



**POLITECNICO**  
MILANO 1863

Scuola di Ingegneria Civile, Ambientale e Territoriale  
Corso di Laurea in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

---

**Monitoraggio di fenomeni  
di fouling e corrosione in condutture:  
sviluppo e testing di un sensore innovativo**

---

Relatore: Prof. Andrea Turolla

Correlatore: Prof. Manuela Antonelli

Tesi di Laurea Magistrale di:

Gaia Pani 883642

Anno Accademico 2018/2019

Monitoraggio di fenomeni di fouling e corrosione in condutture: sviluppo e testing di un sensore innovativo  
*Politecnico di Milano – Tesi di Laurea magistrale in Ingegneria per l'ambiente e il territorio*  
*Gaia Pani - A.A. 2018/2019*

# Abstract

La formazione di depositi di tipo inorganico e organico rappresenta una delle principali cause di alterazione della qualità delle acque in condutture, in campo civile e industriale. Garantire la stabilità chimica e biologica delle acque è fondamentale per limitare problemi di tipo igienico-sanitario, estetico e operativo. Il presente lavoro si inserisce in un progetto di ricerca finalizzato allo sviluppo di un sensore innovativo, denominato "Dirty Sensing", il cui brevetto è stato depositato dal Politecnico di Milano nel 2017. Tale sensore permette di identificare e quantificare, attraverso misure impedenziometriche, lo sporco di tipo inorganico e organico. Nell'ambito di questa tesi sono state svolte tre macro-attività sperimentali, indirizzate rispettivamente a misurare (i) depositi di tipo inorganico e (ii) depositi di tipo organico, nonché (iii) ad identificare fenomeni corrosivi per mezzo del medesimo sensore. Nel corso delle prove su depositi di tipo inorganico, la formazione di depositi calcarei è stata simulata in batch e in flusso, ed è stata individuata una retta di calibrazione tra spessore depositato e misura impedenziometrica; nelle condizioni operative indagate, non è stata riscontrata un'influenza significativa sul deposito della velocità del flusso e del materiale costituente il condotto (PVC, acciaio zincato). Nel corso delle prove su depositi di tipo organico, è stato implementato un sistema in flusso per la crescita di biofilm: a seguito di queste prove, sono stati riscontrati fenomeni di biocorrosione sulla superficie dei sensori e, contrariamente agli studi precedenti, non è stata rilevata una correlazione evidente tra spessore di biofilm e misura impedenziometrica. Per eseguire queste prove, è stato definito un protocollo di misura dello spessore del biofilm tramite l'utilizzo di un microscopio laser confocale in luce laser riflessa. Infine, le prove di corrosione hanno evidenziato la possibilità di monitorare fenomeni corrosivi tramite l'analisi della risposta del sensore. Il presente lavoro pone quindi le basi per una versione migliorata del sensore di sporco e per studi successivi, soprattutto in relazione a depositi di tipo organico.

# Abstract

Inorganic and organic fouling is one of the major causes for water quality alteration in pipelines, both in civil and industrial field. Water chemical and biological stability monitoring is fundamental to avoid hygienic, aesthetic and operational problems. This work is part of a research project aimed at developing an innovative sensor, called "Dirty Sensing", which was patented by Politecnico di Milano in 2017. This sensor allows to identify and quantify inorganic and organic fouling by impedimetric measures. In this work, three experimental macro-activities have been developed to measure (i) inorganic scale, (ii) biofouling and, finally, to (iii) identify corrosive phenomena by using the same sensor. In the first activity, calcium carbonate deposition has been simulated in batch and flow conditions: a calibration curve between the thickness of the deposit and the impedimetric measurement has been determined and, under investigated operating conditions, no influence of velocity and pipe materials (PVC, galvanised steel) was observed. In the second activity, a biofilm growth system has been implemented. During this experiment, biocorrosion phenomena have been found on sensor surfaces and no clear correlation between biofilm thickness and impedimetric measure has been proved. A specific protocol has been developed by using a confocal laser scanning microscope to perform biofilm thickness measurement. Finally, corrosion tests highlighted the chance of monitoring corrosion phenomena through sensor response analysis. Therefore, this work lays the foundation for an enhanced sensor and for later studies, especially about biofouling phenomena.



# INDICE

INDICE DELLE FIGURE.....	V
INDICE DELLE TABELLE.....	VIII
INTRODUZIONE .....	1
1. STATO DELL'ARTE .....	3
1.1 SPORCAMENTO NELLE TUBAZIONI: FORMAZIONE DI INCROSTAZIONI INORGANICHE.....	4
1.1.1 Processo di formazione dei cristalli costituenti lo sporcammento inorganico su una superficie .....	5
1.1.2 Fattori influenzanti la formazione di incrostazioni inorganiche .....	6
1.2.SPORCAMENTO NELLE TUBAZIONI: FORMAZIONE DI BIOFILM .....	9
1.2.1 Fasi di crescita del biofilm .....	10
1.2.2 Composizione e struttura del biofilm .....	12
1.2.3 Fattori influenzanti lo sviluppo di biofilm.....	14
1.3 FENOMENI DI BIOCORROSIONE .....	17
1.4 STUDIO E ANALISI DEL BIOFILM TRAMITE TECNICHE MICROSCOPICHE .....	19
2. MATERIALI E METODI.....	23
2.1 SENSORE DI SPORCAMENTO "DIRTY SENSING" .....	24
2.2 CONFIGURAZIONE OPERATIVA PROVE IN BATCH .....	26
2.3 CONFIGURAZIONE OPERATIVA PROVE NEL LOOP.....	27
2.3.1 Posizionamento sensori e materiali d'interesse .....	29
2.3.2 Calibrazione delle velocità nel loop.....	29
2.3.3 Allestimento delle prove di sporcammento inorganico.....	31
2.3.4 Allestimento delle prove di sporcammento organico.....	31
2.4 MISURA DELLO SPORCAMENTO .....	34
2.4.1 Determinazione della variazione di impedenza .....	34
2.4.2 Valutazione qualitativa e quantitativa del deposito.....	37
3. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	39
3.1 SELEZIONE DELL'INTERVALLO DI FREQUENZE DI INTERESSE .....	39
3.2 ANALISI DEI RISULTATI PER LE PROVE DI DEPOSITO INORGANICO .....	41
3.2.1 Prove in batch .....	41
3.2.2 Prove in loop .....	47
3.3 ANALISI DEI RISULTATI PER LE PROVE DI DEPOSITO ORGANICO.....	55
3.3.1 Influenza dello stato di moto del flusso sul modulo del segnale di impedenza ( $ Z $ )...55	
3.3.2 Utilizzo del microscopio laser confocale per la stima dello spessore del biofilm .....	57
3.3.3 Spessori misurati sui sensori di sporcammento DS e sui campioni di PVC .....	60
3.3.4 Risposta in termini del modulo del segnale di impedenza ( $ Z $ ) del sensore di sporcammento DS alla formazione di biofilm .....	62
3.4 PROVE DI CORROSIONE SUI SENSORI DI SPORCAMENTO DS .....	67
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	77
BIBLIOGRAFIA .....	79
APPENDICE 1.....	87



# INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1 - Andamento del tasso di sporcamiento al variare della velocità del flusso e del diametro del condotto (Watkinson e Martinez, 1975) .....	8
Figura 1.2 - Energia di Gibbs tra una sfera e una superficie piana con la stessa carica superficiale, secondo la teoria DLVO: (a) bassa (b) intermedia (c) elevata forza ionica .....	11
Figura 1.3 - Schematizzazione ideale dello sviluppo del biofilm per due scenari di velocità (Cowle et al., 2014).....	12
Figura 1.4 - Evoluzione dei modelli di descrizione di biofilm dagli anni '70 agli anni '00 (da Boltz et al. (2010) .....	13
Figura 1.5 - I tre livelli di eterogeneità di un biofilm (Picioreanu et al., 2000).....	14
Figura 1.6 - Variazione della densità del biofilm e del suo spessore in relazione agli sforzi di taglio applicati in un reattore a letto fluido (Liu and Tay, 2001 con dati di Chang et al. (1991) .....	15
Figura 1.7 - Schematizzazione dei principali aspetti e processi caratterizzanti il fenomeno di biocorrosione in un ambiente in condizioni aerobiche/anossiche.....	18
Figura .1.8 - Tecniche per investigare la struttura del biofilm a diverse scale spaziali (Wagner et al., 2010).....	20
Figura 2.1 - (a) Principi di funzionamento del sensore: la presenza di deposito altera la resistività della soluzione Rion (Turolla et al., 2019); (b) Rappresentazione del circuito equivalente di un microsensore interdigitato in presenza di deposito.....	24
Figura 2.2 - a) Rappresentazione (non in scala) geometria sensore (sezione); (b) immagine dei sensori da 5 mils (colore verde) e 10 mils (colore rosso).....	25
Figura 2.3 - Fotografia della configurazione operativa dei due loop .....	27
Figura 2.4 - Schema semplificato del funzionamento operativo del (a) circuito primario (b) circuito secondario di uno dei due loop; in rosso è evidenziata la parte di loop interessata dal flusso ....	28
Figura 2.5 - (a) Tappo in PVC con doppia filettatura; (b) contro-tappo per alloggiamento sensore; (c) sensore dotato di O-ring per la tenuta idraulica del tappo; (d) configurazione tappo; (e) connettore per la misura di impedenza .....	29
Figura 2.6 - (a) Flussometro DIGITEN utilizzato nella configurazione sperimentale; (b) Arduino UNO utilizzato per la misura di due portate in contemporanea nella fase di calibrazione delle velocità .....	29
Figura 2.7 - (a) Determinazione della retta di calibrazione resistenza ideale-resistenza reale per un elettrodo pulito (bianco); (b) Determinazione della variazione di resistenzareale tra l'elettrodo pulito e sporco.....	36
Figura 2.8 - (a) Postazione di utilizzo del microscopio laser confocale (a sinistra nell'immagine); (b) Dettaglio del setup di misura dello spessore su un sensore immerso in acqua .....	37

- Figura 3.1 - Spettro di impedenza in un mezzo contenente cellule batteriche tramite l'utilizzo di microelettrodi interdigitati: (A) fase, (B) modulo. Intervallo di frequenza: 1 Hz – 1 MHz (Yang et al., 2003) ..... 40
- Figura 3.2 - Rappresentazione schematica del campo elettrico (linee blu) nel caso di (a) sensore pulito (b) sensore con deposito calcareo (Turolla et al., 2019)..... 41
- Figura 3.3 - A sinistra, rappresentazione della variazione del segnale di impedenza all'aumentare dello spessore depositato in tre condizioni di conducibilità per (a) sensori da 5 mils e (b) sensori da 10 mils. I colori assumono sfumature più intense dalla prima alla terza regione; le rette verticali tratteggiate identificano le tre regioni in cui è stato suddiviso l'andamento in termini di risposta di impedenza dei sensori. A destra, ingrandimento del primo intervallo. Sono riportate per ogni tratto e per ogni conducibilità le linee di tendenza delle serie di dati. .... 42
- Figura 3.4 - Corrente fluente sopra la superficie di un sensore interdigitato; il valore % di ogni curva indica la % di corrente fluente sotto la curva (Van Gerwen et al., 1998) ..... 44
- Figura 3.5 - Andamento dei valori di pendenza (a,c) e intercetta (b,d) al variare della conducibilità nei tre tratti per (a,b) sensori da 5 mils (c,d) sensori da 10 mils..... 45
- Figura 3.6 - Rappresentazione della variazione del segnale di impedenza all'aumentare dello spessore depositato alla conducibilità di  $600 \mu\text{s cm}^{-1}$  per (a) sensori da 5 mils e (b) sensori da 10 mils. Le rette tratteggiate in rosso corrispondono agli intervalli di confidenza al 95% di probabilità delle rette ottenute dall'interpolazione lineare (linee tratteggiate in nero), quelle in blu agli intervalli di predizione al 95% di probabilità. .... 47
- Figura 3.7 - Andamento nel tempo della variazione di impedenza in termini percentuali rispetto al tempo 0 per quattro sensori all'interno del loop; con i cerchi vengono indicati i sensori da 5 mils e con i rombi i sensori da 10 mils ..... 48
- Figura 3.8 - Andamento nel tempo della variazione di impedenza in termini percentuali rispetto al tempo 0 per un sensore sottoposto a due incrementi del livello di sovrasaturazione ( $+1 \text{ g L}^{-1}$  al tempo  $t=22 \text{ h}$  e  $+1 \text{ g L}^{-1}$  al tempo  $t=44 \text{ h}$ )..... 49
- Figura 3.9 - Effetto del numero di Reynolds (a) e della velocità (b) sul deposito di precipitato, per tubature di diametro a. 0,3 b. 0,5 c. 0,7 e d. 1.3 cm..... 52
- Figura 3.10 - Legame tra spessore reale e teorico per (a) sensori da 5 mils (b) sensori da 10 mils. La retta tratteggiata in nero rappresenta la linea di tendenza dei dati riportati nel grafico, quella rossa la bisettrice del primo quadrante ..... 53
- Figura 3.11 – Boxplot degli spessori depositati su diverse tipologie di substrato in caso di flusso con concentrazione pari a (a)  $1 \text{ g L}^{-1}$  (b)  $2 \text{ g L}^{-1}$  ..... 55
- Figura 3.12 – Valori della variazione del modulo del segnale di impedenza  $\Delta R$  misurati nella prima prova di sporcamento organico con la pompa accesa (asse x) e con la pompa spenta (asse y) .. 56
- Figura 3.13 – Immagine ottica al microscopio laser confocale di un deposito di biofilm sul sensore di sporcamento DS, esposto all'aria per 1 h..... 57
- Figura 3.14 - Andamento nel tempo di  $\Delta R$  per quattro sensori durante la prima prova di sporcamento organico; i rombi rossi identificano i sensori protetti con il parafilm, i cerchi neri i sensori utilizzati tal quali ..... 58
- Figura 3.15 - Schermata di lavoro di rielaborazione di un'immagine ottenuta con software del I microscopio laser confocale in luce laser riflessa (misura di step)..... 59

- Figura 3.16 - Schermata di lavoro di rielaborazione di un'immagine ottenuta con il microscopio laser confocale (correzione del tilting)..... 59
- Figura 3.17 – Rilevazione ottica al microscopio laser confocale all'interno del biofilm di un microorganismo superiore (phylum: rotifero)..... 61
- Figura 3.18 - Rappresentazione schematica del campo elettrico (linee blu) nel caso di (a) sensore pulito (b) sensore con deposito biologico, incluse le cellule batteriche (in rosso) e i composti ionici prodotti dal metabolismo batterico (in verde) (Turolla et al., 2019) ..... 63
- Figura 3.19 - Foto dell'interno di una tubazione del loop al termine della prima prova di sporcamento..... 63
- Figura 3.20 - Andamento nel tempo della variazione di impedenza dei 12 sensori del loop rispetto al tempo  $t=0$  (seconda prova di sporcamento di tipo organico)..... 64
- Figura 3.21 – Andamento nel tempo degli spettri di  $|Z|$  nell'intervallo 2 Hz e 20 MHz; la linea rossa tratteggiata corrisponde allo spettro misurato al tempo  $t=0$  d, la linea verde tratteggiata al tempo  $t=54$  d..... 64
- Figura 3.22 – Rette di calibrazione  $R_{b,ideale}$  e  $R_{b,reale}$  (a 25°C) per un sensore soggetto a fenomeni di corrosione a inizio (colore nero) e a fine (colore rosso) prova..... 66
- Figura 3.23 - (a) immagini di un sensore sottoposto alle condizioni di flusso e crescita di biofilm batterico per 30 giorni; la parte più chiara corrisponde a una zona schermata tramite pellicola per impedire l'attaccamento di biofilm; (b),(c) dettaglio di fenomeni di corrosione dei finger, analizzati al microscopio Olympus BX51M ..... 68
- Figura 3.24 – Rappresentazione in scala bi-logaritmica degli spettri del modulo  $|Z|$  di sensori di sporcamento DS nuovi (linee di colore nero) e deteriorati (linee di colore rosso) tra 20 Hz e 20 MHz ..... 69
- Figura 3.25 - Immagini delle condizioni di un sensore durante una prova di corrosione al tempo  $t=$  (a) 0, (b) 15 min, (c) 1 h, (d) 2 h, (e) 4 h, (f) 6 h..... 69
- Figura 3.26 – Grafici degli andamenti dell'impedenza in termini di (a) modulo  $|Z|$  (b) fase  $\phi$  al variare della frequenza, durante lo svolgimento di una prova di corrosione di un sensore di sporcamento DS (conducibilità  $750 \mu S cm^{-1}$ )..... 70
- Figura 3.27 - Andamento medio nel tempo dei valori di pendenza calcolati tra 20 Hz e 2000 Hz dei sensori di sporcamento DS durante la prova di corrosione, al variare della conducibilità della soluzione in cui sono stati immersi i sensori per eseguire la misura ..... 71
- Figura 3.28 – Sensori di sporcamento DS al termine della seconda prova di sporcamento organico: ..... 73
- Figura 3.29 - Spettri dei valori di impedenza in termini di (a) modulo  $|Z|$  e (b) fase  $\phi$ , durante lo svolgimento della seconda prova di sporcamento biologico, di uno dei tre sensori di sporcamento DS (9) visibilmente deteriorato da fenomeni di biocorrosione ..... 73
- Figura 3.30 – Andamento della fase  $\phi$  al variare della frequenza di sensori di sporcamento DS a  $t=54$  d dall'inizio della seconda prova di simulazione di formazione di deposito organico; con le linee tratteggiate sono indicati i 3 sensori in cui è stato rilevato la presenza di deterioramento dovuto a significativi fenomeni corrosivi localizzati (colore blu: DS 8, rosso: DS 9, verde: DS 10)..... 74

# INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1 - Tecniche di analisi qualitativa e quantitativa di un biofilm con riportati obiettivi, vantaggi e svantaggi (Halan et al., 2012).....	21
Tabella 2.1 - Piano sperimentale relativo alla simulazione di fenomeni di depositi inorganici, organici e fenomeni di corrosione .....	24
Tabella 2.2 - Specifiche geometriche dei sensori di sporcamento DS testati.....	26
Tabella 2.3- Portate, velocità, numero di Re nei bracci del loop per ogni prova e relativi RT.....	30
Tabella 2.4 - Dosi giornaliere macronutrienti espresse in $g\ d^{-1}$ .....	33
Tabella 2.5 - Composizione soluzione oligoelementi (concentrazioni in $g\ L^{-1}$ ).....	33
Tabella 2.6 - Soluzione salina di Winogradsky (Ministero delle politiche agricole e forestali, 2002) .....	34
Tabella 3.1 - Combinazioni di intervalli di spessore e relativi $R^2$ delle linee di tendenza per i sensori di sporcamento DS da 5 mils.....	43
Tabella 3.2 - Combinazioni di intervalli di spessore e relativi $R^2$ delle linee di tendenza per i sensori di sporcamento DS da 10 mils.....	43
Tabella 3.3 - Valori di pendenza (m) e intercetta (q) nei tre tratti, per tre valori di conducibilità (sensori da 5 mils).....	44
Tabella 3.4 - Valori di pendenza (m) e intercetta (q) nei tre tratti, per tre valori di conducibilità (sensori da 10 mils).....	44
Tabella 3.5 - Valori di pendenza n, di intercetta p e di $R^2$ (nei tre t ratti e per le due tipologie di sensori) delle regressioni lineari che identificano la relazione tra coefficienti m e q e la conducibilità .....	46
Tabella 3.6 - Valori di p-value per ogni set di dati dei test per la verifica di ipotesi dell'ANOVA e dell'ANOVA stessa.....	50
Tabella 3.7 - Valori di p-value dei test per la verifica di ipotesi dell'ANOVA e dei test alternativi applicati nei set di dati in cui le ipotesi dell'ANOVA non risultano rispettate .....	50
Tabella 3.8 - Valori di pendenza, intercetta e $R^2$ delle rette di interpolazione dei dati di $S_{misurato} - S_{reale}$ .....	53
Tabella 3.9 – Riepilogo delle misure ottenute per i sensori di sporcamento DS in loop (nero) e in batch (blu) e per i campioni in PVC (verde). I sensori evidenziati in rosso non sono stati oggetti di misurazione .....	61
Tabella 3.10 - Valori di variazione di impedenza $ Z $ misurati prima dell'estrazione dei campioni ( $\Delta R_{loop}$ ) e una volta estratti ( $\Delta R_{medio,batch}$ ) e relativa differenza. In rosso sono evidenziati i casi di discostamento delle misure pari a più di 2 ohm.....	65

*Tabella 3.11 - Valori di variazione di impedenza  $\Delta R$  per il sensore sporco e pulito, relativa differenza e spessore medio stimato tramite microscopio laser confocale ..... 65*

*Tabella 3.12 – Valori di variazione di impedenza  $\Delta R$  per il sensore sporco e pulito, relativa differenza e spessore medio stimato tramite microscopio laser confocale ..... 72*





# INTRODUZIONE

La tutela della qualità delle acque di approvvigionamento è un tema fondamentale per poter garantire un uso primario sicuro e affidabile, sia per i settori civili sia per quelli industriali. Le caratteristiche chimiche, biologiche e organolettiche subiscono trasformazioni nel corso della distribuzione all'utenza: la principale causa dell'alterazione della qualità delle acque risulta essere la formazione di depositi di tipo inorganico (come il calcare) e organico (biofilm) nei sistemi di distribuzione. Per questo motivo, diviene stringente l'esigenza di monitorare lo stato dei sistemi di distribuzione, sia per limitarne e controllarne il deterioramento (dovuto, ad esempio, a dosaggi errati di inibenti o agenti biocidi, a fenomeni di intasamento e di biocorrosione), sia per garantire, nel modo più efficiente ed economico possibile, il mantenimento della stabilità chimico-biologica delle acque, secondo i parametri previsti dalle norme vigenti.

Nell'ambito di tale problematica, ad oggi non sono utilizzati in scala reale metodi di misura diretta per la determinazione di incrostazioni calcaree o di biofilm batterico sulle superfici. Tali fenomeni vengono perciò limitati con misure preventive, spesso non ottimali. Tuttavia, sono disponibili diverse tecniche per la misura di depositi sottili su superfici solide; in particolare negli ultimi decenni sono state sviluppate tecniche impedenziometriche per misurare la crescita di biofilm batterico.

Il presente lavoro di tesi si colloca all'interno di un percorso di alcuni anni, che ha previsto l'ideazione e lo sviluppo di un sensore, denominato "Dirty Sensing" (DS), il cui brevetto è stato depositato dal Politecnico di Milano nel 2017. Tale sensore è stato progettato con l'obiettivo di stimare, proprio tramite una misura impedenziometrica, lo spessore di depositi inorganici e organici sulle superfici di condutture e serbatoi.

Il presente elaborato, quindi, si propone di analizzare le differenti risposte, in termini di impedenza, del sensore di sporcamento DS, a seguito di depositi di tipo inorganico e organico e di fenomeni di corrosione. La ricerca sperimentale è stata svolta a scala di laboratorio tramite prove in batch e in flusso; i depositi di tipo inorganico sono stati simulati dosando concentrazioni di carbonato di calcio superiori al valore limite di solubilità in acqua, mentre quelli di tipo organico predisponendo un sistema di crescita di biofilm. A seguito dell'osservazione di fenomeni di biocorrosione durante quest'ultima tipologia di esperimenti, si è deciso di svolgere prove *ad hoc* di corrosione, tramite l'immersione del sensore in soluzioni di ipoclorito di sodio. Per stimare fisicamente lo spessore di biofilm batterico è stato inoltre sviluppato un protocollo di misura mediante l'utilizzo di un microscopio laser confocale.

Nel capitolo 1, vengono illustrati i fenomeni alla base dei processi di formazione di depositi inorganici (paragrafo 1.1) e organici (paragrafo 1.2) e i principali fattori che ne influenzano le caratteristiche. Inoltre, vengono definiti i principi alla base della biocorrosione (paragrafo 1.3) e le tecniche microscopiche utilizzabili per lo studio del biofilm batterico (paragrafo 1.4).

Nel capitolo 2, viene esposto il piano sperimentale sviluppato per questo lavoro di tesi. Nel paragrafo 2.1 vengono illustrate le caratteristiche del sensore di sporcamento DS nelle sue due configurazioni geometriche (da 5 e da 10 mils); nei paragrafi 2.2 e 2.3 vengono riportati gli allestimenti sperimentali rispettivamente delle prove in batch e in flusso. Infine, nel paragrafo 2.4, viene illustrato il procedimento di misura di impedenza e di determinazione dello spessore fisico del deposito.

Nel capitolo 3, vengono prima di tutto illustrati i principi alla base del funzionamento dei microelettrodi interdigitati (paragrafo 3.1), mentre nei paragrafi 3.2, 3.3 e 3.4 vengono illustrati e discussi i risultati sperimentali per le tre tipologie di prove. I risultati ottenuti sono stati confrontati con alcune evidenze sperimentali e teorie riportate nel capitolo 1.

Infine, nel capitolo 4 sono riassunti i principali risultati di questo lavoro e vengono poste le basi per i possibili sviluppi futuri.

# 1

## STATO DELL'ARTE

Tra i fenomeni che possono alterare le caratteristiche delle acque lungo i sistemi di distribuzione dei contesti industriali e domestici, vi sono la precipitazione di sali poco solubili e la crescita di biofilm batterico sulle superfici delle condutture. La presenza di depositi può determinare un aumento dei costi di manutenzione, ad esempio per intasamenti dovuti a incrostazioni o per il deterioramento delle condotte dovuto a fenomeni di biocorrosione. Nel caso di acque potabili, inoltre, le linee guida a livello mondiale più recenti (World Health Organization, 2011) ribadiscono l'importanza per la salute umana di garantire anche al punto di utilizzo, e non solo in uscita dagli impianti di trattamento (se previsti), una qualità dell'acqua adeguata. La presenza di depositi organici, ad esempio, oltre a fenomeni corrosivi, può determinare l'alterazione delle caratteristiche organolettiche e biologiche dell'acqua, tramite il rilascio di microrganismi per il distacco del biofilm. I biofilm, per la loro struttura, possono ospitare anche microrganismi indesiderati e pericolosi per la salute umana, come protozoi, patogeni opportunisti (ad esempio, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*) e virus enterici (Abe et al., 2012; Prest et al., 2016).

Nei seguenti capitoli sono illustrate le dinamiche e i fattori che influenzano i processi di formazione di sporco inorganico (paragrafo 1.1), organico (paragrafo 1.2) e di biocorrosione (paragrafo 1.3), nell'ottica di fornire una documentazione approfondita sulla complessità di questi fenomeni e sull'influenza di alcuni parametri su di essi.

Nel paragrafo 1.4 vengono, inoltre, riportate le principali tecniche microscopiche utilizzabili per l'analisi di un biofilm; rispetto a un deposito di tipo inorganico, infatti, l'eterogeneità di questa tipologia di deposito ne rende complicato lo studio e, quindi, la sua caratterizzazione e il suo monitoraggio.

## 1.1 Sporciamento nelle tubazioni: formazione di incrostazioni inorganiche

La formazione di depositi e incrostazioni inorganiche nelle tubazioni è un problema di importanza significativa sia nel caso di sistemi in cui possono esserci flussi liquidi in condizioni particolari (ad esempio ad elevate temperature, come nel caso degli scambiatori di calore industriali e domestici) (Macadam e Parsons, 2004; Zarga et al., 2013; Hoang, 2015), sia nei sistemi di distribuzione delle acque potabili (Al-Rawajfeh e Al-Shamaileh, 2007; Mirzabeygi et al., 2016; Richards et al., 2017).

Nel caso di sistemi industriali, i casi di incrostazioni più frequenti sono legati ai sistemi di raffreddamento, il campo che fa maggior uso di acqua per scopi industriali, a quelli di desalinizzazione delle acque tramite l'utilizzo di membrane a osmosi inversa (Semiat et al., 2003) e a quelli di tubazioni di giacimenti e pozzi petroliferi (Hoang et al. 2007). In tali casi i depositi incrostanti più comuni sono costituiti dai seguenti composti (Hoang, 2015): carbonato di calcio, solfato di calcio, ossalato di calcio, solfato di bario, idrossido di magnesio, silicati, alluminosilicati, rame, fosfati.

Nei sistemi di distribuzione delle acque potabili, le incrostazioni composte da minerali sono principalmente di origine calcarea o alcalina, come il carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e gli ossidi del ferro (Makris et al., 2014). Il carbonato di calcio esiste in tre principali forme cristalline (calcite, aragonite e vaterite) e in forma amorfa. Solitamente la forma amorfa è la prima a precipitare e nel tempo si stabilizza nella forma cristallina più stabile (Radha et al., 2010; Ng et al., 1996; Wolf et al., 2008): con flussi a temperature minori di 30-40°C, il carbonato di calcio tende a stabilizzarsi sottoforma di calcite, mentre, a temperature superiori, stabilizza sottoforma di aragonite. In entrambi i casi la forma intermedia, di passaggio tra quella amorfa e la più stabile, risulta essere la vaterite (Rodriguez-Blanco et al., 2011).

In particolare, la formazione di depositi di origine calcarea nelle tubazioni è una tematica studiata già da molti decenni (Hasson et al., 1968; Gal et al, 1996). Tuttavia, risulta ancora di interesse per diversi motivi, tra cui lo spostamento dell'equilibrio calcio-carbonico delle acque superficiali dovuto ai cambiamenti climatici (Mosley, 2015), il recente utilizzo di sistemi di riscaldamento domestico che mantengono l'acqua a temperature più alte per ridurre il potenziale sviluppo di patogeni e la necessità di studiare vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di inibitori dei processi di corrosione e di deposito sulle tubature (Richards et al., 2017).

Il processo che determina l'adesione dei depositi incrostanti su una superficie può essere suddiviso in cinque fasi principali (Hoang, 2015):

- condizionamento della superficie, che avviene dal momento in cui si verificano le condizioni per la formazione di depositi incrostanti al momento in cui effettivamente il

processo di precipitazione ha inizio (tempo di induzione). Questo periodo risulta inversamente proporzionale alla temperatura della superficie, al grado di sovrasaturazione, alla rugosità superficiale del substrato;

- trasporto, in cui le sostanze incrostanti sono trasportate fino alla superficie;
- adesione, in cui i depositi aderiscono alla superficie e tra di loro. Gli ioni dei sali vengono attratti verso il substrato a causa delle forze elettromagnetiche che interagiscono tra le particelle e la superficie. In questa fase risultano determinanti le proprietà del materiale;
- maturazione, durante la quale le proprietà meccaniche dei depositi possono modificarsi a causa di cambiamenti nella struttura chimica o cristallina.

Nell'ambito di questa trattazione, inoltre, viene descritto il processo di formazione dei cristalli (paragrafo 1.1.1) costituenti i depositi inorganici, che possono aderire su una superficie secondo le fasi appena descritte, e vengono riportati i principali parametri determinanti il tasso di sporcamento e le sue caratteristiche (paragrafo 1.1.2).

### **1.1.1 Processo di formazione dei cristalli costituenti lo sporcamento inorganico su una superficie**

Perché l'acqua abbia potere incrostante deve esserci la formazione di precipitati in soluzione, ovvero deve avere luogo la cristallizzazione di sali, solitamente poco solubili, in acqua. La cristallizzazione è costituita da due fasi principali (Zarga et al., 2013):

- la nucleazione, in cui le molecole di soluto disperse nel solvente iniziano a raggrupparsi in cluster (nuclei) alla scala nanometrica, fino a raggiungere una dimensione tale da strutturarsi secondo una struttura cristallina;
- lo sviluppo dei cristalli.

La nucleazione può verificarsi in assenza di strutture cristalline nel liquido (nucleazione primaria) oppure i nuclei possono originarsi aderendo ad altri cristalli già formati (nucleazione secondaria) (Hoang, 2015). Nel primo caso, se i primi nuclei si formano spontaneamente per sovrasaturazione in assenza di impurità, il processo di nucleazione viene definito omogeneo; tuttavia, solitamente è la presenza di piccole particelle già presenti in soluzione a determinare la nucleazione (nucleazione eterogenea), soprattutto in prossimità di una superficie (Brown, 1988).

Nel caso di nucleazione primaria omogenea, il tasso di nucleazione  $J$ , ovvero il numero di nuclei formati per unità di tempo per unità di volume, è definito dall'equazione di Arrhenius (equazione 2.1) (Mullin, 2001):

$$J = A_0 \cdot \exp(-\Delta G / kT) \quad (1.1)$$

dove  $A_0$  [ $s^{-1} m^{-3}$ ] è il fattore pre-esponenziale di frequenza,  $T$  [K] la temperatura assoluta,  $k$  [ $J K^{-1}$ ] la costante di Boltzmann e  $\Delta G$  [ $J mol^{-1}$ ] è l'energia libera di Gibbs associata alla nucleazione primaria omogenea, descrivibile tramite l'equazione:

$$\Delta G = \frac{cost \cdot \Gamma^3 \cdot u^2}{(k \cdot T \cdot \ln S)^2} \quad (1.2)$$

dove  $\Gamma$  [ $J m^{-2}$ ] è l'energia superficiale,  $S$  [-] il rapporto di sovrasaturazione (che fornisce un'indicazione sulla concentrazione di una soluzione rispetto alla soluzione satura) e  $u$  [ $m^3$ ] il volume della molecola. Solitamente, tuttavia, la tubazione può essere assimilata a un sito di nucleazione eterogeneo, per il quale l'energia necessaria (energia di attivazione) affinché si verifichi il processo è minore (Hoang, 2015). Come si evince dalle equazioni 1.1 e 1.2, oltre al termine  $S$ , il tasso di nucleazione è dipendente dalla temperatura  $T$  e dall'energia superficiale  $\Gamma$ ; in particolare a una temperatura più alta e a una minore l'energia superficiale corrisponde un tasso di nucleazione  $J$  maggiore.

La fase di nucleazione e quella di sviluppo dei cristalli si verificano simultaneamente finché permane una condizione di sovrasaturazione della soluzione, che è la forza motrice del processo di cristallizzazione. Una volta raggiunto l'equilibrio nel sistema solido-liquido il processo è concluso fino ad eventuali modifiche delle condizioni di equilibrio.

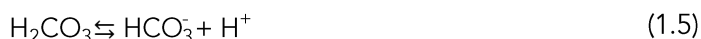
## 1.1.2 Fattori influenzanti la formazione di incrostazioni inorganiche

Come già illustrato, tra i diversi fattori che determinano il tasso di nucleazione, ovvero la velocità di formazione di incrostazioni, il più significativo è il grado di sovrasaturazione (Hoang et al., 2011). In particolare, maggiore è il rapporto di sovrasaturazione e maggiore è la quantità di deposito che si forma sulle superfici. La condizione di sovrasaturazione di una soluzione può essere il risultato di diverse condizioni tra le quali il riscaldamento/raffreddamento di una soluzione, l'evaporazione di acqua, la miscelazione di soluzioni diverse o un equilibrio gas-liquido.

In particolare, il carbonato di calcio viene definito un sale inversamente solubile, in quanto all'aumentare della temperatura diminuisce la sua solubilità in acqua; in caso di fluidi a temperatura elevata, vi è quindi una probabilità maggiore di formazione di precipitati.

L'evaporazione di acqua o la miscelazione di soluzioni diverse, invece, determinano delle nuove condizioni di equilibrio che possono portare la soluzione a un livello molto vicino o superiore al livello di sovrasaturazione.

La soluzione può passare a condizioni di sovrasaturazione anche nel caso di spostamento dell'equilibrio calcio-carbonico, descritto dal seguente sistema di equazioni (Sawada et al., 1997):



I carbonati ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e i bicarbonati ( $\text{HCO}_3^-$ ) sono sali derivanti dalla presenza in acqua dell'acido carbonico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Le costanti di dissociazione dell'acido carbonico e, di conseguenza, la presenza relativa dei tre composti in acqua è dipendente dal pH (McAdam e Parsons, 2004) (equazioni 1.8 e 1.9):

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 2.5 \cdot 10^{-4} \quad @T=25^\circ\text{C} \quad (1.8)$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} = 5 \cdot 10^{-11} \quad @T=25^\circ\text{C} \quad (1.9)$$

I valori delle equazioni 1.8 e 1.9 espressi in forma logaritmica ( $\text{p}K_{a1}$  e  $\text{p}K_{a2}$ ), corrispondono rispettivamente ai valori di 6,4 e 10,3. In particolare, a pH superiori a 10,3 i carbonati risultano la forma carbonica inorganica dominante (Plummer e Busenberg, 1982). Tenendo conto anche della costante di solubilità del carbonato di calcio ( $K_{ps}$ ), pari a  $8,7 \cdot 10^{-9}$  con  $T=25^\circ\text{C}$ , ad un aumento del pH può quindi corrispondere la precipitazione di carbonato di calcio per superamento del prodotto di solubilità (Varaprasad e Viswanadh, 2012).

Il grado di sovrasaturazione è legato alla durezza dell'acqua, espressione della presenza di ioni bivalenti (prevalentemente ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) in essa; Varaprasad e Viswanadh (2012) hanno osservato sperimentalmente una crescita dello spessore del deposito proporzionale linearmente alla durezza dell'acqua.

Il solo grado di sovrasaturazione non è però un parametro sufficiente alla formazione di depositi, che può verificarsi quando diversi nuclei stabili nel flusso in movimento attecchiscono alla superficie secondo il processo descritto nel paragrafo 1.1.1: tra i parametri da considerare vi è quindi anche il tempo di contatto del flusso con la superficie. Il processo incrostante può infatti avere luogo solo con un adeguato tempo di contatto, il cui valore limite è a sua volta influenzato da fattori idrodinamici, da proprietà della superficie e dalla temperatura del flusso.

Differenti velocità possono limitare o accelerare la formazione di depositi, a causa dello strato limite che si forma in prossimità della superficie e che ha caratteristiche diverse dal resto del flusso (Najibi e Jamiaiahmadi, 1997); secondo gli studi di Hoang et al. (2011), all'aumentare della velocità (tra 0,2 e 7  $\text{cm s}^{-1}$ ) aumenta la quantità di massa in forma di deposito proveniente da una soluzione

saturo di gesso ( $\text{CaSO}_4$ ), per la diminuzione della resistenza diffusiva. Per lo stesso campo di velocità Hoang et al. (2011) hanno identificato, inoltre, una relazione lineare positiva tra il logaritmo del numero di Reynolds e il logaritmo della massa di deposito. Da esperimenti condotti a velocità più elevate, tra i 75 e 175  $\text{cm s}^{-1}$ , Yu et al. (2002) hanno invece verificato il fenomeno contrario, a causa dell'aumentare degli sforzi di taglio.

Entrambi i risultati concordano con quanto riportato da Watkinson e Martinez (1975), secondo i quali il tasso di sporcamento (*fouling resistance*, espresso in  $(\text{J s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{K}^{-1})^{-1}$ ) inizialmente cresce con la velocità del flusso e poi decresce (figura 1.1).

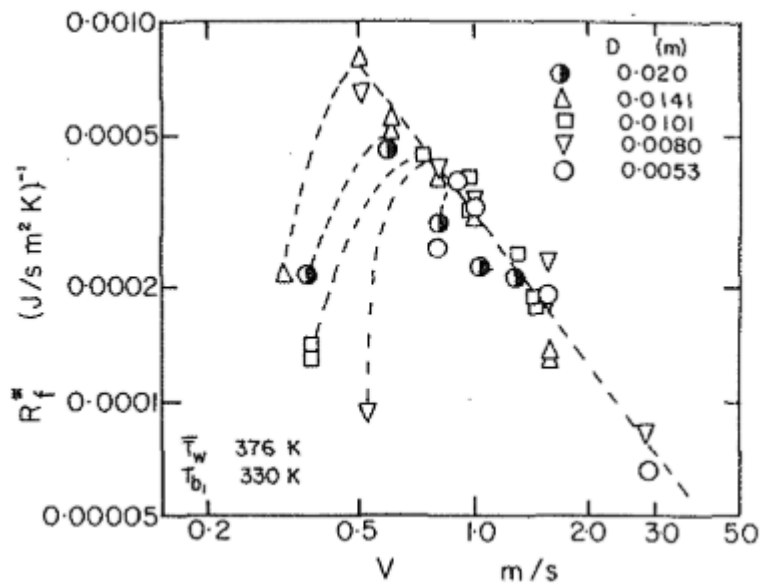


Figura 1.1 - Andamento del tasso di sporcamento al variare della velocità del flusso e del diametro del condotto (Watkinson e Martinez, 1975)

La tipologia di superficie è un altro fattore che influenza notevolmente il tasso di sporcamento inorganico e le sue proprietà fisiche e meccaniche.

L'energia superficiale del materiale, infatti, determina la forza di adesione tra i depositi e le superfici (McAdam e Parsons, 2004). Diversi studi (Müller-Steinhagen e Zhao, 1997; Yang et al., 2002) hanno evidenziato come una minore energia superficiale riduca la forza di adesione del calcare e di altri depositi ( $\text{CaSO}_4$ ), aumentando anche il tempo di latenza del processo (Förster et al., 1999).

Nonostante in letteratura siano presenti numerosi studi riguardanti l'energia superficiale dei materiali utilizzati nelle condotte, non è immediato determinarne la tendenza incrostante. I materiali studiati negli ultimi decenni sono soprattutto i metalli (rame, acciaio inossidabile/acciaio dolce e alluminio) e i materiali polimerici (PVC, PP).

Per quanto riguarda i metalli, le conclusioni riportate in letteratura sull'energia superficiale e la tendenza incrostante risultano contraddittorie: per Dalas e Koutsoukos (1990) l'acciaio inossidabile e l'alluminio presentano un simile potenziale incrostante; per Troup e Richardson (1978) è



l'alluminio il materiale con la tendenza incrostante più alta, seguito dall'acciaio dolce e dal rame; per MacAdam e Parsons (2004) invece il rame ha un tasso di sporcamento maggiore rispetto all'acciaio e all'alluminio.

Solitamente ai materiali inerti (come i polimeri) si associa una tendenza incrostante minore rispetto alle superfici metalliche (Githens, 1965). Tra le motivazioni emerge il fatto che anche la rugosità superficiale del materiale e l'età del condotto (Varaprasad e Viswanadh; 2012). Tuttavia, uno studio simile (Wang et al., 2005) non ha riscontrato differenze statisticamente significative tra i depositi formati su superfici di rame e di materiale polimerico (tra cui il PP).

## 1.2 Sporcamento nelle tubazioni: formazione di biofilm

In natura più del 99% dei microorganismi vive in forma di biofilm, ovvero in forma adesa a una superficie e immerso in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) (Costerton, 1987). In particolare, nel caso dei sistemi di distribuzione dell'acqua in uscita dai sistemi di trattamento, più del 95% della biomassa è presente non in forma sospesa ma come biofilm (Flemming et al., 2002).

Il biofilm si differenzia dalla biomassa in forma sospesa per la produzione di EPS (Donlan, 2002); tuttavia, in questa matrice possono essere inglobati anche materiali non cellulari come cristalli minerali, particelle dovute alla corrosione del substrato, particelle di argilla o altro a seconda dell'ambiente e della superficie su cui si sviluppa. I batteri associati in un biofilm differiscono da quelli sospesi anche per l'alterazione del proprio fenotipo e della trascrizione dei geni (Donlan, 2001).

Lo studio del biofilm risulta di significativa importanza dal momento che i batteri che vivono al suo interno non si distribuiscono sulla superficie di attecchimento in maniera casuale, ma beneficiano della cooperazione interspecifica mostrando, grazie a "barriere" di diffusione, una maggiore resistenza alle sostanze tossiche rispetto alla biomassa planctonica (Elias e Banin 2012, Costerton et al., 1994). Inoltre, la struttura del biofilm permette interazioni tra diverse specie batteriche tramite l'escrezione di molecole "segnalatrici", secondo un fenomeno chiamato *quorum sensing*, e risulta più resistente agli sforzi di taglio (Chaves Simões e Simões, 2013).

## 1.2.1 Fasi di crescita del biofilm

La formazione del biofilm è un processo dinamico risultante dal bilancio di diversi fattori fisici e biochimici (D'Acunto et al., 2017; Monds e O'Toole, 2009), nel quale si possono distinguere quattro fasi:

1. Condizionamento della superficie di adesione, in cui avviene la formazione di un film sottile di molecole organiche e ioni per adsorbimento fisico o chimico, prima che i microorganismi attecchiscano alla superficie (Albert et al., 2017). La natura del film sottile dipende dal tipo di esposizione della superficie (Mizaikoff et al., 2011); in letteratura, infatti, sono documentati casi di substrati, costituiti da materiali inorganici come ossidi metallici o particelle fini di argilla (Cowle et al., 2014). La durata di questa fase è definita "tempo di latenza" (*lag time*) ed è determinata dalle caratteristiche del flusso a contatto con la superficie (viscosità, regime idrodinamico) e dalla superficie stessa (rugosità superficiale). La coesione delle molecole in questa fase influenza significativamente la forza di adesione del biofilm nelle fasi successive (Busscher et al., 1995);
2. Trasporto delle cellule planctoniche dal bulk alla prossimità della superficie, per effetto della fluidodinamica, delle forze gravitazionali e dei moti browniani (Bos et al., 1999);
3. Adesione delle cellule alla superficie di tipo reversibile o irreversibile. Nel caso di processo reversibile i batteri continuano ad essere soggetti a moti browniani (Vigeant et al., 2002) e possono essere rimossi tramite sforzi di taglio poco intensi o dal movimento delle cellule stesse; valgono invece considerazioni opposte per l'adesione di tipo irreversibile. Solitamente il processo di adesione iniziale è di tipo reversibile (van Loosdrecht et al., 1990). Il fenomeno, considerando solo forze a lunga-media distanza di interazione, è descrivibile mediante la teoria DLVO sviluppata in maniera indipendente da Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948) per spiegare il comportamento dei solidi colloidali liofobi (Oliveira, 1992). In prima approssimazione, infatti, i batteri possono essere assimilati sistemi colloidali viventi. La teoria DLVO descrive la variazione dell'energia libera di Gibbs  $G_{tot}$  come funzione della distanza  $H$  tra due corpi, ottenuta dalla somma dell'interazione dovuta alle forze di Van der Waals  $G_A$  (attrattiva) e l'interazione elettrostatica  $G_E$  (repulsiva, poiché solitamente i batteri e le superfici presentano entrambi una carica superficiale negativa).

In figura 1.2 sono riportati gli andamenti delle due componenti  $G_A$ ,  $G_E$  e della risultante  $G_{tot}$  in tre situazioni di forza ionica della soluzione (van Loosdrecht et al., 1990). Se il valore della forza ionica non è elevato  $G_{tot}$  presenta un massimo che impedisce l'adesione nel primo minimo; all'aumentare della forza ionica cresce anche il valore massimo di  $G_{tot}$  in quanto vi è una riduzione dell'intervallo repulsivo di  $G_E$  e può verificarsi un graduale processo di adesione irreversibile. Per  $H$  più elevati (qualche nanometro) esiste un punto di minimo, definito secondario, dove generalmente si verifica il processo iniziale di

adesione reversibile, in quanto le cellule sono libere di muoversi parallelamente alla superficie (van Loosdrecht et al., 1989).

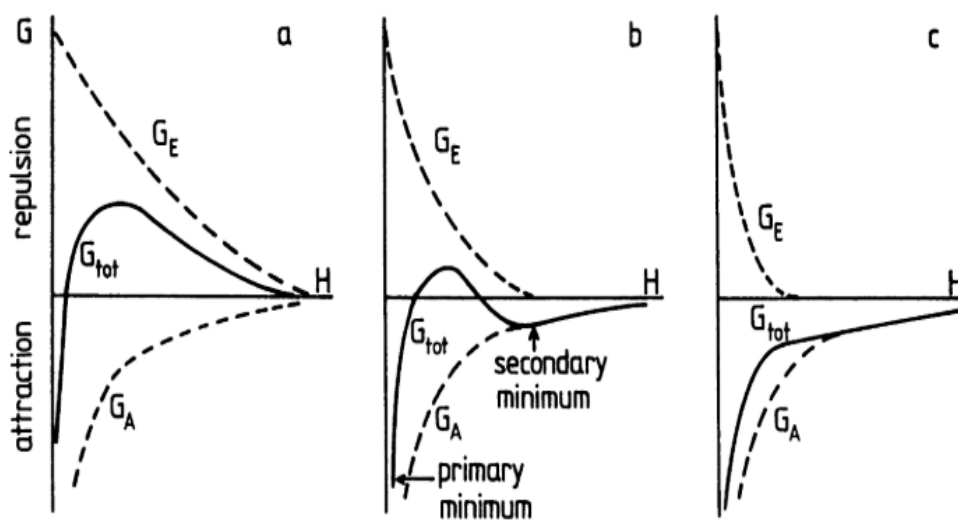


Figura 1.2 - Energia di Gibbs tra una sfera e una superficie piana con la stessa carica superficiale, secondo la teoria DLVO: (a) bassa (b) intermedia (c) elevata forza ionica

Le forze che invece che possono agire a breve distanza sono le interazioni idrofobiche, le forze steriche, le forze di repulsione di Born e i ponti polimerici.

4. Crescita e maturazione del biofilm, in cui i microorganismi adesi formano microcolonie e producono EPS che costituiscono la matrice. Durante la fase iniziale (crescita esponenziale) il tasso di crescita risulta predominante rispetto al tasso di decadimento e distacco; nella fase di maturazione viene raggiunto un equilibrio tra i diversi processi (adesione e distacco, crescita e decadimento) e vi è il completo sviluppo di un sistema di microorganismi immersi in una matrice organica.

Tuttavia, può verificarsi un'alterazione dell'equilibrio raggiunto nella fase di maturazione, ad esempio tramite la perdita del biofilm per distacco o sfaldamento del biofilm, come combinazione di processi biologici e fisici (Cowle et al., 2014a), oppure per predazione (*grazing*) di altre specie (Rogers et al., 1994; Boe-Hansen et al., 2002).

In figura 1.3 si riporta lo sviluppo ideale di un biofilm (Cowle et al., 2014), nel caso di due diversi scenari di velocità del flusso; le condizioni idrodinamiche, come riportato nel paragrafo 1.2.3, rappresentano infatti uno dei parametri influenzanti la struttura del biofilm.

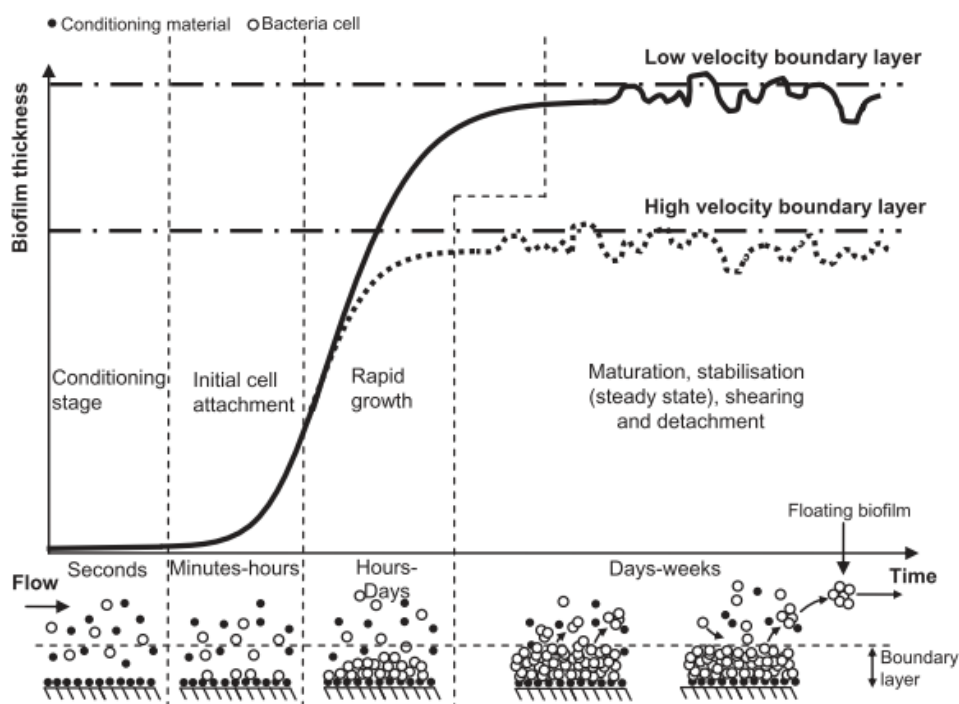


Figura 1.3 - Schematizzazione ideale dello sviluppo del biofilm per due scenari di velocità (Cowle et al., 2014)

## 1.2.2 Composizione e struttura del biofilm

Come illustrato all'inizio del paragrafo 1.2, il biofilm può essere definito come un insieme di microrganismi, principalmente batteri, ma anche archei, funghi e protozoi (Wang et al., 2014), adesi alla superficie grazie alla secrezione di EPS. L'acqua è considerata il maggior componente del biofilm (fino ad arrivare a percentuali superiori al 95% (Zhang et al., 1998)), gli EPS costituiscono in termini di carbonio organico totale dal 50% al 90% del biofilm (Flemming e Wingender, 2001). La matrice di EPS fornisce integrità strutturale e funzionale al biofilm ed il suo studio è essenziale per determinare le proprietà fisico-chimiche e biologiche del biofilm. Con il termine EPS si intende in maniera generica sostanze polimeriche extracellulari, definizione che vuole comprendere differenti classi di macromolecole come i polisaccaridi, le proteine, gli acidi nucleici, i fosfolipidi e altre sostanze polimeriche (Wingender et al., 1980).

Gli EPS, oltre a garantire l'aggregazione tra cellule e ad essere il fondamento strutturale del biofilm, promuovono l'iniziale adesione dei batteri a superfici ricche di nutrienti. Inoltre, hanno la funzione di barriera protettiva rispetto a certi biocidi e predatori e di accumulo di nutrienti dall'ambiente (Wingender et al., 1980).

L'utilizzo di strumenti sempre più raffinati e precisi a livello microscopico (paragrafo 1.4) ha permesso di affinare lo studio e migliorare la conoscenza della struttura e la composizione del biofilm (Böl et al., 2013). Il biofilm, da essere schematizzato come uno strato omogeneo e modellizzato in una dimensione (lungo l'asse  $z$ , ovvero quello perpendicolare al substrato di crescita), oggi viene studiato come una matrice eterogenea e spesso anche modellizzato bi- o tridimensionalmente (figura 1.4), a seconda delle applicazioni (Mattei et al., 2018).

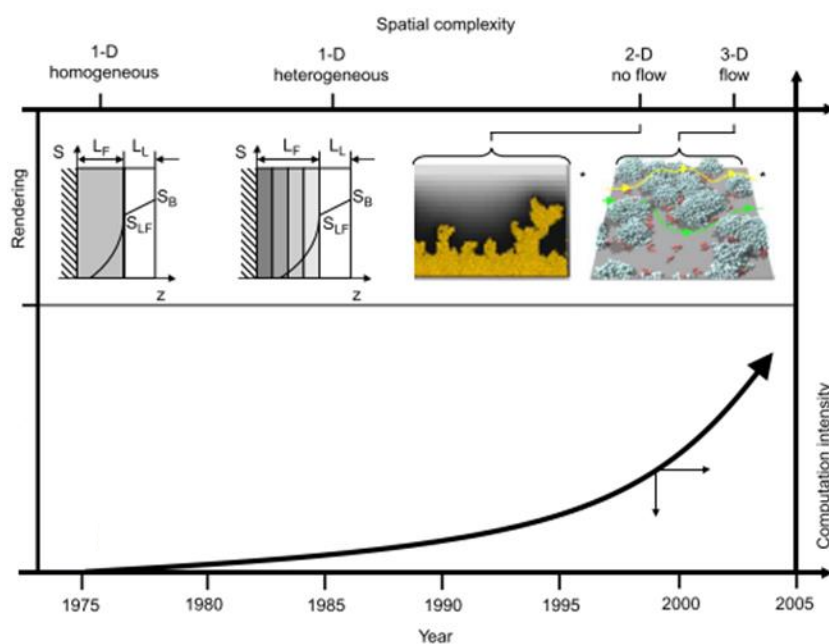


Figura 1.4 - Evoluzione dei modelli di descrizione di biofilm dagli anni '70 agli anni '00 (da Boltz et al. (2010))

L'eterogeneità del biofilm può essere categorizzata in quattro tipologie (Picioreanu et al., 2000):

1. eterogeneità geometrica, relativa allo spessore, alla rugosità superficiale, alla porosità e alla copertura areale del biofilm;
2. eterogeneità chimica, dovuta ai diversi nutrienti, prodotti metabolici e alle diverse reazioni coinvolte;
3. eterogeneità biologica, relativa alle diverse specie microbiche presenti;
4. eterogeneità fisica, legata ai diversi valori di densità, permeabilità, viscosità del biofilm e diffusività e concentrazione dei soluti.

In letteratura lo studio, l'osservazione e la modellizzazione del biofilm sono stati portati avanti su diversi livelli di scala spaziale (figura 1.5): a livello di macroscale sono studiate le eterogeneità del biofilm in termini di copertura areale; a livello di mesoscale possono essere osservate e studiate le eterogeneità alla scala dello spessore del biofilm, come la rugosità superficiale e i pori e i canali nel volume del biofilm. Alla microscale l'interesse si focalizza sulle eterogeneità dal punto di vista della distribuzione delle colonie cellulari, delle diverse specie coinvolte e della diffusione delle sostanze di interesse come nutrienti o biocidi.

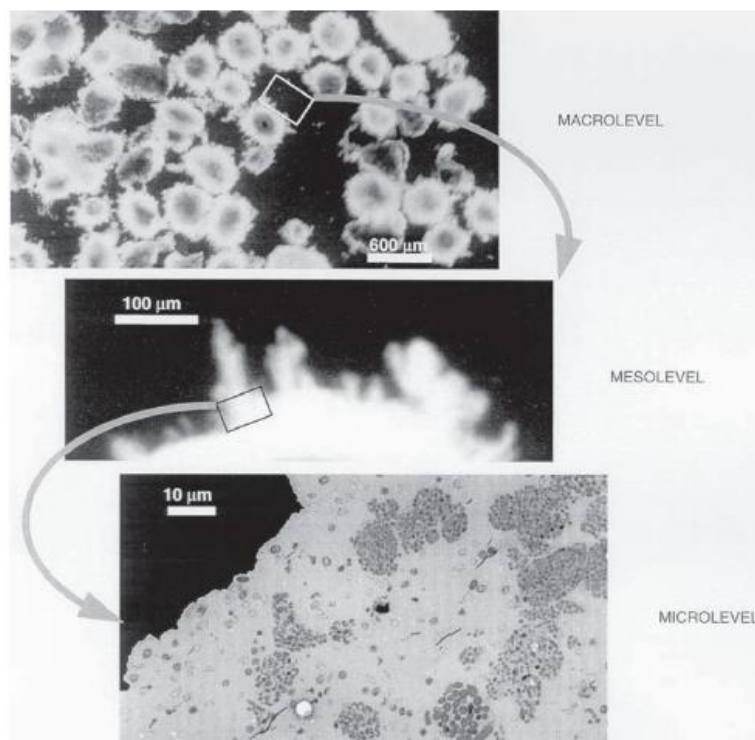


Figura 1.5 - I tre livelli di eterogeneità di un biofilm (Piciooreanu et al., 2000)

Nell'ambito di questa trattazione non sono riportate considerazioni riguardanti la descrizione delle caratteristiche del biofilm lungo il suo spessore; tuttavia, in letteratura si trovano molte ricerche focalizzate su tale aspetto sia dal punto di vista modellistico sia dal punto di vista sperimentale.

### 1.2.3 Fattori influenzanti lo sviluppo di biofilm

Lo sviluppo e la struttura del biofilm dipendono da diversi fattori, che possono essere suddivisi in 4 macro-categorie: la tipologia di superficie, le condizioni idrodinamiche del flusso a contatto con la superficie, i nutrienti e gli eventuali inibitori presenti, le caratteristiche dei microorganismi a contatto con il biofilm (Stoodley et al., 1997), oltre ai parametri di pH e temperatura (Chaves Simões, 2012).

Le caratteristiche della superficie influenzano in maniera significativa soprattutto la fase iniziale dello sviluppo del biofilm; in particolare, la rugosità superficiale favorisce l'attecchimento del biofilm (Verran et al., 1991). Superfici contraddistinte da un'elevata rugosità, infatti, offrono alle colonie batteriche un'area maggiore su cui aderire e una migliore protezione dagli sforzi di taglio; inoltre, i nutrienti (come il fosforo, il ferro, il potassio e il manganese) possono accumularsi sulle pareti dei condotti ed essere assorbiti dai microorganismi (Ridgway e Olson, 1981). Tuttavia, quando il periodo di crescita è sufficientemente lungo (ad esempio, più di 12 mesi), solitamente il biofilm raggiunge un equilibrio che non risente della rugosità del materiale (Chowdhury, 2012). L'affinità delle colonie batteriche alle superficie è influenzata anche da caratteristiche fisico-

chimiche del materiale, come l'idrofobicità; solitamente i microorganismi attecchiscono meno facilmente su superfici idrofiliche, come vetro e metalli (Donlan, 2002). In ogni caso, in molti esperimenti, come quello riportato da Rogers et al. (1994), è stata valutata la propensione dei diversi materiali utilizzati per le condotte a fungere da substrato per il biofilm e tutti sono risultati compatibili alla formazione di fouling di tipo organico. L'unico materiale che risulta avere un effetto limitante sullo sviluppo del biofilm risulta essere il rame, in quanto inibisce la catena respiratoria batterica (Dwidjosiswojo et al., 2011). Alcuni materiali polimerici inoltre rilasciano sostanze organiche biodegradabili che fungono da fonte di nutrienti per i batteri (Bucheli-Witschel, et al., 2012).

Le condizioni idrodinamiche a cui il biofilm è sottoposto ne influenzano notevolmente la struttura (densità, spessore, rugosità) e i parametri legati alla diffusione dei nutrienti o degli inibitori. Sia in regime di moto laminare sia in regime di moto turbolento, lo sviluppo del biofilm ha un andamento nel tempo a sigmoide (figura 1.3); tuttavia, lo stato stazionario (*plateau*) viene raggiunto prima nel caso di velocità più basse (Stoodley et al., 1998). Sperimentalmente è stato riscontrato come la densità del biofilm aumenti al crescere della velocità del flusso e quindi con l'aumento degli sforzi di taglio (Wäsche et al., 2002); viceversa, con bassi sforzi di taglio la struttura del biofilm è contraddistinta da elevata porosità e protuberanze (Kwok et al., 1997). In figura 1.6 si riportano, a titolo di esempio, i risultati sperimentali ottenuti nel caso di un reattore a letto fluido per quanto riguarda la relazione tra sforzi di taglio [ $\text{dyne cm}^{-2}$ ], densità [ $\text{mg SV cm}^{-3}$ ] e lo spessore [ $\mu\text{m}$ ] del biofilm (Liu & Tay, 2001).

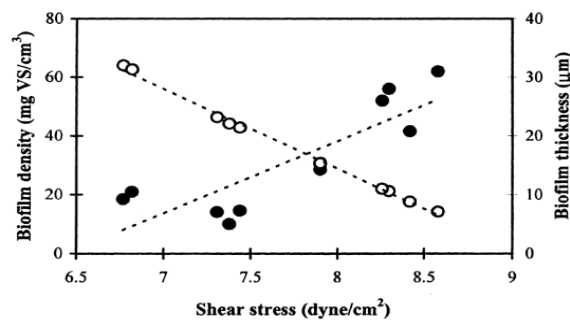


Figura 1.6 - Variazione della densità del biofilm e del suo spessore in relazione agli sforzi di taglio applicati in un reattore a letto fluido (Liu and Tay, 2001 con dati di Chang et al. (1991))

Le condizioni idrodinamiche determinano anche il tasso di trasporto delle cellule, dell'ossigeno e dei nutrienti all'interfaccia solido-liquido (trasporto di massa esterno) e lungo lo spessore del biofilm (trasporto di massa interno). Il coefficiente di trasferimento di massa esterno  $k_m$ , quantifica il tasso di trasporto dei nutrienti dal flusso all'interfaccia liquido-biofilm  $N_s$  (Beyenal e Lewandowski, 2002) secondo la relazione:

$$N_s = k_m \cdot (C_b - C_s) \quad (1.10)$$

dove  $C_b$  [ $\text{kg m}^{-3}$ ] è la concentrazione di nutrienti nel flusso,  $C_s$  [ $\text{kg m}^{-3}$ ] è la concentrazione di nutrienti in corrispondenza della superficie del biofilm e  $k_m$  per semplificazione può essere calcolato tramite la relazione (Moreira et al., 2015):

$$k_m = \frac{Sh \cdot D}{d} \quad (1.11)$$

dove  $D$  [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ] è il coefficiente molecolare di diffusività del nutriente limitante in acqua (variabile a seconda della temperatura),  $d$  [m] è il diametro del condotto e  $Sh$  [-] è il numero di Sherwood, solitamente ricavato tramite relazioni empiriche. Il numero di Sherwood si esprime come funzione del numero di Reynolds  $Re$  [-] e del numero di Schmidt  $Sc$  [-]:

$$Sh = f \left( Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\mu}; Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D} \right) \quad (1.12)$$

dove  $\rho$  [ $\text{kg m}^{-3}$ ] è la densità del fluido,  $v$  [ $\text{m s}^{-1}$ ] è la velocità media del flusso e  $\mu$  [Pa s] è la viscosità dinamica del fluido.

Il trasporto dei nutrienti dal flusso all'interfaccia, quindi, aumenta al crescere della velocità del flusso. All'interfaccia solido-liquido, ipotizzando che non ci sia consumo di substrato nel flusso, il flusso di nutrienti attraverso il biofilm si conserva e vale perciò la seguente relazione (Beyenal & Lewandowski, 2002):

$$N_s = k_m \cdot (C_b - C_s) = D_f \left. \frac{dC}{dz} \right|_{z=L_f} \quad (1.13)$$

dove  $D_f$  è il coefficiente di diffusività del nutriente limitante alla crescita nel biofilm (in questo contesto considerato costante),  $L_f$  è lo spessore del biofilm e  $D_f \left. \frac{dC}{dz} \right|_{z=L_f}$  è espressione della prima legge di Fick. Lungo lo spessore del biofilm il trasporto dei nutrienti avviene principalmente per diffusione; anche il coefficiente di diffusività è legato implicitamente alle condizioni idrodinamiche del flusso, in quanto maggiore è la densità del biofilm, minore è la diffusione dei nutrienti all'interno dello stesso (Beyenal e Lewandowski, 2002).

Anche la concentrazione di nutrienti (carbonio, azoto, fosforo) influenza la formazione e la struttura del biofilm. Diversi studi (Kjelleberg et al., 1985; Petrova e Sauer, 2012; Chen et al., 2005) riportano come non solo i microorganismi presenti all'interno di un biofilm si sviluppino anche in condizioni oligotrofiche e sopravvivano a condizioni temporanee di assenza di nutrienti (*starvation*), ma anche il fatto che la produzione di EPS, ovvero delle sostanze che favoriscono l'attecchimento del biofilm nelle prime fasi, sia incentivata da condizioni apparentemente sfavorevoli. Questo avviene anche nel caso di substrati più difficilmente assorbibili dai batteri presenti nel biofilm (Sheng et al., 2010), in quanto il tasso di produzione degli EPS risulta inversamente proporzionale al tasso di crescita dei batteri (Balzar, 2017).



Condizioni ad elevate concentrazioni di nutrienti, infatti, determinano la formazione di biofilm poco compatto, con una struttura facilmente attaccabile dagli sforzi di taglio esercitati dal flusso (Petrova e Sauer, 2012) e favoriscono piuttosto la crescita di biomassa in forma planctonica (Teodósio et al., 2011).

## 1.3 Fenomeni di biocorrosione

Il fenomeno di corrosione si può definire come un'interazione fisico-chimica tra un metallo e l'ambiente circostante che provoca alterazioni nelle proprietà e nella funzione del metallo. I parametri da considerare per lo studio di questo fenomeno sono il materiale, la sua superficie e l'ambiente circostante (Liengen et al., 2014). Il termine *Microbially Influenced Biocorrosion* (MIC) o biocorrosione si riferisce allo stesso fenomeno, ma promosso o accelerato dalla presenza di biofilm sulla superficie di interesse (Videla e Herrera, 2005).

La biocorrosione è un processo elettrochimico (de Romero e Urdaneta, 2004) determinato dalla presenza di microorganismi in forma di biofilm, da una fonte di energia, da una fonte di carbonio, da un donatore e un accettore di elettroni e dall'acqua (Iwona et al., 2000).

Le caratteristiche di un biofilm possono cambiare molto rapidamente in risposta a determinate fattori ambientali, causando a loro volta variazioni fisico-chimiche del materiale colonizzato alla scala micro- o submicrometrica. La presenza di biofilm può aumentare il tasso di corrosione dei materiali fino a 1000-10000 volte, modificando le condizioni elettrochimiche all'interfaccia metallo-soluzione (Videla, 2018).

Tale fenomeno può interessare sia i sistemi di distribuzione delle acque potabili sia quelli industriali (Beech e Sunner, 2004), alterando le caratteristiche organolettiche e chimico-fisiche delle acque di interesse; tuttavia, ad oggi non sono ancora presenti metodi affidabili e rapidi per la valutazione del rischio da biocorrosione e per il monitoraggio del fenomeno (Liengen et al., 2014).

In figura 1.7, si riporta uno schema esemplificativo dei principali aspetti e processi che possono contribuire alla biocorrosione in un'ambiente in condizioni aerobiche e anossiche; in particolare possono contribuire al fenomeno le specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species* - ROS), i batteri solforiduttori (*Sulphate-Reducing Prokaryotes* - SRP), i batteri solfoossidanti (*Sulphur-Oxidizing Bacteria* - SOB), i batteri metallo-ossidanti (*Metal-Oxidizing Bacteria* - MOB), i batteri metallo-riducenti (*Metal-Reducing Bacteria* - MRB) e i batteri acidoproduttori (*Aciding-Producing Bacteria* - APB).

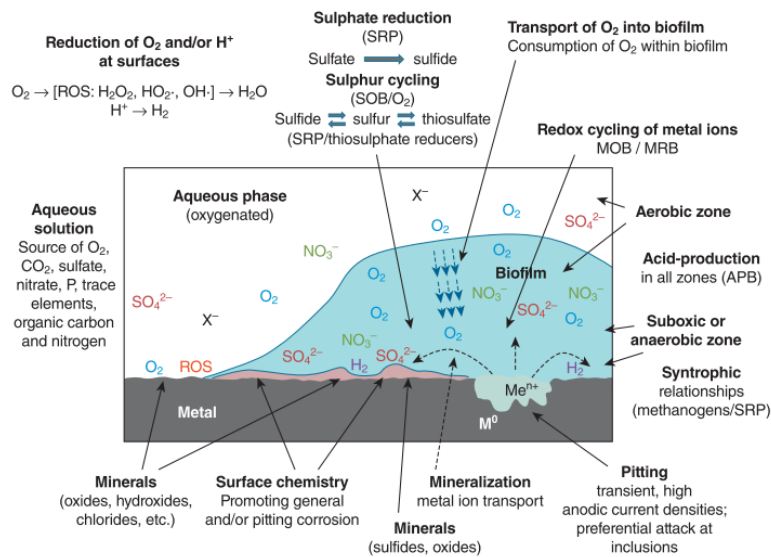


Figura 1.7 - Schematizzazione dei principali aspetti e processi caratterizzanti il fenomeno di biocorrosione in un ambiente in condizioni aerobiche/anoossiche

Il fenomeno di biocorrosione si può verificare secondo diversi meccanismi (Liengen et al., 2014):

- vaiolatura (*pitting*) in cui la corrosione del materiale appare localizzata e concentrata in piccole aree;
- corrosione in fessura;
- corrosione galvanica;
- dealligazione, quando, in una lega, il metallo più elettronegativo viene rimosso in modo selettivo;
- tensocorrosione (o corrosione sotto sforzo)
- altri meccanismi minori.

Generalmente, data l'eterogeneità geometrica, chimica e biologica del biofilm, almeno nei primi stadi la biocorrosione si manifesta in modo localizzato; tuttavia, se il fenomeno persiste, può provocare o accelerare fenomeni di corrosione diffusa.

Il tasso di corrosione può essere valutato tramite tecniche qualitative/semi-quantitative di ispezione visiva e tramite misure gravimetriche (Liengen et al., 2014). Per monitorare un fenomeno di corrosione generalizzato o localizzato, invece, è possibile utilizzare tecniche elettrochimiche (Liengen et al., 2014; Tribollet, 2003), tra cui quelle basate su misure impedenziometriche. Molto spesso, tuttavia, diversi approcci per lo studio di questo fenomeno sono stati sviluppati solo a scala di laboratorio.

## 1.4 Studio e analisi del biofilm tramite tecniche microscopiche

Le comunità batteriche che crescono in forma di film sottile sulle superfici e le caratteristiche del biofilm possono essere investigate sperimentalmente tramite molteplici tecniche di analisi microscopica, selezionabili a seconda dei parametri di interesse.

Negli ultimi decenni, le principali caratteristiche oggetto di analisi sono state:

- la distribuzione spaziale delle cellule batteriche sul supporto di crescita del biofilm;
- la composizione della matrice EPS e i ceppi batterici presenti all'interno del biofilm;
- lo spessore del biofilm;
- la struttura del biofilm;
- la richiesta di ossigeno, di substrati e i loro profili di concentrazione nel biofilm;
- la risposta a particolari condizioni al contorno (ad esempio, sforzi di taglio dovuti alla variazione delle condizioni idrodinamiche nel bulk).

In tabella 1.1 vengono riportati alcuni tra i metodi utilizzati per l'analisi del biofilm, suddivisi per le principali esigenze di studio (Halan et al., 2012) per le quali in questi decenni sono stati utilizzati. Di seguito, vengono approfonditi i metodi legati allo studio della struttura e dell'architettura del biofilm; per i restanti vengono indicati solo alcuni articoli scientifici di riferimento e non è riportata una trattazione di dettaglio.

Per decenni lo Scanning Electron Microscopy (SEM) è stato il principale strumento utilizzato per studiare la morfologia del biofilm su scala micrometrica (Walker et al., 1998). Il SEM è una tecnica in cui un fascio sottile di elettroni ad alta energia è utilizzato per scansionare il campione. Gli elettroni secondari e retro-diffusi vengono quindi catturati per ottenere immagini ad alta risoluzione; è perciò necessario applicare il vuoto per evitare che alcuni di questi si diffondano in aria. Tuttavia, con questa tecnica si verificano alterazioni del campione (Woldringh et al., 1977) dovute alla necessaria essiccazione e al mantenimento ad alto vuoto. Per superare questa problematica sono state sperimentate tecniche in umido (Environmental Scanning Electron Microscopy, ESEM) in cui il campione non viene essiccato, viene mantenuto sotto vuoto in maniera meno invasiva e in cui al tempo stesso vengono applicati e riadattati i protocolli del SEM, come quelli legati alle diverse colorazioni utilizzate per studiare la composizione del biofilm (Priester et al., 2007).

L'Atomic Force Microscopy (AFM) è una tecnica che fornisce principalmente informazioni sulla morfologia del biofilm, ma non sulle sue caratteristiche chimiche. Tale strumento permette di generare immagini di superfici misurando l'interazione fisica tra una punta molto affilata e il

campione da analizzare. L'AFM è solitamente utilizzato per ottenere informazioni sulla topografia e sulla morfologia del substrato (in caso di corrosione delle superfici, ad esempio) e del biofilm; inoltre può fornire informazioni sul comportamento meccanico locale del biofilm (Böl et al., 2013) e sulla sua carica superficiale. Il principale difetto di tale metodologia è quello di deformare il campione durante la misura, alterandone potenzialmente alcuni parametri di interesse.

Il Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) è considerata una delle più importanti tecniche per la misura del biofilm, poichè permette lo studio della morfologia, della fisiologia e la risposta agli stress esterni del biofilm senza alterazioni significative del campione. Tale tecnica permette di ottenere immagini in 3D del biofilm scansionando e mettendo a fuoco un piano per ogni z in un intervallo definito. Il fascio laser utilizzato può essere di diverse lunghezze d'onda, a seconda di ciò che si vuole studiare. Solitamente il CLSM viene accoppiato con l'utilizzo di protocolli di colorazione; tra i diversi parametri di interesse vi sono i costituenti dell'EPS e le eterogeneità presenti lungo lo spessore del biofilm (Stewart e Franklin, 2008), la struttura del biofilm a seconda del flusso a cui è soggetto (Besemer et al., 2007) o degli organismi superiori presenti (Maryna, 2016).

L'Optical Coherence Tomography (OCT) è una tecnica principalmente utilizzata per ottenere informazioni sulla struttura del biofilm alla mesoscala. La scansione del campione avviene analizzando l'intensità e il ritardo della luce retrodiffusa dal campione in risposta a un fascio di luce. È una tecnica non invasiva, non necessita di tecniche di colorazione e permette di identificare i vuoti e le cavità, a differenza degli strumenti che utilizzano immagini a fluorescenza (Wagner et al., 2010); tuttavia, può essere utile un uso combinato di diverse tecniche (OCT+CLSM o OCT+Raman Microscopy) per investigare lo stesso campione dalla micro- alla mesoscala (Halan et al., 2012).

In figura 1.8 vengono riportate le tecnologie illustrate in questo paragrafo in riferimento alla scala spaziale di utilizzo usuale (Wagner et al., 2010).

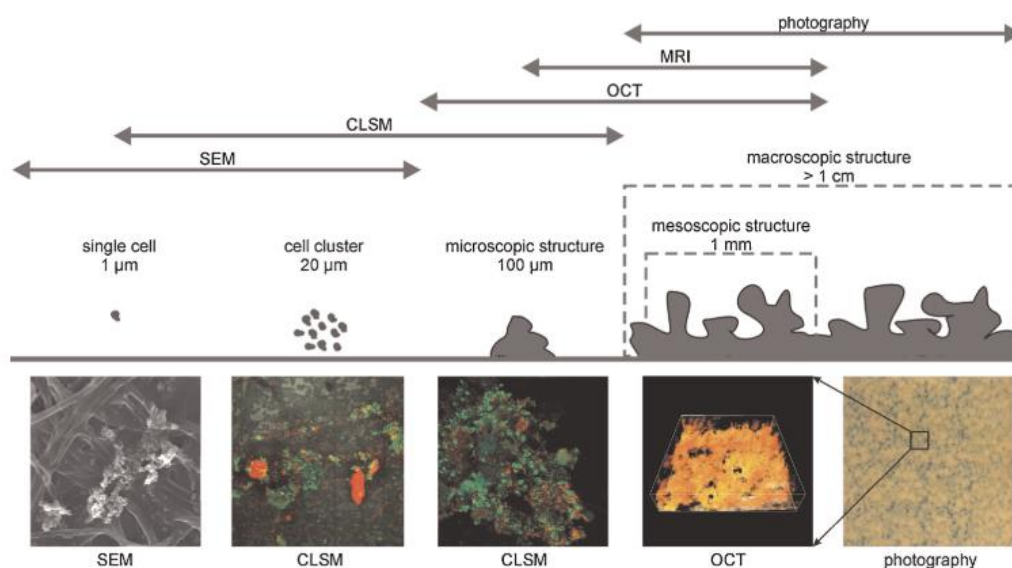


Figura - 1.8 - Tecniche per investigare la struttura del biofilm a diverse scale spaziali (Wagner et al., 2010)

Tabella 1.1 Tecniche di analisi qualitativa e quantitativa di un biofilm con riportati obiettivi, vantaggi e svantaggi (Halan et al., 2012)

Tecnica/ Strumento	Informazioni acquisite	Vantaggi	Svantaggi	Riferimenti
<b>Obiettivo: struttura e architettura biofilm</b>				
OCT	Struttura globale biofilm a scala millimetrica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Non distruttivo</li> <li>- Alta risoluzione</li> <li>- Relativa economicità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dovrebbe essere combinato con altre tecniche (microscopio Raman o CLSM)</li> </ul>	(Wagner et al., 2010)
AFM	Analisi topografica e morfologica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Misura di tipo qualitativa e quantitativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Danneggiamento campione tramite la punta</li> </ul>	(Yuan e Pehkonen, 2009; Dufrêne, 2004)
SEM	Struttura biofilm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta risoluzione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Artifacts dovuti all'essiccamento campione</li> <li>- Costoso</li> </ul>	(Priester et al., 2007)
ESEM	Struttura biofilm sub-micrometrica Matrice EPS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta risoluzione</li> <li>- Possibilità di esaminare campione parzialmente idratato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effetto di contrasto causato dall'acqua condensata</li> <li>- Costoso</li> </ul>	(Muscariello et al, 2005; Priester et al., 2007; Wagner et al., 2010)
CLSM	Distribuzione spaziale delle cellule Struttura e fisiologia del biofilm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Studio sezione ottica</li> <li>- Immagini 3D</li> <li>- Non distruttivo</li> <li>- Sviluppo in time lapse del biofilm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fotobleaching nel caso si utilizzino coloranti fluorescenti</li> <li>- Costoso</li> </ul>	(Lawrence et al., 2003; Palmer et al., 2006)
<b>Obiettivo: processi e fisiologia biofilm</b>				
Microsensori	O <sub>2</sub> ; H <sub>2</sub> ; H <sub>2</sub> S; CO <sub>2</sub> ; NO <sub>x</sub> ; Fe <sup>2+</sup> ; glucosia; temperature; pH; coefficienti di diffusione; tassi di assorbimento	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Economici</li> <li>- Solitamente facilmente disponibili in commercio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fragili</li> <li>- Elevato tempo di preparazione</li> <li>- Necessaria calibrazione</li> <li>- Leggermente invasiva</li> <li>- Misura puntuale</li> </ul>	(Kühl, 2005; Revsbech, 2005)

Obiettivo: componenti e proprietà biofilm e attività dei microorganismi				
<b>Metodo ATP</b>	Biomassa totale Numero cellule Crescita biofilm e attività	- Semplice - Economico	- Distruzione del campione nell'analisi	(Lazarova e Manem, 1995)
<b>Microscopio ottico</b>	Spessore biofilm	- Semplice - Economico	- Solo con biofilm omogenei lungo la superficie - Bassa accuratezza	(Lazarova e Manem, 1995)
<b>Metodo elettrochimico</b>	Spessore biofilm	- Semplice - Economico	- Non utilizzabile nelle prime fasi di crescita	(Boulêtreau et al., 2011)
<b>Misura compressione monoassiale</b>	Stabilità meccanica Spessore biofilm	- Non distruttivo - Economico - No limite di spessore - Altamente riproducibile	- Misura di un singolo parametro per volta	(Körstgens et al., 2001; Paramonova et al., 2007)
<b>Analisi chimica composti biofilm</b>	Composizione matrice EPS	- Semplice - Economico - Metodo affermato	- Valori di deviazione standard elevati - Richiesto molto materiale	(Comte et al., 2006)
<b>Microscopio Raman</b>	Costituenti biofilm	- Non distruttivo - Semplice - Risoluzione spaziale e ottica di un microscopio	- Sensitività limitata che richiede superficie particolare - Equipaggiamento costoso	(Ivleva et al., 2009)

# 2

## MATERIALI E METODI

Il presente lavoro di tesi risulta organizzato in tre macro-attività di carattere sperimentale, volte a studiare la risposta elettrica in termini di impedenza dei sensori di sporcamiento denominati "Dirty Sensing" (DS), le cui caratteristiche sono descritte nel paragrafo 2.1, alla frequenza di 100 kHz e/o su uno spettro di frequenza ampio da 20 Hz a 20 MHz a seconda della tipologia di prova (paragrafo 2.4.1). Le attività sono state svolte nel Laboratorio di Ingegneria Ambientale (LIA) del Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale (DICA) del Politecnico di Milano.

Il primo e il secondo set di prove hanno riguardato rispettivamente la simulazione di depositi inorganici e organici, sia tramite prove in batch (paragrafo 2.2) sia tramite prove in un circuito chiuso (da qui in poi denominato "loop") a diverse velocità (paragrafo 2.3). Le prove hanno avuto una durata variabile, da un minimo di 4 h (nel caso di prove di sporcamiento inorganico) a un massimo di 8 settimane (nel caso di prove di sporcamiento organico).

In entrambi i casi alle misure di impedenza, eseguite con frequenze prestabilite, è stata associata una misura fisica dello spessore del deposito; nel caso di sporcamiento di tipo inorganico mediante l'utilizzo di un profilometro e mediante metodo gravimetrico, nel caso di sporcamiento di tipo organico tramite l'utilizzo di un microscopio laser confocale in luce laser riflessa. Entrambe le procedure sono descritte nel paragrafo 2.4.2.

Il terzo set di prove ha riguardato lo studio della corrosione del sensore di sporcamiento DS e della sua risposta in termini di impedenza (modulo e fase); l'assetto sperimentale viene descritto, insieme alle altre prove batch, nel paragrafo 2.2.

In tabella 2.1 sono sintetizzate le tipologie di prove eseguite; sono state riportate le informazioni riguardanti la tipologia di prova e il fenomeno studiato, il sensore utilizzato (da 5 o da 10 mils, caratterizzati da differenti proprietà geometriche come descritto nel paragrafo 2.1) e le caratteristiche relative all'allestimento, alla durata e alle procedure della prova.

Tabella 2.1 - Piano sperimentale relativo alla simulazione di fenomeni di sporcamento di tipo inorganico, organico e fenomeni di corrosione

Fenomeno studiato	Sensore utilizzato	Tipologia prova	Velocità flusso [cm s <sup>-1</sup> ]	Durata prova	Frequenza misura impedenza/spessore	Misura spessore
Deposito inorganico	5 mils	batch	-	-	al termine di ogni ciclo di deposito-evaporazione	profilometro/ metodo gravimetrico
	10 mils					
	5 mils	loop	1-3-5	da 4 a 69 h	da oraria a bigiornaliera/al termine della prova	profilometro/ metodo gravimetrico
	10 mils					
Deposito organico	10 mils	batch	-	4-7 settimane	al termine della prova	microscopio laser confocale
		loop	3-6-9-12	8 settimane	a giorni alterni/al termine della prova	
				7 settimane		
Corrosione	10 mils	batch	-	6 h	oraria/ -	-

## 2.1 Sensore di sporcamento "Dirty Sensing"

I sensori di sporcamento "Dirty Sensing", utilizzati nell'ambito di questo lavoro di tesi con l'obiettivo di effettuare misurazioni selettive dello sporcamento inorganico e organico sulla loro superficie tramite una misura di impedenza, sono microsensori interdigitati (*interdigitated array* - IDA). Questi sensori sono oggetto di brevetto (PCT N° 102017000130254I), depositato dal Politecnico di Milano nel 2017. Il principio di funzionamento dei sensori è descritto nel dettaglio nella pubblicazione scientifica di Turolla et al. (2019).

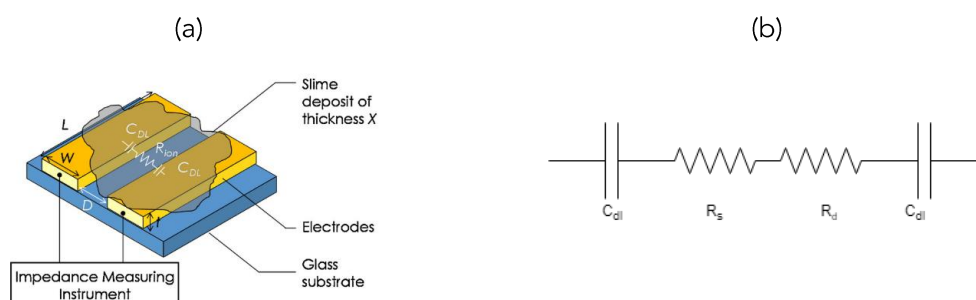


Figura 2.1 - (a) Principi di funzionamento del sensore: la presenza di deposito altera la resistività della soluzione Rion (Turolla et al., 2019); (b) Rappresentazione del circuito equivalente di un microsensore interdigitato in presenza di deposito

Un sensore interdigitato è costituito da due array di microelettrodi che vengono posizionati parallelamente su un substrato di base, formando una maglia interdigitata. Dal punto di vista



elettrico, il circuito equivalente può essere schematizzato come in figura 2.1 (Turolla et al., 2019), riadattando lo schema proposto per il solo deposito organico da Yang e Bashir (2008).

L'impedenza è la resistenza di un circuito elettrico in risposta a una corrente alternata (Furst e Francis, 2019); in una maglia interdigitata può essere quindi rappresentata come un circuito in serie, costituito dalla resistenza della soluzione in cui è immerso il sensore  $R_s$  ( $R_{ion}$  in figura 2.1 (a)) e dal deposito formatosi  $R_d$  (che può dare un contributo positivo o negativo a seconda della tipologia di deposito) tra due capacitori imperfetti  $C_{dl}$  (capacità del doppio strato). Questi ultimi modellano il comportamento in corrente alternata di un doppio strato elettrico, ovvero la struttura che si origina all'interfaccia solido-liquido.

Il sensore di sporco DS è stato realizzato da un'azienda specializzata nella fabbricazione di circuiti stampati (PCBway, China), utilizzando un substrato di vetronite (FR4) di spessore  $H_{sub}$  1,4 mm, su cui i finger sono depositati mediante prepeg (fibra composita pre-impregnata di resina epossidica). Lo spessore della solder mask, che dà il colore verde o rosso al sensore e ha funzione protettiva, ha uno spessore di circa 20-25  $\mu m$ .

I finger sono costituiti da due strati di rame: il primo inciso direttamente da un foglio di rame, il secondo depositato chimicamente per ottenere uno spessore totale  $H_{Cu}$  di 35  $\mu m$ . Per semplicità non sono stati riportate le informazioni riguardanti lo stack up complessivo, ovvero la disposizione degli strati che compongono il PCB. Sulla superficie sommitale lo strato di rame è protetto da sottile strato di oro di spessore  $H_{Au}$  di qualche nanometro.

In figura 2.2 (a) è riportato uno schema semplificato del sensore, con indicate le principali grandezze di interesse. La caratteristica geometrica più rilevante è legata alla spaziatura  $D$  tra i finger, esprimibile in mils (1 mils  $\cong$  0,254 mm); nell'ambito di questo lavoro di tesi sono stati utilizzati sensori da 5 e da 10 mils (figura 2.2 (b)) con le caratteristiche geometriche riportate in tabella 2.2.

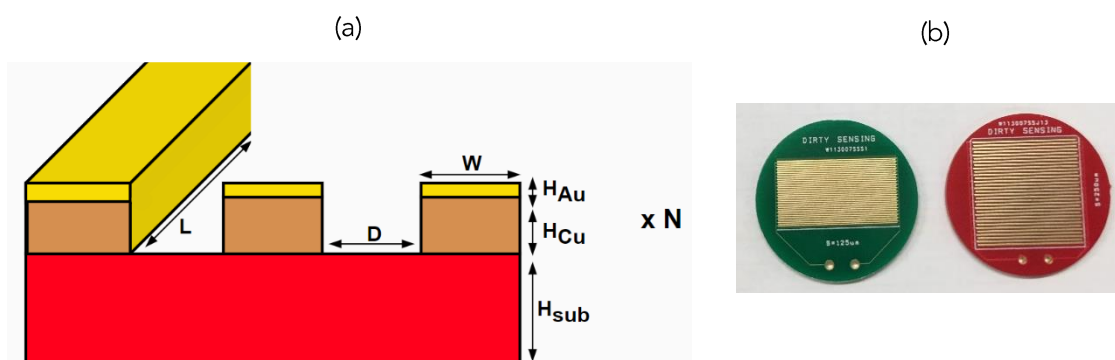


Figura 2.2 - a) Rappresentazione (non in scala) geometria sensore (sezione);  
b) immagine dei sensori da 5 mils (colore verde) e 10 mils (colore rosso)

Tabella 2.2 - Specifiche geometriche dei sensori di sporcamento DS testati

		5 mils	10 mils	Unità di misura
Spaziatura tra i finger / Larghezza canale	D	125	250	[ $\mu\text{m}$ ]
Larghezza dei finger	W	125	250	[ $\mu\text{m}$ ]
Lunghezza dei finger	L	18,17	16,00	[mm]
Numero totale dei finger	N	40	32	[-]

Nel corso delle prove, l'eventuale stato di alterazione dei sensori di sporcamento DS è stato osservato utilizzando un microscopio ottico (Olympus BX51M) e un microscopio laser confocale in luce laser riflessa (Lext OLS4100 Olympus).

## 2.2 Configurazione operativa prove in batch

Per le prove batch, nel caso di depositi inorganici, 4 sensori da 5 mils e 4 sensori da 10 mils sono stati sottoposti a diversi cicli di immersione in soluzioni di carbonato di calcio  $\text{CaCO}_3$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) a volume noto (30 mL) e di evaporazione in stufa per 8 ore a una temperatura costante pari a  $70^\circ\text{C}$ , in modo tale da ottenere strati successivi di deposito inorganico. Dopo ogni ciclo è stata misurato il valore di impedenza alla frequenza di 100 kHz, secondo il procedimento riportato nel paragrafo 2.4.1, in tre soluzioni di KCl, con conducibilità pari rispettivamente a  $500 \mu\text{S cm}^{-1}$ ,  $750 \mu\text{S cm}^{-1}$  e  $900 \mu\text{S cm}^{-1}$  ed è stata determinato lo spessore depositato sul sensore.

Per le prove volte ad analizzare la risposta del sensore ai depositi organici, durante le relative prove in flusso, due sensori sono stati immersi in ciascuna vasca di ricircolo del loop, il cui allestimento è descritta nel paragrafo 2.3. I sensori sono stati ancorati al fondo e impermeabilizzati nella parte inferiore per evitare rispettivamente il galleggiamento e l'alterazione dei collegamenti dell'elettrodo. Alla fine della prova è stato misurato il valore di impedenza, nell'intervallo di frequenza tra 20 Hz e 20 MHz, in una soluzione di KCl a 750 e/o a  $1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ , ed è stata effettuata la misura di spessore di biofilm formatosi sul sensore.

Le prove di corrosione sono state effettuate immergendo la parte superficiale di sei sensori di sporcamento DS da 10 mils in una soluzione di ipoclorito di sodio con concentrazione di cloro attivo pari a circa  $0,001 \text{ g L}^{-1}$ . Le prove sono state condotte per una durata di 6 h (tabella 2.1). Ogni 1-2 ore circa è stato misurato il valore di impedenza, nell'intervallo di frequenza tra 20 Hz e 20 MHz, in una soluzione di KCl con conducibilità pari a 500, 750 e  $1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

## 2.3 Configurazione operativa prove nel loop

Per simulare lo sporcamento inorganico e organico all'interno di condotti, sono stati realizzati due circuiti chiusi (loop) con la medesima configurazione (figura 2.3).

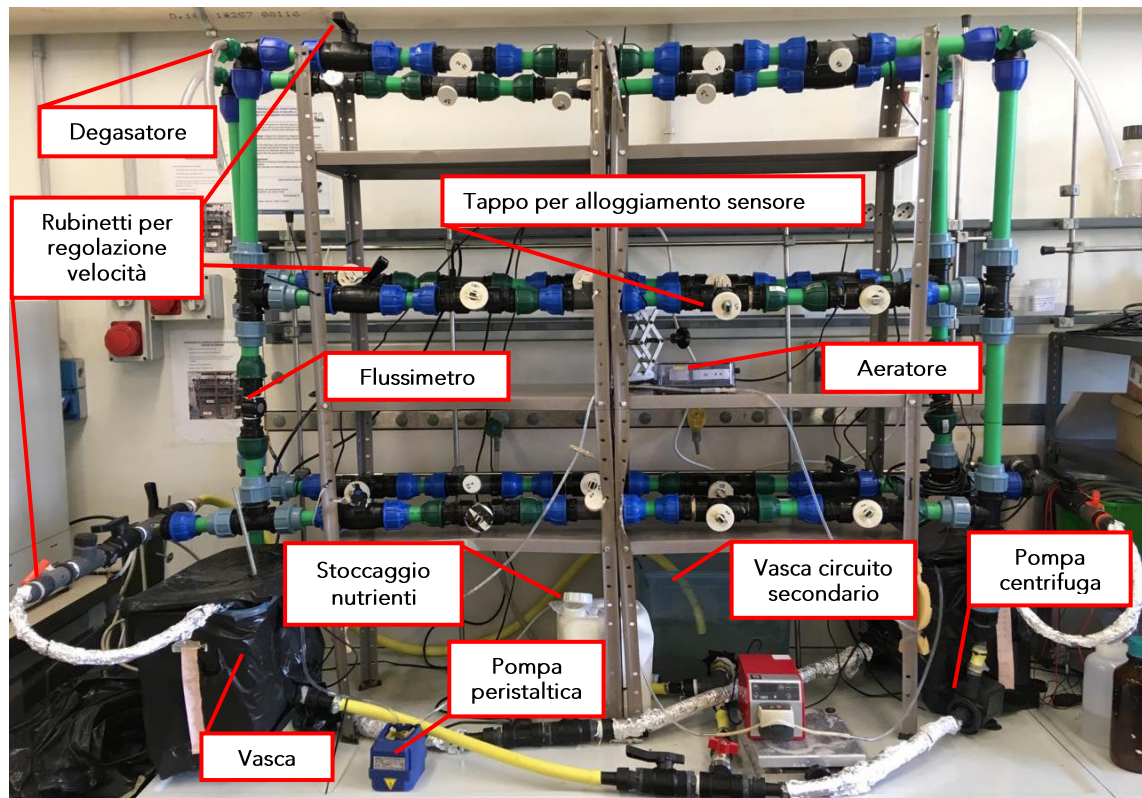
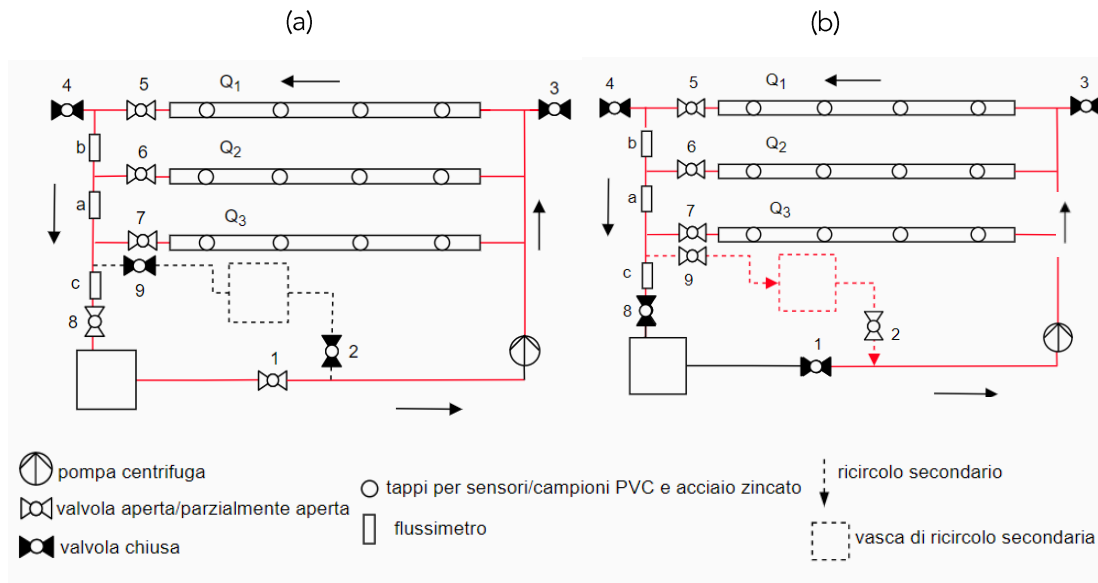


Figura 2.3 - Fotografia della configurazione operativa dei due loop

Ciascun loop è costituito da due sottocircuiti; uno primario, utilizzato normalmente nel corso delle prove, e uno secondario, che conduce il flusso in una vasca di ricircolo ed è stato utilizzato per eseguire misure specifiche. Nella fattispecie, tutte le misure di sporcamento organico nel loop sono state tutte eseguite a conducibilità di  $750 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ , utilizzando il sistema di ricircolo secondario. In figura 2.4 si riporta uno schema semplificato dei due sottocircuiti: con il colore rosso è stata identificata la parte di loop interessata dal flusso.

Durante l'utilizzo del circuito primario, le valvole 1 e 2 sono state tenute rispettivamente aperte e chiuse. Per utilizzare il circuito secondario, il sistema in funzione è stato ogni volta arrestato e aerato, in modo da far tornare il volume di fluido nelle tubature nella vasca principale. Una volta chiuse le valvole 1 e 8 ed aperte le valvole 2 e 9, è stata quindi utilizzata la vasca di ricircolo, riempita con un fluido di caratteristiche diverse a seconda delle esigenze sperimentali.

I circuiti descritti risultano chiuso: il fluido viene aspirato da un volume di ricircolo tramite l'utilizzo di una pompa centrifuga e viene suddiviso in tre tubazioni in polipropilene (tubo di colore verde), caratterizzate da un regime di velocità differente, e ritorna nella vasca di partenza. Ciascuno dei tre bracci di ogni loop è dotato di 4 raccordi a T da 1"1/4, anch'essi in PP, in modo tale da poter inserire tappi estraibili, progettati e realizzati specificamente per il supporto di sensori o di materiali da studiare.



La pompa centrifuga utilizzata è una pompa commerciale da acquario (Newa Jet®), con prevalenza massima pari a 2,10 m e portata di uso massima pari a 1700 L h<sup>-1</sup>. La pressione all'interno delle tubazioni risulta di entità trascurabile, come misurato da manometri a tubo Bourdon.

Il volume di fluido all'interno dei bracci è di circa 3 L, le vasche hanno una capienza massima di 20 L. La lunghezza di ogni braccio è di circa 1,5 m e il diametro delle tubazioni è di circa 1", ovvero 2,5 cm. Tutte le parti del sistema trasparenti alla luce (vasche, parti di tubo) sono state coperte per ostacolare eventuali crescite algali.

Il sistema, una volta avviato, deve essere de-aerato: per fare questo sono stati installati due rubinetti agli estremi del braccio superiore (valvole 3 e 4, figura 2.4): aprendoli l'aria risale verso l'alto e fuoriesce dal sistema.

La velocità dei singoli bracci è stata regolata tramite un rubinetto a sfera posto nel rispettivo tratto finale di ciascun condotto, mentre la portata totale è stata regolata tramite un rubinetto a valle dei 3 bracci. Per conoscere i valori di velocità all'interno dei bracci ed eseguirne la calibrazione, sono stati utilizzati per ogni loop 2-3 flussimetri, secondo la procedura illustrata nel paragrafo 2.3.2.

## 2.3.1 Posizionamento sensori e materiali d'interesse

Per i sensori sono stati realizzati dei tappi appositi da 1"1/4 in PVC (figura 2.5) da inserire nei raccordi a T: la lunghezza del tappo è stata studiata per fare in modo che il sensore risultasse in linea con la parete interna della della tubazione, per non creare alterazioni o zone di ristagno del flusso. All'estremità del tappo è stato fissato un connettore che, collegato al sensore e agli strumenti descritti nel paragrafo 2.4.1, ha permesso di registrare la misura di impedenza.



Figura 2.5 - (a) Tappo in PVC con doppia filettatura; (b) contro-tappo per alloggiamento sensore; (c) sensore dotato di O-ring per la tenuta idraulica del tappo; (d) configurazione tappo; (e) connettore per la misura di impedenza

Con i medesimi criteri sono stati realizzati tappi in PVC a cui sono stati incollati i campioni di materiale plastico (PVC) e metallico (acciaio zincato).

## 2.3.2 Calibrazione delle velocità nel loop

Le velocità nei bracci del loop sono state calibrate attraverso l'utilizzo di flussimetri DIGITEN (modello FL-608) (figura 2.6 (a)) ad effetto Hall (ovvero varianti la propria tensione in uscita in risposta ad un campo magnetico) con intervallo di lavoro tra 1 e 60 L min<sup>-1</sup>. Sono stati installati in 3 posizioni (figura 2.4): due flussimetri nel tratto verticale delle tubature, rispettivamente a valle del braccio in posizione superiore (flussimetro "a") e intermedia (flussimetro "b") e un terzo nel tratto finale prima dell'immissione del flusso nella vasca (flussimetro "c"). Tale configurazione ha permesso di misurare rispettivamente la portata del braccio in posizione superiore ( $Q_1$ ), la somma delle portate del braccio superiore e intermedio ( $Q_1+Q_2$ ) e la portata totale ( $Q_{TOT}$ ). Per differenza è stata quindi ottenuta la portata nel braccio in posizione inferiore ( $Q_3$ ).

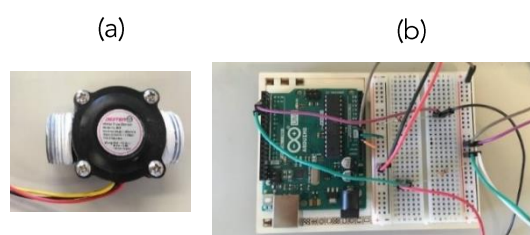


Figura 2.6 - (a) Flussimetro DIGITEN utilizzato nella configurazione sperimentale; (b) Arduino UNO utilizzato per la misura di due portate in contemporanea nella fase di calibrazione delle velocità

Nel caso delle prove dedicate allo studio del deposito organico, sono stati utilizzati solo i flussimetri "b" e "c", in quanto il braccio superiore non è stato soggetto al flusso del circuito.

I flussimetri sono stati collegati ad un ARDUINO UNO (figura 2.6 (b)), programmato in modo tale da identificare le portate e quindi le velocità di interesse due per volta; modificando l'apertura dei 3 rubinetti nei bracci e del rubinetto posto immediatamente dopo il flussimetro "c", sono stati ottenuti ricorsivamente i valori di interesse.

Le portate sono state regolate per ottenere valori di velocità tra 1 e 5 cm s<sup>-1</sup> nel caso delle prove di sporcamento inorganico e tra 3 e 12 cm s<sup>-1</sup> nel caso di sporcamento organico. A tali valori di velocità corrispondono condizioni di moto differenti (laminare, di transizione, turbolento), che sono state identificate tramite il numero di Reynolds (Re) secondo la relazione:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D}{\mu} \quad (2.1)$$

dove  $\rho$  [kg cm<sup>-3</sup>] è la densità del fluido, qui considerata pari a 0,001 kg cm<sup>-3</sup> nel caso di acqua pulita;  $v$  [cm s<sup>-1</sup>] è la velocità media del flusso;  $D$  [cm] è il diametro della tubazione, qui considerato pari a 2,5 cm, e  $\mu$  [Pa s] è la viscosità dinamica del fluido, per l'acqua pari a 0,1 kg cm<sup>-1</sup> s.

I tempi di ricircolo del flusso (RT), calcolabili conoscendo la lunghezza dei bracci, le caratteristiche geometriche delle tubazioni e la velocità del flusso tratto per tratto, permettono di affermare, in prima approssimazione, che il sistema possa considerarsi completamente miscelato. Infatti, il valore più alto (corrispondente a un flusso di velocità pari a 1 cm s<sup>-1</sup> nelle prove di deposito organico) risulta pari a circa 3 minuti, tempo sufficientemente breve da ipotizzare il sistema completamente miscelato (Stoodley e Warwood, 2003).

In tabella 2.3 vengono riportati i valori di portata, velocità, numero di Reynolds e RT nelle diverse prove.

Tabella 2.3- Portate, velocità, numero di Re nei bracci del loop per ogni prova e relativi RT

Tipologia di prova	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>	Q <sub>3</sub>	v <sub>1</sub>	v <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	Re <sub>1</sub>	Re <sub>2</sub>	Re <sub>3</sub>	RT <sub>1</sub>	RT <sub>2</sub>	RT <sub>3</sub>
	[L min <sup>-1</sup> ]			[cm s <sup>-1</sup> ]			[-]			[s]		
deposito inorganico	1,47	0,88	0,29	5	3	1	1250	750	250	79	81	195
deposito organico LOOP 1	-	2,65	1,76	-	9	6	-	2250	1500		35	40
deposito organico LOOP 2	-	3,53	0,88	-	12	3	-	3000	750		30	70

Nel caso di flusso in condotto, le condizioni di moto sono definite secondo i seguenti intervalli (Citriani, 2009):

- Re < 2000, regime di moto laminare;
- Re > 3000, regime di moto turbolento;
- 2000 < Re < 3000, regime di moto transitorio.

Gli esperimenti, quindi, sono stati condotti in condizioni di moto laminare per tutte le prove di deposito inorganico; per le prove di deposito organico sono state indagate anche condizioni in regime di moto transitorio-turbolento.

### **2.3.3 Allestimento delle prove di sporcamento inorganico**

Le vasche dei loop sono state riempite con 11 L di acqua di rete, a cui è stato aggiunto carbonato di calcio fino a raggiungere una concentrazione iniziale pari a  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Nella vasca la soluzione è stata mantenuta completamente miscelata tramite agitatore magnetico (400 RPM) posizionato sul fondo.

Come riportato in tabella 2.1 le prove sono state condotte con durate differenti; in particolare 7 prove su 14 sono state condotte per una durata superiore alle 24 ore.

In 6 prove, durante il loro svolgimento, è stato aggiunto  $1 \text{ g L}^{-1}$  di carbonato di calcio alla soluzione di partenza; tra queste, in due è stato aggiunto, nella parte finale della prova,  $1 \text{ g L}^{-1}$  di  $\text{CaCO}_3$  ulteriore.

Per entrambi i loop sono stati utilizzati i tre bracci con flusso alle velocità di 1, 3 e  $5 \text{ cm s}^{-1}$ . Per ogni braccio sono stati posizionati due sensori DS, un campione di acciaio zincato e uno in PVC.

### **2.3.4 Allestimento delle prove di sporcamento organico**

Per lo studio dei depositi organici derivanti dalla crescita di film batterico, sono state eseguiti due cicli di prove, rispettivamente della durata di 8 e 7 settimane.

Per ogni loop sono stati utilizzati i due bracci in posizione inferiore e intermedia, posizionando per ogni braccio tre sensori di sporcamento DS e un campione in PVC. Nella prima prova di sporcamento organico, per ogni loop, tre elettrodi su sei sono stati schermati per un terzo della loro area utilizzando del parafilm. Non sono stati testati campioni di acciaio zincato per l'eccessiva sensibilità a fenomeni di biocorrosione.

Il volume di acqua di partenza utilizzato è stato pari a 13 L per ciascun loop. Nella prima prova l'acqua di partenza è stata prelevata dal Naviglio della Martesana, con una concentrazione iniziale di solidi sospesi totali (SST) di circa  $7 \text{ mg L}^{-1}$ ; nella seconda è stata utilizzata acqua di rete addizionata con un inoculo di fango prelevato dal Depuratore di Peschiera Borromeo dalla vasca di miscelazione aerata, in quantità tale da garantire una concentrazione di solidi sospesi totali di circa  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

Il flusso è stato mantenuto aerato tramite un sistema di aerazione (compressore Schego M2K3,  $350 \text{ L h}^{-1}$  di aria) equipaggiato con una pietra porosa posizionata sul fondo di ciascuna vasca. La



temperatura è stata mantenuta intorno tra i 22 e i 25°C tramite l'utilizzo di riscaldatori d'acquario all'interno delle vasche (Newa Therm® VTX 50W).

Con cadenza giornaliera sono stati controllati i parametri di temperatura, conducibilità, ossigeno disciolto e pH all'interno delle vasche, tramite l'utilizzo del multimetro portatile HQ40D (HACH): per le ipotesi di completa miscelazione illustrate nel paragrafo 2.3.2, tali parametri sono stati assunti validi anche all'interno del sistema di tubature.

Il livello di ossigeno disciolto (OD) è stato mantenuto pari a  $7 \pm 1$  mg L<sup>-1</sup>, mentre la conducibilità al di sotto di 2500  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, mediante ricambio d'acqua settimanale.

Il pH è stato mantenuto tra 7 e 8, condizione ottimale per la crescita di batteri eterotrofi (Van der Kooij et al., 2013): essendo il valore di equilibrio superiore a 8, a causa dello strippaggio di CO<sub>2</sub> determinato dall'aerazione, sono state effettuate correzioni di pH giornaliere dosando 5 mL di acido cloridrico con concentrazione 1 M.

Sono stati inoltre monitorati i solidi sospesi totali, secondo la procedura presente negli "Standard Methods for the examination of water and wastewater" (1998), tramite l'utilizzo di filtri con porosità di 0,45  $\mu$ m e diametro pari a 47 mm.

In entrambe le vasche l'alimentazione di nutrienti è stata effettuata dosando, in tempi definiti tramite temporizzatori, una soluzione di acetato di sodio con concentrazione pari a 4,8 g L<sup>-1</sup>, (stoccata in una tanica) mediante due pompe peristaltiche (Watson-Marlow 120S e Seko PR4).

Sono stati inoltre dosati, in maniera non automatizzata, macronutrienti e micronutrienti.

All'inizio della prova il sistema è stato alimentato per aumentare la biomassa sospesa all'interno del reattore fino a un valore di circa 50-70 mg L<sup>-1</sup>.

Il carico di COD (*Chemical Oxygen Demand*) in forma di acetato di sodio da dosare giornalmente è stato valutato ragionando in termini di carico volumetrico  $C_v$  [gCOD d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>], secondo la formula (Bonomo et al., 2008):

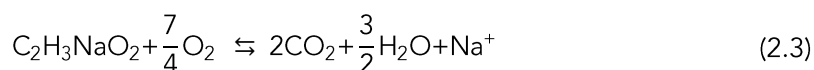
$$C_v = C_F \cdot SST \cdot \frac{SSV}{SST} \cdot 1,1 \quad (2.2)$$

dove:

- $C_F$  è il carico del fango [gCOD gSSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>] solitamente scelto compreso tra 0,2 e 0,4 gCOD gSSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (qui ipotizzato pari a 0,4 gCOD gSSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>);
- SST [gSST L<sup>-1</sup>] è la concentrazione di solidi sospesi totali (in questo caso 70 mg L<sup>-1</sup>);
- SSV/SST è il rapporto tra solidi sospesi volatili e totali (ipotizzato pari a 0,75);
- 1,1 è un fattore di sicurezza che tiene conto di un'efficienza del 90% di assorbimento dei nutrienti da parte della biomassa.

Il carico volumetrico ottenuto è risultato pari a 0,0231 gCOD d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. È stato calcolata la quantità di acetato di sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) corrispondente tramite la reazione:





Dalla reazione 2.3 si evince che per la completa ossidazione dell'acetato di sodio sono necessarie 7/4 moli di O<sub>2</sub>, ovvero di COD (*Chemical Oxygen Demand*). Utilizzando come fattori di conversione i pesi molari dell'acetato di sodio (tenendo conto di un'impurezza del prodotto commerciale dell'1%), risulta che con 1 g di acetato di sodio si ottengono 0,676 g di COD.

Utilizzando questo fattore e tenendo conto del numero di litri del sistema (13 L), la dose giornaliera di acetato utilizzata è stata pari a 0,44 g d<sup>-1</sup>.

Per i macronutrienti (in forma di KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>) sono stati stimati i carichi giornalieri (tabella 2.4) utilizzando come riferimento i rapporti tra le concentrazioni dei vari nutrienti nella composizione di un refluo urbano sintetico, preparato secondo le linee guida proposte dall'OECD (*Guidelines for testing of Chemicals*, 2005).

Tabella 2.4 - Dosi giornaliere macronutrienti espresse in g d<sup>-1</sup>

KCl	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1
MgSO <sub>4</sub>	0,05

Secondo lo stesso principio una volta alla settimana sono stati dosati 3 mL di una soluzione di oligoelementi, la cui composizione è riportata in tabella 2.5.

Tabella 2.5 - Composizione soluzione oligoelementi (concentrazioni in g L<sup>-1</sup>)

K <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,05
Na <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05
FeCl <sub>3</sub>	0,1
CoN <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	0,05
CdSO <sub>4</sub>	0,05
CuSO <sub>4</sub>	0,05
ZnSO <sub>4</sub>	0,05
MnSO <sub>4</sub>	0,05

La dose della soluzione di oligoelementi è stata stimata mantenendo, rispetto alle dosi di macronutrienti riportate in tabella 2.4, la medesima proporzione riscontrata tra le concentrazioni della soluzione salina di Winogradsky (tabella 2.6), costituita da alcuni macronutrienti confrontabili con quelli riportati in tabella 2.4., e la soluzione di oligoelementi stessa.

Tabella 2.6 - Soluzione salina di Winogradsky (Ministero delle politiche agricole e forestali, 2002)

Soluzione di oligoelementi	1	mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	g
NaCl	2,5	g
MnSO <sub>4</sub>	2,5	g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,05	g
Acqua deionizzata	1000	mL

Durante la prova, raggiunta una concentrazione di SST pari circa a 50-70 mg L<sup>-1</sup> nel sistema, è stato adottato un dosaggio a giorni alterni (ciclo di alimentazione-starvation), in relazione alle evidenze illustrate nel paragrafo 1.2.3 per accelerare la crescita del biofilm batterico.

Nei giorni di dosaggio dei nutrienti, il dosaggio di acetato di sodio è stato frazionato in 4 momenti della giornata, per simulare quanto più possibile una condizione di flusso con basso contenuto di nutrienti, ma costante nel tempo. Sono quindi stati dosati quattro volte al giorno 100 mL di soluzione di acetato di sodio.

Si sono inoltre continuati a dosare in maniera non automatizzata, ma secondo lo stesso principio, le soluzioni di macronutrienti e di micronutrienti.

## 2.4 Misura dello sporcamento

Per la misura di depositi (inorganico e organico) è stato definito un protocollo, costituito da due fasi principali:

- la determinazione della variazione di impedenza, determinata dalla formazione del deposito sul sensore;
- la valutazione qualitativa (tipologia) e quantitativa (spessore) del deposito.

Nei paragrafi 2.4.1 e 2.4.2 vengono riportate le procedure e gli strumenti utilizzati per ciascuna fase dello svolgimento della misura.

### 2.4.1 Determinazione della variazione di impedenza

I valori di impedenza sono numeri complessi, costituiti da due termini: il modulo  $|Z|$  (o  $R$ ) e la fase  $\phi$ . La misura di questi valori è stata realizzata attraverso due strumenti:

- una scheda elettronica specificatamente sviluppata per il progetto "Dirty Sensing", progettata e realizzata dal dipartimento di Elettronica, Informatica e Bioingegneria (DEIB) per lavorare alla frequenza di 100 kHz;
- un multimetro LCR Agilent E4980A, che ha permesso di studiare il modulo e la sua fase del segnale di impedenza in un intervallo di frequenza più ampio (20 Hz - 20 MHz).

Nell'ambito di questa trattazione, per identificare il modulo dell'impedenza misurato a 100 kHz, viene utilizzato anche il termine "resistenza".

Con entrambi gli strumenti, operando in corrente alternata, è stata applicata alle due tracce di collegamento degli elettrodi una differenza di potenziale pari a 50 mV.

Nell'ambito di questo lavoro di tesi, il valore di 100 kHz è stato scelto come frequenza sensibile ad entrambe le tipologie di deposito in base ai risultati riportati da Turolla et al. (2019); la scheda elettronica dedicata è stata utilizzata per le prove in cui è stato monitorato il deposito inorganico e per il primo esperimento in loop per il deposito organico. Lo studio delle frequenze in un intervallo ampio, invece, è stato condotto per indagare più nel dettaglio la risposta dei sensori nelle prove batch e nella seconda prova per i depositi organici e nelle prove di corrosione degli elettrodi.

Alla frequenza di 100 kHz, per analizzare la risposta di un sensore durante le diverse prove o al loro termine, è stato necessario ricavare un valore di variazione di resistenza ( $\Delta R$ ) rispetto alle condizioni iniziali del sensore nuovo o rispetto al tempo  $t=0$  della prova.

Per poter essere confrontati, i valori di resistenza misurati sono stati riferiti alle medesime condizioni di temperatura  $T$  e conducibilità  $\sigma$ , attraverso la calibrazione iniziale del sensore.

Il procedimento individuato per il calcolo della variazione di resistenza è stato il seguente (figura 2.7):

1. Per ogni sensore pulito è stato misurato il valore di resistenza in tre soluzioni in un intervallo di conducibilità di lavoro di interesse (500-600, 750 e 900-1000  $\mu\text{S cm}^{-1}$  riportate a una  $T$  di 25°C ad una  $T$  di lavoro variabile ( $R_{\text{reale},T,\sigma}$ );
2. I valori di resistenza misurati sono stati normalizzati rispetto alla  $T$  di 25°C ( $R_{\text{reale},25^\circ\text{C},\sigma}$ ), ipotizzando una dipendenza lineare dalla temperatura, pari al 2% per ogni °C (equazione 2.4):

$$R_{\text{reale},25^\circ\text{C},\sigma} = \frac{R_{\text{reale},T,\sigma}}{(0,02 \cdot (25-T) + 1)} \quad (2.4)$$

3. È stato stimato un valore del modulo del segnale di resistenza ideale riferito alla temperatura di 25°C e a una determinata conducibilità  $\sigma$  ( $R_{\text{ideale},25^\circ\text{C},\sigma}$ ), tenendo in considerazione le caratteristiche geometriche del sensore e il valore di conducibilità. Le grandezze geometriche considerate sono la lunghezza dei finger  $W$ , la spaziatura fra i

- finger  $G$ , la lunghezza dei finger  $L$  e il numero totale dei finger  $N$ . Lo script del modello è riportato in Appendice 1; il modello originario è stato descritto da Igreja e Daires (2004);
- Utilizzando i tre valori di resistenza reali (asse  $y$ ) e ideali (asse  $x$ ) riferiti a  $25^\circ\text{C}$  con conducibilità misurata al punto 1, è stata ricavata una retta di calibrazione (retta rossa in figura 2.7(a)) tale da permettere per ogni sensore di stimare il valore di resistenza reale del sensore pulito, per un qualsiasi valore di conducibilità compreso tra  $500$  e  $1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ ;
  - Nel corso delle prove, ogni valore di resistenza misurato ad una certa  $T$  e  $\sigma$  è stato riportato alla temperatura di  $25^\circ\text{C}$  ed è stato confrontato con il valore di resistenza reale del sensore pulito, stimato come descritto nel punto 4, ottenendo un valore di variazione di resistenza  $\Delta R$ .

In figura 2.7 viene schematizzato il modello concettuale proposto.

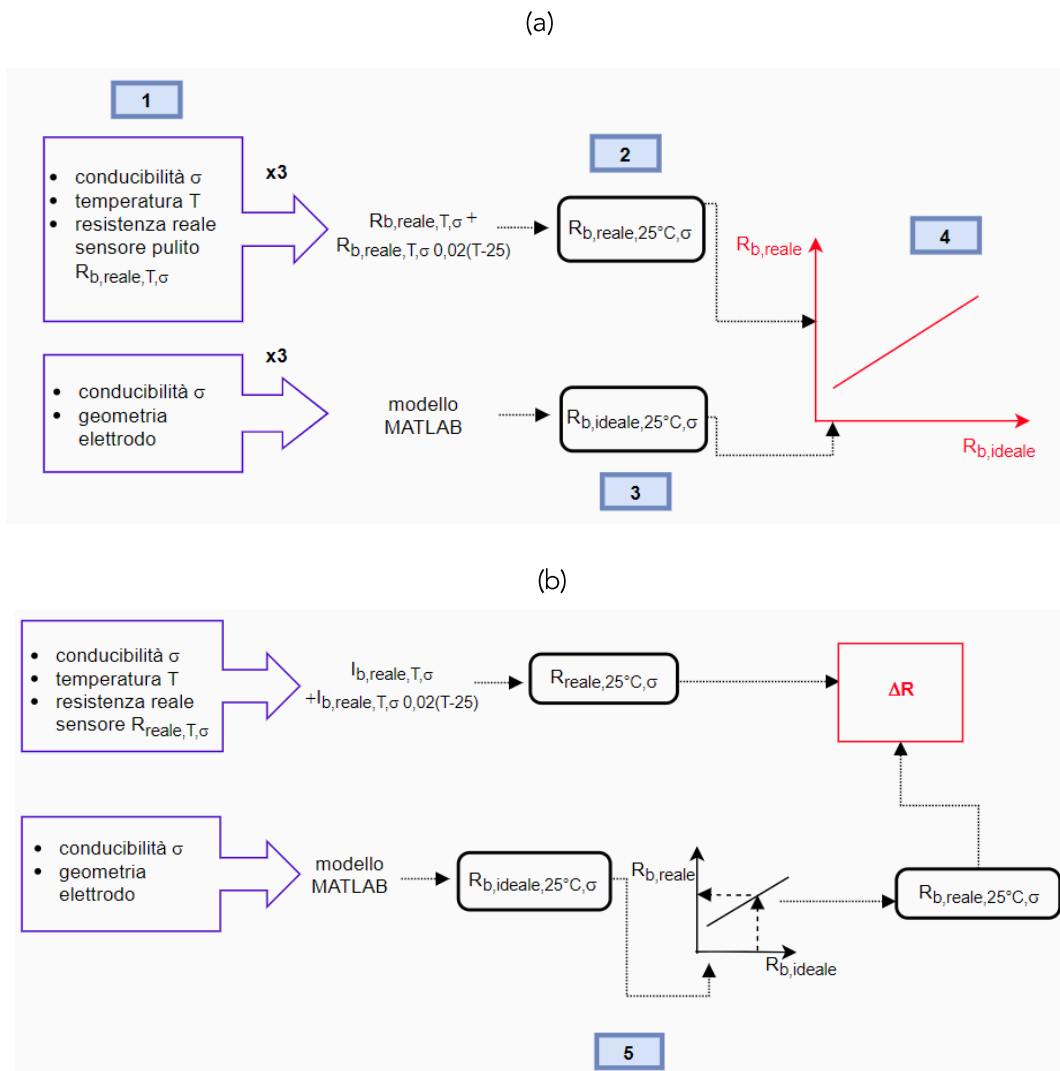


Figura 2.7 - (a) Determinazione della retta di calibrazione resistenza ideale-resistenza reale per un elettrodo pulito (bianco); (b) Determinazione della variazione di resistenza reale tra l'elettrodo pulito e sporco

## 2.4.2 Valutazione qualitativa e quantitativa del deposito

Per la determinazione del deposito inorganico e di quello organico sono stati utilizzati metodi differenti, derivanti dalle diverse caratteristiche delle due tipologie di deposito.

Nel caso dei depositi inorganici, nei primi due cicli di deposito-evaporazione lo spessore del deposito formatosi è stato misurato con un profilometro (KLA Tencor P-15). Successivamente, il sensore è stato pesato prima sporco e poi a seguito di una procedura di pulizia nella zona sensibile dell'elettrodo. La rimozione del deposito è stata eseguita mediante l'utilizzo di una soluzione HCl con concentrazione 0,01 M. Grazie alla combinazione delle due informazioni, essendo nota la superficie  $S$  delle due tipologie di sensori (1,8 cm<sup>2</sup> per i sensori da 5 mils e 2,56 cm<sup>2</sup> per quelli da 10 mils), è stato ricavato il valore di densità del calcare  $\rho_{\text{CaCO}_3}$ , considerato costante per prove in batch o in flusso con pressione trascurabile:

$$\rho_{\text{CaCO}_3} \left[ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] = \frac{\text{massa deposito}[\text{g}]}{S[\text{cm}^2] \cdot \text{spessore deposito}[\text{cm}]} \quad (2.5)$$

Nelle prove successive lo spessore di deposito è stato individuato unicamente tramite metodo gravimetrico, utilizzando il valore di densità ricavato (pari a 0,2608 g cm<sup>-3</sup>).

Tale metodo non ha permesso una valutazione della variazione di spessore lungo la superficie dell'elettrodo, ma ha fornito un unico valore. Nell'ipotesi semplificativa di deposito omogeneo, l'informazione è stata ritenuta adeguata agli scopi preposti.

Nel caso di deposito organico, per la misura di spessore del deposito è stato utilizzato il microscopio laser confocale in luce laser riflessa Lext OLS4100 Olympus (figura 2.8 (a)), presente nel laboratorio di Biological Structure mechanics (LaBS) del Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica del Politecnico di Milano. La luce del laser utilizzata dallo strumento ha lunghezza d'onda pari a 405 nm (regione spettrale del blu).

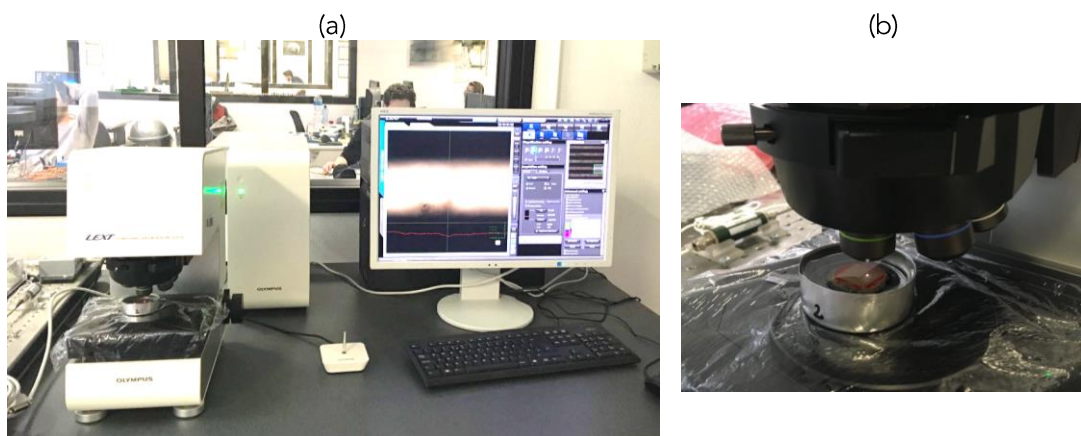


Figura 2.8 - (a) Postazione di utilizzo del microscopio laser confocale (a sinistra nell'immagine);  
(b) Dettaglio del setup di misura dello spessore su un sensore immerso in acqua

La scelta dello strumento è stata motivata dalla natura complessa ed estremamente eterogenea del biofilm, costituito da microorganismi immersi in una matrice semi-trasparente altamente idratata; per misurarne lo spessore effettivo su una superficie è quindi necessario eseguire una misura in umido. I sensori e i campioni in PVC su cui eseguire le misure sono stati quindi estratti al massimo 6 h prima della misura e conservati all'interno di un piattino metallico in acqua di conducibilità il più possibile simile a quella del loop. Per eseguire la misura i campioni sono stati fissati al fondo del piattino in modo tale da evitare il galleggiamento del campione (figura 2.8 (b)). Tra gli obiettivi in dotazione dello strumento sono stati utilizzati quelli che permettessero di studiare il sistema ad una distanza di lavoro compatibile con il setup del campione, ma con una buona apertura numerica (NA), indicatore del massimo angolo per cui è possibile ricevere ed emettere luce. Tale valore è espresso come frazione dell'angolo piatto ( $180^\circ$ ).

Nell'ambito del presente lavoro di tesi sono stati utilizzati due obiettivi:

- MPLFN5X, con NA pari a 0,15 e distanza di lavoro massima pari a 20 mm;
- MPLFN20X, con NA pari a 0,4 e distanza di lavoro massima pari a 12 mm.

Il primo obiettivo, data la bassa risoluzione, è stato utilizzato unicamente per eseguire la panoramica del campione da studiare; il secondo obiettivo invece è stato utilizzato per la misura di spessore.

La procedura individuata per la stima dello spessore del biofilm è la seguente:

1. Il campione è stato preparato tramite pulizia di una striscia di larghezza 2 mm a destra e a sinistra dello stesso, lasciando intatta la parte centrale. Nel caso dei sensori, tale pulizia è stata effettuata in direzione perpendicolare ai canali utilizzando un cotton fioc inumidito.
2. Dopo aver effettuato una scansione dell'intera area del sensore con l'obiettivo con ingrandimento 5x, sono stati selezionati sei punti a destra e a sinistra del campione, a cavallo della zona sporca-pulita.
3. Utilizzando l'obiettivo con ingrandimento 20x, per ogni punto scelto (area quadrata di  $600\mu\text{m} \times 600\mu\text{m}$ ) è stato selezionato un "bottom" (nel caso dei sensori la base dorata del finger) e un "top" (strato superiore dello spessore del biofilm).
4. Nel caso dei sensori, per avere un'immagine a fuoco in ogni z, è stato necessario utilizzare diversi livelli di intensità (tramite la funzione "brightness switch") a seconda del piano focale: molto basso in prossimità del bottom, essendo l'oro un materiale altamente riflettente, e molto elevato risalendo verso l'alto. Nel caso dei materiali plastici è stato sufficiente scegliere un unico valore di brightness.
5. Dopo aver eseguito alcune correzioni dovute al rumore dei canali (molto meno riflettenti rispetto ai finger dorati) e ad eventuali inclinazioni del campione, sono state eseguite misure di step pulito-sporco e di rugosità.

# 3

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In questa sezione sono presentati e analizzati i risultati delle prove sperimentali oggetto del presente lavoro di tesi. In particolare, nel paragrafo 3.1 vengono illustrati i principi alla base della scelta della frequenza (e dell'intervallo di frequenze) di lavoro per l'acquisizione dei segnali elettrici nelle diverse prove sperimentali, illustrate nei paragrafi successivi. Nel paragrafo 3.2 e 3.3 vengono presentati i risultati relativi alle prove di simulazione di depositi di calcare e di formazione di biofilm e nel paragrafo 3.4 i risultati relativi alle prove di corrosione.

### 3.1 Selezione dell'intervallo di frequenze di interesse

Come riportato nel paragrafo 2.4.1, a seconda delle prove il valore di impedenza misurato è stato oggetto di studio per una singola frequenza o in un intervallo di frequenza.

In particolare, per quantificare la variazione di impedenza tra sensore sporco e sensore pulito e correlarla a uno spessore depositato, si è scelto di studiare solamente i segnali alla frequenza di 100 kHz, ovvero all'interno del campo resistivo dello spettro. Il modulo dell'impedenza  $|Z|$  di un circuito equivalente come quello rappresentato in figura 2.1 (b), infatti, è, idealmente, funzione della resistenza dovuta alla soluzione in cui è immerso il sensore  $R_s$ , alla resistenza dovuta all'eventuale deposito formatosi sulla superficie  $R_d$ , alla frequenza applicata  $f$  e alla capacità del doppio strato  $C_{dl}$ , secondo la relazione:

$$|Z| = \sqrt{(R_s + R_d)^2 + \left(\frac{1}{\pi \cdot f \cdot C_{dl}}\right)^2} \quad (3.1)$$

La frequenza risulta perciò essere un parametro fondamentale nelle misure impedenziometriche; a bassi valori di frequenza (<10 kHz) la capacità del doppio strato offre elevata impedenza e risulta il contributo principale al segnale complessivo di impedenza, mentre a frequenze più elevate il contributo dato al segnale di impedenza è legato esclusivamente alla resistenza della soluzione e

dell'eventuale deposito, in quanto il contributo della capacità del doppio strato risulta trascurabile (Yang et al., 2003).

In figura 3.1 viene riportato l'andamento delle due componenti del segnale di impedenza (fase  $\phi$  e modulo  $|Z|$ ) e la differenziazione dello spettro in 3 intervalli, denominati a seconda del contributo prevalente fornito: tra 0 e circa 100 Hz si parla quindi di regione capacitiva e da 10000 Hz in poi di regione resistiva. Nella zona compresa tra questi intervalli coesistono invece entrambi i contributi (regione mista).

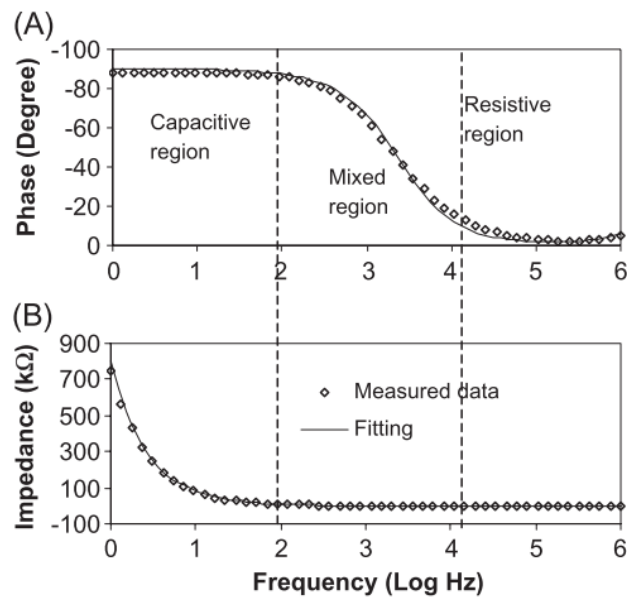


Figura 3.1 - Spettro di impedenza in un mezzo contenente cellule batteriche tramite l'utilizzo di microelettrodi interdigitati: (A) fase, (B) modulo. Intervallo di frequenza: 1 Hz–1 MHz (Yang et al., 2003)

Lo studio della sola frequenza pari a 100 kHz, all'interno della regione resistiva, è stato previsto per tutte le prove di simulazione di depositi inorganici (paragrafo 3.2) e di depositi organici (paragrafo 3.3). Tuttavia, in base alle evidenze sperimentali riscontrate nella prima prova di sporcamento organico, si è deciso di continuare lo studio della variazione di impedenza anche all'interno dello spettro di frequenze 20 Hz – 20 MHz e di sviluppare un ulteriore set di prove, per studiare il fenomeno corrosivo osservato e la relativa risposta del sensore (paragrafo 3.4).



## 3.2 Analisi dei risultati per le prove di deposito inorganico

### 3.2.1 Prove in batch

Le prove batch con simulazione di deposito calcareo sono state effettuate per verificare la risposta in termini di impedenza del sensore di sporcamento DS (da 5 e da 10 mils) e per realizzarne la calibrazione.

In generale, nelle prove eseguite nell'ambito di questo lavoro di tesi, i depositi calcarei formati sono sempre risultati piuttosto omogenei e uniformemente distribuiti sull'intera superficie dell'elettrodo. Tale considerazione è stata riscontrata anche nelle prove in loop (condotte a pressione trascurabile), i cui risultati sono descritti nel paragrafo 3.2.2. Per tutte le prove, quindi, è stato assunto il medesimo valore di densità, il cui procedimento di stima è riportato nel paragrafo 2.4.2.

Come illustrato nel paragrafo 2.4.2, ad ogni valore di spessore, misurato tramite profilometro o metodo gravimetrico, è stato associato un valore di variazione di impedenza tra sensore sporco e sensore pulito. Tale operazione è stata eseguita in tre condizioni di conducibilità, ovvero misurando il valore di impedenza del sensore pulito e del sensore sporco in tre diverse soluzioni (a 600, 750 e 900  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Nei tre casi, per entrambe le tipologie di sensore, è stato osservato un simile andamento dei valori di impedenza  $\Delta R$  al variare dello spessore depositato (figura 3.3). Infatti, la precipitazione di  $\text{CaCO}_3$ , come già osservato sperimentalmente da Turolla et al. (2019), provoca la formazione di un deposito inerte che ostacola il trasferimento di ioni tra due elettrodi consecutivi, causando un incremento del segnale di impedenza (figura 3.2).

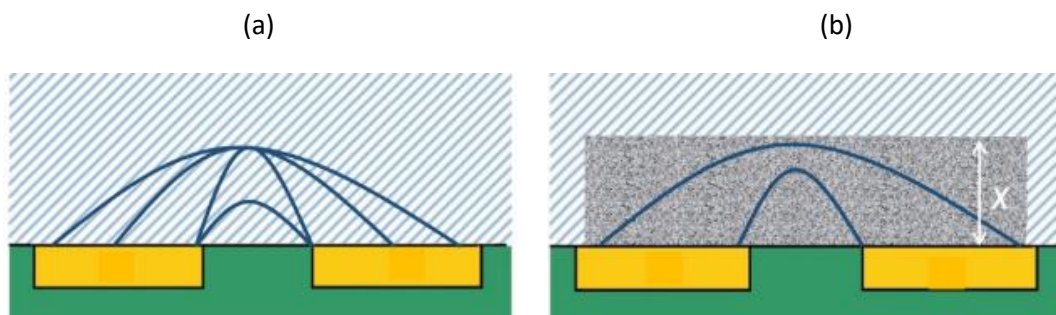


Figura 3.2 - Rappresentazione schematica del campo elettrico (linee blu) nel caso di (a) sensore pulito (b) sensore con deposito calcareo (Turolla et al., 2019).

Tuttavia, analizzando i grafici in figura 3.3, per spessori fino a poche decine di  $\mu\text{m}$  si può notare come piccole variazioni di deposito abbiano determinato elevate variazioni in termini di impedenza; per spessori tra circa una ventina di  $\mu\text{m}$  e 200-300  $\mu\text{m}$  (il valore "soglia" risulta differente a seconda della tipologia di sensore), invece, questo effetto risulta attenuato fino a quasi annullarsi per spessori di deposito superiori, in cui si raggiunge una condizione di *plateau*. Inoltre, si può notare come, a parità di spessore, all'aumentare della conducibilità diminuisca il valore di variazione di impedenza  $\Delta R$  corrispettivo misurato e la relativa sensibilità del sensore.

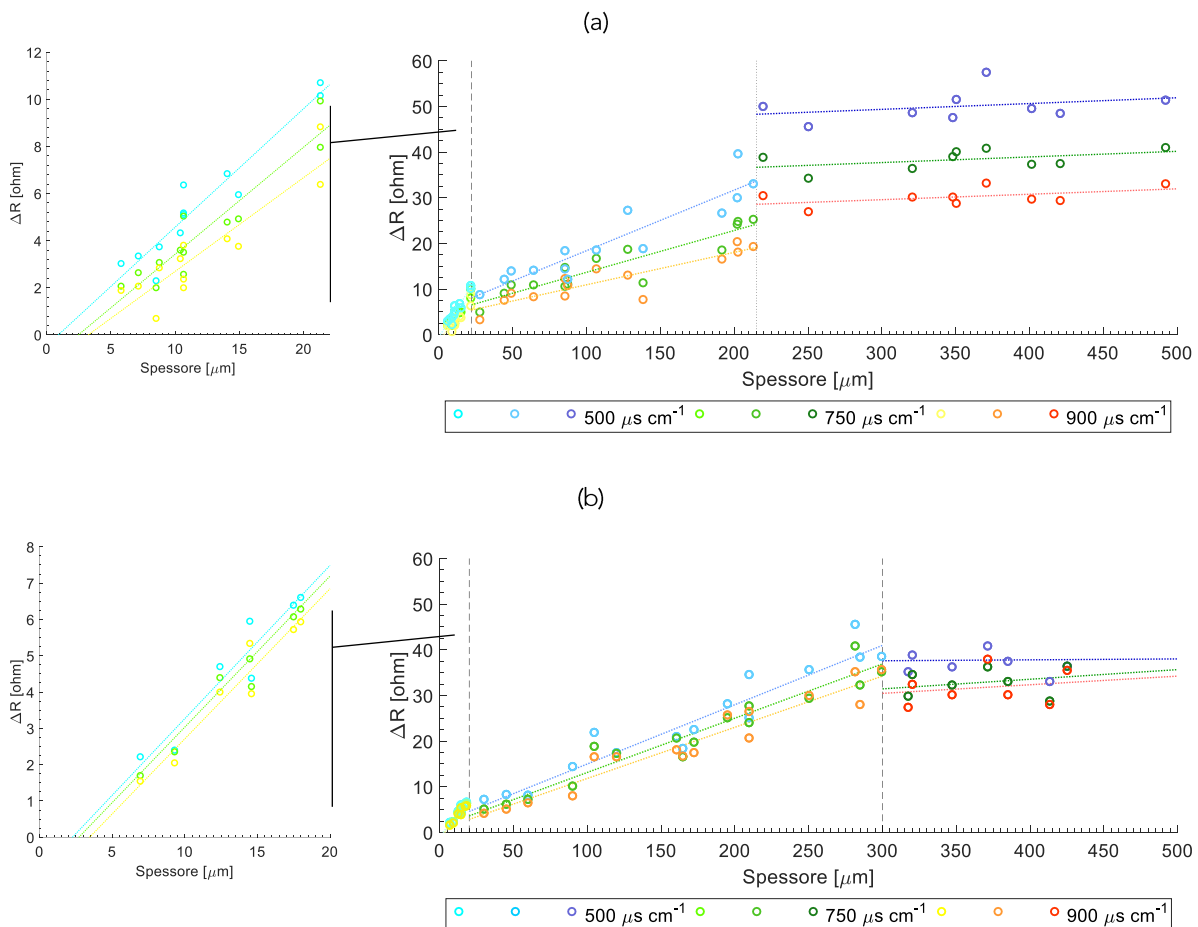


Figura 3.3 - A sinistra, rappresentazione della variazione del segnale di impedenza all'aumentare dello spessore depositato in tre condizioni di conducibilità per (a) sensori da 5 mils e (b) sensori da 10 mils. I colori assumono sfumature più intense dalla prima alla terza regione; le rette verticali tratteggiate identificano le tre regioni in cui è stato suddiviso l'andamento in termini di risposta di impedenza dei sensori. A destra, ingrandimento del primo intervallo. Sono riportate per ogni tratto e per ogni conducibilità le linee di tendenza delle serie di dati.

Per entrambe le tipologie di sensore e per ciascun intervallo, è stata quindi effettuata una regressione lineare e sono stati identificati i valori di pendenza ( $m$ ) e intercetta ( $q$ ). Per scegliere i valori di spessore "soglia" dei tre intervalli, sono state analizzate diverse combinazioni e per ognuna è stato calcolato il coefficiente di determinazione  $R^2$  nei tre tratti; sono stati quindi

selezionate le opzioni con  $R^2$  più elevato nel primo e nel secondo tratto. Il coefficiente di determinazione nel terzo tratto è caratterizzato in tutte le combinazioni da valori significativamente inferiori rispetto alle altre due sezioni, in quanto il segnale di impedenza risulta meno dipendente dallo spessore depositato.

In tabella 3.1 e 3.2 sono riportati gli intervalli analizzati per entrambe le tipologie di sensori con i relativi coefficienti di determinazione per il primo (1), il secondo (2) e il terzo (3) tratto; in giallo è evidenziata la combinazione identificata come ottimale.

Tabella 3.1 - Combinazioni di intervalli di spessore e relativi  $R^2$  delle linee di tendenza per i sensori di sporramento DS da 5 mils

Conducibilità [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]		600			750			900		
Soglia a 1	Soglia a 2	$R^2$			$R^2$			$R^2$		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	205	0,697	0,842	0,315	0,665	0,808	0,383	0,501	0,749	0,409
20	200	0,697	0,79	0,48	0,665	0,652	0,564	0,501	0,566	0,578
20	300	0,697	0,86	0,007	0,665	0,814	0,125	0,501	0,791	0,209
22	205	0,913	0,827	0,315	0,887	0,805	0,383	0,819	0,757	0,409
22	215	0,913	0,853	0,101	0,887	0,842	0,214	0,819	0,796	0,257
22	250	0,913	0,813	0,154	0,887	0,768	0,426	0,819	0,747	0,458
30	215	0,791	0,830	0,101	0,557	0,813	0,214	0,420	0,762	0,257

Tabella 3.2 - Combinazioni di intervalli di spessore e relativi  $R^2$  delle linee di tendenza per i sensori di sporramento DS da 10 mils

Conducibilità [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]		600			750			900		
Soglia 1	Soglia 2	$R^2$			$R^2$			$R^2$		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	200	0,904	0,848	0,068	0,957	0,870	0,1800	0,930	0,878	0,256
20	250	0,904	0,847	0,129	0,957	0,903	0,0005	0,930	0,886	0,015
20	270	0,904	0,847	0,129	0,957	0,903	0,0005	0,930	0,886	0,015
20	290	0,904	0,921	0,0162	0,957	0,921	0,073	0,930	0,910	0,073
20	300	0,904	0,910	0,002	0,957	0,930	0,158	0,930	0,927	0,088
30	290	0,728	0,896	0,162	0,465	0,917	0,073	0,930	0,914	0,020

Per i tratti identificati (0-22, 22-215, 215-...  $\mu\text{m}$  per i sensori da 5 mils e 0-20, 20-300, 300-...  $\mu\text{m}$  per i sensori da 10 mils), si riportano in tabella 3.3 e 3.4 i coefficienti m e q ottenuti dalla regressione lineare. Le relative linee di tendenza sono rappresentate in figura 3.3.

I valori in tabella 3.3 e 3.4 rispecchiano quanto osservato qualitativamente dai grafici in figura 3.3. La pendenza delle rette interpolanti diminuisce successivamente nei tre tratti (andamento che corrisponde a un relativo aumento del valore dell'intercetta) all'aumentare dello spessore; tale fenomeno indica una maggiore sensibilità di risposta del sensore a uno sporcamento di spessore limitato e, viceversa, un'assenza di risposta per depositi di spessore particolarmente elevato.

Tabella 3.3 - Valori di pendenza ( $m$ ) e intercetta ( $q$ ) nei tre tratti, per tre valori di conducibilità (sensori da 5 mils)

Conducibilità [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]	600		750		900	
	$m$	$q$	$m$	$q$	$m$	$q$
Tratto 1	0,5033	-0,4564	0,4548	-1,1207	0,3986	-1,2887
Tratto 2	0,1326	5,1470	0,0915	4,5234	0,0710	3,8389
Tratto 3	0,0127	45,548	0,0123	34,015	0,0119	26,004

Tabella 3.4 - Valori di pendenza ( $m$ ) e intercetta ( $q$ ) nei tre tratti, per tre valori di conducibilità (sensori da 10 mils)

Conducibilità [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]	600		750		900	
	$m$	$q$	$m$	$q$	$m$	$q$
Tratto 1	0,4222	-0,9556	0,4160	-1,2666	0,414	-1,4247
Tratto 2	0,1299	2,3111	0,1189	1,2448	0,1121	0,6108
Tratto 3	-0,0020	37,436	0,02111	25,110	0,0189	27,784

Tale fenomeno è determinato dal diminuire della densità del campo elettrico all'aumentare della distanza dall'elettrodo (nella configurazione coplanare, infatti, il campo elettrico non risulta spazialmente uniforme), come può essere osservato qualitativamente in figura 3.4. Inoltre, a distanze dall'elettrodo superiori alla somma della larghezza del finger e della distanza tra due finger successivi, solo il 5% della totalità della corrente fluisce al di sopra della superficie dell'elettrodo (Van Gerwen et al., 1998).

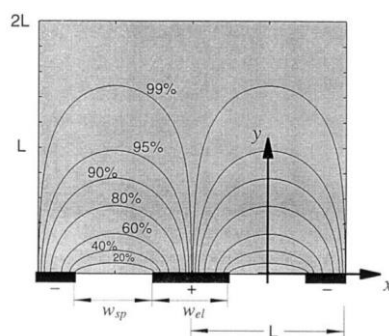


Figura 3.4 - Corrente fluente sopra la superficie di un sensore interdigitato; il valore % di ogni curva indica la % di corrente fluente sotto la curva (Van Gerwen et al., 1998)

In particolare, la prima regione individuata negli intervalli 0-22 e 0-20  $\mu\text{m}$  di spessore corrisponde alla fascia all'interno del canale del sensore di sporcamento DS (in quanto la profondità del canale risulta pari a circa 35  $\mu\text{m}$ , in cui il campo elettrico risulta particolarmente intenso).

I coefficienti ricavati per i tre valori di conducibilità hanno permesso di determinare, tramite un'ulteriore operazione di regressione lineare, una relazione tra i coefficienti  $m$  e  $q$  e la conducibilità nell'intervallo 600-900  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (figura 3.5). Questo consente, per qualsiasi valore di conducibilità nell'intervallo, di poter ricavare una retta di calibrazione del sensore per i tre intervalli di spessore definiti.

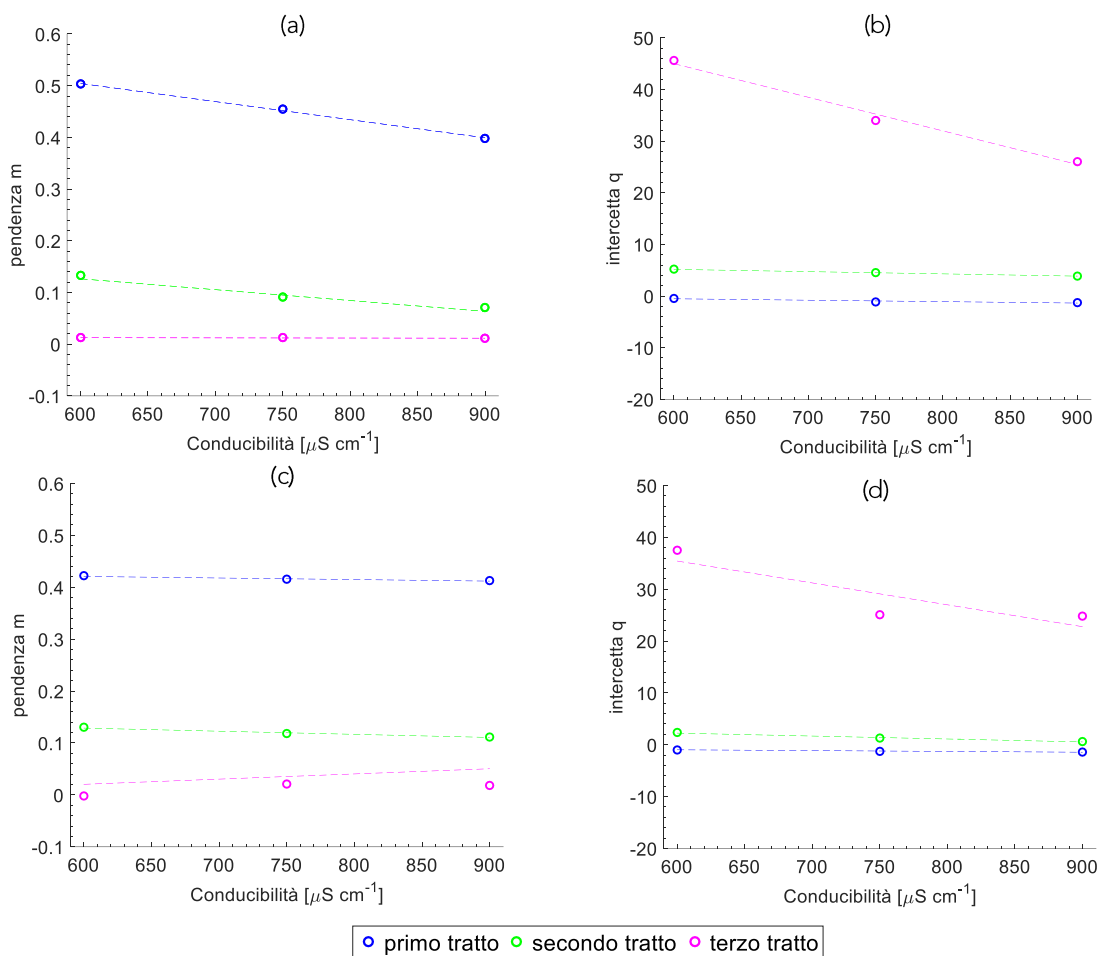


Figura 3.5 - Andamento dei valori di pendenza (a,c) e intercetta (b,d) al variare della conducibilità nei tre tratti per (a,b) sensori da 5 mils (c,d) sensori da 10 mils

In tabella 3.5 sono riportati i valori di pendenza  $n$ , di intercetta  $p$  e di  $R^2$  ottenuti. Analizzando il primo e il secondo tratto, ovvero operando nell'intervallo di spessore in cui il sensore ha sensibilità maggiore, si può notare come i valori delle pendenze diminuiscano all'aumentare della conducibilità; l'intercetta, di conseguenza, segue lo stesso andamento decrescente. Tale fenomeno indica una sensibilità della risposta del sensore in termini di impedenza inversamente

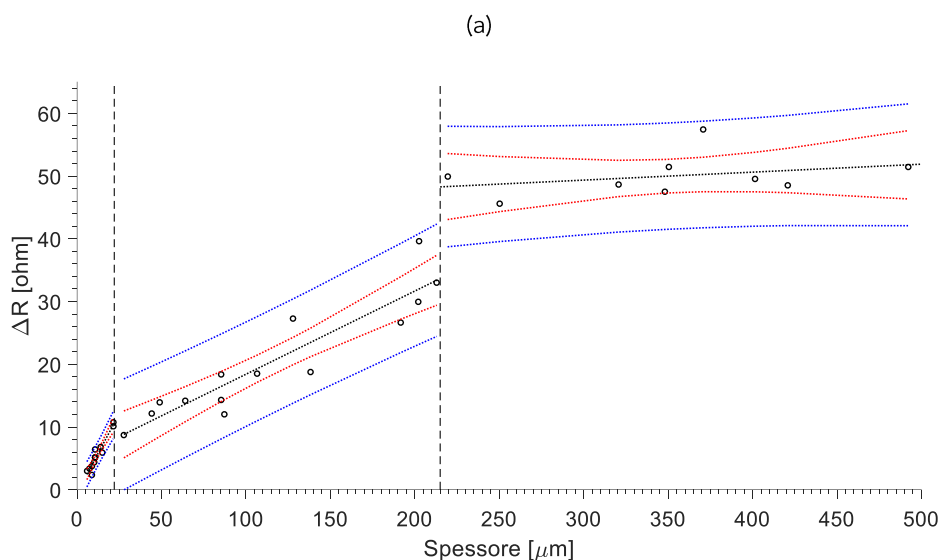
proporzionale alla conducibilità ed è probabilmente dovuto alla variazione del contributo della resistenza della soluzione  $R_s$ , il quale diminuisce all'aumentare della conducibilità e tende ad attenuare così il contributo della resistenza dovuto allo spessore di deposito formatosi  $R_d$ .

Tabella 3.5 - Valori di pendenza  $n$ , di intercetta  $p$  e di  $R^2$  (nei tre tratti e per le due tipologie di sensori) delle regressioni lineari che identificano la relazione tra coefficienti  $m$  e  $q$  e la conducibilità

Coefficienti		5 mils			10 mils		
		n	p	$R^2$	n	p	$R^2$
m	Tratto 1	-0,00035	0,71420	0,9982	-0,00003	0,43884	0,9434
	Tratto 2	-0,00021	0,25243	0,9639	-0,00006	0,16470	0,9810
	Tratto 3	-0,000003	0,01431	0,9999	0,00007	-0,03956	0,6714
q	Tratto 1	-0,00277	1,12560	0,89403	-0,00156	-0,04274	0,9658
	Tratto 2	-0,00436	7,77335	0,9993	-0,00567	5,63977	0,9789
	Tratto 3	-0,0651	84,0490	0,9893	-0,04217	60,740	0,7693

I coefficienti di determinazione riportati in tabella 3.5 evidenziano una buona linearità ( $R^2 > 0,89$ ) tra la conducibilità e i valori di pendenza  $m$  e di intercetta  $q$ , ad eccezione del terzo tratto per i sensori da 10 mils ( $R^2=0,67$  e  $R^2=0,77$ ).

Infine, per le rette di calibrazione ottenute, i cui parametri sono riportati in tabella 3.3 e 3.4, sono stati calcolati gli intervalli di confidenza e di predizione con un livello di significatività  $\alpha$  del 5%. A titolo di esempio si riportano in figura 3.6 le rette di calibrazione con relativi intervalli di confidenza e di predizione per i sensori da 5 e 10 mils studiati alla conducibilità di  $600 \mu\text{s cm}^{-1}$ .



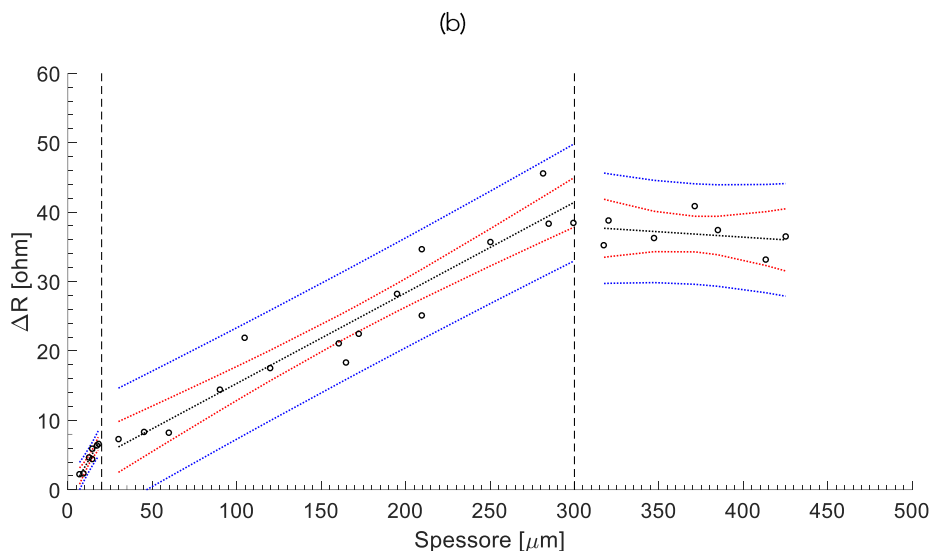


Figura 3.6 - Rappresentazione della variazione del segnale di impedenza all'aumentare dello spessore depositato alla conducibilità di  $600 \mu\text{s cm}^{-1}$  per (a) sensori da 5 mils e (b) sensori da 10 mils. Le rette tratteggiate in rosso corrispondono agli intervalli di confidenza al 95% di probabilità delle rette ottenute dall'interpolazione lineare (linee tratteggiate in nero), quelle in blu agli intervalli di predizione al 95% di probabilità.

Come si poteva osservare già in figura 3.3, le rette di interpolazione delle diverse regioni presentano delle discontinuità in prossimità delle soglie che rendono difficile l'utilizzo delle rette di calibrazione ottenute nelle zone di transizione. I primi due intervalli mostrano una minore variabilità del dato e quindi intervalli di confidenza e previsione meno ampi.

Nella realtà pratica, la variabile indipendente del sistema non sarebbe lo spessore misurato, ma il valore di variazione di impedenza  $\Delta R$ , dal quale poter stimare lo strato di deposito inorganico formatosi; per tale motivo gli intervalli di confidenza e di previsione andrebbero ristimati opportunamente nel caso si volessero utilizzare per determinare l'incertezza relativa a misure di spessore.

A seguito di queste prove e di quelle descritte nel paragrafo 3.2.2, si è deciso per gli studi successivi di utilizzare solo i sensori di sporcamento DS da 10 mils, in quanto sensibili a intervalli maggiori di spessore (fino a  $300 \mu\text{m}$ ). Per spessori più elevati, invece, entrambe le tipologie di sensori di sporcamento DS non sono risultate idonee al monitoraggio dei depositi formatosi.

### 3.2.2 Prove in loop

Sono state eseguite 14 prove in loop, il cui setup sperimentale è descritto nel paragrafo 2.3, per valutare l'influenza della velocità del flusso (in condizioni di pressione trascurabile nelle tubazioni) sullo spessore depositato e sulla relativa risposta in termini di impedenza. Le condizioni di

sovrasaturazione adottate (descritte nel paragrafo 2.2) sono state scelte in modo tale da accelerare la formazione di sporco inorganico, abbattendo l'energia di attivazione necessaria alla formazione di precipitato (equazione 1.2) e alla successiva adesione sulla superficie del loop. La solubilità in acqua di questo sale è, infatti, molto inferiore ai valori delle concentrazioni utilizzate nello svolgimento di queste prove (circa  $0,014 \text{ g L}^{-1}$  alla temperatura di  $25^\circ\text{C}$ , contro una concentrazione iniziale nel loop di  $1 \text{ g L}^{-1}$ ).

La rapidità dell'adesione del deposito nelle tubazioni del loop, in queste condizioni operative, è stata riscontrata tramite la valutazione dell'andamento della variazione di impedenza nel tempo. Infatti, dopo poche ore dall'inizio della prova (con concentrazione di partenza di carbonato di calcio pari a  $1 \text{ g L}^{-1}$ ), è stato verificato un aumento del modulo dell'impedenza rispetto al sensore pulito; tuttavia, nelle misure successive si è registrata una stabilizzazione dei valori ottenuti di  $\Delta R$ . In figura 3.7 viene riportato, a titolo di esempio, il monitoraggio delle misure di impedenza di quattro sensori (2 da 5 mils e 2 da 10 mils) nel corso di una delle prove svolte. Nel caso riportato si può notare come dopo già 2-4 h si verifichi un aumento della variazione di impedenza significativo; nelle ore successive il valore della variazione di impedenza oscilla di circa un  $\pm 10\%$ , ma senza seguire un andamento di aumento riconoscibile.

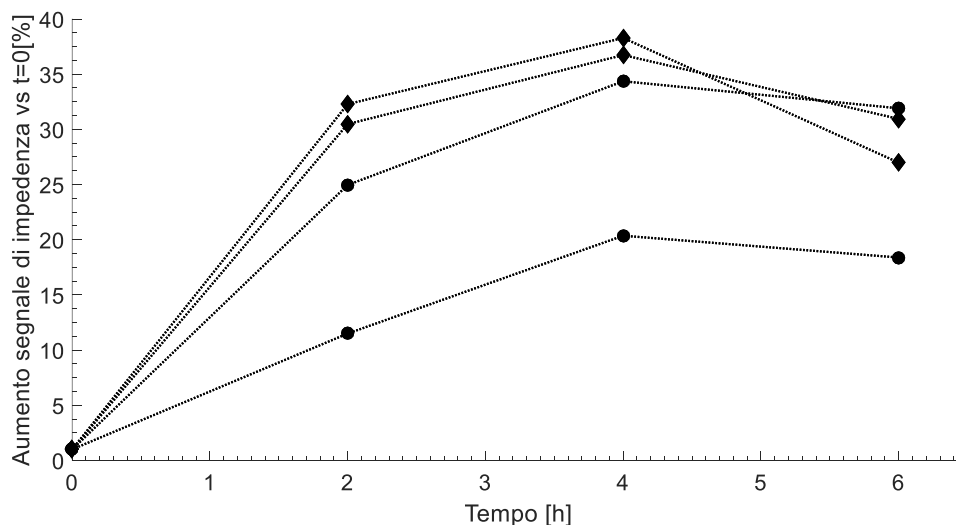


Figura 3.7 - Andamento nel tempo della variazione di impedenza in termini percentuali rispetto a  $t=0$  per quattro sensori all'interno del loop; con i cerchi vengono indicati i sensori da 5 mils e con i rombi i sensori da 10 mils

Nelle prove in cui è stato aggiunto carbonato di calcio nel corso della prova, aumentando il rapporto di sovrasaturazione della soluzione ( $+ 1 \text{ g L}^{-1}$ ), è stato riscontrato nella misura successiva (solitamente eseguita 1-2 h dopo) un aumento del segnale di impedenza significativo, anche del 30-40% rispetto alla misura precedente (figura 3.8).

In due prove è stata aumentata ulteriormente la concentrazione di  $\text{CaCO}_3$ , per un totale di  $+3 \text{ g L}^{-1}$  rispetto alle caratteristiche dell'acqua di rete), ma non in tutti i sensori è stato osservato sperimentalmente un aumento di segnale della stessa entità (figura 3.8); questo è



probabilmente dovuto ai limiti di sensibilità del sensore, già riscontrati nelle prove in batch e descritti nel paragrafo 3.2.1.

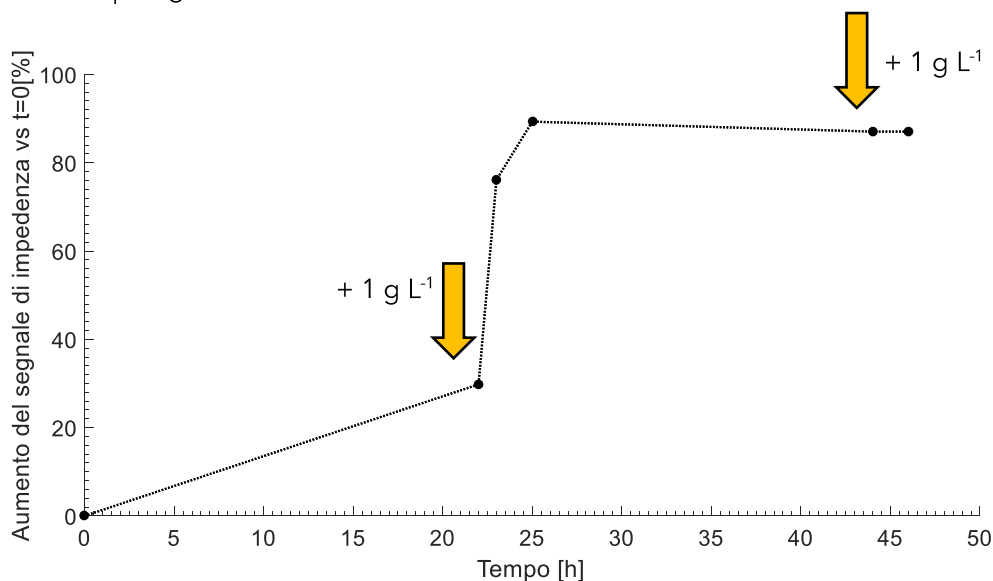


Figura 3.8 - Andamento nel tempo della variazione di impedenza in termini percentuali rispetto a  $t=0$  per un sensore sottoposto a due incrementi del livello di sovrasaturazione ( $+1 \text{ g L}^{-1}$  al tempo  $t=22 \text{ h}$  e  $+1 \text{ g L}^{-1}$  al tempo  $t=44 \text{ h}$ )

Per poter confrontare i risultati ottenuti in batch con quelli in loop, è stata valutata l'influenza della velocità del flusso nell'intero intervallo di studio ( $1\text{-}5 \text{ cm s}^{-1}$ ), in termini di spessore depositato al termine della prova su tre tipi di substrato: quello del sensore di sporcamento DS, plastica (PVC) e acciaio zincato. A seguito di tali considerazioni, è stata infine valutata anche l'influenza del materiale sullo spessore depositato. Le prove condotte con concentrazioni diverse di  $\text{CaCO}_3$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $1 \text{ g L}^{-1} + 1 \text{ g L}^{-1}$ ) nel corso della prova sono state studiate separatamente, mentre sono state trascurate le prove con aggiunta totale di  $\text{CaCO}_3$  pari a  $3 \text{ g L}^{-1}$ , a causa del numero esiguo di dati disponibili. Si sono ottenuti, perciò, sei sottogruppi di dati, identificati dal substrato di interesse e dalla quantità di  $\text{CaCO}_3$  dosato nella soluzione al termine della prova.

La caratterizzazione del fenomeno è stata eseguita tramite l'analisi della varianza (ANOVA) a una via. Tale analisi permette di confrontare gruppi di dati comparando la variabilità interna e la variabilità tra i vari gruppi, per verificare se questi possano essere o meno distinti in base a un determinato fattore. Nell'ANOVA a una via, si ipotizza che un unico fattore possa distinguere i set di dati; in questo caso viene analizzata la velocità di flusso a cui sono stati sottoposti i campioni. Per tale studio statistico è stato utilizzato il software R.

Per ogni sottogruppo sono state dapprima verificate le ipotesi necessarie all'utilizzo corretto dell'ANOVA, ovvero la distribuzione normale dei residui e l'omoschedasticità dei dati. Sono stati inoltre eliminati eventuali outlier. In particolare, è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk per la verifica della normalità dei residui, mentre per verificare l'omoschedasticità dei raggruppamenti dei campioni considerati è stato effettuato il test di Bartlett. Per entrambi i test e per l'ANOVA

stessa è stato scelto un livello di significatività  $\alpha$  pari allo 0,05. Per eseguire tali analisi statistiche in R, sono state utilizzate le seguenti funzioni: `shapiro.test()`, `bartlett.test()` e `aov()`. Il risultato ottenuto per i tre test statistici viene riportato in tabella 3.6 in termini di  $p$ -value ( $p$ ); a valori di  $p$ -value superiori al livello di significatività corrisponde un'evidenza empirica non sufficientemente contraria all'ipotesi nulla  $H_0$ , che viene quindi accettata.

Tabella 3.6 - Valori di  $p$ -value per ogni set di dati dei test per la verifica di ipotesi dell'ANOVA e dell'ANOVA stessa

Set di dati			Verifica ipotesi		ANOVA	
Materiale substrato	Concentrazione e $\text{CaCO}_3$	Numero dati	Normalità dei residui	Omoschedasticità dei dati		
			$p$ -value			
Sensor e DS	5 mils	1 g L <sup>-1</sup>	12	0,1948	0,3803	0,0289
		2 g L <sup>-1</sup>	11	0,0120	0,9664	-
	10 mils	1 g L <sup>-1</sup>	14	0,1723	0,8418	0,355
		2 g L <sup>-1</sup>	12	0,9708	0,3597	0,736
Plastica - PVC	1 g L <sup>-1</sup>	21	0,05498	0,4802	0,602	
	2 g L <sup>-1</sup>	15	0,03077	0,9782	-	
Acciaio zincato	1 g L <sup>-1</sup>	18	0,00025	0,006245	-	
	2 g L <sup>-1</sup>	14	0,6649	0,01169	-	

In tabella 3.6, in rosso sono evidenziati i casi per i quali la verifica di ipotesi non risulta rispettata ( $p$ -value <  $\alpha$ ), in giallo i casi in cui dall'ANOVA risulta esserci una dipendenza delle condizioni di velocità ( $p$ -value <  $\alpha$ ). Quindi, in caso non risultasse rispettata l'ipotesi di distribuzione normale dei residui, è stato applicato il Test di Kruskal-Wallis (in R `kruskal.test()`), un metodo non parametrico comparabile all'ANOVA. Nel caso in cui non venisse rispettata unicamente l'assunzione di omoschedasticità, si è scelto invece di applicare il test di Welch (in R `oneway.test()`), che corregge il test dell'ANOVA per ovviare la non omoschedasticità dei dati. In tabella 3.7 si riportano i risultati ottenuti per i casi evidenziati in rosso in tabella 3.6, applicando i test alternativi descritti precedentemente.

Tabella 3.7 - Valori di  $p$ -value dei test per la verifica di ipotesi dell'ANOVA e dei test alternativi applicati nei set di dati in cui le ipotesi dell'ANOVA non risultano rispettate

Set di dati			Verifica ipotesi		Test di Kruskal-Wallis/ Test di Welch
Materiale substrato	Concentrazione e $\text{CaCO}_3$	Normalità dei residui	Omoschedasticità dei dati		
			$p$ -value		
Sensore DS	5 mils	2 g L <sup>-1</sup>	0,0120	0,9664	0,4708
Plastica (PVC)	2 g L <sup>-1</sup>	0,03077	0,9782	0,7952	
Acciaio zincato	1 g L <sup>-1</sup>	0,00025	0,006245	0,5254	
	2 g L <sup>-1</sup>	0,6649	0,01169	0,4078	

Il set di dati dei sensori da 5 mils sottoposti a una concentrazione in flusso di  $\text{CaCO}_3$  pari a  $1 \text{ g L}^{-1}$  è stato analizzato in maniera più approfondita per valutare il significato del risultato ottenuto tramite ANOVA. Nell'analisi svolta, la velocità del flusso è stata trattata come una variabile categorica, per cui i valori di velocità sono stati posti sullo stesso piano e non legati tra loro in maniera quantitativa. Tramite un'analisi più approfondita, eseguita mediante il software R, sono stati analizzati i contributi delle singole "categorie" di velocità in termini di p-value e si è osservato come fossero i dati con velocità pari a  $3 \text{ cm s}^{-1}$  a differenziarsi dai restanti (valore di p-value inferiore a 0,05), alterando il risultato dell'analisi, ma di fatto non stabilendo un trend positivo o negativo tra spessore depositato e velocità del flusso, trattandosi del valore di velocità intermedio.

Dai risultati emerge, quindi, come non vi sia un'influenza della velocità statisticamente significativa, per nessuno dei set di dati riportati.

Tali risultati sperimentali sono apparentemente discordanti da quelli ottenuti da Hoang et al. (2011) riportati nel paragrafo 1.1.2, i quali hanno osservato nell'intervallo di velocità  $0\text{-}7 \text{ cm s}^{-1}$  un aumento di deposito in termini di massa (e quindi, se ipotizzato omogeneo, di spessore). Tuttavia, i numeri di Reynolds indagati nello studio di Hoang et al. (2011) si discostano dal setup sperimentale utilizzato nell'ambito di questa tesi. Nonostante, infatti, le velocità del flusso siano confrontabili, Hoang et al. (2011) utilizzano tubature di diametro significativamente inferiore ai 2,5 cm che determinano, secondo l'equazione 2.1, valori del numero di Reynolds inferiori a quelli riportati in tabella 2.3: il valore massimo studiato sperimentalmente da Hoang et al. (2011) è pari a 250, che corrisponde al valore minimo analizzato nell'ambito di questa tesi. Le prove eseguite si concentrano, quindi, in un intervallo caratterizzato da valori del numero di Reynolds maggiori rispetto a quelli indagati dallo studio di Hoang et al. (2011).

In figura 3.9 (a) si può osservare, infatti, come Hoang et al. (2011) abbiano indagato un intervallo dei valori di Reynolds tra circa 10 ( $=10^1$ ) e 250 ( $=10^{2,4}$ ), utilizzando diversi valori di velocità e di diametro di passaggio. Per il diametro di lunghezza maggiore (pari 1,3 cm), si nota inoltre una pendenza minore della retta interpolante e quindi una minore variazione di deposito al variare del numero di Reynolds. In termini di velocità, in figura 3.9 (b) si può invece notare come le velocità studiate anche nell'ambito di questo lavoro di tesi (ovvero tra  $1\text{-}5 \text{ cm s}^{-1}$ ) siano state investigate solo per tubature di diametro inferiore a 0,5 cm e che, inoltre, vi sia maggiore variazione in termini di materiale depositato per velocità nel range tra 0 e  $1 \text{ cm s}^{-1}$ .

In conclusione, i risultati ottenuti dalle prove in loop sono discordanti da quelli emersi dallo studio di Hoang et al. (2011); tale differenza di risultati può essere motivata dalle diverse condizioni idrodinamiche. Infatti, maggiore è il valore del numero di Reynolds e minore risulta essere lo spessore del *boundary layer* che si forma in prossimità di una superficie soggetta a un flusso; mentre a velocità molto basse quest'ultimo fattore può influenzare la quantità di deposito adeso alla superficie, per velocità più alte il contributo del numero di Reynolds risulta prevalente e allo

stesso tempo, nell'intervallo indagato, non ha determinato sforzi di taglio tali da influenzare lo spessore depositato.

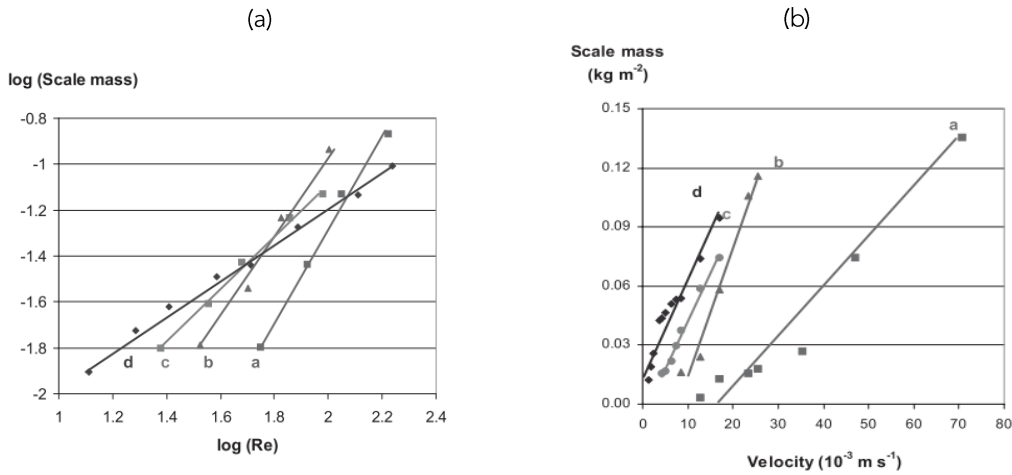


Figura 3.9 - Effetto del numero di Reynolds (a) e della velocità (b) sul deposito di precipitato, per tubature di diametro a. 0,3 b. 0,5 c. 0,7 e d. 1.3 cm

In seguito a tale evidenza sperimentale, ovvero l'indipendenza dello spessore depositato dalla velocità del flusso nell'intervallo 1-5 cm s<sup>-1</sup>, è stato verificato se le rette di calibrazione, ottenute dalle misure di impedenza effettuate in batch per i sensori da 5 mils e da 10 mils, potessero essere applicate anche per le misure effettuate nel loop.

Per entrambe le tipologie di sensori, quindi, sono stati calcolati i valori di spessore atteso  $S_{atteso}$ , utilizzando le rette di calibrazione (i cui coefficienti sono riportati in tabella 3.5) e i valori di impedenza effettivamente misurati  $\Delta R$  (equazione 3.2):

$$S_{atteso} = \frac{\Delta R - q_{tipologia\ di\ sensore, tratto, conducibilità}}{m_{tipologia\ di\ sensore, tratto, conducibilità}} \quad (3.2)$$

dove  $\Delta R$  è la variazione di impedenza tra il sensore sporco a fine prova e il sensore pulito e  $q_{tipologia\ di\ sensore, tratto, conducibilità}$  e  $m_{tipologia\ di\ sensore, tratto, conducibilità}$  sono i coefficienti da utilizzare, diversi a seconda della tipologia di sensore, del valore di spessore misurato  $S_{misurato}$  (e quindi dell'intervallo in cui si trova, secondo la suddivisione individuata in tabella 3.1 e 3.2) e della conducibilità con cui è stata effettuata la misura di impedenza.

Sono stati considerati outlier i valori ottenuti di  $S_{atteso}$  che ricadevano in un altro intervallo di spessore rispetto a quello considerato per la scelta dei coefficienti  $m$  e  $q$ .

Inoltre, la poca precisione dell'interpolazione ottenuta per alcuni tratti, come descritto nel paragrafo 3.2.1, ha impedito l'utilizzo dei dati per i quali lo  $S_{atteso}$  sia stato ritenuto non attendibile (ad esempio nel caso di valori negativi).

I valori di  $S_{misurato}$  e  $S_{atteso}$  sono stati confrontati per verificare che vi fosse un'effettiva corrispondenza tra la calibrazione in batch e i valori ottenuti in condizioni di flusso; in figura 3.10 si riportano i grafici di dispersione con in ascissa e in ordinata rispettivamente i valori di spessore misurato e atteso. In entrambi i casi, la retta ottenuta dall'interpolazione di questi punti, eliminati gli eventuali

outlier, è stata ritenuta confrontabile con la bisettrice del primo quadrante. In tabella 3.8 sono riportati i valori di pendenza, di intercetta e di  $R^2$  ottenuti. Per i sensori da 5 mils la retta di interpolazione ottenuta mostra un andamento meno assimilabile a quello dell'intercetta del primo quadrante; ciò può essere dovuto da una parte alla mancanza di un numero significativo di dati per valori di  $S_{\text{misurato}}$  superiori ai  $50 \mu\text{m}$ , dall'altra alla minor precisione dei coefficienti del primo tratto (tabella 3.5), tramite i quali sono stati ottenuti i valori di  $S_{\text{atteso}}$ .

Da questo risultato si può comunque affermare che le rette di calibrazione ottenute per i sensori in batch siano utilizzabili anche per le prove in loop, per flussi con pressioni trascurabili e nell'intervallo di velocità studiato.

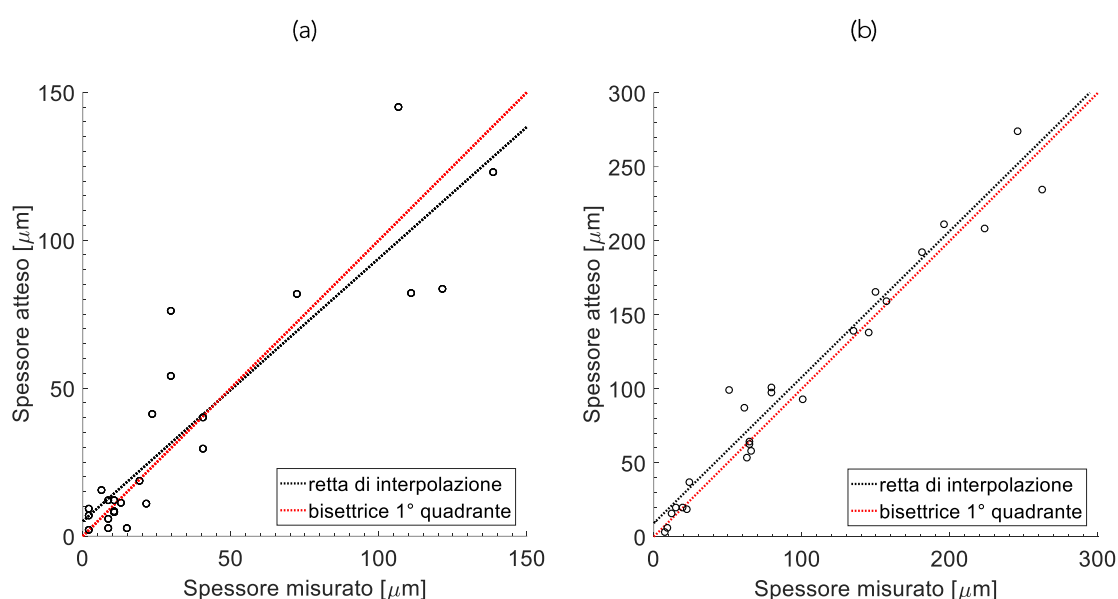


Figura 3.10 - Legame tra spessore reale e teorico per (a) sensori da 5 mils (b) sensori da 10 mils. La retta tratteggiata in nero rappresenta la linea di tendenza dei dati riportati nel grafico, quella rossa la bisettrice del primo quadrante

Tabella 3.8 - Valori di pendenza, intercetta e  $R^2$  delle rette di interpolazione dei dati di  $S_{\text{misurato}} - S_{\text{reale}}$

Sensore	pendenza	intercetta	$R^2$
5 mils	0,8884	5,0537	0,8167
10 mils	0,93107	11,2245	0,8955

Infine, i dati sperimentali di spessore reale sono stati analizzati per verificare l'influenza del tipo di substrato sullo spessore depositato, avendo a disposizione tre tipi di substrato: quello del sensore DS (oro e rame sovrapposti), plastica (PVC) e acciaio zincato.

Infatti, l'applicazione su scala reale del sensore DS, per garantire un monitoraggio realistico della formazione di deposito, necessita che il materiale superficiale di cui è costituito sia comparabile, in termini di formazione di sporco inorganico e organico, ai materiali solitamente utilizzati

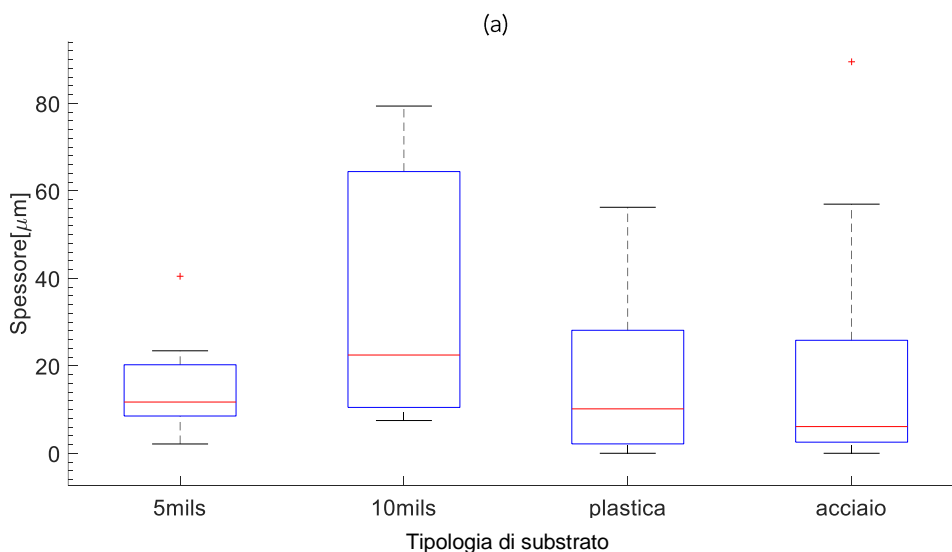
per la realizzazione di tubature. Nel caso ciò non si verificasse, bisognerebbe scegliere un altro materiale di copertura superficiale del sensore o trovare una relazione che leghi il comportamento del materiale del sensore e quello dei materiali utilizzati nelle condotte.

Tramite uno studio ANOVA, secondo il metodo descritto precedentemente in questo paragrafo, sono stati indagati i sottogruppi di dati degli spessori depositati sui campioni plastici, di acciaio zincato e sui sensori da 5 e da 10 mils (considerati separatamente in quanto aventi caratteristiche differenti). L'ANOVA è stata eseguita per due set di dati distinti, caratterizzati da concentrazioni di  $\text{CaCO}_3$  in flusso differenti (1 e 2  $\text{g L}^{-1}$ ).

In entrambi i casi, non essendo rispettate le ipotesi di normalità dei residui e di omoschedasticità dei dati, è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis. Per il set di dati caratterizzato da una concentrazione in flusso pari 1  $\text{g L}^{-1}$  è stato ottenuto un p-value pari 0,0559, valore di poco superiore al livello di significatività (0,05); per il secondo set di dati è stato invece ottenuto un valore pari a 0,3311.

Tali risultati evidenziano come il tipo di materiale non influenzi in maniera significativa lo spessore di deposito formato sulla superficie, nonostante vi sia un'elevata variabilità nei valori, come si può osservare in figura 3.11. In particolare, i valori mediani per ciascuna tipologia di substrato risultano confrontabili; ciò è in linea con quanto riscontrato da Wang et al. (2005), i quali non evidenziano sperimentalmente differenze significative tra gli spessori formati su materiali metallici (rame) e polimerici.

In tale analisi non sono stati considerati i valori di rugosità del materiale a livello micro- e mesoscopico; tuttavia, per i sensori da 10 mils si può osservare una tendenza (comunque non statisticamente significativa) ad accumulare spessori maggiori di deposito rispetto agli altri materiali. Tale fenomeno può essere dovuto a una maggiore spaziatura tra i finger rispetto ai sensori da 5 mils, che rende la superficie macroscopicamente "rugosa".



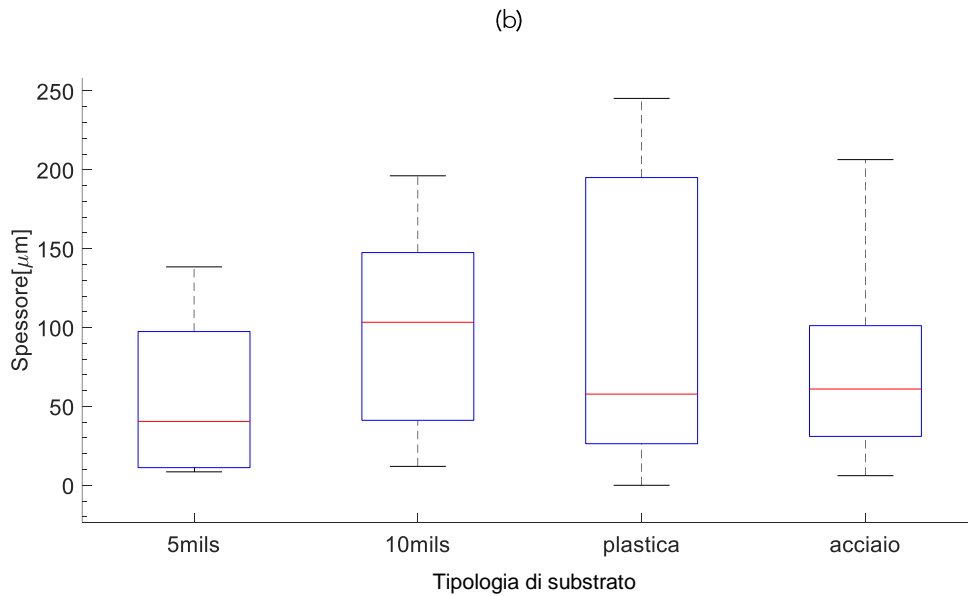


Figura 3.11 – Boxplot degli spessori depositati su diverse tipologie di substrato in caso di flusso con concentrazione pari a (a)  $1 \text{ g L}^{-1}$  (b)  $2 \text{ g L}^{-1}$

### 3.3 Analisi dei risultati per le prove di deposito organico

Le prove di sporcamento organico sono state articolate in due esperimenti, rispettivamente della durata di 8 e 7 settimane. Di seguito vengono riportati i risultati e la relativa discussione in merito all'influenza del moto in flusso sul modulo del segnale di impedenza ( $|Z|$  o  $R$ ) misurato (paragrafo 3.3.1), la tecnica di misura dello spessore del biofilm (paragrafo 3.3.2) e la risposta del sensore di sporcamento DS in termini di impedenza relativamente a un deposito di tipo organico (paragrafo 3.3.3).

#### 3.3.1 Influenza dello stato di moto del flusso sul modulo del segnale di impedenza ( $|Z|$ )

Nell'ambito di queste prove è stata valutata l'influenza dello stato di moto del flusso sul modulo del segnale di impedenza misurato dal sensore di sporcamento DS, a parità delle altre condizioni operative: per fare questo, ogni volta che sono state eseguite misure di impedenza con il flusso in movimento, le misure sono poi state ripetute a seguito dello spegnimento della pompa.

In figura 3.12 vengono riportati i valori della variazione del modulo del segnale di impedenza  $\Delta R$  tra il sensore sporco e quello pulito, ottenuti nella prima prova di sporcamento organico; il valore riportato sull'asse x è stato ottenuto eseguendo la misura con la pompa accesa, mentre quello sull'asse y con la pompa spenta nelle stesse condizioni della prima misura.

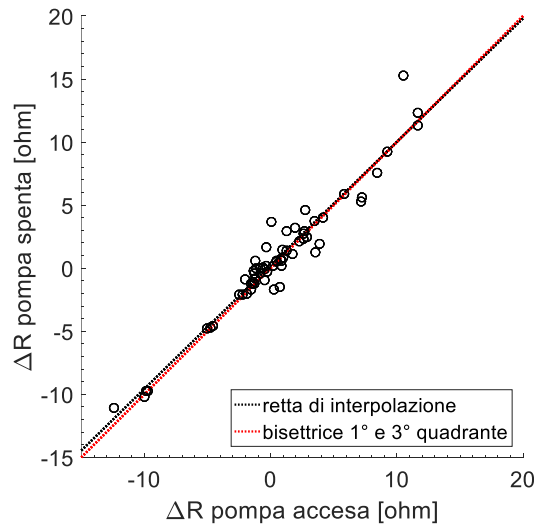


Figura 3.12 – Valori della variazione del modulo del segnale di impedenza  $\Delta R$  misurati nella prima prova di sporcamento organico con la pompa accesa (asse x) e con la pompa spenta (asse y)

Analizzando il grafico in figura 3.12, si può osservare come lo stato di moto del flusso non influenzi la misura del segnale di impedenza; tale verifica è stata effettuata anche per la seconda prova di sporcamento organico: in questo caso è stato riscontrato un allineamento leggermente peggiore con la bisettrice del primo e del terzo quadrante. Tale fenomeno può essere dovuto alla tipologia di misura effettuata dallo strumento: nella prima prova, infatti, è stata utilizzata una scheda elettronica specificatamente sviluppata per il progetto "Dirty Sensing" con lettura in tempo reale tramite il software MATLAB che non misurava un unico valore di  $|Z|$ , bensì la media dei valori ottenuti in un tempo di campionamento di 25 s con un intervallo di 0,5 s; nella seconda prova è stato adoperato uno strumento con caratteristiche metrologiche migliori, ma è stata utilizzata una sola misura puntuale per ogni sensore. Tuttavia, analizzando i dati raccolti in entrambe le prove, il valore medio di differenza tra  $|Z|_{\text{pompa accesa}}$  e  $|Z|_{\text{pompa spenta}}$  è risultato essere prossimo allo 0 (-0,13). I dati, infatti, non mostrano un andamento significativo di sovrastima o sottostima del modulo del segnale di impedenza misurato in stato di moto del flusso rispetto a quello misurato in sua assenza. In generale, da quest'evidenza sperimentale si può affermare che il sensore di sporcamento DS risulti utilizzabile sia in un flusso in movimento sia in assenza di moto, e che la sua risposta non risulti significativamente differente nei due casi.



### 3.3.2 Utilizzo del microscopio laser confocale per la stima dello spessore del biofilm

Una parte dell'attività del presente lavoro di tesi è stata dedicata allo sviluppo di un protocollo affidabile e ripetibile per lo studio dello spessore di biofilm, attraverso l'utilizzo del microscopio laser confocale in luce laser riflessa.

Di seguito vengono illustrati i principali passaggi che hanno permesso il delineamento della procedura descritta nel paragrafo 2.4.2.

Inizialmente le prove di misura sono state eseguite con il campione "asciutto", ovvero appena estratto (da massimo 1 h) dal loop. Tuttavia, anche in un lasso di tempo di esposizione all'aria molto breve, i campioni testati sono stati soggetti ad alterazioni, dovute all'evaporazione del contenuto d'acqua del biofilm. In figura 3.13 viene riportato l'esempio di un'immagine realizzata al microscopio laser confocale tramite una misura "in asciutto": la pellicola di biofilm formatasi risulta "spezzata" in prossimità del canale, a seguito dell'essiccazione del campione.

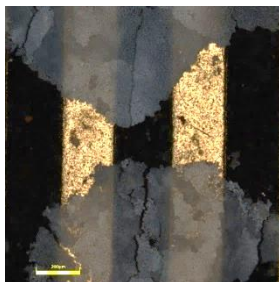


Figura 3.13 – Immagine ottica al microscopio laser confocale di un deposito di biofilm sul sensore di sporcamento DS, esposto all'aria per 1 h

Per tale motivo si è deciso di eseguire le prove con il campione immerso in acqua; tale scelta ha permesso di estrarre più sensori contemporaneamente senza eccessive problematiche dovute alle tempistiche di misura (circa 45 minuti per campione) e di svincolarsi da condizioni operative non controllabili dall'utente, come le perturbazioni nel raggiungere lo strumento (ad esempio, eventuali vibrazioni) o la temperatura esterna dell'aria.

D'altra parte, eseguire le misure in umido ha determinato una variazione del mezzo attraversato dal fascio di luce laser (acqua al posto di aria) e la modifica delle condizioni operative per quanto riguarda due fattori:

- l'acqua smorza l'intensità luminosa del segnale; nel caso in cui lo strumento non rilevi segnale o il segnale sia molto debole, la risposta dello strumento risulta affetta da rumore e artefatta da effetti di picco non controllabili, non corrispondenti a un reale segnale registrato dal microscopio laser confocale. Tale fenomeno determina la necessità di

utilizzare una lente ad ingrandimento 20x, che garantisce un'apertura numerica minore (e quindi un livello di segnale luminoso raccolto maggiore).

Tra le conseguenze di questa modalità di studio, oltre alla difficoltà di analizzare agevolmente ampie sezioni del sensore, vi è l'impossibilità di misurare il biofilm eventualmente formatosi all'interno dei canali dei finger, in quanto l'elevata differenza di riflettività tra i finger e i canali impedisce di identificare una superficie di riferimento (la cui utilità è illustrata successivamente). Le analisi riportate di seguito, dunque, identificano lo spessore di biofilm adeso sopra la superficie sommitale dei finger;

- l'acqua ha un indice di rifrazione  $n$  (pari a 1,33) differente rispetto all'aria ( $n=1$ ); a parità di distanza percorsa dal fascio luminoso, quindi, maggiore è il valore di questo parametro e maggiore risulta il tempo di percorrenza. Dal momento che lo strumento stima lo spessore attraversato dal fascio di luce con l'assunzione che il mezzo abbia un indice di rifrazione pari a 1, è stato necessario moltiplicare i valori di spessore ottenuti per un fattore 1,33.

Per eseguire una misura di spessore, inoltre, è necessario avere una superficie di riferimento. In questo caso è stata utilizzata la parte sommitale dei finger pulita: inizialmente, nella prima prova di sporcamento organico, alcuni sensori sono stati inseriti nel loop con un terzo della propria area protetto da uno strato di parafilm. Tuttavia, oltre ad aumentare significativamente il valore di resistenza iniziale (figura 3.14), tale soluzione comporta il rischio di infiltrazioni e di ristagno d'acqua nelle parti coperte, con la possibilità di un'ulteriore variazione della risposta del segnale, non identificabile con facilità.

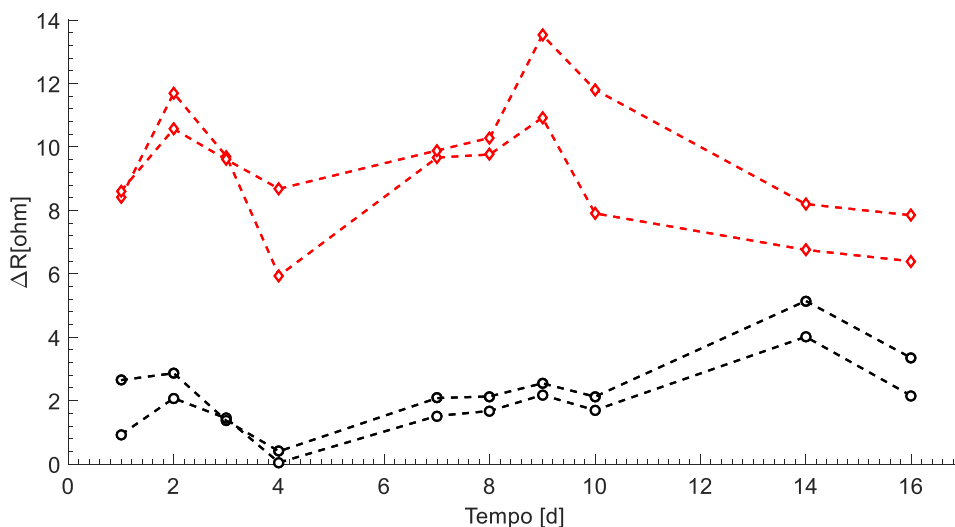


Figura 3.14 - Andamento nel tempo di  $\Delta R$  per quattro sensori durante la prima prova di sporcamento organico; i rombi rossi identificano i sensori protetti con il parafilm, i cerchi neri i sensori utilizzati tal quali

Nella prova successiva, perciò, il riferimento "pulito" del sensore è stato realizzato a posteriori, pulendo due aree del sensore, come descritto nel paragrafo 2.4.2, ed eseguendo una misura di "step" pulito-sporco. In figura 3.15 viene riportata una tipica schermata di lavoro del software

dello strumento, in seguito all'acquisizione di un'immagine. In tutti i campioni analizzati, una correzione solitamente necessaria è quella legata alla non planarità del campione sull'asse x o y (*tilting*). Per fare questo la rielaborazione delle immagini fornita dal software dello strumento permette di modificare questo aspetto imponendo che due o più punti stiano sullo stesso piano (figura 3.16).

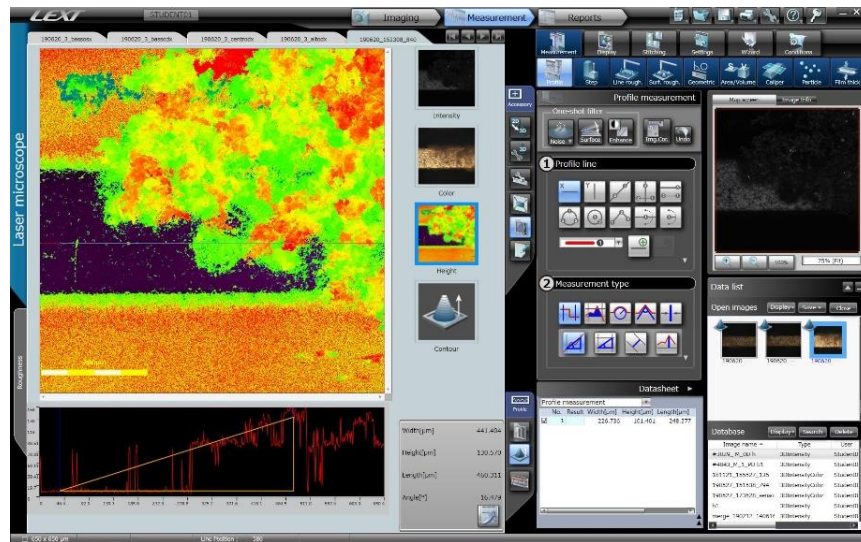


Figura 3.15 - Schermata di lavoro di rielaborazione di un'immagine ottenuta con software del I microscopio laser confocale in luce laser riflessa (misura di step)

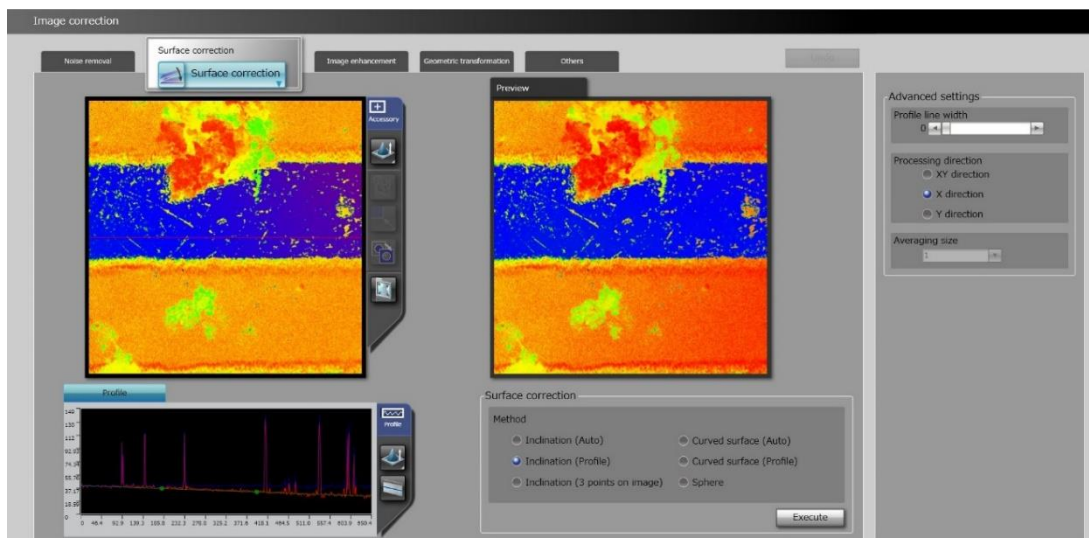


Figura 3.16 - Schermata di lavoro di rielaborazione di un'immagine ottenuta con il microscopio laser confocale (correzione del tilting)

### 3.3.3 Spessori misurati sui sensori di sporcamento DS e sui campioni di PVC

Secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.4.2 e gli accorgimenti riportati nel paragrafo 3.3.2, sono state eseguite misure di spessore sui sensori di sporcamento DS e sui campioni in PVC della seconda prova di sporcamento organico.

I campioni utilizzati nella prima prova non sono stati oggetto di misura sistematica, in quanto sono stati utilizzati per mettere a punto e testare il protocollo individuato. Nella seconda prova, tre sensori (2 nel loop e 1 in batch) su 16 sono stati esclusi dallo studio sia dal punto di vista della stima dello spessore di biofilm formato sia della misura di impedenza, per l'insorgenza di criticità durante le prove (dissaldatura di parte dei connettori).

In tabella 3.9 si riportano i risultati relativi ai campioni oggetto di studio. In particolare, vengono riportate le indicazioni sul tempo di permanenza nel loop (alcuni sensori sono stati estratti durante la prova e non al suo termine per compiere valutazioni intermedie), sulla velocità del flusso a cui sono stati sottoposti, sul tempo di permanenza nel loop e sul valore di spessore medio  $S_{medio}$ , di spessore massimo  $S_{max}$  e di spessore minimo  $S_{min}$  misurati (con la relativa deviazione standard). Per tutti i campioni, ad eccezione di quelli in PVC e di 3 sensori, sono state effettuate le misure in 6 zone nel tentativo di caratterizzare uniformemente la superficie; all'interno di ciascuna sono state estrapolate più misure di spessore. Per i sensori in cui è stata visivamente riconosciuta una sporadicità del biofilm adeso sulla superficie, il numero di misure è risultato inferiore a 10, in quanto non è stata possibile una buona ripetibilità della misura. Per i campioni in PVC, la difficoltà dell'eseguire la misura, dovuta al colore scuro del materiale e alla sua scarsa riflettività, non ha permesso di eseguire un numero di misure sistematico; sono stati quindi identificati 1-2 punti, da cui sono stati estrapolati i dati. Inoltre, due sensori tra quelli visibilmente corrosi (9 e 10) non sono stati studiati al microscopio laser confocale, dal momento che le relative misure non sono state ritenute attendibili.

Analizzando i valori riportati in tabella 3.9, si può notare come vi sia una variabilità non trascurabile nelle misure di spessore; tale fenomeno può essere dovuto, come riportato nel paragrafo 1.2.2 e 1.2.3, alla velocità del flusso e alla diversa diffusione dei nutrienti, ma anche a fenomeni non studiabili a priori, come il *grazing* legato alla presenza di microorganismi parassiti. Per quanto concerne quest'ultimo aspetto, nell'ambito di questo lavoro, sono stati osservati al microscopio laser confocale numerosi microorganismi di alcune decine di  $\mu m$  in prossimità o immersi nel biofilm studiato. È stata condotta una sommaria identificazione delle specie osservate; in particolare, sono stati rilevati sia protozoi (flagellati e ciliati) sia rotiferi (figura 3.17).

Tabella 3.9 – Riepilogo delle misure ottenute per i sensori di sporcamento DS in loop (nero) e in batch (blu) e per i campioni in PVC (verde). I sensori evidenziati in rosso non sono stati oggetti di misurazione

Sensore	Velocità flusso	Tempo permanenza nel flusso	$S_{medio}$	$S_{max}$	$S_{min}$	Deviazione standard	Numero di misure
	[cm s <sup>-1</sup> ]	[settimane]	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]	
1	6	7	117	136	91	20	6
2	6	7	93	175	14	42	16
3	9	4	108	202	64	36	18
4	9	7	177	366	91	74	22
5	12	7	120	272	61	64	13
6	12	7	106	224	59	56	11
7	3	4	54	114	25	38	8
8	3	7	104	204	43	50	9
9	6	7	-	-	-	-	-
10	3	7	-	-	-	-	-
1b	-	4	82	98	51	17	12
2b	-	7	20	37	8	9	9
3b	-	4	16	21	12	4	5
1PVC	6	6	101	104	96	4	3
2PVC	6	3	69	97	37	29	4
3PVC	7	12	71	107	36	29	5



Figura 3.17 – Rilevazione ottica al microscopio laser confocale all'interno del biofilm di un parassita (phylum: rotifero)

Per i sensori sottoposti al flusso, sono stati confrontati gli spessori ottenuti alle diverse condizioni di velocità; i valori puntuali di  $S_{max}$  e  $S_{min}$  misurati, sono stati riportati per esplicitare l'elevata eterogeneità geometrica del biofilm cresciuto. Studiando i valori di  $S_{medio}$ , si può osservare come i valori più bassi corrispondano alle situazioni di velocità minore, ovvero 3 e 6 cm s<sup>-1</sup>. Tale fenomeno risulta in contrasto con quanto riportato in letteratura; con velocità più basse, infatti, il biofilm può crescere più poroso e con un maggior numero di protuberanze (Kwok et al.,1997). Il risultato sperimentale ottenuto può essere dovuto a due fattori: l'eventuale sfaldamento del biofilm, una volta estratto dal loop, e/o una inefficace diffusione dei nutrienti al suo interno. La prima causa sarebbe dovuta alla formazione di un biofilm meno compatto e facilmente alterabile in seguito a condizioni di stress; tale evidenza sperimentale potrebbe essere confermata dagli spessori significativamente minori misurati per tutti i sensori in batch. La seconda motivazione potrebbe

essere avallata solo tramite l'utilizzo di microsensori, i quali permetterebbero di misurare l'effettiva concentrazione dei nutrienti lungo lo spessore del biofilm.

Per i campioni in PVC sono stati riscontrati spessori in linea (campione 1) o minori (campioni 2 e 3) rispetto a quelli misurati per i sensori nelle stesse condizioni di flusso; non è stata effettuata una misura sul quarto campione disponibile a causa di alterazioni del campione durante l'estrazione del loop. Tale evidenza sperimentale in termini di spessore può essere spiegata dalla minore rugosità del materiale plastico rispetto a quella del sensore (dovuta alla sua struttura a canali e ai fenomeni di corrosione riscontrati, come illustrato successivamente); la rugosità superficiale, infatti, favorisce l'attecchimento del biofilm (Verran et al., 1991), soprattutto nei primi mesi di crescita (Chowdhury, 2012). Nonostante il rame (ovvero il materiale costituente lo strato immediatamente sottostante l'oro depositato sui finger dell'elettrodo) abbia un effetto biostatico, probabilmente l'effetto della maggiore rugosità superficiale conseguente alla corrosione è risultato predominante; non sono stati perciò osservati spessori minori di biofilm sui sensori maggiormente corrosi.

### **3.3.4 Risposta in termini del modulo del segnale di impedenza ( $|Z|$ ) del sensore di sporcamento DS alla formazione di biofilm**

Durante le due prove di sporcamento organico, sono stati monitorati i valori di variazione di impedenza rispetto al sensore pulito, alla frequenza di 100 kHz, con cadenza almeno bisettimanale. In entrambe le prove, per tutti i sensori, è stata osservata un'oscillazione dei valori di variazione di impedenza attorno al valore iniziale, diversamente da quanto atteso in relazione alle evidenze sperimentali riportate in letteratura. Turolla et al. (2019) riportano, infatti, una riduzione di  $|Z|$  in campo resistivo in seguito alla crescita di biofilm su un sensore interdigitato. La riduzione è giustificata dalla presenza di EPS che, grazie alla sua composizione, è caratterizzata da un'elevata conducibilità, nell'ordine di  $10^{-3} - 10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$  (Borole et al., 2011) e da una concentrazione crescente di ioni scambiati per metabolismo batterico (Silley e Forsythe, 1996) che determina una diminuzione della resistività elettrica del mezzo (Yang et al., 2003). Come in figura 3.2 per un deposito di tipo inorganico, in figura 3.18 viene schematizzato il campo elettrico in assenza e in presenza di un deposito biologico.



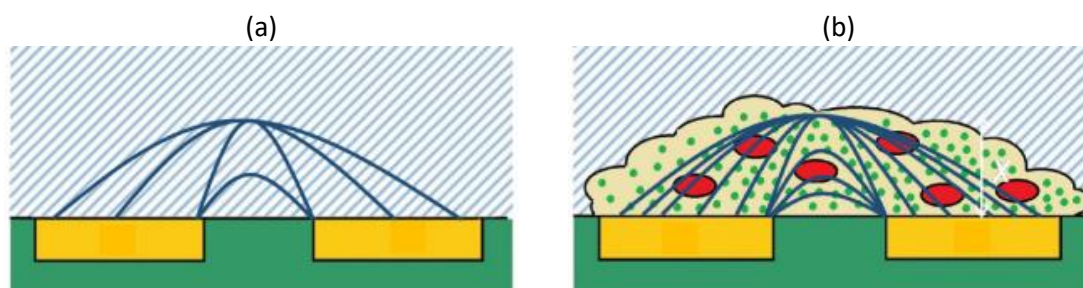


Figura 3.18 - Rappresentazione schematica del campo elettrico (linee blu) nel caso di (a) sensore pulito (b) sensore con deposito biologico, incluse le cellule batteriche (in rosso) e i composti ionici prodotti dal metabolismo batterico (in verde) (Turolla et al., 2019)

Al termine della prima prova, è stato ipotizzato che il fenomeno di corrosione potesse “mascherare” il contributo del segnale negativo dovuto alla crescita di biofilm batterico adesivo. Per verificare tale ipotesi, si è deciso di studiare nella prova successiva lo spettro tra 20 Hz e 20 MHz e di pianificare un’attività sperimentale volta ad analizzare il solo effetto della corrosione sui sensori (paragrafo 3.4). È stata esclusa, invece, la mancata crescita di biofilm sulla superficie in quanto l’effettiva adesione di uno strato di biofilm sulle tubature è stata verificata smontando e analizzando alcune tubazioni del loop (figura 3.19).



Figura 3.19 - Foto dell’interno di una tubazione del loop al termine della prima prova di sporcamento

Nella seconda prova sono stati inseriti nei loop 6 dei sensori già utilizzati nella prima prova (e quindi lievemente corrosi) e 6 nuovi. In figura 3.20 è riportato l’andamento della variazione di impedenza  $\Delta R$  calcolata rispetto al valore di  $|Z|$  al tempo  $t=0$  per i 12 sensori studiati; nel tempo è stato osservato un andamento simile dei valori di  $\Delta R$  (a 100 kHz) a quello della prima prova. Tuttavia, nelle ultime misure, si può notare come per tre sensori (di cui 2 già utilizzati e 1 nuovo) sia stato osservato un aumento di  $\Delta R$  insolito; al termine della prova è risultato che questi sensori avessero risentito di fenomeni di biocorrosione e di alterazione superficiale ad un livello tale da alterare il valore di  $|Z|$  in campo resistivo. Tale fenomeno è stato poi verificato tramite i risultati delle prove di corrosione riportati nel paragrafo 3.4.

A seguito di tali evidenze sperimentali, si prevede di progettare sensori di sporcamento che risultino protetti nella parte sommitale da una maschera polimerica o da un sottile strato di passivazione in biossido di titanio, in modo tale da garantire prestazioni dei sensori inalterate nel tempo.

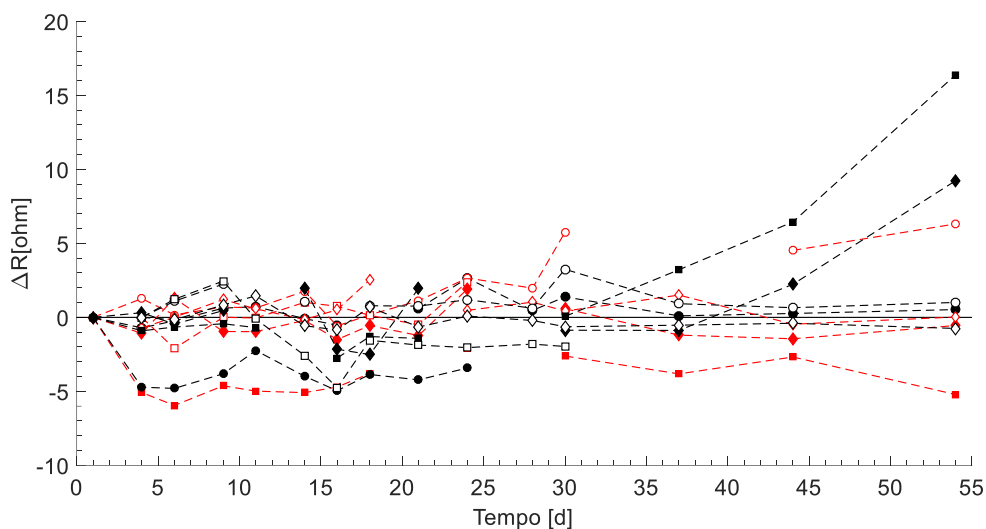


Figura 3.20 - Andamento nel tempo della variazione di impedenza dei 12 sensori del loop rispetto al tempo  $t=0$  (seconda prova di sporcamento di tipo organico)

Durante la prova sono stati studiati i valori di  $|Z|$  anche a frequenze diverse da 100 kHz; ad eccezione dei sensori già indicati, non sono però stati osservati cambiamenti significativi negli spettri (figura 3.21), a meno di un graduale abbassamento di  $|Z|$  che si considera essere l'effetto di un fenomeno di corrosione in stato meno avanzato (come illustrato nel paragrafo 3.4).

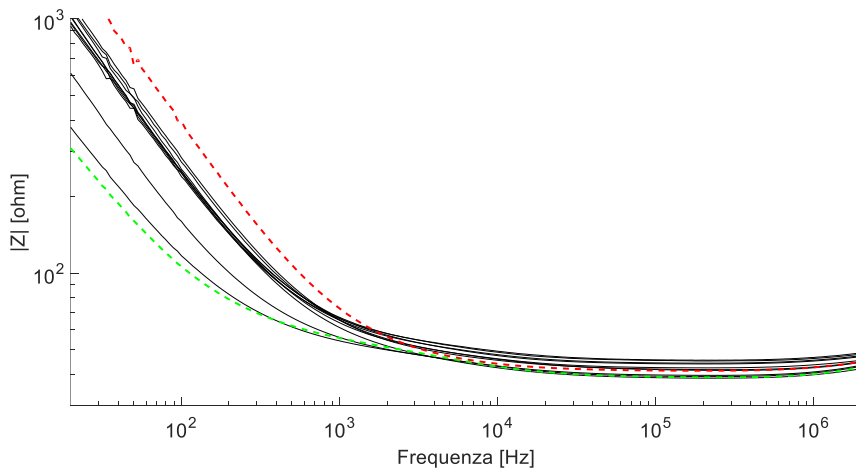


Figura 3.21 – Andamento nel tempo degli spettri di  $|Z|$  nell'intervallo 2 Hz e 20 MHz; la linea rossa tratteggiata corrisponde allo spettro misurato al tempo  $t=0$  d, la linea verde tratteggiata al tempo  $t=54$  d

Infine, si è verificato se le non idealità del flusso (eventuali zone morte, bolle d'aria, turbolenze) potessero influenzare la misura, impedendo di registrare il fenomeno di diminuzione del valore di impedenza. Prima di estrarre i sensori dal loop è stata quindi effettuata una misura di impedenza in flusso e poi subito dopo in batch, a conducibilità pari a  $750 \mu\text{S cm}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ . A differenza delle misure effettuate successivamente con i sensori puliti, non è stata utilizzata una terza



soluzione a conducibilità minore ( $500 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) per evitare di sottoporre il biofilm a un eccessivo stress osmotico derivante da condizioni ambientali molto diverse dal quelle del loop, in cui la conducibilità del flusso è sempre risultata superiore a  $1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

In tabella 3.10 si riportano i valori di variazione di impedenza  $\Delta R$  tra sensore sporco e pulito ottenuti nell'ultima misura in flusso ( $\Delta R_{\text{loop}}$ ), la media dei valori di variazione di impedenza ottenuti in batch nelle due soluzioni ( $\Delta R_{\text{medio,batch}}$ ) e la rispettiva differenza. Si può notare come le misure eseguite nel loop non si discostino significativamente dal quelle in batch; è stata ritenuta non rilevante una differenza inferiore o pari a  $\pm 2$  ohm, considerato il valore soglia superato il quale si riconosce una variazione significativa del valore di impedenza misurato a seguito delle precedenti esperienze del gruppo di ricerca. In tre casi si è verificato uno scostamento significativo nella misura; in particolare per il sensore 4 e 11 è stato ipotizzato che, al momento della misura, l'operazione di degasaggio non fosse stata effettuata in maniera ottimale, mentre la risposta del sensore 10, il quale è stato soggetto a significative alterazioni della risposta in termini di impedenza dovute a fenomeni corrosivi, non è stata considerata totalmente attendibile.

Tabella 3.10 - Valori di variazione di impedenza  $|Z|$  misurati prima dell'estrazione dei campioni ( $\Delta R_{\text{loop}}$ ) e una volta estratti ( $\Delta R_{\text{medio,batch}}$ ) e relativa differenza. In rosso sono evidenziati i casi di discostamento delle misure pari a più di 2 ohm

Sensore	$\Delta R_{\text{loop}}$	$\Delta R_{\text{medio,batch}}$	$\Delta R_{\text{loop}} - \Delta R_{\text{medio,batch}}$
	[ohm]		
1	1,24	0,15	1,09
2	6,63	6,06	0,57
3	0,40	-3,27	<b>3,67</b>
4	0,96	2,93	-1,97
5	11,31	12,75	-1,44
6	1,31	-0,07	1,38
7	2,92	-0,69	<b>3,69</b>
8	0,42	1,70	-1,28
9	-1,11	-1,67	0,56
10	18,8	16,09	<b>2,71</b>

Per verificare l'efficacia del sensore nel rilevare la presenza di un deposito organico, sono stati confrontati i valori di variazione di impedenza tra il sensore sporco e quello pulito a inizio prova ( $\Delta R_{\text{sporco}}$ ) e tra il sensore pulito a fine e inizio prova ( $\Delta R_{\text{pulito}}$ ). Tali valori sono calcolati utilizzando come riferimento la retta di calibrazione tra il valore di resistenza ideale ( $R_{b,\text{ideale}}$ ) e quello reale ( $R_{b,\text{reale}}$ ) realizzata per il sensore pulito a inizio prova, come illustrato nel paragrafo 2.4.1. Per verificare che le rette di calibrazione calcolate a inizio prova rispecchiassero la risposta reale dei sensori anche al termine della prova, è stata determinata nuovamente la retta di calibrazione per tutti i sensori. Non sono risultate variazioni significative della risposta dei sensori, ad eccezione di quelle dei tre sensori soggetti a significative alterazioni dovute a fenomeni di biocorrosione localizzati. Per questi tre sensori, le rette di calibrazione al termine della prova hanno mostrato una

variazione significativa in termini di intercetta, come si può osservare in figura 3.22. Per questo motivo, nelle analisi successive, i valori di  $\Delta R$  a fine prova per questi 3 sensori sono stati studiati utilizzando le nuove rette di calibrazione.

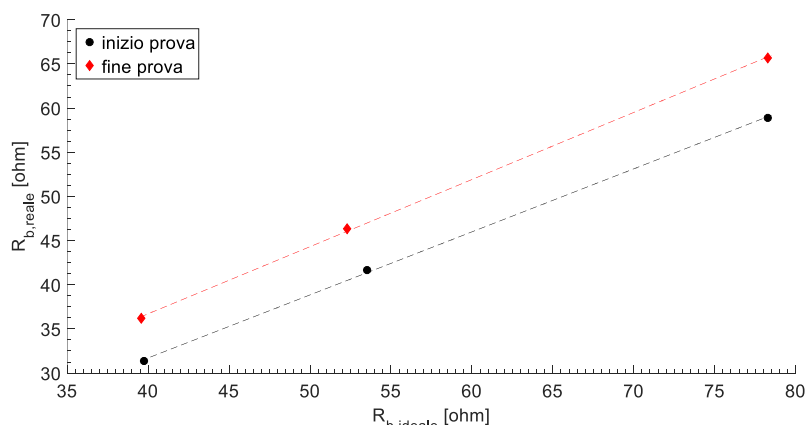


Figura 3.22 – Rette di calibrazione  $R_{b,ideale}$  e  $R_{b,reale}$  (a 25°C) per un sensore soggetto a fenomeni di corrosione a inizio (colore nero) e a fine (colore rosso) prova

In tabella 3.11 si riportano i valori di  $\Delta R_{sporco}$  e  $\Delta R_{pulito}$  per i sensori di sporcamento analizzati e la relativa misura di spessore medio; in entrambi i casi è stato utilizzato il valore medio delle misure effettuate in batch (2 nel caso di sensore sporco e 3 nel caso di sensore pulito). Per i sensori in cui è stata utilizzata una nuova retta di calibrazione, il valore di  $\Delta R_{pulito}$  è prossimo allo zero, in quanto le misure effettuate sono le stesse utilizzate per costruire la retta.

Tabella 3.11 – Valori di variazione di impedenza  $\Delta R$  per il sensore sporco e pulito, relativa differenza e spessore medio stimato tramite microscopio laser confocale

Sensore	$\Delta R_{sporco}$	$\Delta R_{pulito}$	$\Delta R_{sporco} - \Delta R_{pulito}$	$S_{medio}$
	[ohm]			[ $\mu m$ ]
1	0,15	-0,08	0,22	117
2	-1,67	-2	0,33	93
3	-3,27	0,37	-3,63	108
4	2,93	0,98	1,95	177
5	-1,94	0,06	-2	120
6	-0,07	-0,69	0,62	106
7	-0,69	-0,42	-0,27	54
8	1,70	0,43	1,27	104
9	0,75	-0,04	0,28	-
10	-0,65	-0,10	-0,55	-
1b	-2,21	1,10	-3,31	101
2b	2,58	2,72	-0,14	69
3b	-0,65	-0,40	-0,25	71

Analizzando i valori di spessore e la relativa variazione di impedenza a 100 kHz, si può notare come ad un aumento dello spessore di biofilm non corrisponda una diminuzione del valore di impedenza e talvolta il valore  $\Delta R_{sporco} - \Delta R_{pulito}$  risulti addirittura positivo. Inoltre, tranne in due casi, i valori

ottenuti rientrano nell'intervallo  $\pm 2$  ohm. Da questa prova, quindi, la misura effettuata dai sensori di sporramento DS sembra scorrelata dallo spessore di biofilm adeso alla superficie. Tale evidenza sperimentale deve essere indagata in studi futuri; i risultati ottenuti si discostano, infatti, da quelli riportati da Turolla et al. (2019). Tra i possibili fattori che potrebbero avere determinato questo comportamento dei sensori di sporramento DS, vi potrebbe essere la significativa eterogeneità del biofilm dal punto di vista geometrico e chimico (paragrafo 1.2.2). Sui sensori, infatti, è stata osservata una copertura non omogenea, che potrebbe essere risultata non sufficiente ad influenzare il segnale di impedenza; inoltre, le prove sperimentali condotte da Turolla et. al (2019) hanno utilizzato come soluzione di partenza una miscela aerata caratterizzata da una concentrazione di SST 100 volte maggiore. Tale differenza di condizioni e di provenienza della biomassa batterica costituente la soluzione potrebbe aver determinato lo sviluppo di un biofilm con caratteristiche diverse, ovvero più poroso e/o contraddistinto da una minore concentrazione di ioni nell'EPS, proprietà fondamentali nel determinare la tipologia di deposito organico e la relativa influenza sulla risposta del sensore.

## 3.4 Prove di corrosione sui sensori di sporramento DS

Durante le attività sperimentali relative a questo lavoro di tesi e, in particolare, a valle di fenomeni di biocorrosione in forma localizzata (*pitting*) e diffusa verificatisi durante la prima prova di simulazione di deposito organico (paragrafo 3.1), si è manifestata la necessità di analizzare la risposta del sensore di sporramento DS nel caso di un suo possibile deterioramento.

In primo luogo, si è verificato se vi fosse un'alterazione significativa nel segnale di impedenza nell'intervallo tra 20 Hz e 2 MHz e, in particolare, alla frequenza di 100 kHz; in secondo luogo, sono stati identificati i parametri da monitorare per rilevare la corrosione del sensore di sporramento DS. Quest'ultimo studio costituisce, quindi, il primo passaggio verso lo sviluppo di un protocollo alternativo per monitorare il fenomeno di biocorrosione dei materiali metallici, spesso utilizzati per la realizzazione di tubature e serbatoi.

Per analizzare in maniera completa la risposta in termini di impedenza del sensore, è stato utilizzato un multimetro LCR Agilent E4980A, le cui caratteristiche sono descritte brevemente nel paragrafo 2.4.1. Tale strumento ha permesso di studiare in dettaglio lo spettro di frequenza tra 20 Hz (regione capacitiva) e 2 MHz (regione resistiva), valutando gli eventuali discostamenti dal comportamento ideale del circuito equivalente del sensore (figura 2.1).

Per quanto concerne la prima prova di sporramento organico, in cui è stato osservato un fenomeno di corrosione dei sensori (figura 3.23), non è stato possibile confrontare l'andamento del segnale di impedenza in termini di modulo  $|Z|$  e fase  $\phi$  prima e dopo la prova: inizialmente, infatti, i sensori sono stati calibrati e studiati solo in termini del modulo  $|Z|$  alla frequenza di 100 kHz. Inoltre, per eseguire tali misure, è stato utilizzato uno strumento differente (paragrafo 2.4.1), realizzato appositamente per lavorare con il sensore di sporramento DS. Queste differenze, perciò, non hanno permesso un confronto diretto tra le condizioni iniziali e quelle deteriorate di ciascun sensore.

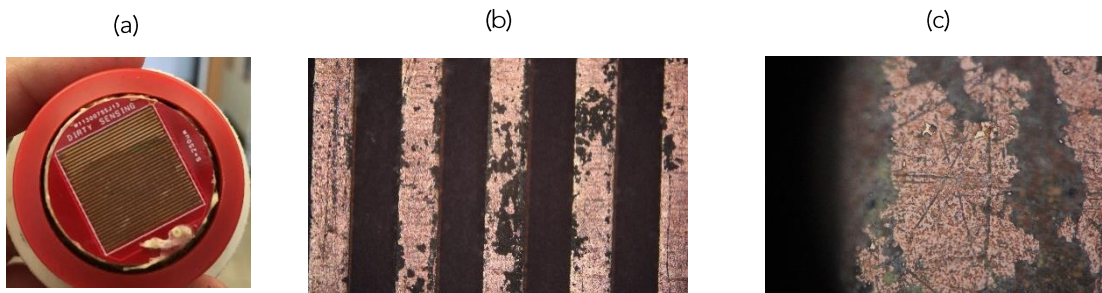


Figura 3.23 - (a) immagini di un sensore sottoposto alle condizioni di flusso e crescita di biofilm batterico per 30 giorni; la parte più chiara corrisponde a una zona schermata tramite pellicola per impedire l'attecchimento di biofilm; (b),(c) dettaglio di fenomeni di corrosione dei finger, analizzati al microscopio Olympus BX51M

Nonostante ciò, analizzando gli spettri dei sensori deteriorati e ponendoli a confronto con spettri di sensori nuovi (figura 3.24), sono stati osservati qualitativamente i seguenti aspetti:

- per bassi valori di frequenza, nonostante non si possano confrontare in termini di valore assoluto spettri di sensori diversi e considerata l'elevata variabilità dei valori nella regione capacitiva, i sensori nuovi presentano valori assoluti di impedenza anche 4-5 volte maggiori dei sensori corrosi;
- le pendenze degli spettri (tra 20 e 200-2000 Hz) di alcuni sensori deteriorati risultano inferiori a quelle dei sensori nuovi;
- in campo resistivo, e in particolare a 100 kHz, il modulo dell'impedenza non sembra risentire del fenomeno di biocorrosione.

In seguito a tali osservazioni, si è deciso di proseguire le prove sperimentali di sporramento biologico non più studiando una singola frequenza, ma l'intervallo di frequenza 20 Hz – 20 MHz; inoltre, sono state eseguite prove in batch *ad hoc* con l'obiettivo di simulare il fenomeno corrosivo sulla superficie del sensore di sporramento DS.

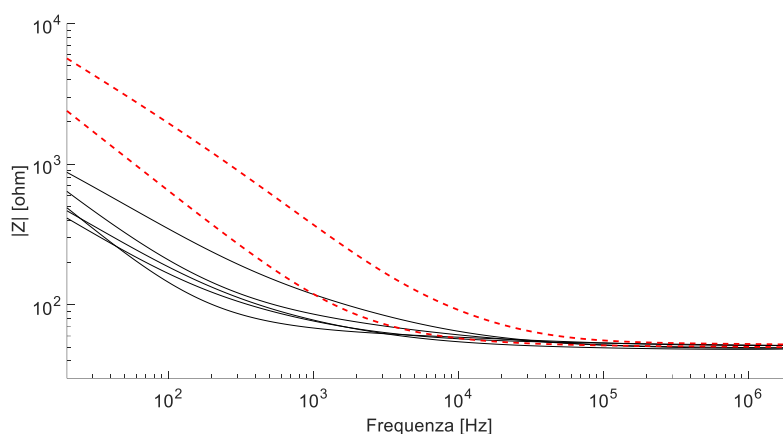


Figura 3.24 – Rappresentazione in scala bi-logaritmica degli spettri del modulo  $|Z|$  di sensori di sporramento DS nuovi (linee di colore nero) e deteriorati (linee di colore rosso) tra 20 Hz e 20 MHz

Per effettuare prove facilmente riproducibili e compatibili con le tempistiche richieste da questo lavoro di tesi, non è stato simulato il fenomeno corrosivo causato da processi di origine biologica, ma si è operato riproducendo processi di natura prettamente chimica; i sensori analizzati, infatti, sono stati sottoposti a condizioni fortemente ossidanti tramite l'utilizzo di ipoclorito di sodio, secondo il setup descritto nel paragrafo 2.2. In figura 3.25 sono riportate le foto che mostrano il graduale deterioramento di uno dei sei sensori sottoposti alla prova di corrosione.

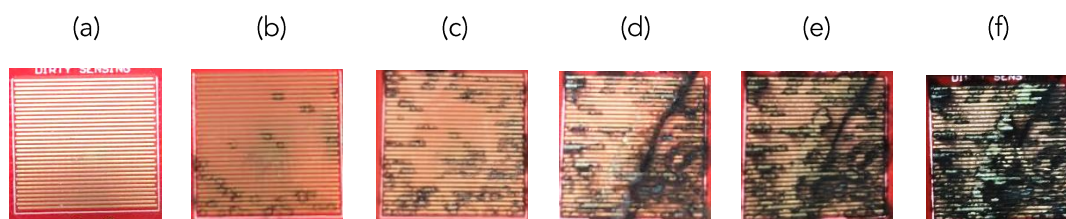


Figura 3.25 - Immagini delle condizioni di un sensore durante una prova di corrosione al tempo  $t =$  (a) 0, (b) 15 min, (c) 1 h, (d) 2 h, (e) 4 h, (f) 6 h

Le misure impedenziometriche hanno permesso di studiare l'andamento del modulo  $|Z|$  e della fase  $\phi$ , in funzione del valore di frequenza  $f$ . In figura 3.27 si riportano, a titolo di esempio, alcune serie di dati del modulo  $|Z|$  e della fase  $\phi$  nell'intervallo 20 Hz – 20 MHz, rispettivamente in scala bi-logaritmica e semi-logaritmica, ottenute durante lo svolgimento di una prova di corrosione.

Come si può notare analizzando le serie temporali di figura 3.26, emergono considerazioni differenti da quelle illustrate precedentemente dallo studio del grafico in figura 3.25:

- per bassi valori di frequenza ( $< 100$  Hz), durante le prime 4 h della prova, i sensori di sporramento DS hanno mostrato valori del modulo  $|Z|$  stabili o gradualmente decrescenti.

Viceversa, nelle due misure successive (a 5 e 6 h), il valore del modulo  $|Z|$  aumenta, raggiungendo o avvicinandosi ai valori al tempo  $t=0$ ;

- le pendenze degli spettri (tra 20 e 200-2000 Hz) diminuiscono significativamente durante il corso della prova;
- in campo resistivo e, in particolare, a 100 kHz, il valore di  $|Z|$  inizia a risentire del fenomeno di corrosione dopo qualche ora (4 h) dall'inizio della prova, fino a un aumento del contributo resistivo di 20-30 ohm.

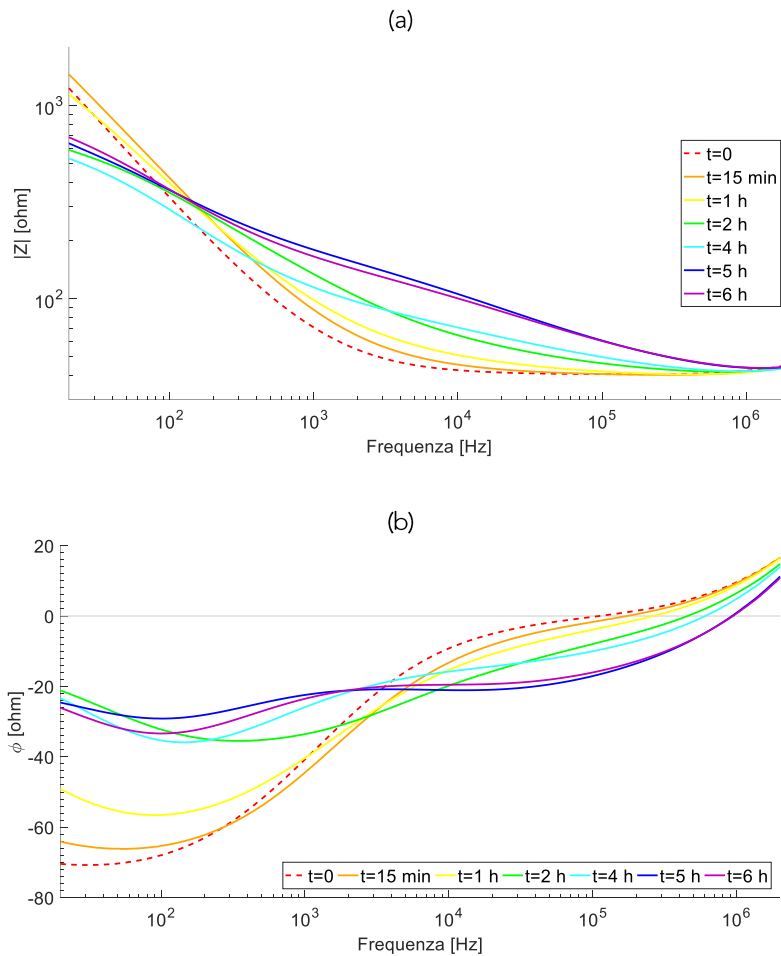


Figura 3.26 – Grafici degli andamenti dell'impedenza in termini di (a) modulo  $|Z|$  (b) fase  $\phi$  al variare della frequenza, durante lo svolgimento di una prova di corrosione di un sensore di sporcamento DS (conducibilità  $750 \mu S cm^{-1}$ )

Tali osservazioni sono state riscontrate per tutti i 6 sensori studiati; per semplicità, non si è tenuto conto dell'effetto della temperatura, data la limitata variabilità di tale parametro tra una misura e l'altra (circa  $\pm 1$  °C).

Per quanto riguarda il valore del modulo  $|Z|$  alle basse frequenze, idealmente legato al contributo capacitivo e costituente il secondo termine della formula 3.1 riportata nel paragrafo 3.1, questo idealmente dovrebbe seguire un andamento pari all'inverso del valore

della frequenza; tuttavia, molte prove sperimentali riportate in letteratura dimostrano come il comportamento all'interfaccia elettrodo/soluzione sia spesso lontano dal comportamento ideale (Carminati et al., 2013). Gli spettri misurati sperimentalmente, infatti, risultano spesso descritti meglio dai cosiddetti elementi a fase costante (*constant-phase elements, CPE*), caratterizzati da un valore di impedenza pseudo-capacitivo di tipo  $\frac{1}{(2\pi \cdot i \cdot f \cdot Q)^n}$ , dove  $f$  è la frequenza,  $i$  è l'unità immaginaria,  $Q$  è la pseudo-capacità del sistema e  $n$  è un parametro il valore è minore dell'unità (Carminati et al., 2013). I parametri  $Q$  e  $n$  dipendono dall'ordine frattale della superficie e dalla sua rugosità: maggiore è la rugosità superficiale, maggiore è l'area a contatto all'interfaccia con la soluzione e perciò maggiore è il contributo capacitivo. Tale fenomeno determina una diminuzione della pendenza dello spettro a basse frequenze, identificabile nel termine  $-n$  tramite la trasformazione della relazione 3.1 in forma logaritmica, tenendo conto delle non idealità appena illustrate e trascurando il contributo resistivo  $R_s+R_d$ :

$$\log(|Z|) = -n \cdot \log(2\pi \cdot i \cdot f \cdot Q) \quad (3.3)$$

Durante le prove di corrosione, come si può osservare in figura 3.25, il sensore è stato soggetto a significative alterazioni superficiali, localizzate e disuniformi, che hanno determinato un incremento della rugosità superficiale e quindi una diminuzione del valore di pendenza  $-n$  (da qui in poi identificato con la sola lettera  $n$ ). Tale fenomeno è stato riscontrato per tutti i sensori sottoposti alla prova di corrosione; in figura 3.27 si riportano i valori medi delle pendenze dei sensori, con le relative deviazioni standard, ottenuti alle conducibilità di 500, 750 e 1000  $\mu\text{s cm}^{-1}$ .

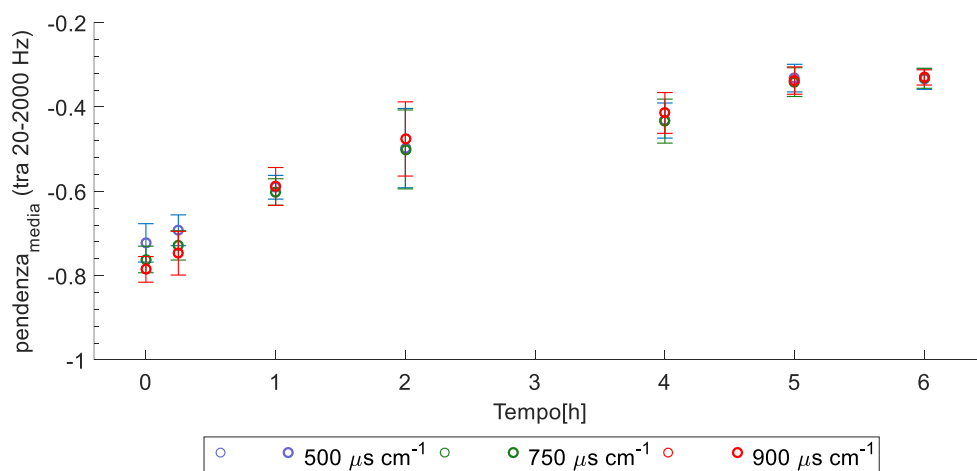


Figura 3.27 - Andamento medio nel tempo dei valori di pendenza calcolati tra 20 Hz e 2000 Hz dei sensori di sporcamento DS durante la prova di corrosione, al variare della conducibilità della soluzione in cui sono stati immersi i sensori per eseguire la misura

In tabella 3.12 sono inoltre riportati i valori medi di pendenza iniziali e finali per le misure effettuate alle tre diverse conducibilità, le relative deviazioni standard e la variazione percentuale media del parametro  $n$  tra inizio e fine prova.

Tabella 3.12 – Valori di pendenza media con relativa deviazione standard (a 500, 750 e 1000  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) a inizio e fine della prova di corrosione

Conducibilità		500 $\mu\text{S cm}^{-1}$	750 $\mu\text{S cm}^{-1}$	1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$
$n_{\text{medio, iniziale}}$	pendenza	-0,722	-0,761	-0,785
	dev.std.	0,046	0,035	0,052
$n_{\text{medio, finale}}$	pendenza	-0,334	-0,332	-0,330
	dev.std.	-0,024	0,024	0,018
Variazione media %		53,8	56,4	58

Per quanto riguarda la fase  $\phi$ , come rappresentato in figura 3.1, il comportamento ideale per il circuito equivalente considerato ha un andamento a sigmoide, che parte da un valore pari a  $90^\circ$  nella zona capacitiva e tende a  $0^\circ$  nella zona resistiva. Tuttavia, come riportato da Carminati et al. (2013), il valore reale che assume la fase all'inizio dello spettro è inferiore, ovvero pari a circa  $-90^\circ \cdot n$ . Tale osservazione rispecchia gli andamenti nel tempo riscontrati sperimentalmente nelle prove di corrosione (figura 3.26 (b)); in particolare, durante la prova di corrosione, il valore a 20 Hz della fase si discosta gradualmente dall'idealità e l'andamento a sigmoide risulta sempre più appiattito.

Inoltre, nel caso di processo di corrosione in stato avanzato, la variazione dell'andamento del segnale di impedenza in termini del modulo  $|Z|$  potrebbe essere dovuta alla comparsa nel circuito equivalente di un contributo resistivo parallelo, che aumenta di decine di ohm il valore del modulo dell'impedenza nel campo resistivo, ma ne incrementa anche il valore in campo capacitivo (come si può osservare per le ultime ore di sperimentazione in figura 3.26 (a)).

Tali osservazioni hanno avuto un riscontro sperimentale nella seconda prova di sporcamento biologico. Durante tale prova, infatti, diversi sensori sono stati soggetti a fenomeni di biocorrosione; in particolare, 3 sensori di sporcamento DS (il numero 8,9 e 10) hanno mostrato, oltre a un leggero deterioramento diffuso del sensore, fenomeni di corrosione localizzati (*pitting*) in stato avanzato (figura 3.28). I sensori 8 e 10 erano già stati utilizzati nella prima prova di sporcamento organico con un terzo dell'area protetto da parafilm ed erano stati soggetti ad un probabile fenomeno di infiltrazione e ristagno dell'acqua durante la prova; il sensore 2 invece non era mai stato utilizzato. Questa volta, oltre a un'analisi di tipo visivo, si è potuto effettuare uno studio della risposta impedenziometrica del sensore di sporcamento DS.





Figura 3.28 – Sensori di sporcamento DS al termine della seconda prova di sporcamento organico: (a) 8, (b) 9, (c) 10

A titolo di esempio, vengono riportate alcune serie di dati (figura 3.29) del segnale di impedenza (modulo  $|Z|$  e fase  $\phi$ ) per uno dei tre sensori in cui è stato rilevato il fenomeno. Studiando lo spettro del modulo  $|Z|$ , si può riscontrare come la pendenza caratterizzante le basse frequenze diminuisca con l'aumentare nel tempo (da  $-0,828$  al tempo 0 a  $-0,661$  al tempo  $t= 54$  d con una variazione percentuale pari al 20%). Inoltre, seppur in maniera meno netta rispetto ai sensori sottoposti alle prove di corrosione, nel tempo si verifica un discostamento significativo del valore della fase dal comportamento ideale ed è stato rilevato un aumento del contributo resistivo ad alte frequenze, che ha perciò alterato la rilevazione dello sporcamento biologico, come spiegato nel paragrafo 3.3.4.

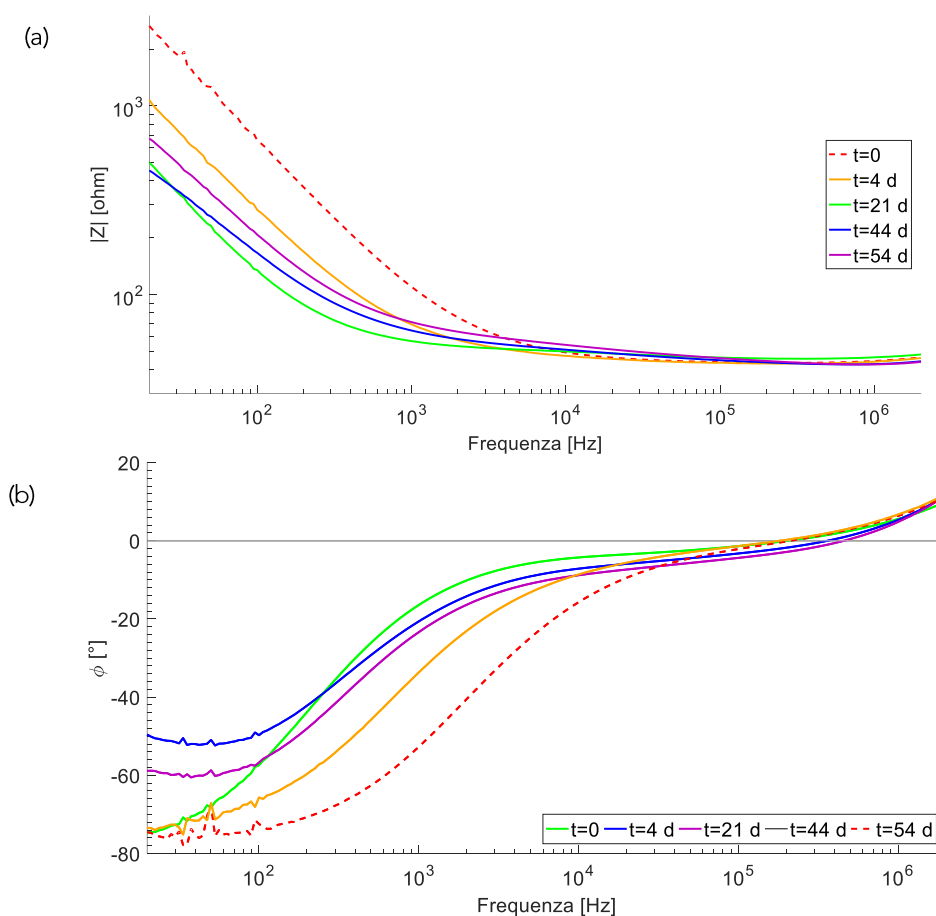


Figura 3.29 - Spettri dei valori di impedenza in termini di (a) modulo  $|Z|$  e (b) fase  $\phi$ , durante lo svolgimento della seconda prova di sporcamento biologico, di uno dei tre sensori di sporcamento DS (9) visibilmente deteriorato da fenomeni di biocorrosione

È stato inoltre verificato che l'alterazione dell'andamento della fase nei tre sensori biocorrosivi non ha riguardato tutti i sensori. In figura 3.30 si riporta un grafico con gli andamenti delle fasi dei 12 sensori del loop sottoposti alla seconda prova di sporcamento organico al 54° giorno di prova. In tale grafico, si può osservare una differenza, sia da un punto di vista qualitativo sia da uno quantitativo, tra i valori assunti dai sensori visibilmente soggetti a fenomeni significativi di biocorrosione e quelli dei restanti sensori. Infatti, queste appaiono distinguersi sia per il valore iniziale della fase (che risulta maggiore), sia, in due casi, per l'andamento lungo la parte restante dello spettro.

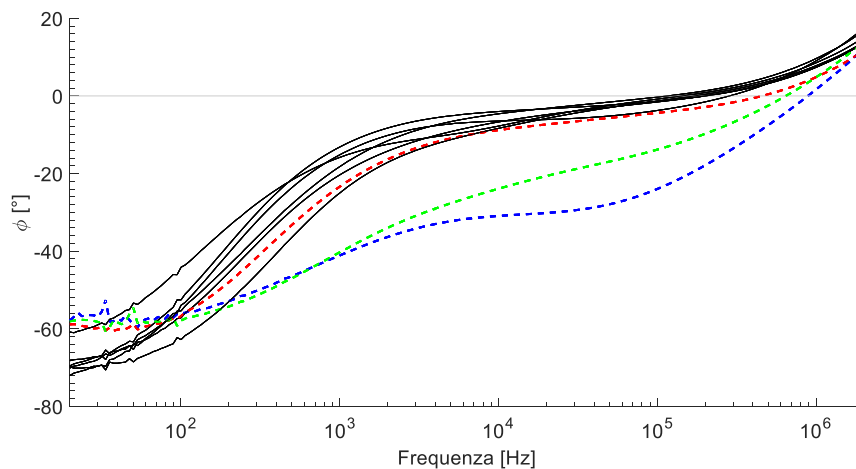


Figura 3.30 – Andamento della fase  $\phi$  al variare della frequenza di sensori di sporcamento DS a  $t= 54$  d dall'inizio della seconda prova di simulazione di formazione di deposito organico; con le linee tratteggiate sono indicati i 3 sensori in cui è stato rilevato la presenza di deterioramento dovuto a significativi fenomeni corrosivi localizzati (colore blu: DS 8, rosso: DS 9, verde: DS 10)

Date le evidenze sperimentali riportate, si ipotizza che il fenomeno abbia riguardato i sensori di sporcamento DS soggetti a difetti di fabbricazione o sottoposti precedentemente a condizioni particolari (come i sensori 8 e 10). Tuttavia, per tutti i sensori sono state rilevate alterazioni sulla superficie dell'elettrodo: non si esclude, quindi, la possibilità che anche altri sensori avrebbero potuto mostrare un comportamento simile, se la prova fosse stata prolungata nel tempo. Ad esempio, in figura 3.30, si può osservare come uno degli spettri presenti un valore della fase prossimo a quello dei tre sensori considerati.

In conclusione, si può affermare che i sensori di sporcamento DS sono in grado di rilevare la presenza di fenomeni corrosivi localizzati dei metalli che lo costituiscono (principalmente il rame, in quanto è probabile che il sottile strato d'oro superficiale venga rimosso per distacco dovuto alla formazione di processi corrosivi negli strati sottostanti, a causa delle porosità e delle imperfezioni del materiale). I processi di biocorrosione hanno tempi molto lunghi ed effetti più difficilmente rilevabili rispetto a processi di corrosione più aggressivi; tuttavia, tramite lo studio dell'andamento del segnale di impedenza, possono essere identificate eventuali anomalie del

sensore. In particolare, si ritengono potenzialmente critici casi in cui si verificano (i) variazioni di pendenza nel tempo superiori al 20% alle basse frequenze, (ii) valori della fase maggiori di  $-60^\circ$  per frequenze prossime agli 0 Hz e (iii) aumenti inaspettati del modulo del segnale di impedenza in campo resistivo.



# 4

## CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il presente lavoro si inserisce all'interno di un progetto di ricerca che ha previsto l'ideazione e lo sviluppo del sensore di sporramento "Dirty Sensing".

Nel corso delle prove su depositi di tipo inorganico, le prove in batch hanno permesso di individuare una retta di calibrazione tra spessore depositato e misura impedenziometrica; in particolare, maggiore è la quantità di deposito calcareo depositato e maggiore è risultato il valore di variazione di impedenza  $\Delta R$  tra il sensore "sporco" e il sensore pulito. Tuttavia, per le proprietà del sensore in sé, la sensibilità dei sensori di sporramento DS decresce all'aumentare dello spessore depositato; al di sopra di spessori pari a 220  $\mu\text{m}$  (per i sensori da 5 mils) e 300  $\mu\text{m}$  (per i sensori da 10 mils) il sensore non è in grado di rilevare un eventuale aumento di sporramento inorganico sulla sua superficie. La retta di calibrazione individuata risulta valida anche per i sensori sottoposti a un flusso con una pressione nelle condutture trascurabile e nelle condizioni indagate sperimentalmente. Possibili sviluppi futuri riguardano lo studio della risposta del sensore in condutture a pressioni di non trascurabili e in altre condizioni di flusso e la realizzazione di un modello predittivo che permetta, conoscendo il valore di  $\Delta R$ , di stimare il valore di spessore calcareo depositato.

Per le prove in cui è stato simulato un deposito di tipo organico, è stato implementato un sistema in flusso di crescita di biofilm, in cui è stato possibile stabilire le condizioni di misura, grazie all'utilizzo di un circuito secondario. A seguito di queste prove, sono stati riscontrati fenomeni di biocorrosione sulla superficie dei sensori; sono quindi state eseguite prove di corrosione *ad hoc* per studiare il fenomeno. Contrariamente agli studi precedenti, in cui è stato rilevato un andamento di  $\Delta R$  al variare dello spessore di biofilm opposto rispetto a quello riscontrato nel caso di fouling inorganico, nell'ambito di questo lavoro non è stata rilevata una correlazione evidente tra spessore di biofilm e misura impedenziometrica. Tra le possibili motivazioni vi può essere la significativa eterogeneità del biofilm sviluppatosi; si rimanda a studi futuri un'analisi dettagliata del fenomeno. Per misurare lo spessore di biofilm, inoltre, è stato definito un protocollo che prevede l'analisi del campione in umido tramite l'utilizzo di un microscopio laser confocale in luce laser riflessa.

Le prove di corrosione effettuate hanno confermato la sensibilità del sensore, in termini del modulo  $|Z|$  e della fase  $\phi$ , all'alterazione delle proprie caratteristiche superficiali. Il sensore di sporcamento DS risulta quindi adatto all'identificazione di fenomeni di corrosione localizzati lungo le condutture metalliche.

Il presente lavoro pone le basi per lo studio di una versione migliorata del sensore di sporcamento DS; in particolare, è già oggetto di studio la possibilità di salvaguardare da fenomeni corrosivi la parte sommitale del sensore, tramite la deposizione di una maschera polimerica o di un sottile strato di biossido di titanio. Si propone, per i prossimi studi, di testare la nuova versione del sensore di sporcamento DS eseguendo nuove prove in relazione ai depositi di tipo inorganico e soprattutto organico, nell'ottica di acquisire una conoscenza completa della risposta del sensore ai diversi tipi di fenomeno e di renderne l'utilizzo affidabile per il monitoraggio online in scala reale.

## BIBLIOGRAFIA

- Abe, Y., Skali-Lami, S., Block, J. C., & Francius, G. (2012). Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Research*, 46(4), 1155–1166.
- Al-Rawajfeh, A. E., & Al-Shamaileh, E. M. (2007). Assessment of tap water resources quality and its potential of scale formation and corrosivity in Tafila Province, South Jordan. *Desalination*, 206(1–3), 322–332.
- Albert, M., Hijnen, W., Van Vossen, J., & Blokker, M. (2017). Modelling Bacterial Biomass in a Non-chlorinated Drinking Water Distribution System. *Procedia Engineering*, 186(0), 127–134.
- Balzar, S. (2017). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1–13.
- Beech, I. B., & Sunner, J. (2004). Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 181–186.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A. K., Hochedlinger, G., Hödl, I., ... Battin, T. J. (2007). Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 4966–4974.
- Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2002). Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnology Progress*, 18(1), 55–61.
- Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H. J., Arvin, E., & Jørgensen, C. (2002). Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. *Water Research*, 36(18), 4477–4486.
- Böl, M., Ehret, A. E., Bolea Albero, A., Hellriegel, J., & Krull, R. (2013). Recent advances in mechanical characterisation of biofilm and their significance for material modelling. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(2), 145–171.
- Boltz, J. P., Morgenroth, E., & Sen, D. (2010). Mathematical modelling of biofilms and biofilm reactors for engineering design. *Water Science and Technology*, 62(8), 1821–1836.
- Bonomo, L., Masotti, L., & Verlicchi, P. (2008). Trattamenti delle acque reflue. In *Symposium on Integrated Water Resources Management* (Vol. 26, p. 28).
- Borole, A. P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z. W., Feng, Y., & Kim, B. H. (2011). Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy and Environmental Science*, 4(12), 4813–4834.
- Bos, R., Mei, H. C. Van Der, & Busscher, H. J. (2017). Physico-chemistry initial microbial adhesive interactions- mechanisms and methods. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 179–230.
- Boulêtreau, S., Charcosset, J. Y., Gamby, J., Lyautey, E., Mastrotillo, S., Azémar, F., ... Garabetian, F. (2011). Rotating disk electrodes to assess river biofilm thickness and elasticity. *Water Research*, 45(3), 1347–1357.
- Bucheli-Witschel, M., Kötzsch, S., Darr, S., Widler, R., & Egli, T. (2012). A new method to assess the influence of migration from polymeric materials on the biostability of drinking water. *Water Research*, 46(13), 4246–4260.
- Busscher, H. J., Bos, R., & Van der Mei, H. C. (1995). Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS microbiology letters*, 128(3), 229-234.

- Carminati, M., Caviglia, C., Heiskanen, A., Vergani, M., Ferrari, G., Sampietro, M., ... Emnéus, J. (2013). Theoretical and experimental comparison of microelectrode sensing configurations for impedimetric cell monitoring. *Lecture Notes on Impedance Spectroscopy: Volume 4*, (January 2014), 75–82.
- Chang, H. T., & Rittmann, B. E. (1991). Biofilm Detachment Mechanisms in a Liquid-Fluidized Bed. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 499–506.
- Chaves Simões, L., & Simões, M. (2013). Biofilms in drinking water: Problems and solutions. *RSC Advances*, 3(8), 2520–2533.
- Chen, M. J., Zhang, Z., & Bott, T. R. (2005). Effects of operating conditions on the adhesive strength of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in tubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43(2), 61–71.
- Chowdhury, S. (2012). Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system: A review. *Environmental Monitoring and Assessment* (Vol. 184).
- Citrini, D., & Nosedà, G. (2009). *Idraulica*. Casa Ed. Ambrosiana.
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 237–245.
- Costerton, J. (1987). Bacterial Biofilms In Nature And Disease. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 435–464.
- Cowle, M. W., Babatunde, A. O., Rauen, W. B., Bockelmann-Evans, B. N., Barton, A. F. (2014a). Biofilm development in water distribution and drainage systems: dynamics and implications for hydraulic efficiency. *Environmental Technology Reviews*, 3(1), 31–47.
- Cowle, M. W., Babatunde, A. O., Rauen, W. B., Bockelmann-Evans, B. N., e Barton, A. F. (2014b). Biofilm development in water distribution and drainage systems: dynamics and implications for hydraulic efficiency. *Environmental Technology Reviews*, 3(1), 31–47.
- D'Acunto, B., Frunzo, L., & Mattei, M. R. (2017). Continuum approach to mathematical modelling of multispecies biofilms. *Ricerche Di Matematica*, 66(1), 153–169.
- Dalas, E. . K. P. (1990). Calcium Carbonate Scale Formation and Prevention in a Flow-Through System at Various Temperatures, 78, 403–416.
- de Romero, M. F., Urdaneta, S., Barrientos, M., & Romero, G. (2004). Correlation between *Desulfovibrio sessile* growth and OCP, Hydrogen Permeation, Corrosion Products and Morphological attack on iron. *Corrosion/2004*, paper, 4576, 1-27
- Donlan, R M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1387–1392.
- Donlan, Rodney M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.*, 8(9), 881–890.
- Dufrène, Y. F. (2004). Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature Reviews Microbiology*, 2(6), 451.
- Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M. M., Dopp, E., Flemming, H. C., & Wingender, J. (2011). Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 485–492.



- Flemming, H. C., Percival, S. L., & Walker, J. T. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Science and Technology: Water Supply*, 2(1), 271–280.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water science and technology*, 43(6), 1-8.
- Förster, M., Augustin, W., & Bohnet, M. (1999). Influence of the adhesion force crystal/heat exchanger surface on fouling mitigation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 38(4–6), 449–461.
- Furst, A. L., & Francis, M. B. (2019). Impedance-Based Detection of Bacteria. *Chemical Reviews*, 119(1), 700–726.
- Halan, B., Buehler, K., & Schmid, A. (2012). Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in Biotechnology*, 30(9), 453–465.
- Hasson, D., Avriel, M., Resnick, W., Rozenman, T., & Windreich, S. (1968). Mechanism of calcium carbonate scale deposition on heat-transfer surfaces. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, 7(1), 59-65.
- Hoang, T. A., Ang, M., & Rohl, A. L. (2011). Effects of Process Parameters on Gypsum Scale Formation in Pipes. *Chemical Engineering and Technology*, 34(6), 1003–1009.
- Hoang, T. A. (2015). Mechanisms of scale formation and inhibition. In *Mineral Scales and Deposits* (pp. 47-83). Elsevier.
- Hoang, Tung A., Ang, H. M., & Rohl, A. L. (2007). Effects of temperature on the scaling of calcium sulphate in pipes. *Powder Technology*, 179(1–2), 31–37.
- Horn, H., & Hempel, D. C. (1995). Mass transfer coefficients for an autotrophic and a heterotrophic biofilm system. *Water Science and Technology*, 32(8), 199-204.
- Igreja, R., & Dias, C. J. (2004). Analytical evaluation of the interdigital electrodes capacitance for a multi-layered structure. *Sensors and Actuators A: Physical*, 112(2-3), 291-301.
- Ivleva, N. P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R., & Haisch, C. (2009). Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 197–206.
- Iwona, B., Alian, B., Alfonso, M., Hansiria, F., Vittiria, S., & Wolfgang, S. (2000). Microbially Influenced Corrosion of Industrial Materials. *Biocorrosion Network 00-02*.
- Kjelleberg, S., Marshall, K. C., & Hermansson, M. (1985). Oligotrophic and copiotrophic marine bacteria-observations related to attachment. *FEMS Microbiology Letters*, 31(2), 89–96.
- Körstgens, V., Flemming, H. C., Wingender, J., & Borchard, W. (2001). Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 46(1), 9–17.
- Kühl, M. (2005). Optical microsensors for analysis of microbial communities. *Methods in Enzymology*, 397(1984), 166–199.
- Kwok, W. K.; Picioreanu, S.; Ong, S. (1997). Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(4), 400–407.
- Lazarova, V., & Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29(10), 2227–2245.

- Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Araki, T., Zhang, X., West, M. M., & Hitchcock, A. P. (2003). Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(9), 5543-5554.
- Liengen, T.; Féron, D.; Basséguy, R.; Beech, B. (2014). *Understanding Biocorrosion. Understanding Biocorrosion*. Woodhead Publishing in Materials.
- Liu, Y., & Tay, J. H. (2001). Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 111–117.
- Macadam, J., & Parsons, S. A. (2004). Calcium carbonate scale control, effect of material and inhibitors. *Water Science and Technology*, 49(2), 153–159.
- Makris, K. C., Andra, S. S., & Botsaris, G. (2014). Pipe scales and biofilms in drinking-water distribution systems: Undermining finished water quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(13), 1477–1523.
- Maryna, P. (2016). *Ultra-low pressure ultrafiltration for decentralized drinking water treatment*. ETH Zurich Research Collection.
- Mattei, M. R., Frunzo, L., D'Acunto, B., Pechaud, Y., Pirozzi, F., & Esposito, G. (2018). Continuum and discrete approach in modeling biofilm development and structure: a review. *Journal of Mathematical Biology*, 76(4), 945–1003.
- Mirzabeygi, M., Najji, M., Yousefi, N., Shams, M., Biglari, H., & Mahvi, A. H. (2016). Evaluation of corrosion and scaling tendency indices in water distribution system: a case study of Torbat Heydariye, Iran. *Desalination and Water Treatment*, 57(54), 25918–25926.
- Mizaikoff, B., Lorite, G. S., Cotta, M. A., de Souza, A. A., Kranz, C., & Rodrigues, C. M. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), 289–295.
- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73–87.
- Moreira, J. M. R., Simões, M., Melo, L. F., & Mergulhão, F. J. (2015). The combined effects of shear stress and mass transfer on the balance between biofilm and suspended cell dynamics. *Desalination and Water Treatment*, 53(12), 3348–3354.
- Mosley, L. M. (2015). Drought impacts on the water quality of freshwater systems; review and integration. *Earth-Science Reviews*, 140, 203–214.
- Müller-Steinhagen, H., & Zhao, Q. (1997). Investigation of low fouling surface alloys made by ion implantation technology. *Chemical Engineering Science*, 52(19), 3321–3332.
- Muscariello, L., Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Cafiero, G., & Barbarisi, A. (2005). A critical overview of ESEM applications in the biological field. *Journal of cellular physiology*, 205(3), 328-334.
- Najibi, S. H., Muller-Steinhagen, H., & Jamialahmadi, M. (1997). Calcium carbonate scale formation during subcooled flow boiling. *Journal of heat Transfer*, 119(4), 767-775.
- Ng, J. D., Lorber, B., Witz, J., Théobald-Dietrich, A., Kern, D., & Giegé, R. (1996). The crystallization of biological macromolecules from precipitates: Evidence for Ostwald ripening. *Journal of Crystal Growth*, 168(1–4), 50–62.
- Chemicals, D. O. F. O. (2005). *OECD Guideline for testing of chemicals*. The Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, France, 1-13.

- Oliveira, D. R. (1992). Physico-chemical aspects of adhesion. In *Biofilms—Science and Technology* (pp. 45-58). Springer, Dordrecht.
- Palmer, R. J., Haagensen, J. A., Neu, T. R., & Sternberg, C. (2006). Confocal microscopy of biofilms—spatiotemporal approaches. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (pp. 870-888). Springer, Boston, MA.
- Paramonova, E., De Jong, E. D., Krom, B. P., Van Der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Sharma, P. K. (2007). Low-load compression testing: A novel way of measuring biofilm thickness. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 7023–7028.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2012). Sticky situations: Key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, 194(10), 2413–2425.
- Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M. C., & Heijnen, J. J. (2000, October). Modelling and predicting biofilm structure. In *Symposia-Society for General Microbiology* (pp. 129-166). Cambridge; Cambridge University Press; 1999.
- Plummer, L. N., & Busenberg, E. (1982). The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O solutions between 0 and 90 C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O. *Geochimica et cosmochimica acta*, 46(6), 1011-1040.
- Priester, J. H., Horst, A. M., Van De Werfhorst, L. C., Saleta, J. L., Mertes, L. A., & Holden, P. A. (2007). Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 577-587.
- Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, (2002). Approvazione ed ufficializzazione dei Metodi di analisi microbiologica del suolo. (Decreto n. 010175).
- Prest, E. I., Hammes, F., van Loosdrecht, M. C. M., & Vrouwenvelder, J. S. (2016). Biological stability of drinking water: Controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–24.
- Priester, J. H., Horst, A. M., Van De Werfhorst, L. C., Saleta, J. L., Mertes, L. A. K., & Holden, P. A. (2007). Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 577–587.
- Radha, A. V., Forbes, T. Z., Killian, C. E., Gilbert, P. U. P. A., & Navrotsky, A. (2010). Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16438–16443.
- Revsbech, N. P. (2005). Analysis of microbial communities with electrochemical microsensors and microscale biosensors. *Methods in Enzymology*, 397(2003), 147–166.
- Richards, C. S., Wang, F., Becker, W. C., & Edwards, M. A. (2018). A 21st-Century Perspective on Calcium Carbonate Formation in Potable Water Systems. *Environmental Engineering Science*, 35(3), 143-158.
- Ridgway, H. F., & Olson, B. H. (1981). Scanning Electron Microscope Evidence for Bacterial Colonization of a Drinking-Water Distribution System, 41(1), 274–287.
- Rodriguez-Blanco, J. D., Shaw, S., & Benning, L. G. (2011). The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, via vaterite. *Nanoscale*, 3(1), 265–271.
- Rogers, J., Dowsety, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., & Keevil, C. W. (1994). Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems, 60(6), 1842–1851.
- Sawada, K. (1997). The mechanisms of crystallization and transformation of calcium carbonates. *Pure and Applied Chemistry*, 69(5), 921-928.

- Semiat, R., Sutzkover, I., & Hasson, D. (2003). Scaling of RO membranes from silica supersaturated solutions. *Desalination*, 157(1–3), 169–191.
- Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 882–894.
- Silley, P., & Forsythe, S. (1996). Impedance microbiology — a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(3), 233–243.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. D., & Lappin-Scott, H. M. (1998). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology*, 85(S1), 19S–28S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05279.x>
- Stoodley, Paul, Boyle, J. D., Dodds, I., & Lappin-scott, H. M. (1997). Consensus Model Of Biofilm Structure.
- Teodósio, J. S., Simões, M., Melo, L. F., & Mergulhão, F. J. (2011). Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling*, 27(1), 1–11.
- Tribollet, B. (2003). Electrochemical sensors for biofilm and biocorrosion. *Materials and Corrosion*, 54(7), 527–534.
- Troup, D. H., & Richardson, J. A. (1978). The Link Between the Corrosion and calcium carbonate scaling susceptibilities of heat transfer surfaces. *Materials and Corrosion*, 29(5), 312–320.
- Turolla, A., Di Mauro, M., Mezzera, L., Antonelli, M., & Carminati, M. (2019). Development of a Miniaturized and Selective Impedance Sensor for Real-Time Slime Monitoring in Pipes and Tanks. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 281(October 2018), 288–295.
- Van der Kooij, D., van der Wielen, P. W., Rosso, D., Shaw, A., Borchardt, D., Ibsch, R., ... & Mavinic, D. (Eds.). (2013). *Microbial growth in drinking water supplies*. Iwa Publishing.
- Van Gerwen, P., Laureyn, W., Laureys, W., Huyberechts, G., De Beeck, M. O., Baert, K., ... & Mertens, R. (1998). Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 49(1-2), 73–80.
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54(1), 75–87.
- van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. B. (1989). Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microbial Ecology*, 17(1), 1–15.
- Varaprasad, B. J. S., & Viswanadh, G. K. (2012). a Study on Scale Formation in Water Distribution Systems. *International Journal of Water Resources and Environmental Management*, 3(1), 129–136.
- Verran, J., Lees, G., & Shakespeare, A. P. (1991). The effect of surface roughness on the adhesion of *Candida albicans* to acrylic. *Biofouling*, 3(3), 183–191.
- Videla, A.; Herrera, L. K. (2005). Microbiologically influenced corrosion: looking to the future, 169–180.
- Videla, H. (2018). *Manual of biocorrosion*. Routledge.
- Vigeant, M. a.-S., Vigeant, M. a.-S., Ford, R. M., Ford, R. M., Wagner, M., Wagner, M., ... Tamm, L. K. (2002). Reversible and irreversible adhesion of motile. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2794–2801.

- Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C., & Horn, H. (2010). Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(5), 844–853.
- Walker, J. T., Hanson, K., Caldwell, D., & Keevil, C. W. (1998). Scanning confocal laser microscopy study of biofilm induced corrosion on copper plumbing tubes. *Biofouling*, 12(4), 333–344.
- Wang H., Masters S., E. M. (2014). Effect of Disinfectant, Water Age, and Pipe Materials on Bacterial and Eukaryotic Community Structure in Drinking Water Biofilm. *Tetrahedron*, 70(45), 8648–8656.
- Wang, Y. (2005). Scaling in Polymer Tubes and Interpretation for Use in Solar, 127, 3–14.
- Wäsche, S., Horn, H., & Hempel, D. C. (2002). Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Research*, 36(19), 4775–4784.
- Watkinson, A. P., & Martinez, O. (2010). Scaling of Heat Exchanger Tubes by Calcium Carbonate. *Journal of Heat Transfer*, 97(4), 504.
- Wingender, J., Thomas, N., & Flemming, H. C. (1980). What are Bacterial EPS? *Kango Kenkyu. The Japanese Journal of Nursing Research*, 13(2), 156–163.
- Woldringh, C. L., De Jong, M. A., van den Berg, W., & Koppes, L. (1977). Morphological analysis of the division cycle of two *Escherichia coli* substrains during slow growth. *Journal of Bacteriology*, 131(1), 270–279.
- Wolf, S. E., Leiterer, J., Kappl, M., Emmerling, F., & Tremel, W. (2008). Early homogenous amorphous precursor stages of calcium carbonate and subsequent crystal growth in levitated droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 130(37), 12342–12347.
- Yang, L., & Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, 26(2), 135–150.
- Yang, L., Ruan, C., & Li, Y. (2003). Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(5), 495–502. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00229-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00229-X)
- Yang, Q., Liu, Y., Gu, A., Ding, J., & Shen, Z. (2002). Investigation of induction period and morphology of CaCO<sub>3</sub> fouling on heated surface. *Chemical Engineering Science*, 57(6), 921–931.
- Yu, H., Sheikholeslami, R., & Doherty, W. O. S. (2002). Composite fouling characteristics of calcium oxalate monohydrate and amorphous silica by a novel approach simulating successive effects of a sugar mill evaporator. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 41(14), 3379–3388.
- Yuan, S. J., & Pehkonen, S. O. (2009). AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas NCIMB 2021* and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater. *Corrosion Science*, 51(6), 1372-1385.
- Zarga, Y., Ben Boubaker, H., Ghaffour, N., & Elfil, H. (2013). Study of calcium carbonate and sulfate co-precipitation. *Chemical Engineering Science*, 96, 33–41.
- Zhang, X., Bishop, P. L., & Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology*, 37(4–5), 345–348.



# APPENDICE 1

In questa Appendice si riporta il codice utilizzato per calcolare il termine corrispondente al termine di resistenza ideale alla frequenza di 100 kHz, a una temperatura T pari a 25°C e a una determinata conducibilità  $\sigma$  ( $R_{ideale,25^{\circ}C,\sigma}$ ). Tale valore è dipendente dalle caratteristiche geometriche del sensore. Le relazioni del modello derivano da quelle riportate da Igreia e Daias (2004).

```
function R = R_coplanari_infinitelayer(cond,W,G,L,N)

% ----- L. Mezzera - 22/07/2011 -----
% Parametri:
% cond = conducibilità del mezzo [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]
% W = larghezza dei finger [ $\mu\text{m}$ ]
% G = spaziatura fra i finger [ $\mu\text{m}$ ]
% L = lunghezza dei finger [ $\mu\text{m}$ ]
% N = numero totale dei finger
% Restituisce la resistenza [Ohm] e la capacità di double layer [F]
% Richiede le funzioni allegate theta() e jacobithetaeta()
% -----

W1 = W*1e-6;
G1 = G*1e-6;
L1 = L*1e-6;

eta = W1 / (W1+G1);

% Termini legati agli elettrodi interni -----

kI = sin(pi/2*eta);
kpI = sqrt(1-kI^2);
CCI = ellipke(kI^2)/ellipke(kpI^2);
% -----

% Termini esterni -----

kE = (2*sqrt(eta))/(1+eta);
kpE = sqrt(1 - kE^2);
CCE = ellipke(kE^2)/ellipke(kpE^2);
% -----

CCTOT = (N-3)*CCI/2 + 2*CCI*CCE/(CCI+CCE);

cond1=cond*1e-4;
rho = 1/cond1;

R = (rho/(L1*CCTOT))
CDL = 0.1*1*W1*L1*N/4
```

