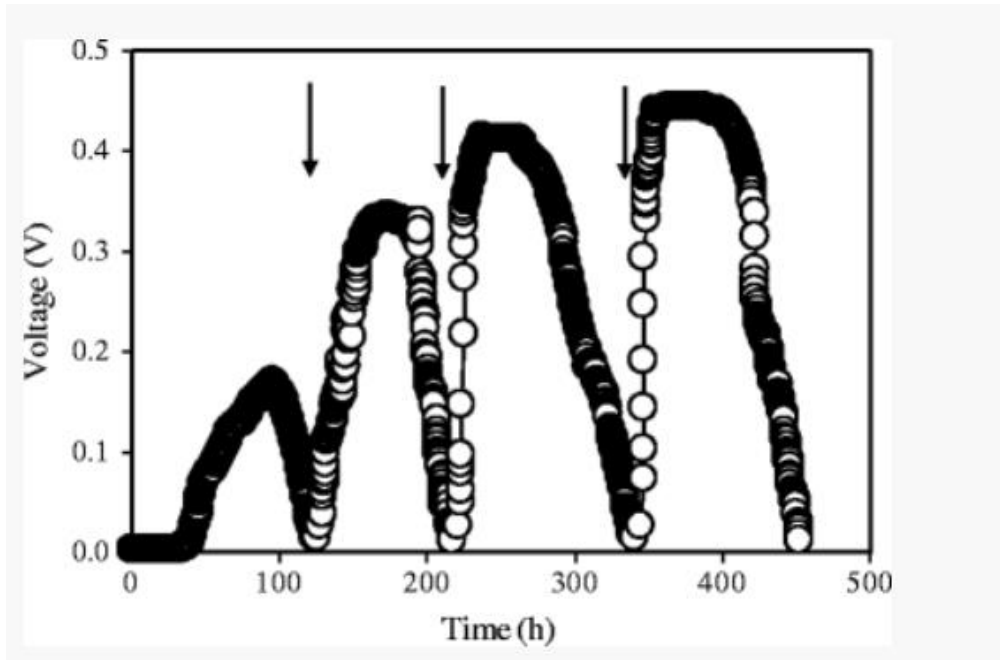


Figura 3.11: Cicli batch di introduzione dello xylosio, le frecce indicano il momento dell'introduzione della soluzione di xylosio [75]

L'andamento atteso della tensione durante i cicli batch è come quello mostrato in Figura 3.11.

Dal grafico tensione-tempo ottenuto si può ricavare il grafico della potenza nel tempo, poiché è noto il carico esterno (corrispondente a 1000Ω). In particolare la potenza può essere ricavata dall'equazione (2.13). Convertito il grafico potenziale vs tempo in potenza vs tempo, è possibile farne l'integrale numerico per ottenere l'energia estratta dalla soluzione di acetato inserita nella cella.

L'integrale della curva potenza vs tempo può essere fatto adottando il metodo dei trapezi:

$$\int_{t_0}^{t_{fin}} P dt \approx \frac{1}{2} \sum_{i=0}^N (P_i + P_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (3.1)$$

P : potenza della MFC valutata con l'Eq. (2.13) [W]

t_0 : tempo iniziale del ciclo [s]

t_{fin} : tempo finale del ciclo [s]

t_i : tempo i -esimo della misura [s]

P_i : potenza misurata nel tempo i -esimo [W]

Che è equivalente ad approssimare la curva ad una serie di trapezi, come mostrato in Figura 3.12:

Metodo dei trapezi

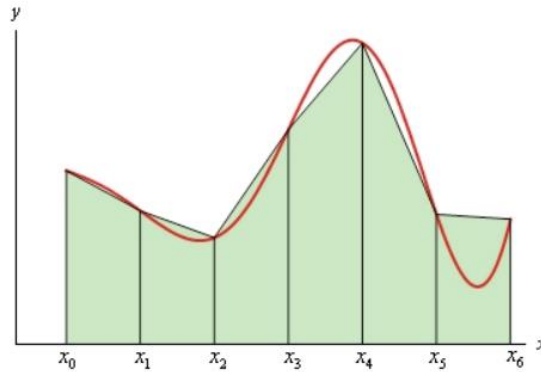
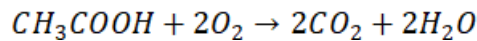


Figura 3.12: Rappresentazione grafica del metodo dei trapezi [76]

Nota l'energia estratta dall'acetato inserito, è possibile ricavarne il rendimento termodinamico della conversione di acetato, secondo la formula (2.25). La variazione di energia libera dell'acetato si riferisce alla reazione di combustione dell'acetato:



Dove ΔG^0 è valutato secondo la ben nota formula della termodinamica:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3.2)$$

ΔH^0 : variazione di entalpia di combustione dell'acido acetico in condizioni standard [J mol^{-1}]

ΔS^0 : variazione di entropia di combustione dell'acido acetico in condizioni standard [$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$]

T: temperatura assoluta [K]

Per le condizioni di lavoro le condizioni standard sono adatte.

Sapendo che i valori termodinamici su citati sono:

Composto chimico	$\Delta_f H^0$ [kJ mol^{-1}]	S^0 [$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$]
Acido acetico	-483,5	158,0
O_2	0	205,0
CO_2	-393,5	213,8
H_2O	-292,7	69,9

Tabella 3.3: Valori di entalpie standard di formazione e entropia standard dei composti coinvolti nella reazione di combustione dell'acido acetico

Applicando la (3.2) otteniamo che ΔG^0 è pari a $-888,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Possiamo pertanto trovare il rendimento energetico conoscendo che il volume di terreno inserito nelle MFC è pari a 15 mL.

Da queste misure è possibile anche calcolare l'efficienza coulombica, calcolabile numericamente con il metodo dei trapezi dalla formula (2.24).

3.3.2 La curva di polarizzazione

Per generare la curva di polarizzazione delle celle MFC, viene impiegato il potenziostato BioLogic VSP in modo da fare una *Linear Sweep Voltammetry* (LSV).

La tecnica della LSV consiste nell'applicazione di una resistenza variabile generata dallo strumento alle celle, in modo da variarne la tensione. Infatti la tensione massima in una MFC è ottenuta quando il circuito viene lasciato aperto, in quanto gli elettroni generati dall'ossidazione dell'acetato si accumulano all'anodo. Chiudendo il circuito si ottiene una tensione tanto più bassa quanto è più bassa la resistenza applicata.



Figura 3.13: BioLogic VSP [77]

La LSV è equivalente all'applicare diverse resistenze ai capi delle MFC e misurarne la corrente generata, ma attraverso il potenziostato è possibile evitare l'applicazione manuale delle resistenze, applicando invece diversi valori di tensione. Il sistema infatti applica differenze di potenziale con una velocità controllata e registra la corrispondente corrente. Una volta applicata un'erta caduta di potenziale i microrganismi si adatteranno alle nuove condizioni di lavoro (equivalenti ad un'altra resistenza esterna applicata) e pertanto è importante impostare una velocità di scansione sufficientemente bassa in modo tale da permettere ai microrganismi di rispondere alle variazioni di potenziale generate. Per garantire che i microrganismi rispondano adeguatamente raggiungendo il nuovo stato stazionario a fronte della variazione di potenziale applicata, viene impostata una variazione di potenziale lineare pari a 0,1 mV/s.

La LSV parte dal valore di OCV della cella, pertanto le MFC vengono poste in circuito aperto prima dell'analisi. E viene monitorato l'andamento dell'OCV in modo che la cella raggiunga un potenziale sufficientemente stabile da poter essere considerato in condizioni di stazionarie. La cella viene analizzata dopo qualche ora dal *refill* con terreno a base di acetato di sodio, in modo da garantire che essa si trovi in condizioni simili alle condizioni ambientali di lavoro, ovvero in presenza di un substrato naturalmente presente in natura fungente da substrato per i microrganismi.

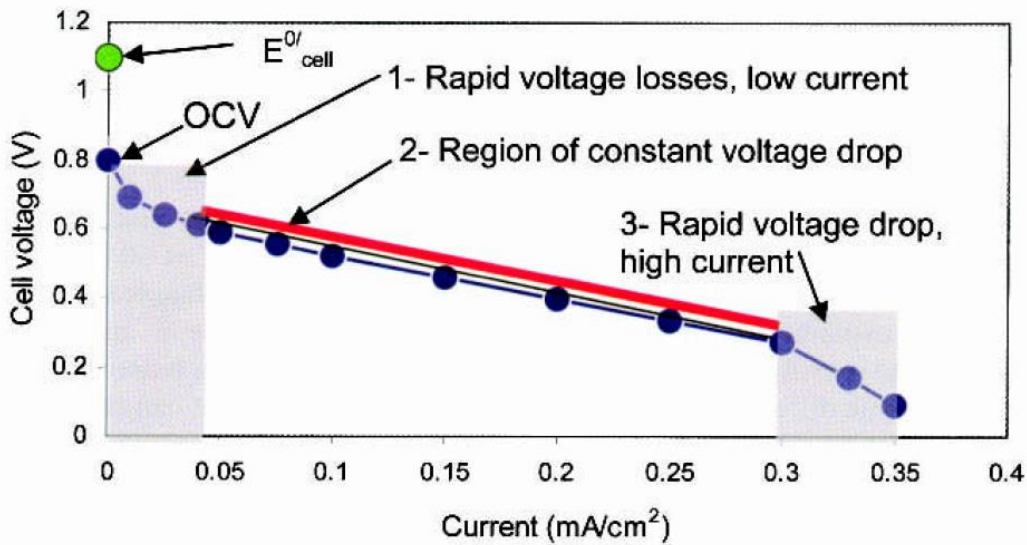


Figura 3.14: Rappresentazione della curva di polarizzazione di una MFC [1]

La curva di polarizzazione mostra la corrente prodotta dal sistema MFC al variare della tensione di cella. La curva di polarizzazione è l'output di una LSV.

La curva può essere divisa in tre regioni:

- La regione della rapida riduzione di tensione: quando il sistema è a circuito aperto non passa corrente elettrica, corrispondente all'OCV. Ma appena il circuito viene chiuso con alte resistenze, ovvero a bassi valori di intensità di corrente, si ha una rapida decrescita del valore di tensione;
- La regione a decrescita costante della tensione: in questa zona si ha il comportamento lineare tra decrescita di tensione e intensità di corrente. La pendenza di questa zona corrisponde alla somma delle resistenze interne presenti nel circuito. Prolungando tale zona verso l'asse del potenziale si ottiene un valore di tensione chiamato OCV*. Da questo valore è possibile ottenere l'equazione linearizzata della curva di polarizzazione:

$$E_{emf} = OCV^* - R_{int}I \quad (3.3)$$

- La regione della veloce riduzione della tensione di cella: in questa zona la resistenza esterna è molto bassa, fino a diventare nulla (condizioni di cortocircuito) e la tensione decresce rapidamente.

Queste aree hanno comportamento diverso in quanto la tensione di cella è definito da diversi fenomeni che avvengono in serie. Infatti il potenziale di una MFC può essere definito come:

$$E_{emf} = E^0 - (\Sigma OP_{An} - |OP_{cat}| + I R_{ohm}) \quad (3.4)$$

OP_{An} : sovratensione anodica [V];

OP_{cat} : sovratensione catodica [V];

R_{ohm} : resistenze ohmiche del circuito.

Le sovratensioni agli elettrodi sono maggiormente visibili nella zona iniziale della curva di polarizzazione, laddove si ha bassa densità di corrente e veloce riduzione di tensione [1].

Queste sovratensioni derivano da diversi meccanismi. Tali meccanismi diventano prevalenti in varie regioni della curva di polarizzazione e ciò implica che le sovratensioni sono variabili con la densità di corrente del circuito, e pertanto sono i responsabili delle aree non lineari della curva di polarizzazione. I meccanismi sono dovuti a:

- Perdite di attivazione: dovute alle reazioni di ossidazione/riduzione agli elettrodi, ma anche al trasferimento degli elettroni dalle proteine cellulari della membrana all'elettrodo. Questo tipo di perdite sono tipiche per tipo di batterio *exoelettrogeno* scelto, in quanto varia il meccanismo di trasferimento elettronico dalla cellula all'elettrodo. Le perdite di attivazione sono causate dalla lenta cinetica di trasferimento elettronico, che causa quindi un accumulo di cariche positive sull'anodo e un accumulo di anioni nella zona del liquido a contatto con l'anodo. Questo doppio strato, che possiede una differenza di potenziale e che riduce la tensione complessiva della cella di un valore pari alla sua differenza di potenziale, si chiama appunto perdita di attivazione. Tali perdite sono prevalenti a bassi valori di corrente. Per ridurre questo tipo di perdite bisognerebbe adottare dei materiali anodici che hanno una bassa resistenza, oppure utilizzare batteri con una resistenza intrinseca di trasferimento elettronico bassa o anche utilizzare un catalizzatore altamente performante al catodo in modo da favorire il passaggio degli elettroni verso il catodo.
- Perdite di concentrazione o di *mass transfer*: queste perdite sono originate dall'accumulo di specie ad un elettrodo o da una mancanza di specie. Ciò si genera quando si ha un flusso insufficiente di reagenti o di prodotti verso gli elettrodi. Dovuto dal fatto che si ha una velocità di degradazione del substrato sull'anodo, una velocità di produzione di sostanze ossidate e di diffusione delle specie all'interno del biofilm, può accadere che si generi l'accumulo o la mancanza delle specie agli elettrodi. Ciò varia il potenziale di elettrodo in accordo all'equazione di Nernst. A livello dell'anodo si ha che il substrato diffonde nel biofilm per essere ossidato, e di contro le sostanze ossidate diffondono verso il liquido, ma questo processo di diffusione essendo lento crea un gradiente di sostanze ossidate e di protoni sull'anodo. Ciò produce un aumento della tensione anodica. In maniera analoga accade oppostamente al catodo, dove il potenziale diminuisce. L'accumulo di protoni, per esempio, è un problema per i microrganismi in quanto varia il pH della soluzione e questo può rallentare di molto la reazione, come mostrato dal grafico presente in Figura 3.15:

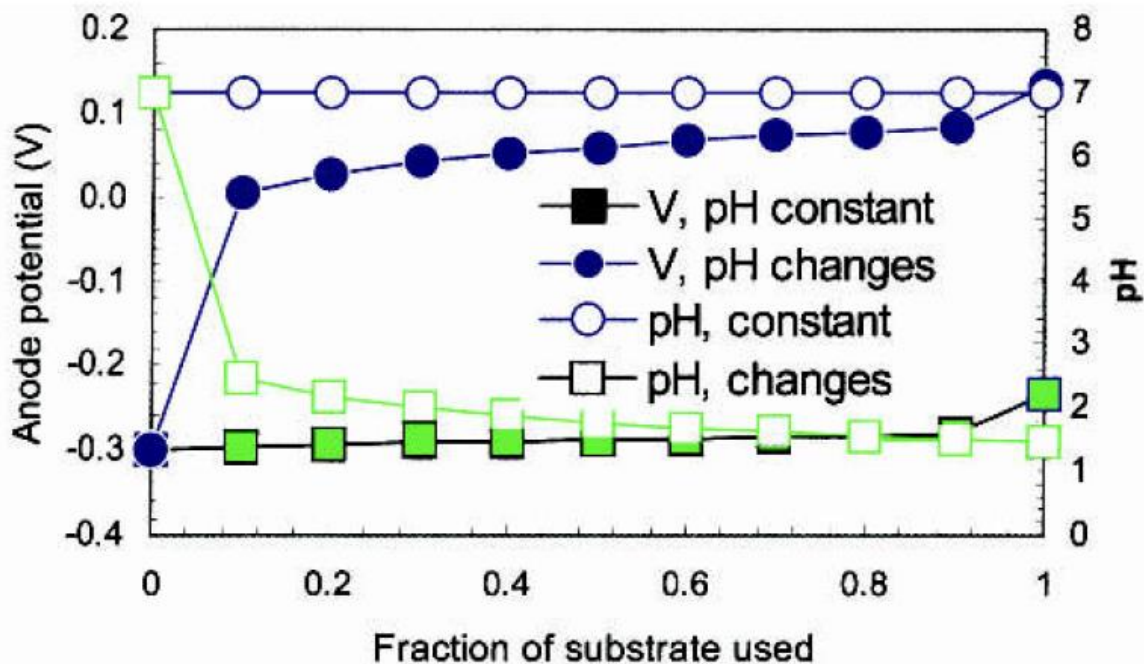


Figura 3.15: Effetto del pH sulla tensione anodica di una MFC [1]

Per limitare questo effetto può essere scelto di utilizzare una soluzione tampone per garantire la neutralità della soluzione.

- Perdite dovute al metabolismo dei batteri: questo genere di perdite è dovuto ai processi metabolici di ossidazione di substrato da parte dei microrganismi presenti nel biofilm anodico. La perdita causata dal metabolismo dei microrganismi dipende strettamente dal tipo di microrganismi presenti nel consorzio microbiologico e dalla concentrazione stessa dei batteri *exoelettrogeni*. Per ridurre il più possibile questo fenomeno è necessario garantire la presenza di un biofilm denso di microrganismi, cercando di tenerlo sottile in modo da ridurre le perdite di diffusione. Ne risulta fondamentale la scelta del materiale anodico, il quale deve garantire un'alta superficie specifica per l'addensamento della colonia microbiologica e deve essere tale da favorire l'insediamento dei batteri e facilitarne il passaggio degli elettroni attraverso l'anodo.
- Perdite ohmiche: queste risultano essere le perdite più importanti per una MFC, e si riferiscono sia alla conduzione dei protoni attraverso l'elettrolita e l'eventuale membrana di scambio protonico, sia alla resistenza al trasferimento degli elettroni nei punti di contatto tra materiali o fasi. Ne risulta che la configurazione della MFC è fondamentale per ridurre questo tipo di resistenze, motivo per cui viene adottata una *single-chamber* MFC per non avere la perdita ohmica causata dalla membrana. Inoltre queste perdite possono essere ridotte riducendo lo spazio intercorrente tra i due elettrodi e aumentando la conducibilità dell'elettrolita, per esempio introducendo sali e aumentandone il potere tamponante [1].

3.3.4 Protocollo di esposizione al toluene e metodi di analisi dei dati

Viene scelto di operare con toluene, testato a diverse concentrazioni via via crescenti fino ad avvicinarci alla concentrazione pari al limite di legge per l'acqua potabile secondo l'EPA pari a 1000 µg/L [18]. Si sceglie di lavorare a concentrazioni crescenti per evitare che già la prima

concentrazione possa avere un effetto tossico tale da uccidere i batteri, impendendo l'indagine di altre concentrazioni.

In letteratura sono presenti diversi studi sulle concentrazioni tollerate dai batteri. Si evince che vi è un ampio spettro di possibili valori soglia di tolleranza in accordo con il tipo di microrganismo. Per esempio un valore tipico di IC50 (ovvero la concentrazione che mostra un'inibizione del 50% della popolazione microbiologica testata) di toluene è pari a circa 140 mg/L di toluene [78], mentre altri batteri riescono a resistere a soluzioni concentrate di toluene, come per lo *Pseudomonas putida* [79].

La procedura prevede di introdurre una soluzione di toluene disciolto nel terreno anodico a base di una soluzione di acetato di sodio nelle celle, e monitorare l'andamento della tensione nel tempo. Il toluene viene disciolto nella stessa soluzione utilizzata precedentemente per i *refill* in modo da evidenziare le variazioni nei parametri descritti nel capitolo 2.4 *Le performance di una MFC* rispetto alle condizioni in ambiente privo di *toxicant*.

Le concentrazioni di toluene studiate sono riportate nella Tabella 3.4:

Numero progressivo prova	Concentrazione di toluene [ppm]
1	0,05
2	0,1
3	0,2
4	0,4
5	0,6

Tabella 3.4: Concentrazioni in ppm (mg L⁻¹) di toluene testate

Dalle misurazioni di tensione è possibile trovare il grafico corrente-tempo, utilizzando la legge di Ohm, e da questi ultimi valori possiamo ricavare l'efficienza coulombica dei sensori MFC quando sono posti in ambiente tossico. Dato che l'efficienza coulombica si calcola dalla formula (2.24), è richiesta la risoluzione numerica dell'integrale per trovare la carica estratta dal substrato. Anche in questo caso può essere utilizzata la formula dei trapezi analogamente a quanto fatto per il calcolo dell'energia estratta dal substrato con l'equazione (3.1).

$$\int_{t_0}^{t_{fin}} I dt \approx \frac{1}{2} \sum_{i=0}^N (I_i + I_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (3.14)$$

Conoscendo il volume di acetato introdotto nella cella, pari a 15mL, è possibile ricavare l'efficienza coulombica dalla (2.24).

Ottenuti i risultati delle efficienze coulombiche sia in condizioni prive di analita, sia in presenza dell'analita, si valuta il tasso di inibizione da toluene, come differenza relativa dell'efficienza coulombica, indicata nell'equazione (2.27).

4. Analisi dei dati

In questo capitolo vengono mostrati i risultati degli esperimenti condotti in laboratorio e vengono analizzati i dati ottenuti in modo da poter avanzare una prima discussione sul funzionamento del sistema MFC come sensore di toluene. L'esperimento è stato condotto su tre celle indipendenti identificate dalle sigle MFC1, MFC2 e MFC3. Per facilitare la comprensione dei risultati ottenuti vengono mostrati in questo capitolo i grafici relativi alle misure condotte sulla cella MFC1, mentre i grafici corrispondenti alle misurazioni fatte sulle altre celle vengono riportati in appendice.

Verranno inoltre calcolati e discussi i principali parametri utili per analizzare la risposta delle *MFC-based biosensors*.

4.1 L'andamento della tensione e della corrente nel tempo

Le MFC, dopo essere state montate, sono state alimentate ripetutamente con un terreno a base di una soluzione acquosa di acetato di sodio 1 g/L, come indicato nella sezione 3.2 *L'avviamento delle celle*, e, in ogni ciclo *batch*, è stato possibile visionare la degradazione completa del substrato monitorando la tensione ai capi della cella nel tempo.

Nell'ambito della somministrazione ripetuta di substrato, è possibile distinguere l'andamento della tensione in due fasi temporali, la prima è la **fase di stabilizzazione del segnale**, in cui il biofilm si adatta alle condizioni ambientali della cella e il suo potenziale raggiunge un plateau, corrispondente al segnale di tensione di equilibrio della cella; e la **fase di replica**, in cui il segnale oscilla un po' attorno al valore di plateau. L'andamento della tensione registrata per la cella MFC1 nel tempo è presentato nel grafico mostrato in Figura 4.1:

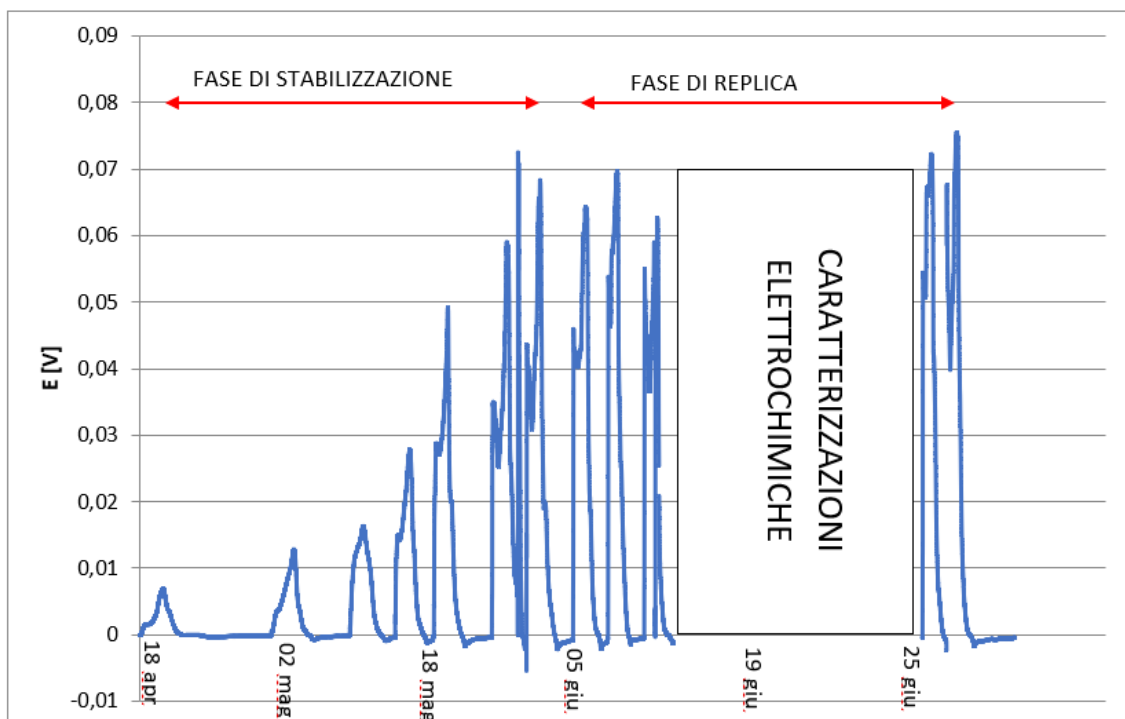


Figura 4.1: Andamento della tensione della MFC1, con evidenziate le fasi di stabilizzazione del segnale e di replica

Il grafico in Figura 4.1 permette di apprezzare un andamento ciclico della tensione, attraverso la presenza di una successione di picchi. Questi picchi sono dovuti alla modalità di alimentazione della soluzione contenente acetato di sodio durante l'esperimento, ed evidenzia le tempistiche della degradazione ossidativa dell'acetato di sodio prodotta dai microrganismi. Per meglio evidenziare la correlazione tra la struttura e forma del grafico e i refill condotti nella cella nel grafico in Figura 4.2 sono stati evidenziati attraverso delle frecce rosse i momenti di introduzione delle nuove soluzioni nella cella.

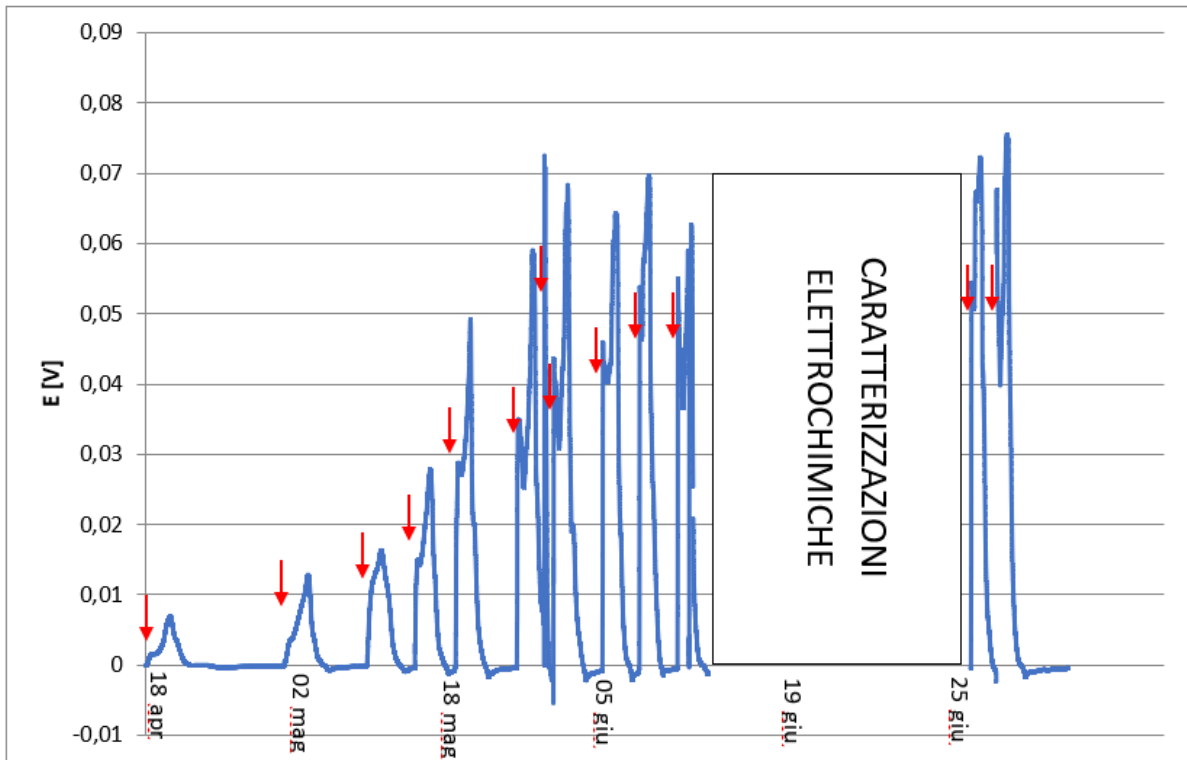


Figura 4.2: Andamento della tensione della cella MFC1. Le frecce rosse indicano i momenti in cui sono stati fatti i refill, come descritto nella sezione 3.2 *L'avviamento delle celle*

La tensione generata durante i cicli ripetuti di somministrazione del terreno segue la fase di crescita del massimo di tensione fino al raggiungimento di un plateau dopo diversi refill. Il plateau corrisponde al raggiungimento della fase di stabilizzazione del biofilm sulla superficie anodica, con lo stabilirsi di una condizione di equilibrio tra ambiente e biofilm stesso. I refill successivi sono stati condotti per analizzare e garantire una buona ripetibilità dell'andamento della tensione nel tempo.

Nelle Figure 4.1 e 4.2 viene evidenziato un intervallo di tempo durante il quale non vi è stata l'acquisizione della tensione in tempo reale, questo perché si è provveduto in tale fase a realizzare le misure di caratterizzazione elettrochimica delle celle mediante la tecnica LSV. Queste caratterizzazioni possono essere una fonte di disturbo nel funzionamento delle MFC, infatti richiedono l'apertura del circuito esterno e la stabilizzazione della corrispondente tensione di OCV e la successiva applicazione di potenziali non di equilibrio nelle celle, che possono arrecare disturbi al metabolismo dei microrganismi, i quali spesso necessitano di tempo per ritornare nella fase di replica. Tuttavia nella cella MFC1 non si evidenzia un disturbo causato dalle caratterizzazioni elettrochimica.

È possibile ricavare le tensioni medie di oscillazione delle varie celle durante la fase di replica:

Cella	Tensione media di oscillazione [mV]
MFC1	58
MFC2	60
MFC3	16

Tabella 4.1: Potenziali medi di oscillazione dei plateau delle celle MFC1, MFC2, MFC3

Come è possibile apprezzare dalla Tabella 4.1, il valore dei potenziali può essere abbastanza variabile da cella a cella, in quanto, sebbene gli inoculi provenissero tutti dallo stesso sedimento marino, la popolazione microbiologica che si instaura a livello del biofilm può essere più o meno ricca di batteri *exoelettrogeni*, in base a fattori esterni e interni del sistema.

4.2 La Linear Sweep Voltammetry

È stata eseguita la LSV su tutte le celle e i risultati ottenuti sono i classici grafici tensione-corrente dai quali è possibile ottenere il grafico della potenza-corrente. Da quest'ultimo grafico possiamo individuare la resistenza elettrica esterna che è possibile applicare per chiudere il circuito in modo da spingere la cella a lavorare al massimo di prestazioni in termini di energia prodotta.

Il grafico ottenuto per la cella MFC1 è il seguente:

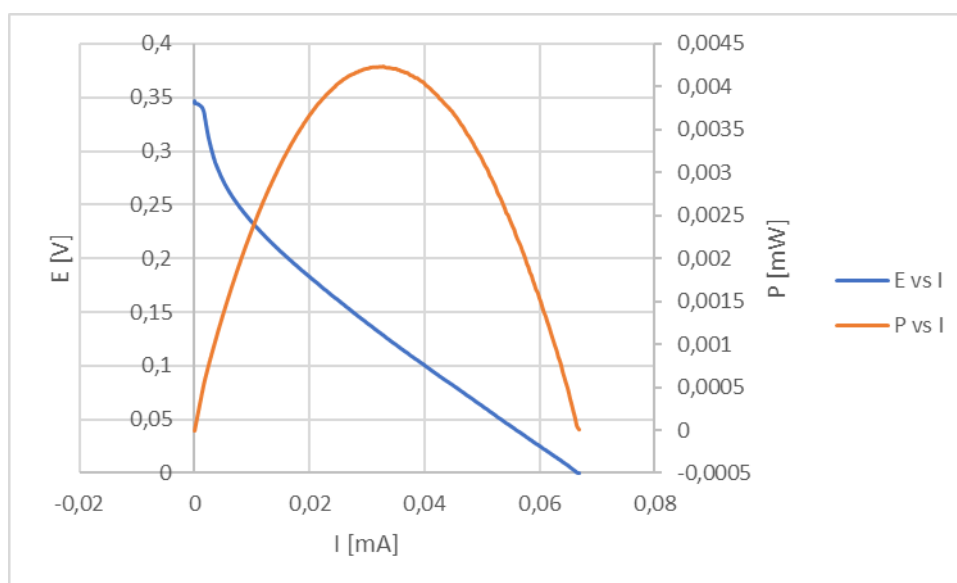


Figura 4.3: Curva tensione-corrente (curva in blu) ottenuta dalla tecnica LSV per la cella MFC1 e curva tensione-corrente (curva arancione) derivata dalla curva tensione-corrente per la MFC1.

Dal grafico di Figura 4.3 possiamo trovare sia la tensione di OCV (l'asse delle ordinate del presente grafico) sia i valori di resistenza interna e di resistenza esterna che massimizzi la produzione di energia elettrica.

Cella	OCV [V]	R _{MAX} [Ω]	R _{INT} [Ω]
MFC1	0,347	3925	4635
MFC2	0,630	1815	1627
MFC3	0,671	4564	5335

Tabella 4.2: valori di OCV per le MFC testate. Valori di resistenze corrispondenti alla potenza massima per le MFC testate (R_{MAX}). Valore della pendenza del tratto lineare della curva tensione -corrente per le MFC testate (R_{INT}).

Per le MFC diverse dalla MFC1 la curva tensione-corrente aveva due pendenze, e quindi generava due picchi di potenza. Questo può essere dovuto dal fatto che il tasso di scansione (pari a 0,1 mV/s) potrebbe essere troppo veloce e non garantire alle celle il tempo necessario per adattarsi alle nuove condizioni di tensione. Pertanto per trovare la resistenza che produce la potenza massima e la resistenza interna della cella, si è utilizzato il valore lineare corrispondente a potenziali più bassi, poiché si suppone che i batteri siano in grado di sostenere più facilmente una differenza di potenziale inferiore.

Come discusso nel paragrafo “2.4.1 La potenza elettrica”, il massimo di potenza dovrebbe ottenersi per resistenza interna uguale alla resistenza esterna. Vediamo dai dati che si ha una relativa vicinanza tra i due valori di resistenza, considerato che la resistenza interna del sistema reale varia con la tensione.

4.3 L'andamento della corrente nei sistemi esposti al toluene

Nel sistema MFC utilizzato come sistema sensore è preferibile presentare i risultati in termini di corrente. La corrente nel tempo è possibile ottenerla dalla legge di Ohm, sapendo che la resistenza esterna applicata è pari a 1000 Ω, la corrente risultante è mostrata per la cella MFC1 in Figura 4.4.

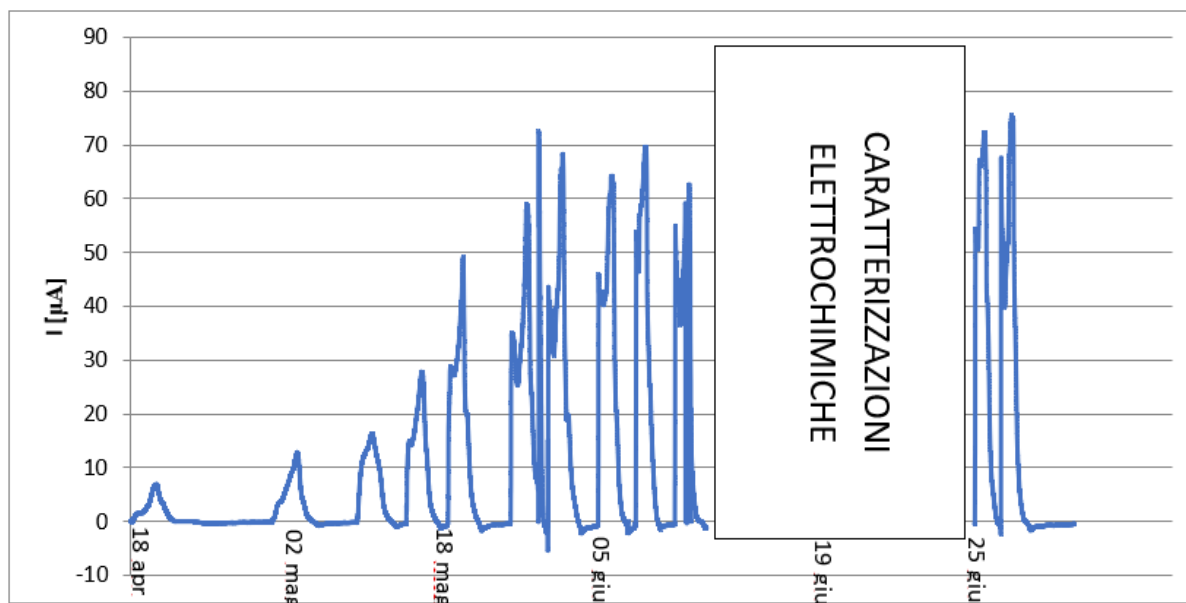


Figura 4.4: Andamento della corrente nel tempo della cella MFC1 in condizioni atossiche

L'andamento della corrente durante i cicli batch è stato monitorato sia in assenza che di presenza di toluene in modo da analizzare il comportamento del sistema sensore. In particolare, si valuta la corrente come intensità di corrente mediata sull'area del grafico corrente-tempo compresa tra l'intensità di corrente massima e il 70% di questo valore massimo, in modo da rendere trascurabili eventuali *spike*, come mostrato in Figura 4.5 per un picco esemplificativo. L'equazione (4.1) descrive il calcolo condotto per valutare la corrente media utilizzata nei calcoli del sensore.

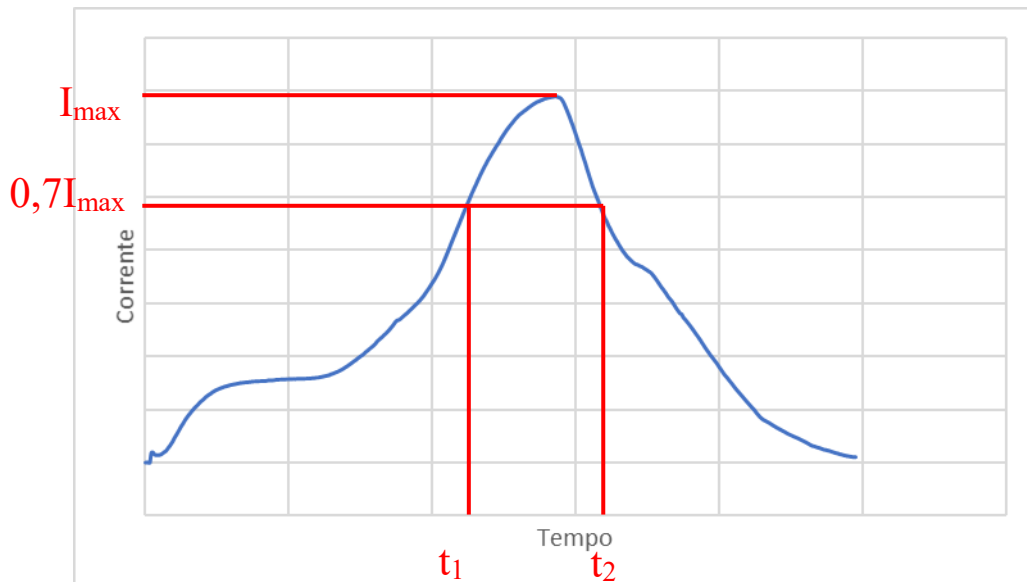


Figura 4.5: Individuazione della corrente massima e del 70% della corrente massima, e evidenziazione dell'intervallo di tempo in cui si ottiene questo picco durante un ciclo batch

$$\bar{I} = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} I dt \quad (4.1)$$

Dal grafico presente nella seguente Figura 4.6 è possibile apprezzare la differenza tra i picchi ottenuti con l'aggiunta di toluene, contrassegnati con la concentrazione di toluene inserita, e i due picchi iniziali, ottenuti in assenza di condizioni tossiche. Prima dell'introduzione di toluene si è atteso qualche giorno in modo da stabilizzare a zero la corrente in uscita.

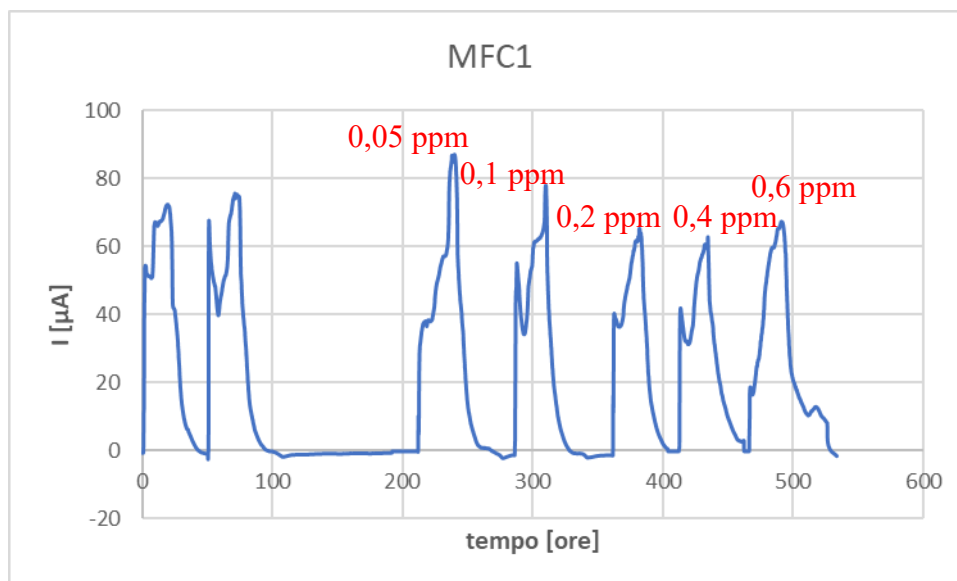


Figura 4.6: Andamento della corrente nella MFC1. I primi due picchi rappresentati sono i cicli batch effettuati in assenza di toluene. Gli ultimi picchi sulla destra si riferiscono alle somministrazioni di terreno contenente toluene (si faccia riferimento alle concentrazioni segnate in rosso per il toluene)

I valori di corrente media nel tempo sono indicati nella Tabella 4.3.

	0 ppm toluene	0,05 ppm toluene	0,1 ppm toluene	0,2 ppm toluene	0,4 ppm toluene	0,6 ppm toluene
Cella	\bar{I} [µA]	\bar{I} [µA]	\bar{I} [µA]	\bar{I} [µA]	\bar{I} [µA]	\bar{I} [µA]
MFC1	63,3	81,6	63,7	56,6	55,1	59,9
MFC2	59,0	55,1	62,6	57,8	69,2	76,1
MFC3	85,7	99,5	114,3	123,8	74,9	81,2

Tabella 4.3: Corrente media calcolata sia quando le MFC sono a contatto con toluene sia quando non sono in ambiente tossico.

È possibile notare che in generale la corrente media tende ad aumentare con la concentrazione per i valori più bassi di toluene. Questo comportamento potrebbe essere spiegato dal fatto che il toluene possa aver interagito con il biofilm che in sistemi MFC a camera singola si forma spontaneamente sul catodo limitando l'efficacia della catalisi [80] ma senza intaccare significativamente il biofilm anodico.

In Figura 4.7 viene proposto il grafico che riporta in ordinata la corrente media ottenuta come media delle tre celle alle varie concentrazioni di toluene. La trattazione del valore medio dei dati ottenuto dalle tre celle dell'esperimento è funzionale allo studio del comportamento dell'intero set di celle, intese come repliche nel contesto dell'esperimento, in modo da avere maggiore rappresentatività della risposta del sistema microbiologico.

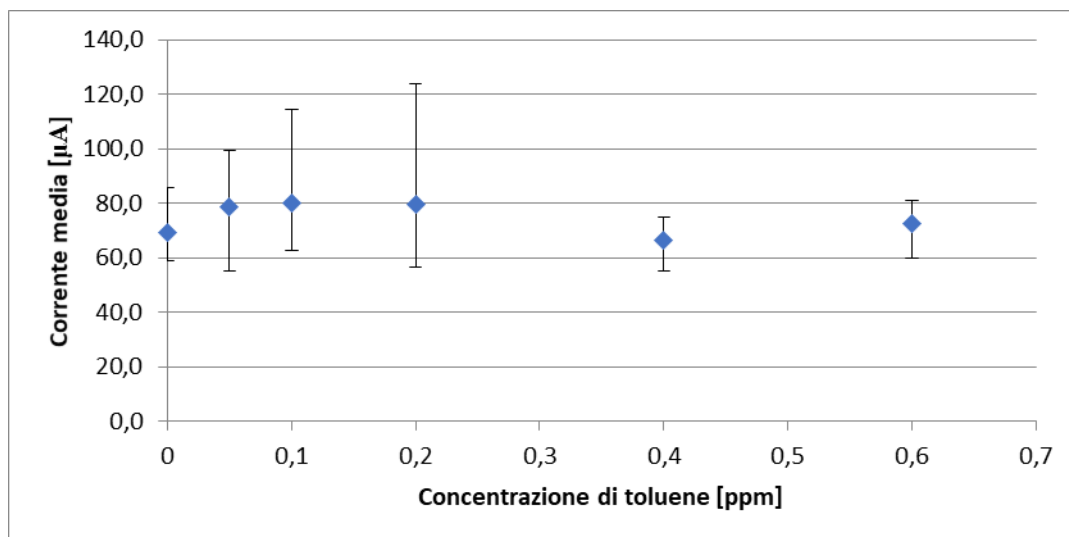


Figura 4.7: Andamento della corrente media ottenuta come media delle celle MFC1, MFC2, MFC3 per ogni concentrazione di toluene testata. Sono evidenziate le barre di errore.

Dalla Figura 4.7 si evince che la corrente tende ad aumentare a bassi valori di concentrazione, ma anche che la corrente non può essere un parametro identificativo dell' concentrazione di toluene nell'intervallo di concentrazioni sperimentato, in quanto non è possibile osservare una variazione significativa di questo parametro al variare del quantitativo di toluene introdotto.

4.4 Il tempo di risposta

Dai picchi di tensione è possibile ricavare i tempi di risposta delle varie celle alla presenza di acetato, sia in condizioni atossiche sia in presenza di toluene. Il tempo di risposta viene valutato in due modi: come il tempo che il sistema MFC impiega dall'iniezione del terreno a tornare allo zero di tensione (o di corrente), di seguito indicato come t_{TOT} , e come il tempo che impiega a raggiungere il valore massimo di tensione (o di corrente), indicato invece come t_{MAX} . Il tempo di risposta in condizioni atossiche viene valutato come media dei tempi di risposta ottenuti sugli ultimi due picchi di refill della fase di replica.

Cella	0 ppm toluene		0,05 ppm toluene		0,1 ppm toluene		0,2 ppm toluene		0,4 ppm toluene		0,6 ppm toluene	
	t_{MAX} [ore]	t_{TOT} [ore]	t_{MAX} [ore]	t_{TOT} [ore]	t_{MAX} [ore]	t_{TOT} [ore]	t_{MAX} [ore]	t_{TOT} [ore]	t_{MAX} [ore]	t_{TOT} [ore]	t_{MAX} [ore]	t_{TOT} [ore]
MFC1	27	51	28	55	24	42	24	40	20	40	25	63
MFC2	18	39	24	52	19	43	18	42	17	50	17	59
MFC3	17	35	13	26	17	34	1,2	11	20	51	18	32

Tabella 4.4: Tempi di risposta per completare un ciclo batch (t_{TOT}) e per arrivare al massimo di tensione o di corrente (t_{MAX}) per le diverse celle, sia in condizioni atossiche sia in presenza di toluene.

I valori t_{MAX} vengono anche riportati in un grafico (Figura 4.8) che ne evidenzia l'andamento medio al variare della concentrazione di toluene:

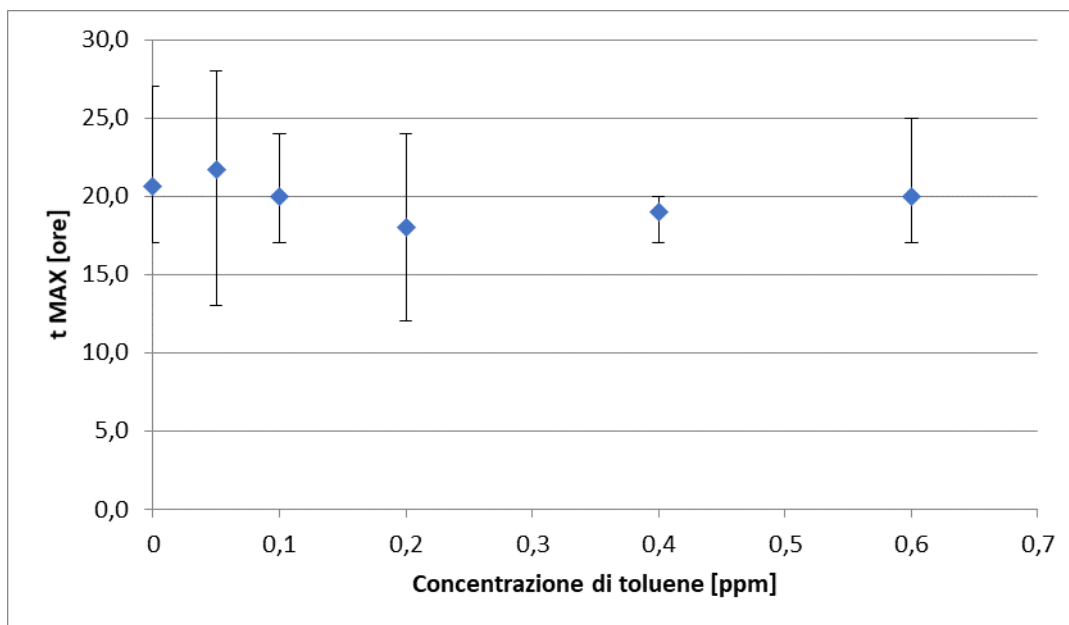


Figura 4.8: Andamento del tempo di risposta t_{MAX} mediato per le celle MFC1 MFC2 e MFC3 per ogni valore di concentrazione di toluene testata. Sono evidenziate le barre d'errore.

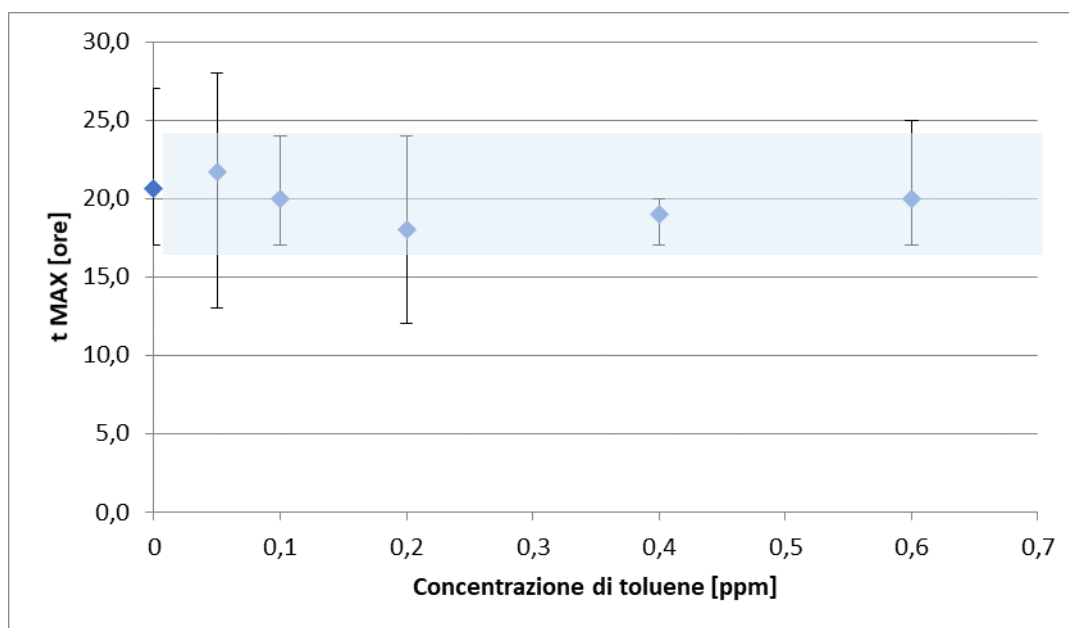


Figura 4.9: Andamento del tempo di risposta t_{MAX} mediato per le celle MFC1 MFC2 e MFC3 per ogni valore di concentrazione di toluene testata. Sono evidenziate le barre d'errore e un riquadro che indica il $\pm 20\%$ del valore ottenuto in assenza di *toxicant*

Dal grafico mostrato in Figura 4.9 si evince che il tempo di risposta tende ad essere abbastanza omogeneo attorno ad un valore medio, questo ci impedisce l'utilizzo del tempo di risposta come un parametro possibile per correlare la risposta delle MFC alla presenza di toluene nell'intervallo di concentrazione esaminato.

4.5 L'efficienza di conversione e l'efficienza coulombica

Per ricavare l'efficienza di conversione dell'acetato di sodio in un ciclo batch si deve convertire il grafico presente in Figura 4.1 che mostra l'andamento della tensione nel tempo in un grafico che mostri l'andamento della potenza elettrica (calcolata con l'equazione (2.13)) nel tempo e farne l'integrale numerico tramite il metodo dei trapezi. Ciò può essere facilmente fatto conoscendo che la resistenza esterna applicata al circuito esterno delle celle è pari a 1 k Ω .

	0 ppm toluene		0,05 ppm toluene		0,1 ppm toluene	
Cella	Energia di conversione [J]	η_{MFC} [%]	Energia di conversione [J]	η_{MFC} [%]	Energia di conversione [J]	η_{MFC} [%]
MFC1	0,35	0,22	0,38	0,24	0,29	0,18
MFC2	0,30	0,18	0,24	0,14	0,28	0,18
MFC3	0,50	0,31	0,53	0,33	0,47	0,29
	0,2 ppm toluene		0,4 ppm toluene		0,6 ppm toluene	
Cella	Energia di conversione [J]	η_{MFC} [%]	Energia di conversione [J]	η_{MFC} [%]	Energia di conversione [J]	η_{MFC} [%]
MFC1	0,23	0,14	0,21	0,14	0,28	0,17
MFC2	0,23	0,14	0,31	0,19	0,40	0,24
MFC3	0,29	0,18	0,24	0,15	0,29	0,18

Tabella 4.5: Valore dell'energia estratta in un ciclo batch per ogni cella, e rendimento di conversione dell'acetato (η_{MFC}). Valori valutati sia in presenza sia in assenza di toluene.

I valori ottenuti in assenza di toluene sono ricavati come medie delle energie estratte con gli ultimi cicli batch della fase di replica.

Il rendimento termodinamico è ricavato dalla formula (2.25), sapendo che in ogni ciclo batch vengono introdotti 15 mL di terreno anodico contenente 1 g/L di acetato di sodio.

Da questi valori si evince che le potenze di estrazione di energia dall'acetato sono molto basse, ciò può essere dovuto al fatto che nel biofilm sono presenti altri microrganismi in grado di degradare acetato oltre agli *exoelettrogeni*, arrecando una perdita di sistema. Inoltre la mancanza di una membrana che separa il comparto anodico da quello catodico permette la diffusione dell'ossigeno nella soluzione con perdita di resa di conversione di acetato in energia elettrica. Dai valori di potenza si può vedere che per 0,05 ppm di toluene spesso si è avuto un miglioramento della conversione. Forse potrebbe essere spiegato dal fatto che a basse concentrazioni di toluene il biofilm catodico viene intossicato dal toluene mentre il biofilm anodico, più densamente popolato di quello catodico è in grado di mettere in atto dei meccanismi di difesa per contrastare questa bassa concentrazione di toluene.

Viene proposto il grafico che mostra il valore dell'energia estratta in presenza di toluene mediata sulle celle MFC1, MFC2, MFC3 (Figura 4.10):

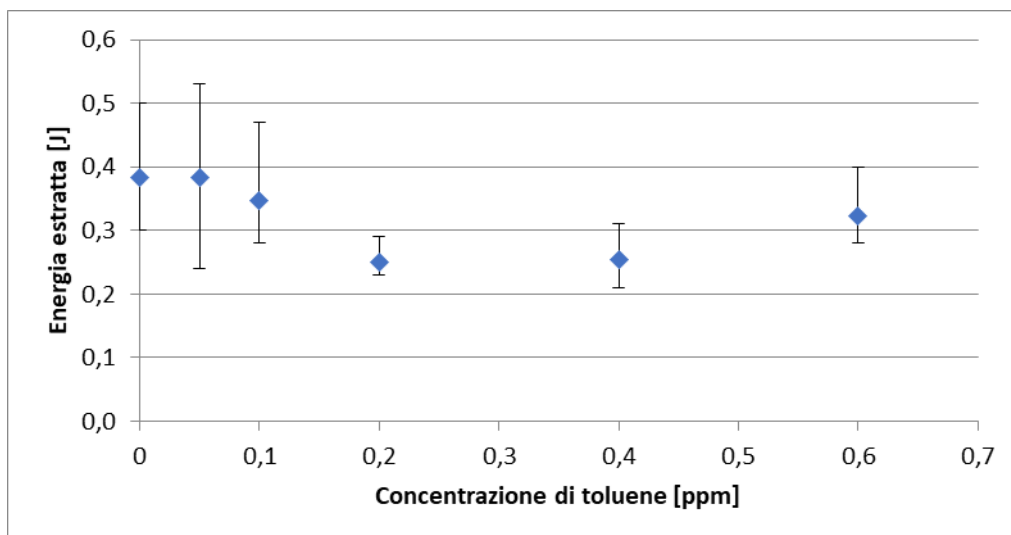


Figura 4.10: Andamento dell'energia estratta dall'acetato come media dei valori ottenuti dalle celle MFC1, MFC2 e MFC3. Sono evidenziate le barre di errore.

Anche nel caso dell'energia, mostrato in Figura 4.10, non vi è un trend monotono. Si evidenzia però che nelle concentrazioni più basse di toluene la variabilità dell'energia estratta tende ad essere maggiore (fenomeno evidenziato dall'ampiezza delle barre d'errore). Nell'intervallo di concentrazione di *detection* selezionato per lo studio condotto in questa tesi anche l'energia di estrazione non risulta essere correlabile in modo univoco alla concentrazione di toluene. Infatti, dal seguente grafico (Figura 4.11) si evidenzia che la maggior parte dei punti sono nell'intervallo compreso nel $\pm 20\%$ del valore in assenza di *toxicant*.

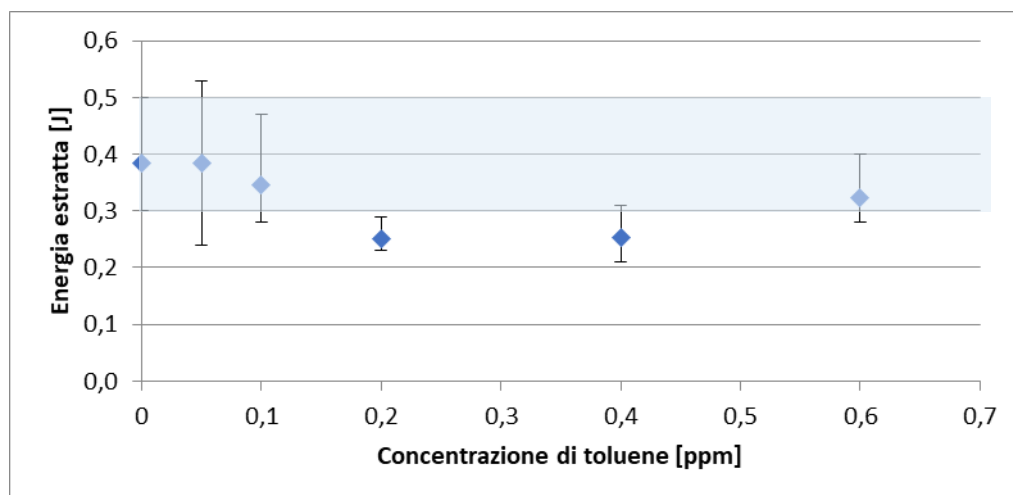


Figura 4.11: Andamento dell'energia estratta come media dei valori ottenuti dalle MFC1, MFC2 e MFC3 alle varie concentrazioni di toluene. Viene evidenziato un riquadro che indica l'ampiezza della zona corrispondente al $\pm 20\%$ del valore di energia estratta in assenza di *toxicant*.

Dal grafico in Figura 4.11 si evince che i valori di concentrazione di toluene utilizzato non hanno provocato una variazione significativa della risposta delle celle.

Viene anche valutato il grafico (Figura 4.12) che mostra l'andamento della corrente media misurata in presenza di toluene rispetto alla sua assenza:

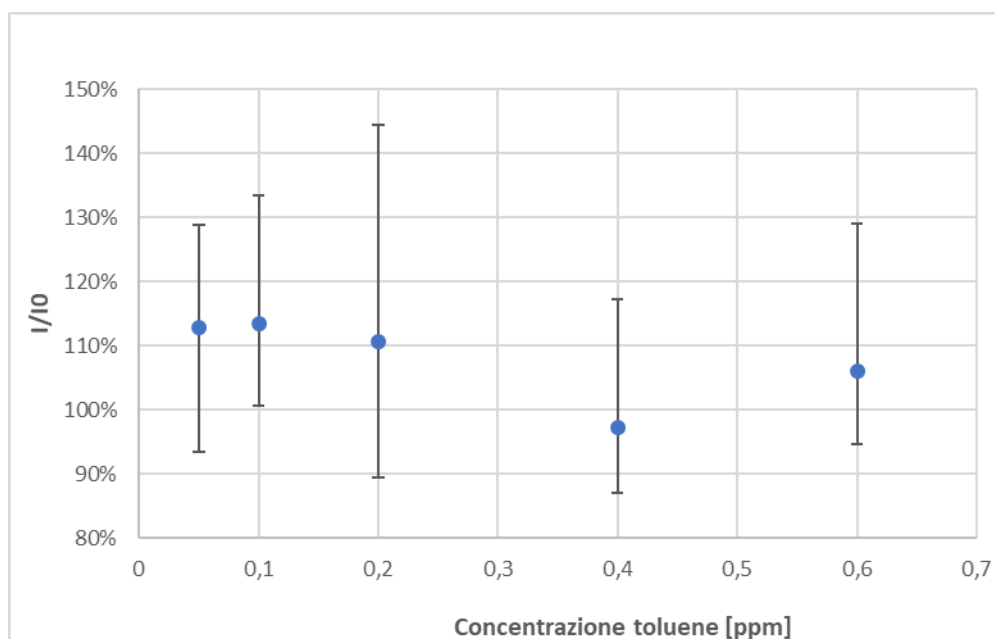


Figura 4.12: Media di MFC1, MFC2 e MFC3 dei rapporti tra la corrente misurata alla rispettiva concentrazione di toluene indicata in ascissa e la corrente in assenza di toluene.

Si evince che la corrente media tende ad essere maggiore rispetto al valore in assenza di *toxicant*. Questo è valido soprattutto a bassa concentrazione. Gli errori rimangono comunque abbastanza elevati e i valori registrati nell'intervallo di indagine oscillano attorno al valore 100%. Ciò potrebbe significare che tale sensore necessita di concentrazioni più elevate di toluene per poter essere sufficientemente sensibile.

Un altro parametro che utile a studiare le prestazioni di un *MFC based sensor* è il rendimento di estrazione della carica dal substrato (acetato di sodio) introdotto, chiamata anche efficienza coulombica (equazione (2.24)). Tale valore è stimabile conoscendo che da una molecola di acetato è possibile, idealmente, estrarre 8 elettroni.

Quando le MFC sono in presenza di *toxicant*, è quindi valutabile la riduzione relativa di efficienza coulombica che la sostanza tossica, il toluene in questo caso, apporta durante la degradazione del substrato (acetato in questo caso). Questo valore di decremento relativo è chiamato tasso di inibizione ed è calcolato dalla (2.27). Si è preferito calcolare il tasso di inibizione senza il valore assoluto della differenza delle efficienze coulombiche per meglio interpretare i dati ottenuti.

Cella	0 ppm toluene		0,05 ppm toluene		0,1 ppm toluene		0,2 ppm toluene		0,4 ppm toluene		0,6 ppm toluene	
	C_E [%]	I_n [%]	C_E [%]	I_n [%]	C_E [%]	I_n [%]	C_E [%]	I_n [%]	C_E [%]	I_n [%]	C_E [%]	I_n [%]
MFC1	4,23	-	4,91	16,1	3,98	-5,8	3,51	-17,0	3,67	-13,3	4,59	8,6
MFC2	3,97	-	3,87	-2,6	4,01	1,0	3,60	-9,4	4,42	11,2	5,12	29,0
MFC3	4,99	-	4,41	-11,7	2,07	-13,3	2,06	-58,5	3,47	-30,4	3,49	-30,1

Tabella 4.6: Efficienza coulombica di estrazione di carica dal substrato (C_E) e tasso di inibizione (I_n) dovuta alla presenza di toluene. Parametri valutati alle diverse concentrazioni di toluene. Il tasso di inibizione non viene definito in condizioni prive di *toxicant*.

Dalla Tabella 4.6 non si evidenzia un effetto univoco di abbassamento o incremento della carica estratta dall'acetato in presenza di toluene, evidenziato anche dal grafico presente in Figura 4.13:

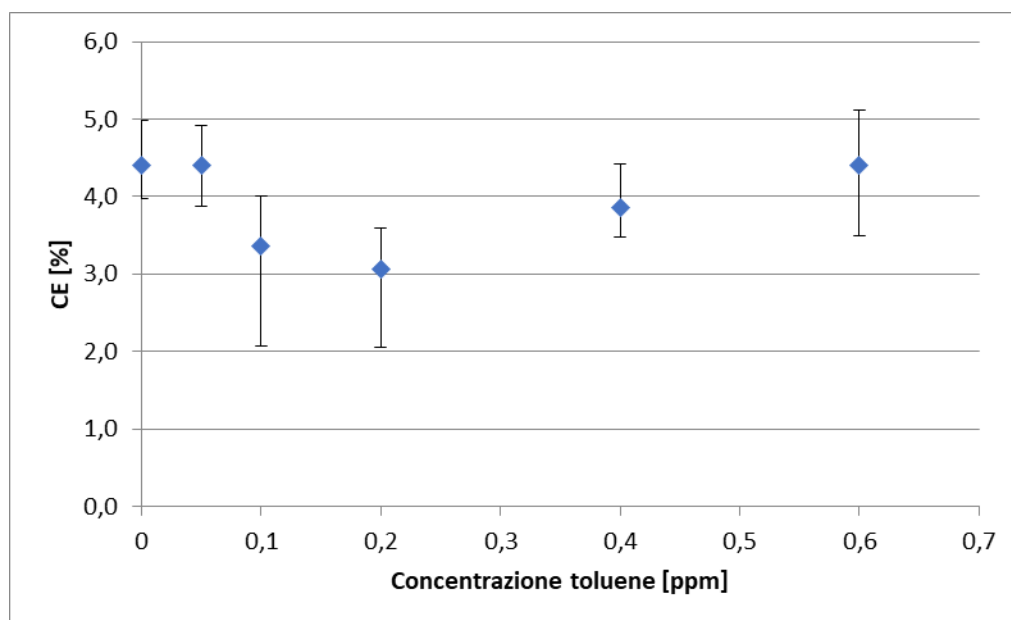


Figura 4.13: Andamento della efficienza coulombica ottenuta come media dei valori ottenuti dalle celle MFC1 MFC2 e MFC3, per ogni condizione di concentrazione di toluene. Sono evidenziate le barre di errore

Dalla Figura 4.13 ne deriva che non è presente un andamento monotono dell'efficienza coulombica. Pertanto anche in questo caso il parametro analizzato non può essere utilizzato come variabile del sensore correlabile alla concentrazione di toluene. Inoltre dal seguente grafico è visibile che non si ha uno scostamento significativo rispetto alle condizioni atossiche:

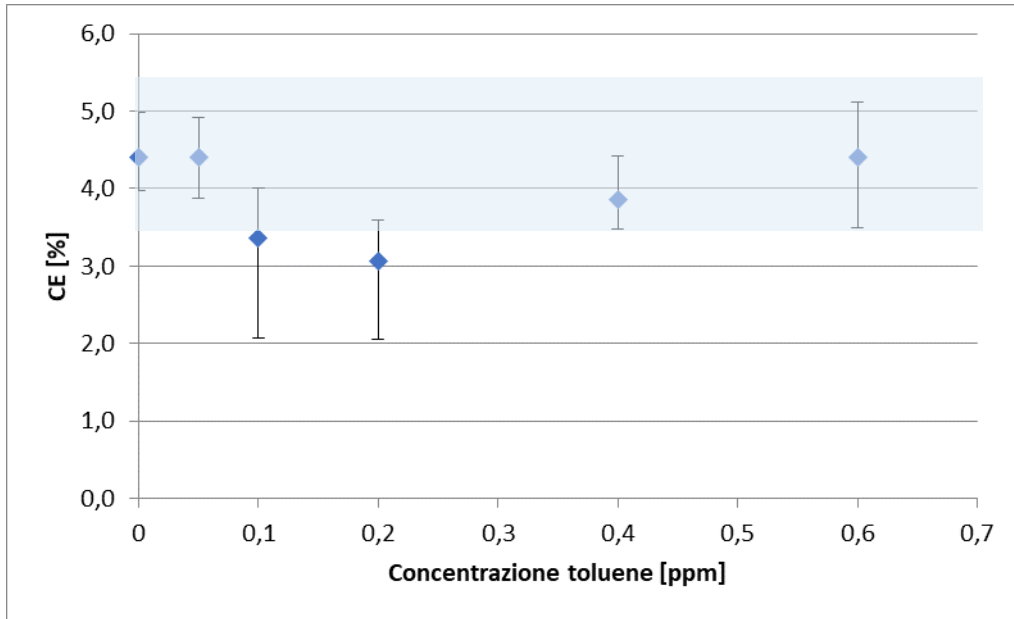


Figura 4.14: Efficienza coulombica ottenuta come media dei valori ottenuti dalle celle MFC1, MFC2 e MFC3, alle varie concentrazioni di toluene. Si evidenzia l'area corrispondente al $\pm 20\%$ del valore di efficienza coulombica in assenza di *toxicant*.

Dal grafico presente in Figura 4.14 si nota che l'efficienza coulombica, sebbene sia uno dei parametri più influenzati dalla presenza di toluene, non risulta subire un significativo scostamento dai valori ricavati in assenza di *toxicant*.

Per quanto riguarda invece l'andamento del tasso di inibizione, esso è mostrato in Figura 4.15:

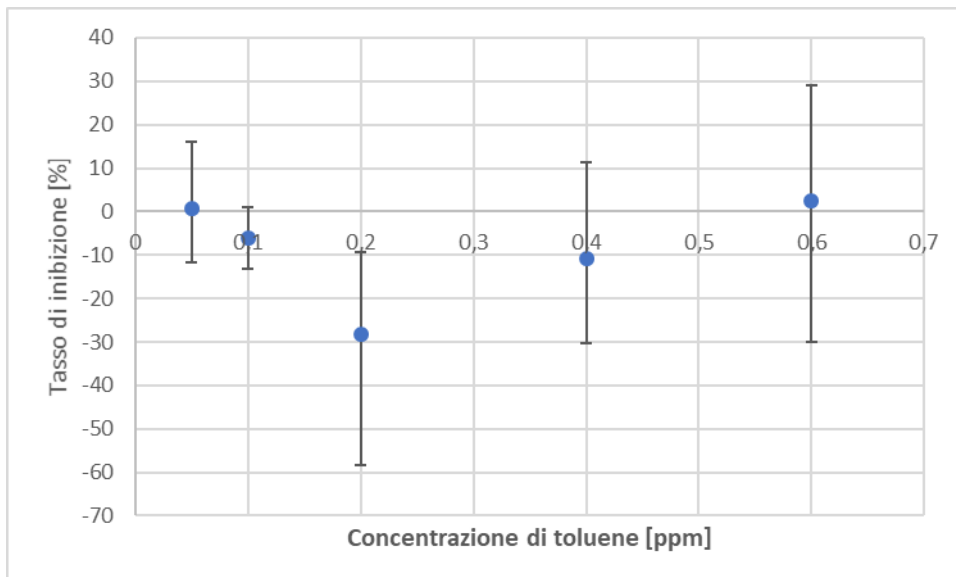


Figura 4.15: Andamento del tasso di inibizione ottenuto come media dei valori ottenuti dalle celle MFC1, MFC2 e MFC3, per ogni condizione di concentrazione di toluene. Sono evidenziate le barre di errore

Anche dalla Figura 4.15 si evince che il tasso di inibizione è in un intervallo attorno allo zero, forse dovuto al fatto che questi sistemi diventano sensibile per concentrazioni superiori allo 0,6 ppm di toluene.

5. Conclusioni e sviluppi futuri

L'obiettivo di questa tesi è quello di verificare la fattibilità tecnica della realizzazione di un sensore basato sulla tecnologia MFC per la rilevazione di BTEX, scegliendo tra di essi in particolare il toluene per l'esecuzione dei test.

Lo studio si è suddiviso in due fasi principali, una fase di messa a punto di celle MFC in triplicato e una seconda fase di studio del comportamento delle celle stesse all'esposizione di toluene in diverse concentrazioni.

Dai valori riportati ne risulta una grande variabilità nella risposta al BOD presente in ambiente (in questa tesi simulata dall'acetato di sodio iniettato in cella). Sia in termini di tensioni generate, sia in termini di durata del ciclo di degradazione. Questo comportamento ha aumentato le incertezze associate alle misure nel corso dell'esperimento e contribuito a rendere complessa l'analisi. In futuro sarebbe auspicabile poter utilizzare un gruppo di celle con comportamenti più confrontabili.

Per quanto riguarda la seconda parte, l'analisi è iniziata con la selezione delle concentrazioni di toluene da impiegare. Come evidenziato nel Capitolo 3 (Paragrafo 3.3.4) non è stato possibile individuare in letteratura lavori affini a quello qui condotto che potessero fornire delle linee guida sulla selezione delle concentrazioni di toluene, e BTEX più in generale, da applicare in esperimenti coinvolgenti sensori basati su MFC. Sono quindi state selezionate 5 concentrazioni relativamente basse (0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,4 ppm e 0,6 ppm) con l'obiettivo di non causare uno shock eccessivo ai sistemi. Sono stati analizzati i principali parametri utili a descrivere il comportamento dei sensori basati su MFC: corrente media, energia chimica estratta, rendimento di conversione del substrato in energia elettrica utile, tempo di risposta, efficienza coulombica e tasso di inibizione. Dai risultati ottenuti con la somministrazione di toluene non è stato possibile individuare un parametro correlabile strettamente alla concentrazione di toluene con buona precisione. Infatti per le concentrazioni di toluene più basse testate, il sistema ha addirittura prodotto un aumento, talvolta significativo, del segnale, questo potrebbe esser spiegato dall'inibizione della popolazione microbiologica costituente il biofilm catodico, che risulta avere un consorzio microbiologico aerobico, con un conseguente miglioramento delle prestazioni grazie ad una più efficiente catalisi della riduzione dell'ossigeno.

Per quanto riguarda i parametri analizzati rispetto alle condizioni atossiche, esse oscillano, rendendo impossibile l'identificazione univoca di un parametro correlabile alla concentrazione di toluene, e quindi della definizione della sensibilità del sensore ad uno dei parametri analizzati. Inoltre, le MFC hanno una risposta diversa alle somministrazioni di toluene, come per esempio per la MFC1 che tende ad avere una diminuzione di corrente relativa, mentre la MFC2 tende a generare un aumento della stessa. Le variazioni di comportamento delle singole celle contribuiscono all'aumento della barra d'errore associata a ciascun parametro, rendendo complessa l'analisi.

Si conclude quindi che nell'intervallo di concentrazione di toluene analizzato, con il consorzio microbiologico derivante dal sedimento marino, con la configurazione scelta, e con il metodo di alimentazione adottato (tipo *fed-batch* con cicli di somministrazione di toluene consecutivi) non è possibile utilizzare le celle MFC come sensori per il toluene.

La somministrazione di toluene in così basse concentrazioni potrebbe anche avere consentito al consorzio di microrganismi presenti nel biofilm anodico una parzialmente resistenza a questo *toxicant*, rendendo così meno sensibili le risposte del sistema sensore. Per evitare questa eventualità sviluppi futuri di questo lavoro potrebbero considerare di

modificare la modalità di alimentazione le celle, alternando l'esposizione ad una soluzione priva di toluene tra due somministrazioni di *toxicant* in modo da ristabilire uno zero di corrente, e in modo da non tenere continuamente i microrganismi in contatto con il *toxicant*. Inoltre considerando che i parametri analizzati oscillano in maniera molto vicina ai valori analizzati in condizioni atossiche, è altamente raccomandabile, come sviluppo futuro della tesi, il proseguimento dei test delle concentrazioni di toluene più alte, in modo da raggiungere variazioni dei parametri più significative ed evidenziare una maggiore sensibilità delle MFC alla presenza di questo *toxicant*.

In conclusione questa tesi rappresenta l'inizio di un percorso di studio delle celle MFC impiegate come potenziali sensori di toluene (BTEX) e ha contribuito a identificare l'inadeguatezza di questi sistemi alla rilevazione di concentrazioni di Toluene uguali e inferiori a 0.6 ppm.

6. Appendice

In questa appendice vengono spiegati i simboli e gli anagrammi utilizzati, e in aggiunta vengono messi i grafici delle MFC2, MFC3 non mostrati nella tesi.

6.1 Simbologia utilizzata

MFC: Microbial Fuel Cell

BOD: Biological Oxygen Demand

GFP: Green Fluorescence Proteins

BTEX: Benzene Toluene Ethyl-benzene Xylene

WHO: World Health Organization

WHO DWG: World Health Organization Drinking Water Guidelines

US NPDWS: United States National Primary Drinking Water Standards

ADWG: Australian Drinking Water Guidelines

COD: Chemical Oxygen Demand

NAD⁺/NADH: Nicotinammide Adenina Dinucleotide

FAD/FADH₂: Flavin Adenin Dinucleotide

FMN: Flavinmononucleotide

ATP: Adenosin Tri-Fosfato

TEA: Accettore Terminale di Elettroni

OCV: Open Circuit Voltage

RVC: Reticulated Vetrified Carbon

ORR: Oxygen Reduction Reaction

ppm: parts per million

ppb: parts per billion

HFC: Hydrogen Fuel Cell

PEM: Proton Exchange Membrane

OP: Organo-phosporus Compound

BVM: Butler-Volmer-Monod

PTFE: politetrafluoroetilene

GDL: Gas Diffusion Layer

EPS: Esopolisaccaridi

LSV: Linear Sweep Voltammetry

EIS: Electrochemical Impedance Spettroscopy

E_{An}: potenziale di anodo [V]

E_{An}^0 : potenziale di anodo nelle condizioni standard [V]

R: costante universale dei gas

T: temperatura assoluta

F: costante di Faraday

[X]: concentrazione della specie x

E_{Cat} : potenziale di catodo [V]

E_{emf} : forza elettromotrice della MFC [V]

S: substrato

X_{OX} : specie ossidante

X_C : complesso redox

P: prodotto ossidato

k_1 : costante cinetica della reazione diretta di formazione del complesso redox a partire dal substrato e dall'agente ossidante [s^{-1}]

k_2 : costante cinetica della reazione inversa di formazione del complesso redox a partire dal substrato e dall'agente ossidante [s^{-1}]

k_3 : costante cinetica della reazione diretta di formazione del prodotto a partire dal complesso redox [s^{-1}]

k_4 : costante cinetica della reazione inversa di formazione del prodotto a partire dal complesso redox [s^{-1}]

k_5 : costante cinetica della reazione diretta di trasferimento eterogeneo elettronico all'elettrodo [s^{-1}]

k_6 : costante cinetica della reazione inversa di trasferimento eterogeneo elettronico all'elettrodo [s^{-1}]

k_0 : costante cinetica della reazione diretta di trasferimento eterogeneo elettronico all'elettrodo in condizioni standard [s^{-1}]

α : coefficiente di trasferimento [-]

E_X^0 : potenziale standard di riduzione dell'intermedio redox [V]

I: intensità di corrente espressa o in termini assoluti [A] o come densità di corrente [$A\ m^{-2}$]

n: numero di elettroni scambiati

K_m : costante di Michaelis-Menten [$kmol\ m^{-3}$]

K_P : costante di inibizione da prodotto [$kmol\ m^{-3}$]

η : sovratensione dell'anodo [V]

I_{max} : intensità di corrente massima producibile [A] o densità di corrente massima [$A\ m^{-2}$]

K_1 : parametro che indica il rapporto tra costanti cinetiche delle reazioni biochimiche ed elettrochimiche [-]

K_2 : parametro che indica il rapporto tra le costanti cinetiche diretta e inversa delle reazioni biochimiche [-]

β_i : termini di inibizione [-]

K_i : costante di affinità del *toxicant* per la reazione che avviene con schema di inibizione i-esimo [kmol m^{-3}]
 χ_i : concentrazione del *toxicant* [kmol m^{-3}]
 P : potenza generata [W]
 E_{MFC} : tensione di cella [V]
 R_{ext} : carico esterno del circuito MFC [Ω]
 A_{An} : area della proiezione dell'anodo (lunghezza per larghezza) in questa tesi [m^2]
 P_{An} : potenza per unità di superficie anodica [W m^{-2}]
 $P_{\text{t,emf}}$: potenza teorica massima ottenibile dalla forza elettromotrice [W]
 $P_{\text{t,OCV}}$: potenza massima possibile [W]
 $P_{\text{max,emf}}$: potenza utile massima ottenibile dalla forza elettromotrice [W]
 $P_{\text{max,OCV}}$: potenza massima utile [W]
 R_{int} : resistenza interna della cella [Ω]
 C_E : efficienza coulombica [-]
 t : tempo [s]
 t_b : tempo impiegato per completare un ciclo *batch* [s]
 b_{es} : numero di elettroni estraibile da una molecola di substrato [$\text{mol e}^-/\text{mol}$]
 V_{An} : volume del comparto anodico per una *double-chamber* MFC, o volume di terreno introdotto per una *single-chamber* MFC [L]
 Δc : variazione di concentrazione del substrato in un ciclo *batch* (concentrazione del substrato prima della degradazione – concentrazione del substrato al tempo t_b) [g L^{-1}]
 M_S : massa molare del substrato [g/mol]
 ΔG^0 : variazione di energia libera molare standard della reazione di combustione dell'acido acetico [J mol^{-1}]
 ΔH^0 : variazione di entalpia di combustione dell'acido acetico in condizioni standard [J mol^{-1}]
 ΔS^0 : variazione di entropia di combustione dell'acido acetico in condizioni standard [$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$]
 η_{MFC} : rendimento termodinamico di conversione del substrato [-]
 S_{MFC} : sensibilità del sistema sensore [$\text{A L m}^{-2} \text{g}^{-1}$]
 I_n : tasso di inibizione [-]
 $C_{E,\text{TOX}}$: efficienza coulombica in presenza di *toxicant* [-]
 OCV^* : potenziale ottenuto come intersezione sull'asse della tensione del prolungamento della zona lineare della curva di polarizzazione [V]
 OP_{An} : sovratensione anodica [V]
 OP_{cat} : sovratensione catodica [V]
 R_{ohm} : resistenze ohmiche del circuito [Ω]

6.2 Grafici aggiuntivi

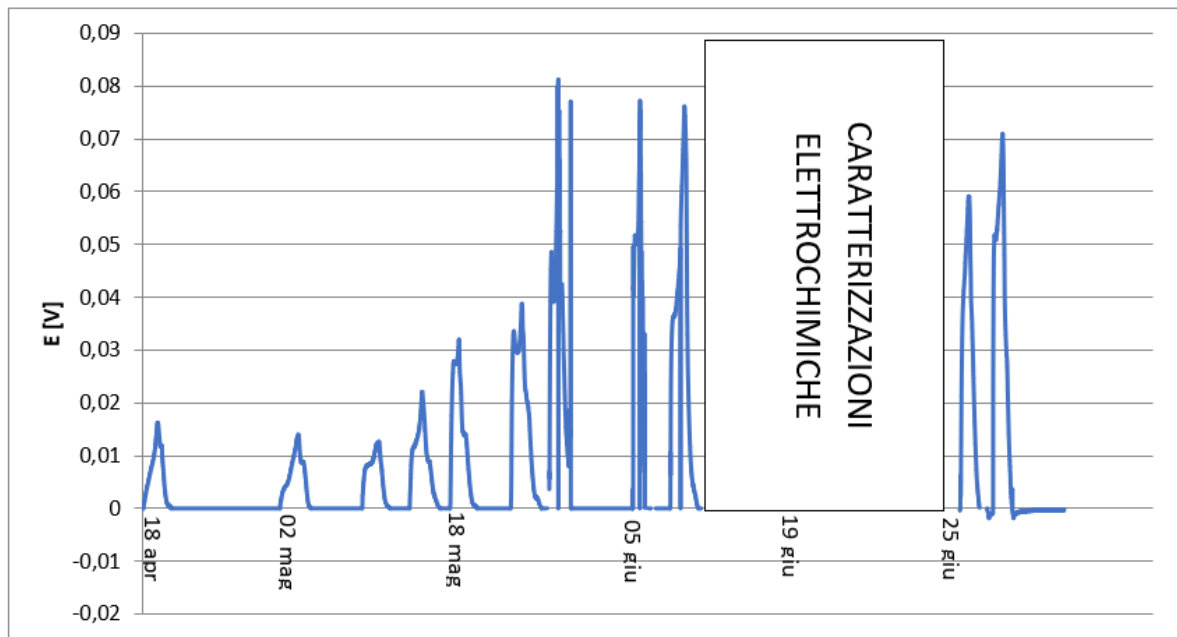


Figura 6.1: Andamento della tensione nel tempo della MFC2 in assenza di toluene

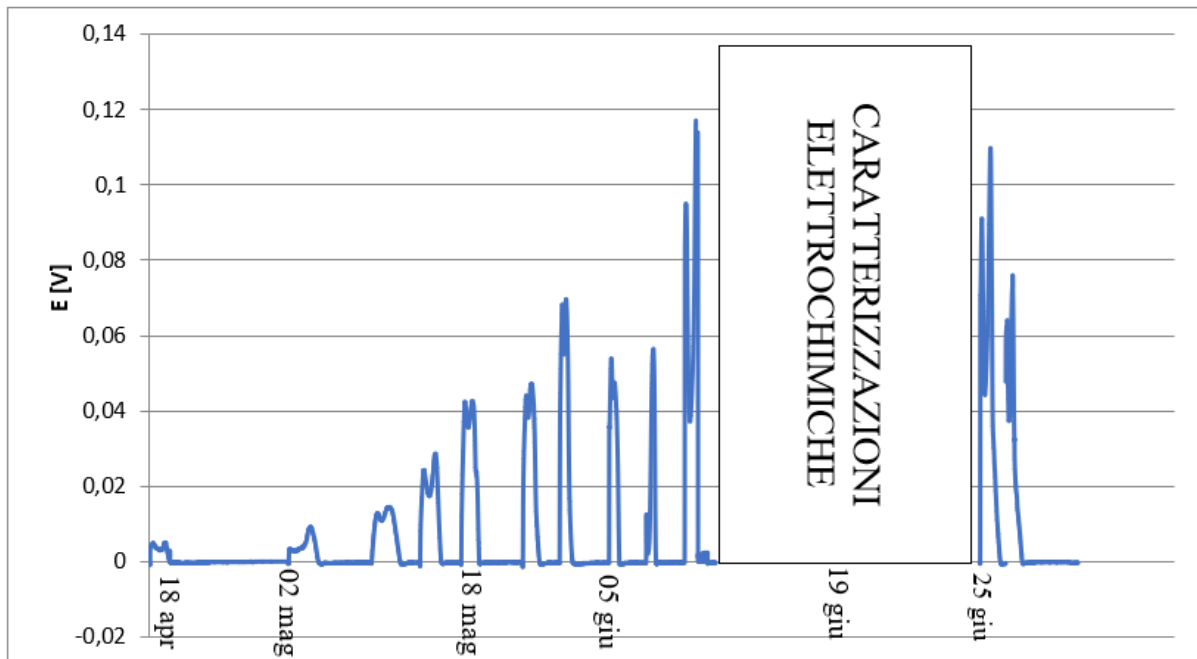


Figura 6.2: Andamento della tensione nel tempo della MFC3 in assenza di toluene

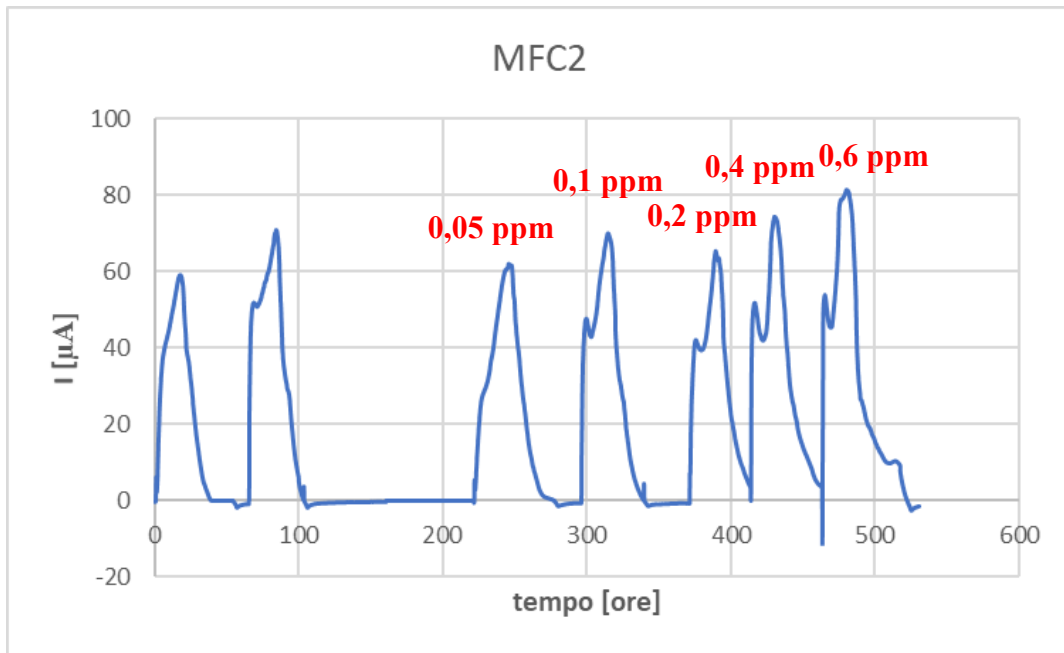


Figura 6.3: Andamento della corrente nel tempo della MFC2 in assenza di toluene (due picchi a sinistra) e in presenza di toluene (picchi a destra)

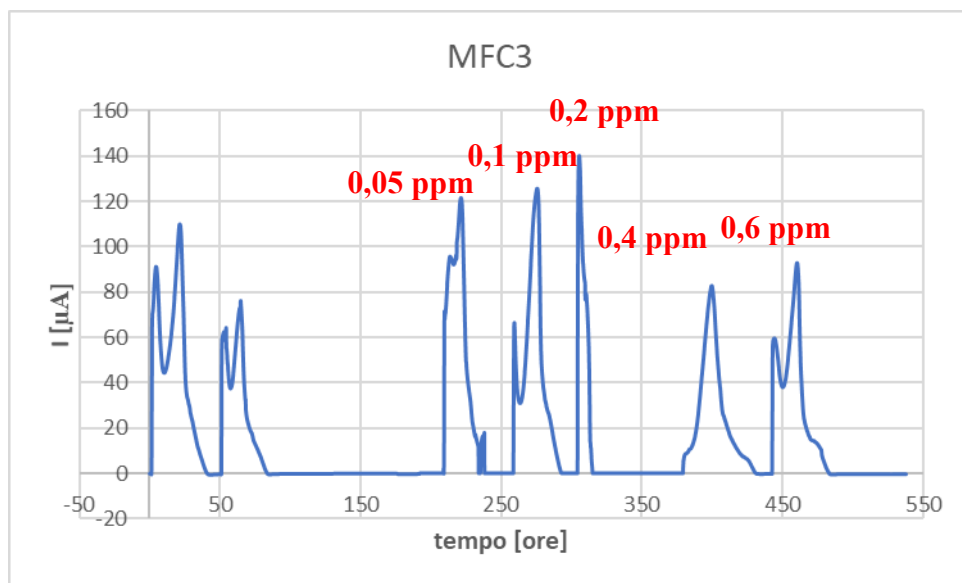


Figura 6.4: Andamento della corrente nel tempo della MFC3 in assenza di toluene (due picchi a sinistra) e in presenza di toluene (picchi a destra)

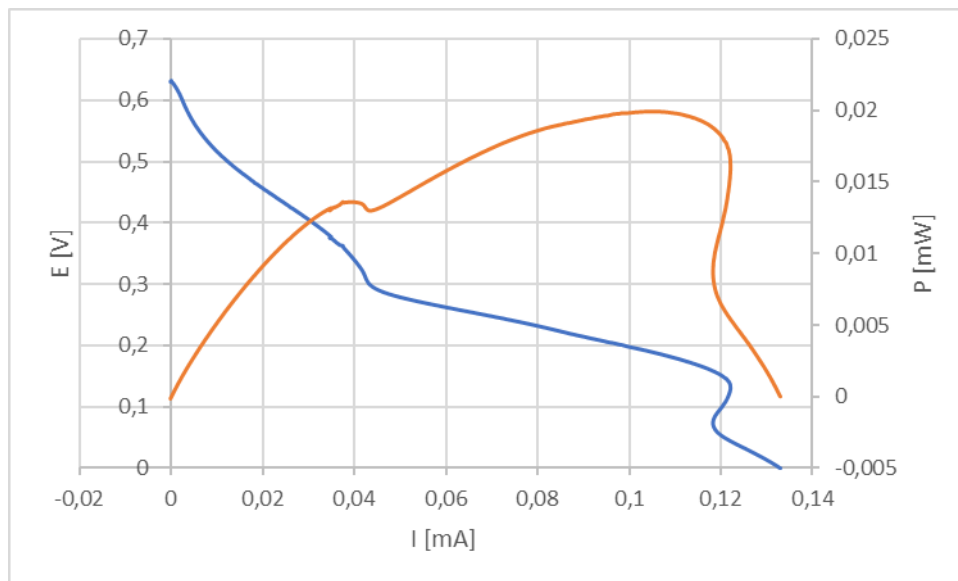


Figura 6.5: Grafico tensione-corrente (curva blu) ottenuto dalla LSV per la cella MFC2.
Curva potenza-corrente (curva arancione) per la MFC2.

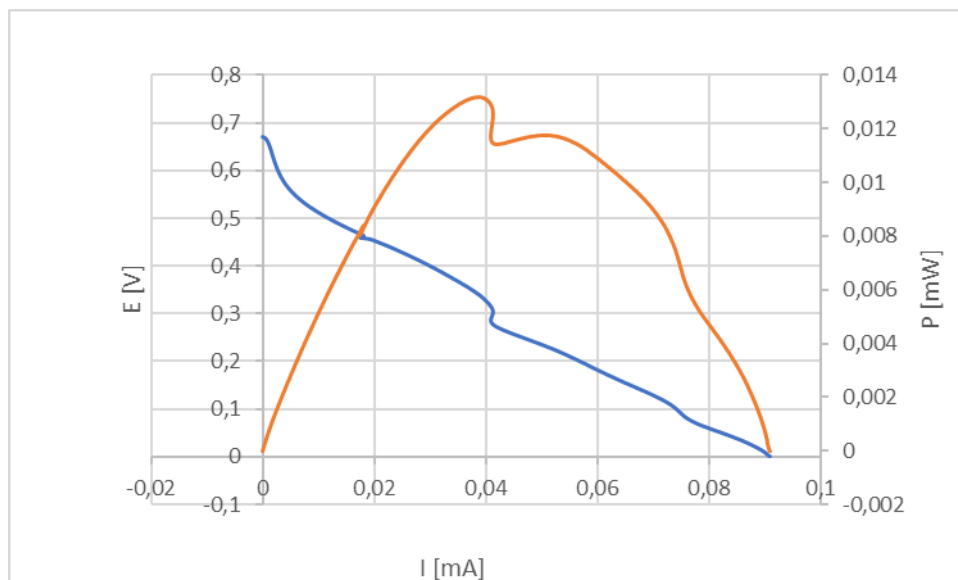


Figura 6.6: Grafico tensione-corrente (curva blu) ottenuto dalla LSV per la cella MFC3.
Curva potenza-corrente (curva arancione) per la MFC3.

7. Bibliografia e sitografia

- [1] Logan, B.E., *Microbial Fuel Cells*, New Jersey: Wiley & Sons; 2008
- [2] Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). *Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. Journal of Power Sources*, 356, 225-244
- [3] Yu, J., Seon, J., Park, Y., Cho, S., & Lee, T. (2012). *Electricity generation and microbial community in a submerged-exchangeable microbial fuel cell system for low-strength domestic wastewater treatment. Bioresource Technology*, 117, 172-179. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.078
- [4] Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J., & Buisman, C. J. N. (2008). *Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. Trends in Biotechnology*, 26(8), 450-459. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.008
- [5] Mandal, S.K., & Das, N. (2018). *Application of Microbial Fuel Cells for Bioremediation of Environmental Pollutants: an Overview. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 7(4), 437-444
- [6] Chouler, J., & Di Lorenzo, M. (2015). *Water Quality Monitoring in Developing Countries; Can Microbial Fuel Cells be the Answer? Biosensors*, 5(3), 450-470. doi:10.3390/bios5030450
- [7] Sun, J.Z., Peter Kingori, G., Si, R.W., Zhai, D.-D., Liao, Z.H., Sun, D.Z., Yong, Y.C. (2015). *Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: a review. Water Science and Technology*, 71(6), 801-809. doi:10.2166/wst.2015.035
- [8] https://ec.europa.eu/clima/policies/international/negotiations/paris_en (02/07/2019)
- [9] <https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/future-and-emerging-technologies> (02/07/2019)
- [10] <https://www.nature.com/news/power-from-the-oceans-blue-energy-1.15045> (02/07/2019)
- [11] Fayemiwo, O. M., Daramola, M. O., & Moothi, K. (2017). *Review: BTEX compounds in water – future trends and directions for water treatment. Water SA*, 43(4), 602. doi:10.4314/wsa.v43i4.08
- [12] https://www.carlroth.com/downloads/sdb/it/4/SDB_4445_CH_IT.pdf (02/07/2019)
- [13] https://www.carlroth.com/downloads/sdb/it/5/SDB_5785_CH_IT.pdf (02/07/2019)
- [14] https://www.carlroth.com/downloads/sdb/it/4/SDB_4904_IT_IT.pdf (02/07/2019)
- [15] https://www.carlroth.com/downloads/sdb/it/8/SDB_8749_IT_IT.pdf (02/07/2019)
- [16] https://www.carlroth.com/downloads/sdb/it/4/SDB_4912_CH_IT.pdf (02/07/2019)
- [17] https://www.carlroth.com/downloads/sdb/it/8/SDB_8817_IT_IT.pdf (02/07/2019)
- [18] Su, F., Lu, C., Johnston, K. R., & Hu, S. (2010). *Kinetics, Thermodynamics, and Regeneration of BTEX Adsorption in Aqueous Solutions via NaOCl-Oxidized Carbon Nanotubes. Environanotechnology*, 71-97. doi:10.1016/b978-0-08-054820-3.00005-8
- [19] Sawyer CN, McCarty PL, Parkin GF. *Chemistry for environmental engineering*. 4th ed. Singapore: McGraw-Hill; 1994. p. 224.

- [20] Fayemiwo, O. M., Daramola, M. O., & Moothi, K. (2017). *Review: BTEX compounds in water – future trends and directions for water treatment*. *Water SA*, 43(4), 602. doi:10.4314/wsa.v43i4.08
- [21] Allouch, A., Le Calvé, S., & Serra, C. A. (2013). *Portable, miniature, fast and high sensitive real-time analyzers: BTEX detection*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182, 446–452. doi:10.1016/j.snb.2013.03.010
- [22] Tecon, R., & Van der Meer, J. (2008). *Bacterial Biosensors for Measuring Availability of Environmental Pollutants*. *Sensors*, 8(7), 4062–4080. doi:10.3390/s8074062
- [23] Zhou, T., Han, H., Liu, P., Xiong, J., Tian, F., & Li, X. (2017). *Microbial Fuels Cell-Based Biosensor for Toxicity Detection: A Review*. *Sensors*, 17(10), 2230. doi:10.3390/s17102230
- [24] Spurr, M. W. A., Yu, E. H., Scott, K., & Head, I. M. (2018). *Extending the dynamic range of biochemical oxygen demand sensing with multi-stage microbial fuel cells*. *Environmental Science: Water Research & Technology*. doi:10.1039/c8ew00497h
- [25] Girguis, P. R., Nielsen, M. E., & Figueroa, I. (2010). *Harnessing energy from marine productivity using bioelectrochemical systems*. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 252–258. doi:10.1016/j.copbio.2010.03.015
- [26] Kumara Behera, B., & Varma, A. (2016). *Microbial Fuel Cell (MFC)*. *Microbial Resources for Sustainable Energy*, 181–221. doi:10.1007/978-3-319-33778-4_4
- [27] Patil, S. A., Hägerhäll, C., & Gorton, L. (2012). *Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems*. *Bioanalytical Reviews*, 4(2-4), 159–192. doi:10.1007/s12566-012-0033-x
- [28] I. Bertini, et al., *Cytochrome c: occurrence and functions*, *Chem. Rev.* 106: 90-115 (2006).
- [29] Potter, M. C. (1911). *Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 84(571), 260–276. doi:10.1098/rspb.1911.0073
- [30] Bond, D. R. (2002). *Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments*. *Science*, 295(5554), 483–485. doi:10.1126/science.1066771
- [31] Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S. D., Verhaege, M., & Verstraete, W. (2004). *Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5373–5382. doi:10.1128/aem.70.9.5373-5382.2004
- [32] Hernandez, M. E., Kappler, A., & Newman, D. K. (2004). *Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 921–928. doi:10.1128/aem.70.2.921-928.2004
- [33] Gorby, Y.A. and Beveridge, T.J. *Composition, reactivity, and regulation of extracellular metal-reducing structures (nanowires) produced by dissimilatory metal reducing bacteria*, Richland: Pacific Northwest National Laboratory
- [34] Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B.E., Nealson, K.A., Fredrickson, J. K. (2006). *Electrically conductive bacterial nanowires produced by Shewanella oneidensis strain MR-1 and other*

microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11358–11363. doi:10.1073/pnas.0604517103

[35] Leech, D., Kavanagh, P., & Schuhmann, W. (2012). *Enzymatic fuel cells: Recent progress*. *Electrochimica Acta*, 84, 223–234. doi:10.1016/j.electacta.2012.02.087

[36] Nelson DL ,Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed., New York: WH Freeman and Co.; 2008

[37] Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Annie Modestra, J., & Srikanth, S. (2014). *Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 779–797. doi:10.1016/j.rser.2014.07.109

[38] Logan, B., Cheng, S., Watson, V., & Estadt, G. (2007). *Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells*. *Environmental Science & Technology*, 41(9), 3341–3346. doi:10.1021/es062644y

[39] Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., & Schroder, U. (2015). *Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems*. *Energy and Environmental Science*. 8, 2048

[40] Kim, B. H., Chang, I. S., & Gadd, G. M. (2007). *Challenges in microbial fuel cell development and operation*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 485–494. doi:10.1007/s00253-007-1027-4

[41] Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., & Cosnier, S. (2011). *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes*. *Nature Communications*, 2(1). doi:10.1038/ncomms1365

[42] He, Z., Wagner, N., Minteer, S. D., & Angenent, L. T. (2006). *An Upflow Microbial Fuel Cell with an Interior Cathode: Assessment of the Internal Resistance by Impedance Spectroscopy*. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5212–5217. doi:10.1021/es060394f

[43] Liu, H., & Logan, B. E. (2004). *Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane*. *Environmental Science & Technology*, 38(14), 4040–4046. doi:10.1021/es0499344

[44] Stein, N. E., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. N. J. (2010). *Stabilizing the baseline current of a microbial fuel cell-based biosensor through overpotential control under non-toxic conditions*. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 87–91. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.09.009

[45] Di Lorenzo, M., Thomson, A. R., Schneider, K., Cameron, P. J., & Ieropoulos, I. (2014). *A small-scale air-cathode microbial fuel cell for on-line monitoring of water quality*. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 182–188. doi:10.1016/j.bios.2014.06.050

[46] Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2011). *Submersible microbial fuel cell sensor for monitoring microbial activity and BOD in groundwater: Focusing on impact of anodic biofilm on sensor applicability*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2339–2347. doi:10.1002/bit.23204

[47] Modin, O., & Wilén, B.-M. (2012). *A novel bioelectrochemical BOD sensor operating with voltage input*. *Water Research*, 46(18), 6113–6120. doi:10.1016/j.watres.2012.08.042

[48] Logan, B. E., & Rabaey, K. (2012). *Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies*. *Science*, 337(6095), 686–690. doi:10.1126/science.1217412

- [49] Lovley, D. R. (2008). *The microbe electric: conversion of organic matter to electricity*. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 564–571. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.005
- [50] Kim, M., Sik Hyun, M., Gadd, G. M., & Joo Kim, H. (2007). *A novel biomonitoring system using microbial fuel cells*. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(12), 1323. doi:10.1039/b713114c
- [51] Shen, Y. J., Lefebvre, O., Tan, Z., & Ng, H. Y. (2012). *Microbial fuel-cell-based toxicity sensor for fast monitoring of acidic toxicity*. *Water Science and Technology*, 65(7), 1223–1228. doi:10.2166/wst.2012.957
- [52] Di Lorenzo, M. (2016). *Use of microbial fuel cells in sensors*. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, 341–356. doi:10.1016/b978-1-78242-375-1.00011-3
- [53] Gil, G.C., Chang, I.-S., Kim, B. H., Kim, M., Jang, J.-K., Park, H. S., & Kim, H. J. (2003). *Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell*. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(4), 327–334. doi:10.1016/s0956-5663(02)00110-0
- [54] Kang, K.H., Jang, J.K., Pham, T.H., Moon, H., Chang, I.S., & Kim, B.H., (2003). *A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biochemical oxygen demand sensor*. *Biotechnol. Letters*, 25, 1357–1361.
- [55] Chang, I. S., Jang, J. K., Gil, G. C., Kim, M., Kim, H. J., Cho, B. W., & Kim, B. H. (2004). *Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 607–613. doi:10.1016/s0956-5663(03)00272-0
- [56] Hamelers, H. V. M., ter Heijne, A., Stein, N., Rozendal, R. A., & Buisman, C. J. N. (2011). *Butler–Volmer–Monod model for describing bio-anode polarization curves*. *Bioresource Technology*, 102(1), 381–387. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.156
- [57] Armstrong, F. A., Butt, J. N., & Sucheta, A. (1993). [18] *Voltammetric studies of redox-active centers in metalloproteins adsorbed on electrodes*. *Metallobiochemistry Part D: Physical and Spectroscopic Methods for Probing Metal Ion Environment in Metalloproteins*, 479–500. doi:10.1016/0076-6879(93)27020-h
- [58] Allen J.B., & Larry R.F., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., New York: Wiley & Sons; 2001
- [59] Cleland, W. . (1963). *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67, 173–187. doi:10.1016/0926-6569(63)90226-8
- [60] Hamelers, H. V. M., Ter Heijne, A., Sleutels, T. H. J. A., Jeremiasse, A. W., Strik, D. P. B. T. B., & Buisman, C. J. N. (2009). *New applications and performance of bioelectrochemical systems*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1673–1685. doi:10.1007/s00253-009-2357-1
- [61] Stein, N. E., Keesman, K. J., Hamelers, H. V. M., & van Straten, G. (2011). *Kinetic models for detection of toxicity in a microbial fuel cell based biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(7), 3115–3120. doi:10.1016/j.bios.2010.11.049
- [62] Oh, S.-E., & Logan, B. E. (2005). *Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), 162–169. doi:10.1007/s00253-005-0066-y

- [63] Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S. D., & Verstraete, W. (2003). *A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency*. *Biotechnology Letters*, 25(18), 1531–1535. doi:10.1023/a:1025484009367
- [64] Scott K., & Yu E.H., *Microbial Electrochemical and Fuel Cells: Fundamentals and Applications*, Cambridge: Elsevier; 2016
- [65] Guerrini, E., Grattieri, M., Faggianelli, A., Cristiani, P., & Trasatti, S. (2015). *PTFE effect on the electrocatalysis of the oxygen reduction reaction in membraneless microbial fuel cells*. *Bioelectrochemistry*, 106, 240–247. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.05.008
- [66] <https://www.fuelcellearth.com/fuel-cell-products/avcarb-mgl280-teflon-treated/> (02/07/2019)
- [67] Cheng, S., Liu, H., & Logan, B. E. (2006). *Power Densities Using Different Cathode Catalysts (Pt and CoTMPP) and Polymer Binders (Nafion and PTFE) in Single Chamber Microbial Fuel Cells*. *Environmental Science & Technology*, 40(1), 364–369. doi:10.1021/es0512071
- [68] Yi, Y., Xie, B., Zhao, T., & Liu, H. (2018). *Comparative analysis of microbial fuel cell based biosensors developed with a mixed culture and Shewanella loihica PV-4 and underlying biological mechanism*. *Bioresource Technology*, 265, 415–421. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.037
- [69] Miao, L., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Ao, Y., Li, Y., ... Gu, Q. (2017). *Response of wastewater biofilm to CuO nanoparticle exposure in terms of extracellular polymeric substances and microbial community structure*. *Science of The Total Environment*, 579, 588–597. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.056
- [70] http://www.asal.it/2012/index.php?option=com_content&view=article&id=162&Itemid=180&lang=it (02/07/2019)
- [71] Lee, J., Phung, N. T., Chang, I. S., Kim, B. H., & Sung, H. C. (2003). *Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses*. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 185–191. doi:10.1016/s0378-1097(03)00356-2
- [72] Du Y., Feng Y., Teng Q., & Li H. (2014). *Effect of Inorganic Salt in the Culture on Microbial Fuel Cells Performance*. *International Journal of Electrochemical Science*, 10(2015), 1316-1325.
- [73] <http://certoclav.com/de/index.htm> (02/07/2019)
- [74] <https://www.us-instrument.com/agilenthp-34972a-lxi-data-acquisition-switch-unit> (02/07/2019)
- [75] Huang, L., & Logan, B. E. (2008). *Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4), 655–664. doi:10.1007/s00253-008-1588-x
- [76] <http://www.dima.unige.it/~delprete/SMID/sssmidweb/intnumerica2.html> (02/07/2019)
- [77] <https://www.bio-logic.net/products/potentiostat-galvanostat-eis/vsp-modular-5-channels-potentiostatgalvanostat/> (02/07/2019)
- [78] Fellie E.A., Sannasi P., Wong K.K., Salmijah S., & Kader J. (2012). *Tolerance and Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes (BTEX) by a Metal Acclimatized Bacterial Consortium Culture*, *Research Journal of Technology*, 7(3), 52-58

[79] Sardesai, Y., & Bhosle, S. (2002). *Tolerance of bacteria to organic solvents. Research in Microbiology, 153(5), 263–268.* doi:10.1016/s0923-2508(02)01319-0

[80] Dai Y., Chan, Y., Jiang, B., Wang, L., Zou, J., Pan, K., & Fu, H. (2016). *Bifunctional Ag/Fe/N/C Catalysts for Enhancing Oxygen Reduction via Cathodic Biofilm Inhibition in Microbial Fuel Cells, ACS Applied Materials and Interfaces, 8, 6992-7002*

8. Ringraziamenti

Vorrei ringraziare innanzitutto Marzia e Giulia, che hanno creduto nelle mie capacità e che mi hanno permesso di laurearmi a luglio: anche laddove io non credevo che avessi potuto farcela loro hanno continuato a spingere perché io ce la potessi fare. Grazie anche delle revisioni che avete fatto per la tesi. È stato un bellissimo percorso.

Team Bensaid grazie! Voi (Agnese, Chiara, Giorgio, Giovanni e Stefano) avete seguito i miei ultimi mesi al Politecnico molto da vicino, e mi avete supportato psicologicamente durante il mio periodo di tesi. Siete stati molto presenti in questo semestre e mi avete fatto tanto divertire. Giorgio mi devi dire dove le prendi le GIF e le memes!

Grazie anche a te Giulia Bucca, che sei mia amica e collega amante dei gatti. Hai reso le lezioni al Poli divertenti. E adoravo darti fastidio mentre prendevi appunti, scrivendoti insistentemente il nome di Brian sul quaderno. Hai sopportato tutte le volte che non avevo voglia di stare in classe e volevo distrarmi: puntualmente c'eri tu come vittima della mia noia.

Un ringraziamento speciale va sicuramente a mio zio Alarico, senza il quale non mi sarei iscritto al Politecnico di Torino, che ha creduto in me e ha voluto a tutti i costi permettermi di frequentare l'università qui a Torino.

Sono doverosi i ringraziamenti a mamma e papà per il loro supporto economico e affettivo, per aver apprezzato sempre i miei sforzi con entusiasmo, e per avermi sempre aiutato nell'organizzare tutto. Grazie papà che con i tuoi discorsi sui motori perpetui mi abitui a spiegare in parole semplici il secondo principio della termodinamica. Grazie mamma che mi fai da segretaria, ricordandomi gli impegni che ho ogni settimana e prendendo gli appuntamenti dai dottori, barbiere, estetista ecc.

Un grazie anche a mio fratello Luca, che mi intrattiene spiegandomi come dovrei fare palestra e soprattutto dove sbaglio. Ti ringrazio anche per avermi portato in macchina ovunque volessi quando tornavo in Abruzzo, e per avermi fatto fare anche i giri in macchina senza una meta precisa (cosa che adoro). Inoltre so che ti dava fastidio, ma grazie per avermi fatto mettere Lady Gaga nella radio della tua automobile.

Non posso non ringraziare nonna Venerina per l'ispirazione che ogni volta mi dà. Sei una donna forte e con un ottimo acume per il business. Senza parlare delle tue abilità culinarie! Mi hai sempre cucinato quello che volevo, e mi hai sempre trattato da re. Grazie anche dei 20€ che mi dai ogni volta che torno in Abruzzo per "comprarmi un caffè a Torino".

Un ringraziamento va anche alla mia best Claire, presenza fondamentale della mia vita. Grazie a te sono riuscito a fare coming out. Non mi dimenticherò mai i pranzi e le cene che mi cucinavi quando venivo a casa tua, sei una cuoca bravissima. Dopo la laurea ti ricordo che mi hai promesso di cucinare assieme e di fare festa nella piscina di casa tua e di Svetly.

Non posso non ringraziare la mia amica sommelier Anna. Anna mi porti sempre fuori dandomi un po' di respiro dai ritmi serrati di studio intenso. Grazie per tutti i consigli che mi dai, specie per capire i ragazzi. Ti aspetto come mia ospite in Abruzzo.

Grazie al mio migliore amico Vincenzo. Sei stato catalizzatore della mia trasformazione "sociale", mi hai aiutato a sviluppare le *soft skills* importanti della vita. Grazie anche di stimolare continuamente il mio ragionamento con i tuoi quesiti filosofici e fumosi del tipo "è più giusto dire che Firenze ha 0 abitanti o che ne abbia 1 milione?" (della cui risposta siamo sempre stati in disaccordo). Grazie anche di chiamarmi tutti i weekend tenendomi al telefono

2-3 ore di fila, ma sempre senza mai annoiarmi. Infine grazie di ospitarmi in Sardegna dopo la mia laurea. Ti voglio tanto bene, senza di te sarei completamente un'altra persona.

Infine, ma assolutamente non per ordine di importanza, devo ringraziare l'amore della mia vita, il mio fidanzato Brian, che, grazie alla sua presenza, mi ha spinto a dare il massimo. Grazie di farmi commuovere sia pubblicando delle storie inaspettate su instagram, sia di dimostrare il tuo amore nei miei confronti con i messaggi che ogni tanto mi scrivi su whatsapp. Adoro il fatto che quando ti scrivo la buonanotte tu poi inizi un discorso, e magari vai avanti anche per più di un'ora tenendomi sveglio ad ascoltarti. Come quando mi hai spiegato come è strutturata la società delle api. Grazie di abbracciarmi ogni volta che ci vediamo: i tuoi abbracci e i tuoi sguardi sono le cose più belle del mondo. Grazie infinite di esistere. Ti amo.