

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
INGEGNERIA ELETTRONICA

**Rilevazione di batteriofagi del  
Lactococcus Lactis in campioni di latte  
mediante biosensori elettrochimici**

*Relatore:*

PROF. ALESSANDRO PACCAGNELLA

*Laureanda:*

SARA POGGI

1238696

*Correlatore:*

DOTT. STEFANO BONALDO

Anno Accademico 2021/2022



## Abstract

La rilevazione di agenti patogeni all'interno dei prodotti alimentari riveste un ruolo di notevole importanza per le industrie agroalimentari. La presenza di entità dannose può portare a rilevanti sprechi di prodotti ed inquinamento, oltre a perdite economiche. Questo progetto di tesi è dedicato ai batteriofagi del *Lactococcus Lactis*, patogeni che hanno un forte impatto sull'industria lattiero-casearia. Il *Lactococcus Lactis* appartiene alla categoria dei Batteri dell'Acido Lattico (LAB), responsabili del processo di fermentazione del lattosio, necessario per la produzione di formaggi, latticello, yogurt, etc. e di migliorare i tempi di conservazione dei prodotti. La presenza di batteriofagi causa l'interruzione della fermentazione, e quindi rallentamenti nel processo di produzione oltre ad un peggioramento della qualità del prodotto. È quindi importante per le industrie monitorare costantemente ed efficacemente la produzione in modo tale da riuscire ad identificare, isolare e sanificare i lotti contaminati, così che l'infezioni non si diffonda.

Le tecniche al momento utilizzate hanno un'alta sensibilità ed efficacia, ma richiedono lunghi tempi di risposta ed hanno alti costi. Lo scopo di questo lavoro di tesi è la caratterizzazione di un biosensore elettrochimico per rilevare la presenza di batteriofagi del *Lactococcus Lactis* in modo rapido ed economico; in particolar modo si è focalizzata l'attenzione sul rilevare la presenza di questi fagi in campioni contenenti del latte, variando il protocollo di trattamento del campione, per fornire una metodologia di analisi dei campioni il più semplice possibile.

Per analizzare la presenza di fagi nel campione si è utilizzata la tecnica di *Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica* (EIS), che ha permesso di osservare il comportamento sulla superficie del sensore. In simultanea sono state eseguite delle misure di assorbanza per monitorare la crescita batterica e verificarne la coerenza con i dati misurati elettrochimicamente.

Nella prima parte della tesi sono riportate le misure che hanno permesso di trovare il protocollo di trattamento ottimale per osservare la crescita batterica e la loro inibizione a causa della presenza di fagi, mentre nella seconda parte ci si è avvicinati ad un caso reale e, tramite l'adozione di un protocollo semplificato, si è dimostrato che l'utilizzo dei biosensori può rendere le rilevazioni più rapide, abbattendo i costi.

Questo progetto è stato svolto in collaborazione con ARC – Centro Ricerche Applicate, Padova.



# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1 Lactococcus Lactics e batteriofagi nelle industrie lattiero-casearie</b>	<b>3</b>
<b>2 Biosensori e misure elettrochimiche</b>	<b>11</b>
2.1 Modello dell'interfaccia elettrodo-soluzione [1]	13
2.1.1 Modello di Helmholtz: "Double layer"	15
2.1.2 Modello di Gouy-Chapman: "Diffusive double layer"	15
2.1.3 Modello di Stern: "Double layer and Diffusive double layer"	16
2.1.4 Modello di Grahame: "Double layer, Diffuse double layer and adsorption"	16
2.1.5 Modello BDM	17
2.2 Metodi di misura elettrochimica [1]	17
2.2.1 Voltammetria	18
2.2.1.1 Ciclovoltammetria	18
2.2.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica	20
2.2.2.1 Circuiti elettrici equivalenti	21
<b>3 Materiali, strumenti e protocolli biologici</b>	<b>25</b>
3.1 Materiali	25
3.1.1 M17	25
3.1.2 Ferri/Ferrocianuro [2]	26
3.1.3 Cloruro di Calcio [3]	27
3.2 Strumenti	27
3.2.1 DRP-C223AT	27
3.2.2 Set-up sperimentale: cella, connettore e potenziostato	28
3.2.3 Spettrofotometro	29
3.2.4 Software	30
3.2.4.1 PSTrace	30

---

3.2.4.2	Matlab . . . . .	30
3.2.4.3	EISSA . . . . .	30
3.3	Protocolli biologici . . . . .	31
3.3.1	Terreno di coltura M17 . . . . .	31
3.3.2	Crescita di colonie batteriche . . . . .	32
3.3.3	Titolazione fagi . . . . .	33
<b>4</b>	<b>Risultati degli esperimenti</b>	<b>35</b>
4.1	Campioni nel caso ideale . . . . .	37
4.2	Campioni con latte . . . . .	42
4.2.1	Latte purificato . . . . .	42
4.2.1.1	Diverse concentrazioni di fagi . . . . .	47
4.2.1.2	Produzione di nuovi fagi . . . . .	50
4.2.2	Diluzione dei fagi nel latte . . . . .	53
4.2.2.1	Batteri con solo latte purificato . . . . .	53
4.2.2.2	Confronto diluizioni di fagi PRE e POST purifi- cazione del latte . . . . .	55
4.3	Campioni con latte e $CaCl_2$ . . . . .	68
4.3.1	Diverse concentrazioni di fagi . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>77</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>79</b>

# Introduzione

I batteriofagi del *Lactococcus Lactis*, infettando i batteri del latte e impedendo così il processo di fermentazione, rappresentano un problema di forte impatto nelle industrie agroalimentari lattiero-casearie; infatti, questi fagi sono causa di grandi perdite economiche nel processo di produzione di alimenti fermentati.

Per questo motivo è importante monitorare costantemente ogni step del processo di produzione in modo da localizzare tempestivamente la presenza di fagi, isolare il lotto e sanificarlo, in modo tale che l'infezione non si diffonda.

I metodi di rilevamento correnti, basati su test biologici, richiedono analisi in laboratorio, personale specializzato, strumentazione costosa e hanno dei tempi di risposta lunghi. Nell'ultima decade, lo sviluppo di biosensori elettrochimici si sta facendo sempre più spazio tra le tecniche di rilevamento di batteri e fagi nelle industrie agroalimentari, offrendo una prestazione più rapida, efficiente ed economica.

Questa tesi mira a caratterizzare un biosensore elettrochimico, *DropSens* DRP-C223AT, e a testare un nuovo protocollo di trattamento e di misura per la rilevazione di batteriofagi del *Lactococcus Lactis* in campioni contenuti del latte. Il rilevamento della presenza di batteri e fagi si basa su variazioni dei parametri elettrici del sensore, valutate tramite misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica.

In questo lavoro si evidenzia la possibilità di ottenere una tecnica di rilevamento economica, rapida e con un protocollo di facile applicazione.

Nel primo capitolo sono esplorati i motivi che hanno portato a sviluppare un sensore elettrochimico per la rilevazione di patogeni, con un breve excursus sulle caratteristiche dei batteri del *Lactococcus Lactis* e i suoi fagi. Si è focalizzata l'attenzione sugli aspetti positivi e negativi delle tecniche di rilevamento attuali, poste a confronto con quelle più innovative dei sensori elettrochimici, dimostrando che questi ultimi risultano la soluzione più ottimale.

Nel secondo capitolo vengono descritti i principi base su cui si basano i sensori

elettrochimici, come la definizione dell'interfaccia e il concetto di cella elettrochimica, e le tecniche di misura elettrochimiche utilizzate durante il lavoro di tesi.

Il terzo capitolo tratta il setup strumentale, i prodotti chimici usati e i protocolli utilizzati per effettuare le analisi e le misure.

Nel quarto capitolo sono descritti i risultati dei vari test effettuati sui campioni. Per prima cosa si è analizzata la risposta di campioni di latte purificato in presenza di batteri e di diverse concentrazioni di fagi. Successivamente, si è modificato il protocollo di trattamento del latte, valutando quale fosse la condizione migliore per avere un sistema stabile nel tempo. Confermata la stabilità, si è testata una condizione più vicina ad una reale applicazione all'interno di un'industria casearia, in cui i fagi vengono direttamente diluiti nel latte prima di essere trattato. Dopo aver valutato le risposte del sistema al rilevamento di batteri e fagi si è provato a semplificare il protocollo e a velocizzare i tempi di risposta utilizzando del cloruro di calcio; infine, si è studiata la sensibilità del sistema variando la concentrazione di fagi in soluzione.

Il lavoro si conclude con delle riflessioni sui dati ottenuti, fornendo degli spunti per lavori successivi.

La fase sperimentale, i protocolli e il trattamento dei materiali biologici sono stati supervisionati e condotti presso il laboratorio di microbiologia di ARC-Centro Ricerche Applicate s.r.l, Padova.



# Capitolo 1

## Lactococcus Lactics e batteriofagi nelle industrie lattiero-casearie

L'industria agroalimentare è tra le più importanti nel panorama economico, e presenta vari aspetti complessi; questo è dovuto al fatto che le aziende alimentari trattano una vasta varietà di prodotti freschi, molti dei quali sono caratterizzati da un deterioramento rapido e da un terreno di coltura adatto alla proliferazione di patogeni. Questo richiede che l'azienda sia efficiente ed organizzata nei controlli di produzione, in modo tale da fornire al consumatore dei prodotti sicuri e di qualità [4].

Il deterioramento repentino dei prodotti freschi è un limite importante delle aziende agroalimentari; il processo più diffuso e più antico per la conservazione degli alimenti è la fermentazione: una tecnica nata per sbaglio, in cui prodotti come latte o carne vengono trasformati, da microrganismi come batteri o lieviti, in prodotti alimentari finiti, in cui si è riscontrato un miglioramento della qualità, della conservabilità e della sicurezza. Questo processo viene al giorno d'oggi ampiamente utilizzato soprattutto nelle industrie lattiero-casearie. Infatti, i batteri dell'acido lattico, grazie alle loro caratteristiche metaboliche, sono coinvolti in molti processi di fermentazione del latte, rendendo i prodotti non solo più duraturi, ma anche più digeribili, migliorandone il gusto e creando nuovi prodotti, come ad esempio lo yogurt e il latticello [5].

I batteri dell'acido lattico (nel seguito LAB) sono i microrganismi più utilizzati nella fermentazione dei prodotti alimentari, ne aumentano la conservabilità e l'immunità da patogeni. Infatti, questi batteri, inseriti nel latte, convertono il lattosio in acido lattico, come principale sottoprodotto della fermentazione degli zuccheri, riducendo il pH della soluzione così da inibire la crescita di patogeni. I

LAB, generalmente, sono gram-positivi<sup>1</sup>, crescono in ambienti anaerobici e non formano spore. Sono inoltre tipici di ambienti ricchi di nutrienti, come latte, carne, cereali e verdure [6]. La classificazione dei batteri dell'acido lattico viene stilata in base alla morfologia, alla tecnica di fermentazione del glucosio, alla diversa temperatura di proliferazione, all'interazione con l'ambiente circostante e all'attività metabolica [7]. In base al loro sottoprodotto nella fermentazione degli zuccheri, i batteri dell'acido lattico possono essere divisi in due gruppi: omofermentativi e eterofermentativi [8]. I batteri omofermentativi sono batteri che dalla fermentazione di una molecola di glucosio producono come sottoprodotto primario due molecole di acido lattico e, attraverso il processo di fosforilazione, le trasformano in due molecole di ATP. Di questo gruppo fanno parte i *Lactococcus*, utilizzati nelle colture di latticini per produrre rapidamente acido lattico in condizioni di pH ridotto, gli *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eterococcus*, *Pediococcus* e *Aerococcus*. I batteri eterofermentativi, invece, sono batteri lattici che producono, oltre all'acido lattico, anche etanolo/acido acetico e  $CO_2$  come sottoprodotti della fermentazione del glucosio.

Il *Lactococcus Lactis* è il batterio dell'acido lattico più utilizzato nella fermentazione degli alimenti nelle aziende lattiero-casearie, soprattutto per la produzione di formaggi, yogurt e simili. È un batterio riconosciuto come sicuro dalla *Food and Drug Administration* e oltre a conferire sapore aiuta anche nella conservazione dei prodotti [9]. Inoltre, è un batterio gram-positivo, non mobile e non forma spore. In termini di morfologia, questi tipi di batteri sono di forma sferica o ovoidale e si trovano in celle singole o formano lunghe catene. Possono crescere a  $10^\circ C$ , ma non oltre i  $45^\circ C$ ; sono omofermentativi e dal loro processo di fermentazione producono acido lattico senza ulteriori sottoprodotti [10], [11]. La tassonomia del *Lactococcus Lactis* è attualmente basata sul fenotipo, differenziandosi in *lactis* e *cremoris*; entrambe le sottospecie vengono usate come coltura starter nelle industrie lattiero-casearie, ma quelli *cremoris* vengono preferiti per la produzione di formaggio, in relazione alla produzione di acido lattico, allo sviluppo del sapore e alla resistenza ai batteriofagi [12].

I processi di fermentazione sono comunemente attaccati dai batteriofagi [13]. I batteriofagi, o fagi, sono virus che infettano le cellule batteriche, utilizzandole per replicarsi: il processo di infezione inizia con l'attaccamento del fago, tramite

---

<sup>1</sup>I batteri vengono definiti *gram-positivi* perchè rimangono colorati di blu o viola dopo aver subito la colorazione di Gram. I batteri infatti vengono distinti in funzione della colorazione che presentano dopo essere stati soggetti al trattamento di Gram, anche se ciò non ha attinenza con il grado di parentela filogenetica tra le diverse specie batteriche. *Wikipedia*

la coda, ad un ricettore sulla superficie della cellula batterica, terminando con la lisi batterica e il rilascio di nuovi fagi infetti nell'ambiente. La loro presenza è uno dei problemi principali per le industrie in cui è coinvolta la fermentazione del latte, perchè, a causa della lisi dei batteri, avviene un rallentamento della produzione dell'acido lattico o addirittura un totale fallimento del processo di fermentazione; questo provoca un peggioramento della qualità dei prodotti e gravi perdite economiche [14]. La prima descrizione dei "fagi del LAB" che hanno colpito un'industria lattiero-casearia è stata riportata da Whitehead e Cox nel 1935 [15]. Si è visto infatti, durante la produzione di formaggio, in cui viene richiesta l'inoculazione di  $10^7$  cellule batteriche (colture starter) per mL di latte pastorizzato, che i batteri LAB, in ambiente non sterile o trattato termicamente, entrano in contatto con i fagi presenti nel latte. Sebbene la concentrazione iniziale di fagi sia solitamente bassa, una popolazione specifica di fagi può aumentare rapidamente se nella coltura starter sono presenti cellule sensibili a questi fagi, con conseguente lisi dei batteri e interruzione del processo di fermentazione. Nel caso peggiore il latte deve essere quindi scartato. Affinchè la quantità di fagi nel latte sia considerata innocua deve essere minore di  $10^5$  PFU/mL<sup>2</sup>; se sono presenti a livello uguale o superiore avviene una completa inibizione della crescita batterica e quindi una totale interruzione del processo di fermentazione [16]. La coltura starter più utilizzata nel processo di fermentazione, per la produzione di molti tipi di formaggi, latticello e panna acida, è il *Lactococcus Lactis*; questo tipo di batteri viene facilmente attaccato da specifici batteriofagi. I fagi *lactococcal* vengono classificati in 11 specie o gruppi: tra le più coinvolte nelle aziende di produzione di alimenti derivanti dal latte ci sono : P335, 936 e c2. Tuttavia, la loro capacità di evolversi ha portato ad un ulteriore differenziamento all'interno dei gruppi, rendendo così difficile il rilevamento [14].

Nelle industrie alimentari la presenza di batteriofagi è inevitabile. La contaminazione può avvenire in modi diversi, sia per la scarsa igiene che per contaminazione dall'aria esterna, e può avvenire in più momenti durante il processo di produzione, rendendo così inutilizzabile tutto il lotto prodotto. Per questo motivo per le aziende è importante sviluppare delle tecniche di rilevamento della presenza di fagi che abbiano un'alta sensibilità e una risposta il più rapida possibile.

Le tecniche utilizzate fino ad ora si dividono in due categorie: molecolari e microbiologiche. Le tecniche molecolari si basano sulla rilevazione della presenza o assenza di uno specifico componente del virus; sono caratterizzati da una grande

---

<sup>2</sup>Per PFU si intende unità formanti placche, ovvero l'unità di misura per calcolare il numero di colonie presenti in soluzione.

sensibilità, ma non sono in grado di distinguere i fagi infettanti da quelli non infettanti, sovrastimando il numero di fagi presenti nel campione [14].

La tecnica molecolare più utilizzata dalle industrie per il rilevamento dei fagi *Lactococcus* o *Streptococcus* è quella della *Polymerase chain reaction* (PCR). Questa tecnica venne scoperta nel 1983 da K. Mullis e si basa sull'amplificazione di determinate sezioni di DNA. Ogni ciclo di amplificazione prevede tre passaggi termoregolati e temporizzati: per prima cosa viene denaturata la catena di DNA portandola ad una temperatura di circa 90°C, in modo tale da rompere i legami idrogeno tra le basi complementari e separare le due eliche; successivamente la temperatura viene abbassata tra i 40°C e i 60°C in modo tale da favorire il legame tra un primer (oligonucleotidico) artificiale specifico e la regione bersaglio di interesse; una polimerasi termostabile, cioè funzionante anche ad alte temperature, sintetizza nuovi filamenti complementari formando nuovi desossinucleotidi trifosfato presenti nella miscela di reazione; alla fine dell'allungamento la temperatura si alza nuovamente fino a denaturare tutte le nuove doppie eliche, iniziando un nuovo ciclo [17]. Questa tecnica viene usata per rilevare e identificare virus e batteri in diversi ambienti alimentari, in particolare per analizzare la presenza di fagi nel latte [18]; il limite di rilevazione varia tra i 10<sup>4</sup> e i 10<sup>7</sup> PFU/mL. Questo metodo però non è in grado di individuare se il fago è attivo o meno, causando una sovrastima del numero complessivo di fagi nel campione; inoltre un'analisi completa richiede diverse ore. Serve quindi che l'intero processo sia terminato prima di sapere se il fago è presente o meno.

Per ovviare a quest'ultima problematica vengono usati i metodi *q-PCR*, che monitorano le repliche di specifici fagi in tempo reale. La tecnica q-PCR si rivela essere un'analisi rapida, specifica ed altamente efficace per rilevare la contaminazione di fagi. Essa si basa sull'aumento del segnale di fluorescenza in corrispondenza dell'avanzamento della reazione: il fluoroforo, un colorante, si lega al DNA a doppia elica oppure si lega in modo covalente ad una sonda target specifica. Il fluoroforo mostra un forte segnale in fluorescenza se legato al DNA a due eliche, mentre mostra un segnale più debole in presenza di DNA a filamento singolo. I segnali di fluorescenza risultanti permettono di confrontare la quantità di target presente tra due o più campioni [19]. Tuttavia queste tecniche molecolari possono risultare molto costose per esperimenti di routine, richiedono personale specializzato e possono essere addirittura troppo specifiche, consentendo di individuare solo i fagi di cui si conoscono già i dati genomici [14].

In parallelo a queste tecniche vengono utilizzati metodi microbiologici, basati

sulla diretta visualizzazione dei virus. Il più comune è lo *Spot Test* che si basa sull'inibizione della crescita batterica: un campione di latte viene diluito in un terreno ottimale per la crescita di batteri, centrifugato e filtrato in modo tale da rimuovere i batteri presenti; successivamente viene prelevata una goccia, depositata su una piastra contenente dei batteri e messa in incubatore, se dopo più o meno 12 ore si osservano delle placche, questo è indice della presenza di fagi nel campione [20]. Questa è un'analisi molto sensibile e permette di quantizzare i fagi presenti in soluzione; tuttavia la sua esecuzione non è rapida, ma anzi richiede dalle poche ore a diversi giorni, a seconda dell'interazione batterio-fago. Inoltre, richiede strumenti di laboratorio specifici e un personale tecnico specializzato.

Un'altra tecnica microbiologica diffusa è la *Citrometria a flusso*, in grado di quantificare in modo efficiente i fagi in un campione, indipendentemente dal loro ospite. Infatti, quando i fagi infettano il loro ospite questi subiscono cambiamenti morfologici che portano alla lisi. La citrometria a flusso ne monitora gli effetti, ovvero la perdita di massa e l'interruzione della divisione cellulare, tramite la diffusione di luce, permettendo di discriminare le cellule infette da quelle non infette. La presenza di fagi viene valutata dalla distribuzione di massa cellulare fornita dall'analisi. Un'ampia distribuzione indica la presenza di cellule lisate, mentre picchi stretti indicano cellule vive. Questa tecnica ha il vantaggio di non dipendere dal tipo di ceppo e i limiti di rilevazione sono paragonabili a quelli del PCR. Consente inoltre di rilevare i fagi in tempo reale e rapidamente, ma richiede apparecchiature costose e tecnici preparati [21].

Una tecnica altrettanto usata per individuare la presenza o meno di fagi in soluzione è la *Spettroscopia di assorbanza ottica*. Questa tecnica monitora il comportamento di un campione contenente batteriofagi confrontandolo con uno di controllo, privo di questi, valutando la variazione dello spettro di assorbanza nel tempo [21]. Questo metodo si basa sul fatto che ogni molecola assorbe, trasmette o riflette luce ad una certa lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) e, variando la lunghezza d'onda, è possibile determinare la presenza di un componente suscettibile ad una data  $\lambda$ . Lo spettrofotometro utilizzato per le misure consente di determinare la concentrazione di un analita in soluzione analizzando la variazione dell'intensità luminosa della luce prima e dopo aver attraversato la cuvetta contenente la soluzione di interesse. Infatti il picco di assorbanza risulta direttamente proporzionale alla concentrazione della soluzione:

$$A = \epsilon(\lambda)Cd \tag{1.1}$$

ove  $\epsilon(\lambda)[M^{-1}cm^{-1}]$  è il coefficiente di estinzione molare,  $C[M]$  è la concentrazione della specie di interesse e  $d[cm]$  è il cammino ottico.

La sorgente luminosa di uno spettrofotometro viene regolata, ad una specifica lunghezza d'onda, da un monocromatore, e la luce trasmessa attraverso la cuvetta viene rilevata da un fotorivelatore, che la trasforma in un segnale analizzabile [1]. Questo tipo di test è molto sensibile, quindi potrebbe portare a dei falsi positivi e può richiedere diverse ore. Inoltre, anche per questa tecnica, servono strumenti specifici e operatori con competenze tecniche.

In conclusione, il costo relativamente alto dei test e la richiesta di personale specializzato porta le industrie a ridurre il monitoraggio dei prodotti, inoltre, i tempi lunghi per le risposte delle analisi può causare lo scarto di più lotti di latte o addirittura l'utilizzo di antibiotici, che abbassano la qualità del prodotto finale; infatti, la maggior parte delle analisi molecolari e microbiologiche vengono effettuate alla fine del processo di produzione, per cui i prodotti contaminati hanno già attraversato costosi trattamenti prima che si manifestino problemi. Risulta quindi indispensabile per prevenire lo spreco di prodotti e di soldi un monitoraggio rapido, economico, semplice della produzione e che consenta uno screening degli alimenti durante tutto il processo produttivo, così da poter garantire la qualità dei prodotti.

La tecnologia che soddisfa questi requisiti è quella dei biosensori elettrochimici, che permette di rilevare la presenza di analiti di interesse tramite variazione dei parametri elettrochimici.

Dagli ultimi anni il settore dei biosensori per il monitoraggio degli alimenti è in continua crescita. Nelle aziende che trattano soprattutto di alimenti freschi, come il latte, l'uso dei biosensori è molto richiesto: diversi tipi di sensori ad esempio sono stati studiati per controllare la qualità del latte. Uno di questi è stato progettato per rilevare la presenza di lattato, utilizzato come indicatore della presenza del processo di fermentazione, consentendo di valutare la qualità del prodotto [22]. Un altro è stato progettato per determinare la presenza di antibiotici nel latte, analizzando la risposta transitoria del sensore alla presenza di reazioni chimiche specifiche [23], [24].

In letteratura si trovano pochi studi sul rilevamento diretto della presenza di batteriofagi in soluzione. I fagi, infatti, sono stati per lo più utilizzati come elemento sensibile di riconoscimento, non come elemento da rilevare. Ad esempio, per monitorare la presenza della *Salmonella Typhimurium* sono stati utilizzati i fagi E2 come elemento di riconoscimento [25]. Tuttavia, una prima applicazione

---

del batteriofago, come elemento di rilevamento, è stata usata in un sensore elettrochimico per rilevare la presenza di fagi *PhiX174* in una soluzione contenente i batteri dell'*Escherichia coli* *WG5*. In questo studio è stato sviluppato un metodo di rilevamento rapido dei batteriofagi in campioni di latte e PBS<sup>3</sup>, basato sull'analisi dei cambiamenti di impedenza che si verificano durante l'infezione di un biofilm batterico, stabilito su microelettrodi metallici. La presenza di fagi infatti causa la lisi dei batteri che si depositano sulla superficie, provocando così cambiamenti delle proprietà elettrochimiche del sistema, rilevabili utilizzando misure di spettroscopia di impedenza [26], [27].

Più di recente è stato sviluppato un sensore elettrochimico per il rilevamento di batteriofagi del *Lactococcus Lactis* su elettrodi interdigitati *inkjet-printed*, basato sempre sul rilevamento della presenza di batteriofagi in soluzione osservando i cambiamenti dei parametri elettrici a confronto con un campione negativo, privo di elementi biologici. Il sistema, dopo aver trovato il tipo di sensore e di protocollo ottimale per le misure, è stato testato solo su soluzioni ideali; in parallelo è stata eseguita la tecnica della spettroscopia di assorbanza ottica per valutare la coerenza delle misure elettrochimiche [28], [29].

Il progetto di tesi qui riportato, si basa sulla continuazione della ricerca, descritta nelle ultime due referenze sopracitate, di un biosensore elettrochimico, *DropSens* DRP-C223AT, per il rilevamento della presenza di batteriofagi del *Lactococcus Lactis*. L'obiettivo è, quindi, quello di testare il sensore su soluzioni a base di latte, definendo un protocollo il quanto più possibile semplificato applicabile in ambito industriale, garantendo un monitoraggio della presenza di batteriofagi rapido, economico, di alta sensibilità e di semplice utilizzo.

---

<sup>3</sup>Il PBS è un tampone fosfato salino (phosphate buffered saline PBS) spesso usato per diluizioni e colture biologiche così da mantenere il pH costante.





## Capitolo 2

# Biosensori e misure elettrochimiche

Un sensore è un dispositivo che permette di rilevare dei cambiamenti nell'ambiente circostante, convertendo l'informazione in modo tale che possa essere recepita da macchine o persone; seguendo una definizione più precisa, data dall'*Oxford English Dictionary*, un sensore è un dispositivo che rileva e misura una proprietà fisica e registra, indica o risponde ad essa. I sensori sono presenti nella quotidianità di ogni persona, attraverso un termostato, un rilevatore di fumo o all'interno di uno smartphone.

Negli ultimi 10 anni l'utilizzo di sensori sta crescendo nelle industrie mediche, nelle aziende alimentari e in generale in qualunque sistema in cui sia presente dell'automazione.

I sensori si suddividono in tre categorie a seconda del segnale che analizzano:

- FISICI: misurano grandezze fisiche come distanza, massa, temperatura, pressione, etc.;
- CHIMICI: misurano sostanze chimiche o risposte da reazioni chimiche o fisiche dell'ambiente;
- BIOSENSORI: misurano sostanze chimiche utilizzando elementi di *sensing* biologici.

Tutti questi dispositivi devono essere connessi ad un trasduttore che permetta di convertire i segnali del sensore in risposte osservabili.

Negli ultimi 15 anni gli studi sui biosensori hanno iniziato ad espandersi sempre più velocemente e il loro mercato, ad esempio quello *healthcare*, per controllo di processi industriali e per il monitoraggio ambientale, risulta in continua ascesa, soprattutto in Asia, Nord-America e Europa, perché consentono di ridurre i

tempi e i costi delle analisi ambientali [30]. I biosensori sono pertanto dei dispositivi analitici che convertono una risposta biologica in un segnale elettrico [31]. La sostanza o costituente chimico (target) che si vuole misurare viene definito analita. Il dispositivo rileva la presenza del target grazie all'elemento di riconoscimento biologico, esempio enzimi, anticorpi, DNA, etc., fornendo un segnale di tipo elettrico, o di altra natura, che poi viene convertito tramite trasduttore, in segnali misurabili, proporzionali all'entità dell'evento di riconoscimento stesso.

I biosensori possono essere catalogati in base al tipo di trasduttore utilizzato:

- **Trasduttori elettrochimici:** rilevano la presenza dell'analita in soluzione e utilizzano la variazione delle proprietà elettriche dovute a reazioni chimiche che producono o consumano ioni, formando così uno scambio di carica all'interfaccia tra elettrodo e soluzione. Vengono utilizzati in vari ambiti, ad esempio in medicina per la rilevazione di glucosio nel sangue, oppure nelle industrie agroalimentari per la rilevazione del lattato, etc.

Questi a loro volta si suddividono in varie categorie a seconda dei segnali elettrici che vengono misurati:

- *Potenziometrici:* dispositivi che misurano la differenza di potenziale di una cella in presenza di una corrente nulla, permettendo così di rilevare, a causa della diversa concentrazione di specie ioniche in soluzione, la concentrazione dell'analita [32].
  - *Voltammetrici:* dispositivi che misurano la corrente e i relativi picchi, che si generano in corrispondenza dei fenomeni di ossidoriduzione, causati dall'applicazione di rampe di tensione tra gli elettrodi del sensore.
  - *Amperometrici:* dispositivi simili ai voltammetrici, che vengono utilizzati quando la differenza di potenziale applicata agli elettrodi non varia.
  - *Capacitivi:* sensori che monitorano le reazioni sulla superficie del trasduttore. Misurano la variazione della conducibilità in soluzione, concentrandosi non solo sulla conduttanza, ma anche analizzando la risposta dell'impedenza complessa del sistema elettrodo-soluzione, rispetto a segnali sinusoidali applicati.
- **Trasduttori ottici:** i trasduttori ottici rispondono alla presenza di un'analita nell'ambiente variando le loro proprietà ottiche. Queste variazioni

vengono registrate attraverso un trasduttore ottico, fotorilevatore, che le trasforma in un segnale elettrico [33]. Pertanto la presenza del target in soluzione può venir registrato in vari modi, o con la variazione della luce assorbita, come nella spettroscopia di assorbimento, o con la variazione di luce emessa, come fluorescenza o fosforescenza, o, ancora, con la luminescenza, in cui viene prodotta luce come reazione in presenza dell'analita.

Un'ulteriore tecnologia tipica dei trasduttori ottici è la risonanza plasmonica superficiale (SPR), generata dall'eccitazione dei polaroni plasmonici di superficie a causa dell'interazione tra gli elettroni liberi e le onde elettromagnetiche sulla superficie, tra il film metallico e il mezzo dielettrico [34]. Un fascio di luce (laser) incide sulla superficie eccitando gli elettroni e trasferendo loro parte della sua energia. Vengono così a formarsi onde plasmoniche superficiali, o polaritoni plasmonici di superficie, che penetrano nel metallo fino al dielettrico. Questo tipo di biosensore ottico permette di rilevare la presenza dell'analita tramite lo scostamento della frequenza di risonanza dei plasmoni superficiali.

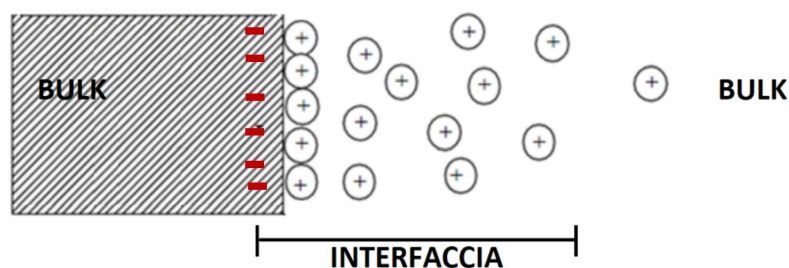
- **Trasduttori piezoelettrici:** si basano sull'effetto piezoelettrico: applicando pressione su un quarzo si genera carica netta sulla superficie, producendo così una differenza di potenziale proporzionale alla pressione applicata. Quindi, da una pressione meccanica, si genera direttamente un segnale di uscita.
- **Trasduttori termici:** rilevano i cambiamenti di temperatura dovuti alle reazioni chimiche, esotermiche o endotermiche, in presenza dell'analita di interesse. La variazione di temperatura è rilevata tramite un termistore.

## 2.1 Modello dell'interfaccia elettrodo-soluzione [1]

Il funzionamento di un sensore elettrochimico si basa principalmente sulle discontinuità che si generano all'interfaccia, ovvero nella regione di contatto tra due fasi diverse solido/liquido, solido/gas, metallo/semiconduttore, metallo/isolante. Queste ultime possono causare variazione di carica o di analiti, oppure un campo elettrico diverso rispetto alle caratteristiche dei corrispondenti bulk, regioni più distanti non interessate dalle variazioni di proprietà.

Nei sensori elettrochimici l'interfaccia si trova tra due conduttori: uno elettronico, un elettrodo solido metallico in cui sono presenti cariche mobili, elettroni,

la cui conducibilità è descritta dalla teoria delle bande energetiche di conduzione e valenza e dalla statistica di Fermi-Dirac (gli elettroni si trovano solamente al di sotto del livello di Fermi), e uno ionico, una soluzione liquida elettrolitica, in cui le cariche mobili sono costituite da ioni positivi che, per il loro peso superiore a quello degli elettroni, generano una bassa conduzione.



**Figura 2.1:** Schema dell' interfaccia dei sensori elettrochimici tra metallo e soluzione.

La presenza di cariche mobili vicine all'interfaccia determina un trasferimento di carica attraverso un processo di ossidoriduzione, in cui gli elettroni dell'elettrodo attraversano l'interfaccia raggiungendo un orbitale molecolare in soluzione, causando la riduzione; viceversa, quando la carica rilasciata dalla molecola naviga verso il conduttore elettronico, questo viene ossidato.

Le correnti scambiate nelle due direzioni si eguagliano quando la reazione raggiunge l'equilibrio al potenziale standard di ossidoriduzione  $E_0$ , caratteristico di ogni elettrolita in soluzione e definito rispetto al potenziale dell'elettrodo usato come riferimento.

A causa dell'importanza dell'interfaccia elettrodo/soluzione per caratterizzare i sensori, nel corso degli anni il suo studio ha riscontrato un grande interesse nella comunità scientifica, portando a definire modelli sempre più completi e complessi che ne descrivessero la struttura fisica.

### 2.1.1 Modello di Helmholtz: "Double layer"

Data la presenza delle cariche mobili nei due conduttori e la loro diffusione attraverso l'interfaccia, quest'ultima si carica elettricamente. Si crea così una differenza di potenziale elettrico che genera un campo elettrico intrinseco tra le due fasi.

Il primo modello per descrivere la distribuzione di carica sull'elettrodo è stata teorizzata da H.von Helmholtz nel 1853 e consiste nel definire il sistema come due facce piane parallele cariche di segno opposto: una sulla superficie del conduttore elettronico (metallo), l'altra che passa lungo i centri degli ioni che si trovano in soluzione a contatto con la superficie dell'elettrodo; la zona interfase tra le due superfici viene definita *double layer*.

Il modello di Helmholtz può essere quindi visto come un condensatore a facce piane parallele, la cui capacità dipende solo dalla costante dielettrica della soluzione e dalla distanza tra le due superfici. Tuttavia questo modello è troppo semplificato, infatti non considera la diffusione degli ioni e l'adsorbimento con la superficie, la presenza di momenti di dipolo elettrici e la dipendenza dalla tensione applicata, dalla temperatura e dalla concentrazione degli ioni in soluzione.

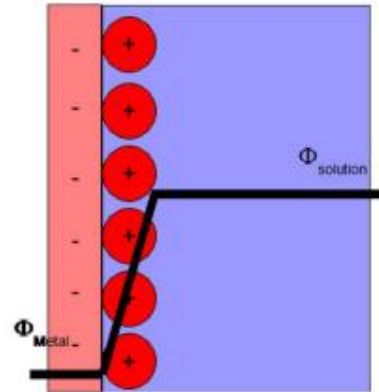


Figura 2.2: Modello di Helmholtz

### 2.1.2 Modello di Gouy-Chapman: "Diffusive double layer"

Per superare queste limitazioni, tra il 1910 e il 1913, L.G. Gouy e D.L.Chapman osservarono che la capacità non è costante, ma dipende dalla variazione di potenziale e dalla concentrazione: teorizzarono così un nuovo modello in cui venne introdotto un *diffusive double layer*, la cui struttura può essere descritta quantitativamente usando le equazione di Poisson-

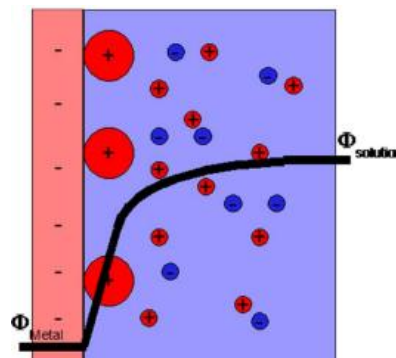


Figura 2.3: Modello di Gouy-Chapman.

Boltzmann. Così facendo la variazione di potenziale diventa esponenziale e in funzione della distanza dall'elettrodo. In questo modo la capacità dipende da tensione, temperatura e concentrazione. Tuttavia, rimangono ancora dei limiti: questo modello non considera le dimensioni degli ioni, considera il *diffuse layer* a partire da  $x = 0$ , cosa che rende il modello fallimentare per il doppio strato altamente carico, e non considera l'adsorbimento con la superficie.

### 2.1.3 Modello di Stern: "Double layer and Diffusive double layer"

Nel 1924 O. Stern combinò i modelli proposti da Helmholtz e da Gouy-Chapman. Il suo modello prevede che siano presenti due strati uno più esterno di diffusione (come supposto da Gouy-Chapman) e uno interno, in cui gli ioni vengono adsorbiti dall'elettrodo (come teorizzato da Helmholtz), definito *internal Stern layer*. Il modello viene quindi descritto come la serie di due capacità:  $C_{Helm} + C_{diff}$ . Però anche questo modello non tiene conto della dimensione degli ioni e assume che la permittività dielettrica e la viscosità siano costanti.

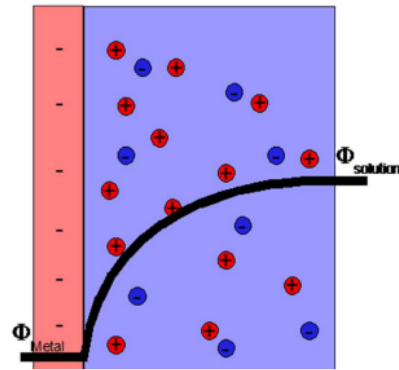


Figura 2.4: Modello di Stern.

### 2.1.4 Modello di Grahame: "Double layer, Diffuse double layer and adsorption"

D.C. Grahame modificò, nel 1947, il modello di Stern, prendendo in considerazione anche gli ioni solvatati vicino all'elettrodo, quegli ioni che perdono il loro guscio di solvatazione mentre si avvicinano all'elettrodo, definiti come *specifically adsorbed ions*. In questo modello si definiscono tre regioni: *Inner Helmholtz Plane* (IHP), che passa attraverso i centri degli ioni specificamente adsorbiti; *Outer Helmholtz*

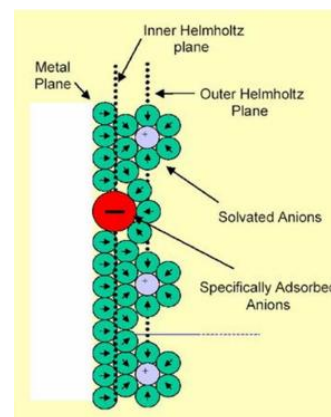


Figura 2.5: Modello di Grahame.

*Plane* (OHP), che passa attraverso i centri degli ioni solvatati e che si avvicinano il più possibile alla superficie dell'elettrodo; infine il *diffuse layer*, che si trova oltre OHP verso il bulk.

### 2.1.5 Modello BDM

Nel 1963 J.O'M. Bockris, M.A.V. Devanathan e K.A.Müller proposero un ultimo modello, utilizzato attualmente, che include l'azione del solvente all'interfaccia. Mantenendo costante la suddivisione in strati proposta da Grahame, teorizzarono che il primo strato di molecole di solvente (quello più prossimo all'elettrodo), fosse fortemente orientato a seconda del campo elettrico applicato all'interfaccia. In questo modo, la costante dielettrica del solvente (limite riscontrato da Stern) cambia con l'intensità del campo .

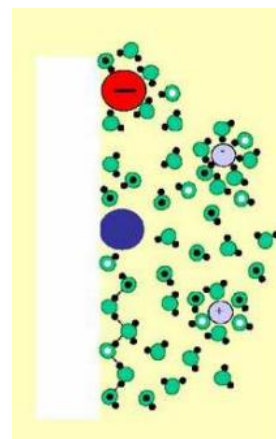


Figura 2.6: Modello BDM.

## 2.2 Metodi di misura elettrochimica [1]

Per misurare il potenziale di un elettrodo, ovvero di un metallo che viene inserito in una soluzione contenente ioni in cui si verifica contemporaneamente una separazione di carica all'interfaccia, tra il metallo e la soluzione, e un trasferimento di carica attraverso processi ossidoriduttivi, si deve creare una cella elettrochimica.

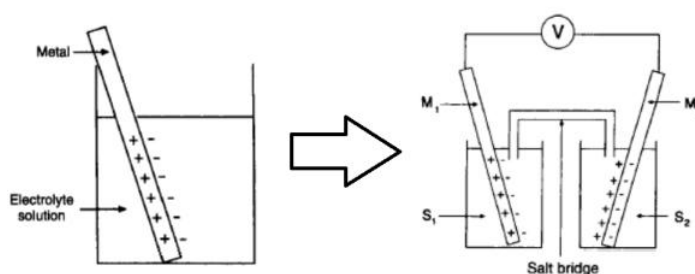


Figura 2.7: Sistema elettrodo-elettrolita e cella elettrochimica.

Questa cella è formata da due strutture elettrodo-elettrolita, in cui gli elettrodi sono collegati tramite un ponte conduttivo, o una membrana; così facendo, viene

a formarsi un circuito chiuso dove la forza motrice della cella non è altro che la differenza di potenziale tra gli elettrodi. Una cella elettrochimica ha due possibili configurazioni a seconda del range di corrente da misurare e delle velocità di variazione della tensione applicata (*rampe rate*), forzata tra gli elettrodi.

Il primo set-up è formato da due elettrodi: il potenziale viene applicato tra l'elettrodo di *Working* (W) e l'elettrodo di *Reference* (R). Attraverso gli elettrodi stessi è possibile calcolare la corrente che scorre nel circuito. Questo tipo di configurazione non è indicata se si vogliono misurare alte correnti o grandi variazioni di tensione.

La seconda tipologia di cella utilizza tre elettrodi: il potenziale viene sempre imposto tra W e R, mentre la corrente viene misurata usando un potenziometro tra l'elettrodo di *Counter* (C) e di W. Questo sistema viene usato principalmente per misurare elevate correnti.

Quindi, è consigliabile usare il set-up a tre elettrodi quando si devono eseguire delle misure perturbative del sistema, come voltammetria a impulsi differenziali o ciclovoltammetria; si usa quello a due elettrodi, nel caso di spettroscopia di impedenza elettrochimica.

## 2.2.1 Voltammetria

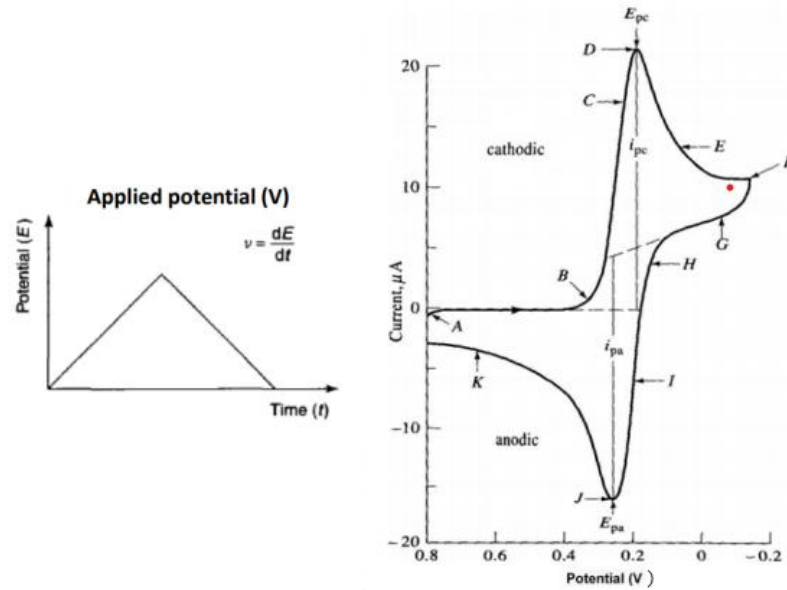
La voltammetria è una tecnica che permette di rilevare la presenza di una specie elettroattiva dalla variazione di corrente; in una cella elettrochimica viene inserito un elettrolita di supporto, usato per rendere conduttiva la soluzione, e una specie elettroattiva, RedOx. Viene poi applicato un potenziale tra W e R, che varia linearmente nel tempo, e misurata la corrente tra W e C. I valori applicati e misurati vengono poi rappresentati su di un voltammogramma.

### 2.2.1.1 Ciclovoltammetria

La ciclovoltammetria è una tecnica voltammetrica in cui viene applicata una rampa lineare di tensione in un senso e, una volta raggiunto il massimo valore, ne viene applicata una di senso opposto. In figura 2.8 viene riportata la rampa di tensione applicata e il ciclovoltammogramma che mostra la risposta del sistema alla presenza della specie elettroattiva, mettendo in relazione corrente e tensione applicata.

Osservando il ciclovoltammogramma si può osservare un primo tratto A-B in cui si ha una corrente di *background* che dipende da una corrente di spostamento





**Figura 2.8:** Rampa lineare di tensione e ciclo voltammogramma.

non faradica, dovuta all'incremento degli ioni, e una corrente residua da impurità (corrente faradica<sup>1</sup>). Diminuendo la tensione a valori sempre più negativi rispetto al potenziale standard di ossido-riduzione  $E_0$ , si ha un aumento di elettroni che si trasferiscono dall'elettrodo alla specie ossidata, infatti la tensione sempre più negativa favorisce l'accumulo di carica positiva, aumentando così la corrente faradica.

Nel tratto B-C la specie ossidata viene ridotta secondo un rate di riduzione che dipende dalla tensione applicata: la corrente cresce esponenzialmente, venendo limitata dalla diffusione di specie ridotta per tensioni oltre  $E_{pc}$ . Quando si arriva all'esaurimento della specie ossidata disponibile per la riduzione si ha un picco di corrente di riduzione  $i_{pc}$ , definito come:

$$i_{pc} = 2.686 \cdot 10^5 n^{3/2} A \sqrt{DC_{Ox}} \sqrt{v} \quad (2.1)$$

dove C è la concentrazione della specie ossidata, A è l'area dell'elettrodo, D è il coefficiente di diffusione,  $v$  è lo *sweep rate* e n è il numero di elettrodi scambiati. Successivamente al picco di corrente, si ha un calo di corrente a causa dell'effetto di svuotamento di specie riducibili vicino all'elettrodo.

A questo punto si inverte la tensione, e avviene il processo di ossidazione

<sup>1</sup>La corrente faradica è la corrente che si genera in corrispondenza dell'interfaccia elettrodo-elettrolita, come conseguenza delle reazioni tra le specie chimiche nell'elettrolita e la superficie dell'elettrodo. Si contrappone alla corrente di carica, data dallo spostamento degli ioni nell'elettrolita. *Wikipedia*

in modo analogo al precedente. La tensione diventa sempre più positiva fino a raggiungere il potenziale  $E_{pa}$ , in questo tratto tutte le specie ridotte iniziano ad essere ossidate fino ad esaurimento della specie ridotta, dopo di che si deve attendere un ricambio dal bulk. In corrispondenza di  $E_{pa}$  è possibile calcolare il picco di corrente di ossidazione  $i_{pa}$ :

$$i_{pa} = 2.686 \cdot 10^5 n^{3/2} A \sqrt{DC_{Red}} \sqrt{v} \quad (2.2)$$

in questo caso la corrente dipende dalla concentrazione della specie ridotta. Grazie alla misura CV è possibile calcolare  $E_0$

$$E_0 = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (2.3)$$

Tramite le curve CV è possibile verificare la reversibilità di un processo RedOx, se questo segue tutte e tre le condizioni elencate di seguito:

1. il rapporto tra i picchi di corrente è unitario:  $\frac{|i_{pa}|}{i_{pc}} = 1$ ;
2. la differenza tra le due tensioni di picco è pari a  $\Delta E = \frac{0.056}{n} [V]$ , dove  $n$  è il numero di elettroni trasferiti durante il processo di ossidoriduzione;
3. il picco di corrente è proporzionale alla radice quadrata dello scan rate  $i_p = \text{cost} \sqrt{v}$ .

## 2.2.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica

La spettroscopia di impedenza elettrochimica è una tecnica di misurazione non perturbativa, infatti applica correnti basse cosicché non vi sia polarizzazione negli elettrodi. Essa permette di rilevare l'impedenza del sistema elettrodo-interfaccia-soluzione, applicando piccoli segnali sinusoidali. Il set-up utilizzato è quello a due elettrodi, W e R, tra cui viene applicato un potenziale continuo, in modo tale da avere una piccola corrente in DC e un segnale sinusoidale; solitamente si utilizzano frequenze dai MHz ai centinaia di mHz.

Questa tecnica permette di rilevare elementi di legame superficiale, cambiamenti nelle proprietà della superficie e reazioni che avvengono anche a distanza dall'elettrodo, riuscendo a distinguere tra gli elementi legati a caratteristiche capacitive e resistive. Viene generalmente usata per analisi microbiologiche: controllo del cibo, monitoraggio della corrosione, controllo qualità, etc.

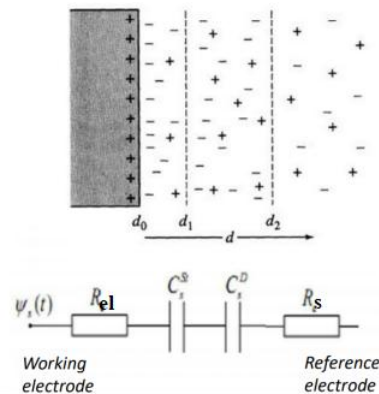
I resistori ideali seguono la legge di Ohm in qualsiasi condizione di tensione, corrente e frequenza, senza sfasamenti tra corrente e tensione in AC. Nei circuiti reali tuttavia sono sempre presenti componenti capacitive o induttive che rendono necessario utilizzare il concetto di impedenza. Per misurare un'impedenza è necessario applicare una perturbazione sinusoidale al sistema  $\delta V$ , polarizzato ad una certa tensione continua  $V_0$ , detta "punto di lavoro". Si ottiene così una piccola perturbazione di corrente  $\delta I$ , con la quale è possibile calcolare il valore dell'impedenza nel punto di lavoro:

$$Z(\omega) = \frac{\delta V(\omega)}{\delta I(\omega)} \quad (2.4)$$

Questa è formata da una componente reale a fase nulla,  $R$ , e una componente puramente immaginaria  $-\frac{j}{\omega C}$  con fase  $-\frac{\pi}{2}$ .

### 2.2.2.1 Circuiti elettrici equivalenti

#### Cella elettrochimica con elettrolita di supporto ideale

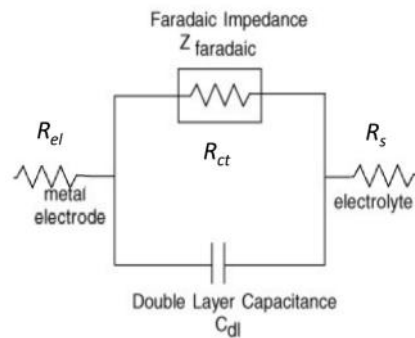


**Figura 2.9:** Rappresentazione schematica di una cella elettrochimica senza mediatore RedOx.

Una cella elettrochimica con un elettrolita di supporto, senza mediatore RedOx, si comporta come una serie R-C, figura 2.9, dove  $R_{el}$  indica il contributo resistivo del metallo,  $C_S$  e  $C_D$  indicano rispettivamente il contributo capacitivo di Stern e di diffusione tra i layer all'interfaccia, mentre  $R_S$  si riferisce al contributo resistivo del bulk in soluzione ( $R_S \gg R_{el}$ ).

### Cella elettrochimica con mediatore RedOx: impedenza faradica

Quando alla cella elettrochimica viene aggiunto un mediatore RedOx avvengono processi di ossidoriduzione e quindi, oltre alla corrente di spostamento e diffusione, si rileva anche una componente di scambio di carica tra elettrodo e soluzione, che origina una impedenza faradica,  $R_{CT}$ , resistenza che si oppone al trasferimento di carica. La somma di queste due correnti viene rappresentata come parallelo tra  $C_{dl}$  e  $R_{CT}$ , ottenendo così il modello elettrico presentato in figura 2.10.

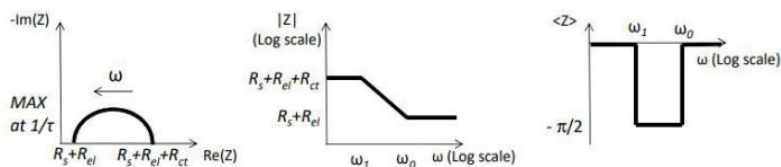


**Figura 2.10:** Rappresentazione schematica di una cella elettrochimica con mediatore RedOx ideale.

L'impedenza del circuito è:

$$Z = (R_S + R_{el}) + \frac{R_{CT}}{1 + (\omega R_{CT} C_{dl})^2} - j \frac{\omega R_{CT}^2 C_{dl}}{1 + (\omega R_{CT} C_{dl})^2} \quad (2.5)$$

Come si può vedere in figura 2.11, il circuito genera nel diagramma di Nyquist una semicirconferenza che interseca l'asse reale in  $R_S + R_{el}$  e in  $R_S + R_{el} + R_{CT}$ , quindi il diametro del semicerchio corrisponde alla resistenza di trasferimento di carica. Il diagramma di Bode mostra che, alle basse frequenze, il sistema è influenzato da  $R_S + R_{el} + R_{CT}$  e che, all'aumentare della frequenza, diminuisce il contributo capacitivo fino al raggiungimento di una condizione stabile a  $R_S + R_{el}$ .



**Figura 2.11:** Diagrammi di Nyquist e di Bode di una cella elettrochimica con mediatore RedOx ideale.

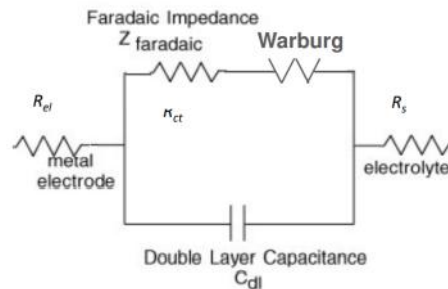
In realtà, alle frequenze molto basse, subentrano processi di diffusione a grandi

distanze che limitano la corrente faradica, quindi all'elettrodo le specie arrivano molto lentamente per effettuare lo scambio di carica.

Si definisce così l'elemento di Warburg, che modella questo comportamento alle basse frequenze, dipendente dalle concentrazioni delle specie ridotte ed ossidate e distinto in base allo spessore del layer di diffusione di Nernst,  $\delta$ . L'impedenza di Warburg a diffusione infinita è definita come:

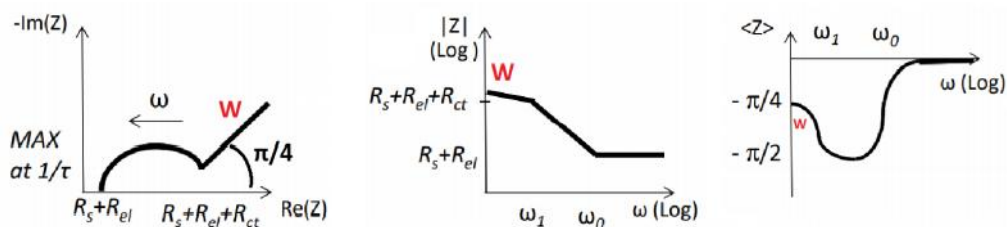
$$Z = \sigma \frac{(1-j)}{\sqrt{\omega}}, \quad \sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \left( \frac{1}{C_{Ox} \sqrt{D_{Ox}}} + \frac{1}{C_{Red} \sqrt{D_{Red}}} \right) \quad (2.6)$$

dove D rappresenta i coefficienti di diffusione e C le concentrazioni nel bulk, delle soluzioni ridotte e ossidate.



**Figura 2.12:** Rappresentazione schematica di una cella di Randles.

Pertanto, la configurazione circuitale della cella elettrochimica più completa, chiamata anche cella di Randles (figura 2.12), è quella che comprende l'elemento di Warburg in serie all'impedenza faradica, in modo da considerare i processi diffusivi a basse frequenze, come si può osservare dai diagrammi di Bode e in particolare di Nyquist, figura 2.13.



**Figura 2.13:** Diagrammi di Nyquist e di Bode di una cella di Randles.

In quest'ultimo, infatti, si osserva come a basse frequenze il nuovo elemento genera una semiretta con pendenza  $\frac{\pi}{4}$ , con modulo crescente verso  $\omega = 0$ .



# Capitolo 3

## Materiali, strumenti e protocolli biologici

In questo capitolo vengono spiegati i vari materiali usati, come il terreno di coltura M17 e il  $Fe(CN)_6^{-3/-4}$ , gli strumenti e i software impiegati per analizzare i dati e, per concludere, i protocolli biologici per la coltura dei batteri e dei fagi.

### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 M17

Il terreno di coltura M17 viene utilizzato per la coltura dei batteri *Lactococcus* e dei loro batteriofagi [35]. La sua composizione chimica viene riportata nella seguente tabella 3.1.

Ingredienti	Quantità [g/L]
Digestione peptica di tessuti animali	2.500
Idrolizzato enzimatico di caseina	2.500
Idrolizzato papaico di semi di soia	5.000
Estratto di lievito	2.500
Estratto di manzo	5.000
Lattosio	5.000
Acido ascorbico (Vitamina C)	0.500
Disodio- $\beta$ -glicerofosfato	19.000
Solfato di magnesio	0.250

**Tabella 3.1:** Composizione del terreno di coltura M17.

La complessità della coltura è dovuta al fatto che questi tipi di batteri richiedono vari nutrienti per una crescita ottimale [36].

Il disosio-glicerofosfato mantiene il pH della soluzione sopra 5.7, un più basso pH potrebbe inibire la crescita batterica. Inoltre, il glicerofosfato non crea precipitati di calcio, necessario per la formazione delle placche di lisi dei batteriofagi lattici. I peptoni di soia, caseina e carne contengono le fonti di carbonio e di azoto necessarie per la crescita dei batteri del *Lactococcus*.

L'estratto di lievito è una fonte di vitamine B.

Il lattosio favorisce l'attività metabolica dei batteri, mentre l'acido ascorbico stimola la crescita batterica.

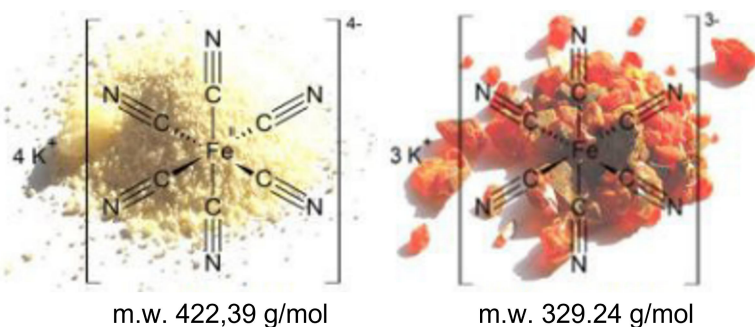
Il solfato di magnesio fornisce gli ioni essenziali agli organismi.

La sua preparazione viene descritta nella sezione 3.3.1.

Nell'esperimento proposto in questa tesi, l'M17 viene utilizzato come terreno di coltura per i batteri e usato come elettrolita di supporto in cui viene disciolto il mediatore RedOx, che introduce la componente di corrente faradica.

### 3.1.2 Ferri/Ferrocianuro [2]

Il mediatore RedOx utilizzato nelle misure è il ferri-ferrocianuro,  $Fe(CN)_6^{-3/-4}$ .



**Figura 3.1:** Molecola di  $Fe(CN)_6^{-4}$  e  $Fe(CN)_6^{-3}$ .

Lo ione ferrocianuro,  $Fe(CN)_6^{-4}$ , deriva dalla dissoluzione del ferrocianuro triidrato di potassio ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) in una sostanza acquosa. A temperatura ambiente è un sale inodore e di colore giallo, con massa molare pari a  $m.w. = 422.39g/mol$ , pericoloso per l'ambiente.

Lo ione ferricianuro, invece,  $Fe(CN)_6^{-3}$ , deriva dal ferricianuro di potassio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) disciolto in soluzione acquosa. A temperatura ambiente si pre-



senta come un sale di colore rosso scuro inodore con una massa molare pari a  $m.w = 329.24g/mol$ . I due sali vengono riportati in figura 3.1.

Per le misure elettrochimiche eseguite viene utilizzata una soluzione di  $Fe(CN)_6^{-3/-4}$ , disciogliendo i sali in M17, per ottenere una concentrazione di 10 mM.

### 3.1.3 Cloruro di Calcio [3]

Il cloruro di calcio,  $CaCl_2$ , è un sale inodore di colore bianco, con massa molecolare pari a  $m.w. = 110.96g/mol$ , ottenuto dalla reazione fra acido cloridrico ( $HCl$ ) e carbonato di calcio ( $CaCO_3$ ). Solitamente viene disciolto nelle soluzioni acquose, nel caso in esame, viene disciolto in MilliQ.

Per milliQ si intende l'acqua purificata deionizzata ad alto livello tramite sistema di purificazione che utilizza filtri a resine e metodi di deionizzazione monitorando la concentrazione di ioni nell'acqua attraverso una misura di resistenza elettrica.

## 3.2 Strumenti

### 3.2.1 DRP-C223AT

Per le misure elettrochimiche sono stati utilizzati i sensori *screen-printed* DRP-C223AT (figura 3.2): questi dispositivi vengono fabbricati dall'azienda *Metrohm DropSens* stampando diversi tipi di inchiostro (conduttivo o isolante), a seconda delle proprietà elettriche desiderate, su substrati isolanti di plastica o ceramica.

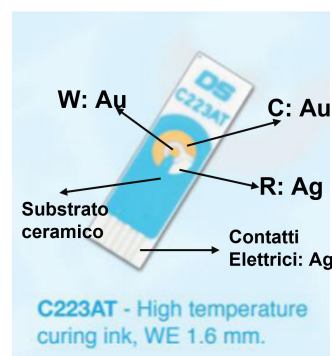


Figura 3.2: Sensore DRP-C223AT

Tali sensori consentono una rapida analisi in situ con elevata sensibilità e riproducibilità. Sono formati da contatti elettrici in argento e un substrato di ceramica 33

x 10 x 0.5 mm, caratteristiche trovate nella scheda tecnica dei *DropSens: Screen-Printed Gold Electrodes*. Gli elettrodi di Working (dal diametro di 1.6 mm) e il Counter sono in oro, mentre l'elettrodo di Reference è in argento.

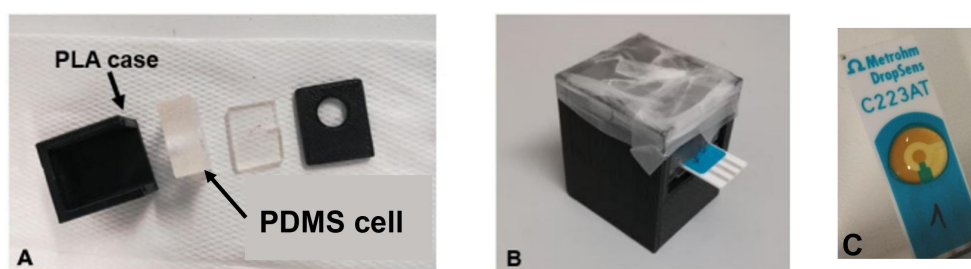
### 3.2.2 Set-up sperimentale: cella, connettore e potenziostato



**Figura 3.3:** Set-up di misura.

Nella figura 3.3 viene riportato il set-strumentale utilizzato durante il rilevamento, composto, a partire da destra, da una cella, il connettore e il potenziostato.

La cella, figura 3.4, è un supporto in cui viene inserito il sensore per evitare che venga urtato durante le misure. Essa è formata da una struttura PLA (*Polylactic Acid*), una scatola rigida con un lato aperto in cui viene posato il sensore, e il PDMS [37] (*Polydimethylsiloxane, Sylgard 184*), un silicone opaco con un buco in corrispondenza dell'area degli elettrodi che viene posato sopra il sensore, in modo tale che la goccia di soluzione depositata sul sensore rimanga confinata solo sugli elettrodi.

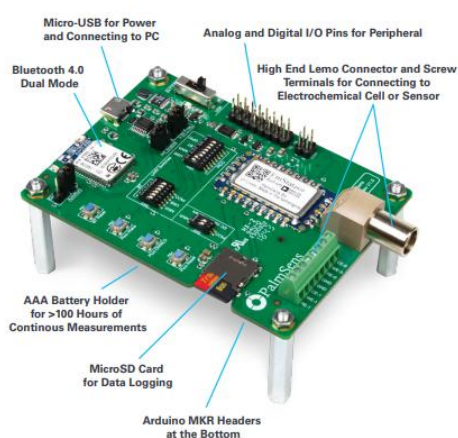


**Figura 3.4:** Struttura della cella: **A.** Cella scomposta nei vari componenti. **B.** Cella montata e parafilata. **C.** Sensore in cui viene posata una goccia di soluzione sopra gli elettrodi.

L'intera cella, dopo la deposizione della goccia, viene coperta con del *parafilm*, un materiale composto da cere paraffiniche e da poliolefine, che aderisce saldamente alla struttura, senza far evaporare o degradare la soluzione.

Per interfacciare gli elettrodi del sensore al potenziostato viene usato un connettore, dell'azienda *Metrohm DropSens*.

Il potenziostato utilizzato è il *PalmSens EmStat PICO* (figura 3.5). Permette di effettuare diverse misure elettrochimiche, tra cui CV e EIS. Viene collegato al connettore della cella elettrochimica tramite *High End Lemo Connector*, il tutto viene collegato al computer tramite porta micro-USB [38]. Il codice di script del metodo per la configurazione delle misure viene generato tramite il software PStTrace.



**Figura 3.5:** Scheda di sviluppo *EmStat PICO*.

### 3.2.3 Spettrofotometro



**Figura 3.6:** Spettrofotometro *UV-30 SCAN*.

Durante le misure elettrochimiche, in parallelo, sono state eseguite delle misure di assorbanza ottica, come prova di verifica delle rilevazioni. È stato utilizzato lo spettrometro UV/Vis *UV-30 SCAN*, figura 3.6. Questo dispositivo consente una scansione dello spettro di assorbanza nel range tra i 300 e 900 nm; inoltre sottrae automaticamente il riferimento per l'intero intervallo di misure, facilitando il rilevamento. Nel caso in esame, per rilevare la crescita batterica, si è scelto,

tra un range di 450 e 800 nm,  $\lambda = 600nm$ , lunghezza d'onda assorbibile dalla soluzione contenente i batteri.

### 3.2.4 Software

#### 3.2.4.1 PSTrace

Il software utilizzato per le misure con il potenziostato è *PSTrace*, che permette sia di raccogliere i dati che di analizzarli ed elaborarli tramite comandi da terminale. Consente, inoltre, di scegliere il tipo di misura elettrochimica con cui si vogliono analizzare i dati e di impostare i relativi parametri.

Per le misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica, eseguite durante tutto l'esperimento, sono stati inseriti i seguenti parametri:  $V_{AC} = 10mV$ , valore standard,  $V_{DC} = 91mV$ , pari al valore del potenziale standard di ossido-riduzione calcolato con le misure di ciclovoltammetria, range di frequenze  $[100kHz - 1Hz]$  e si è scelto di effettuare 10 punti per decade.

Le misure raccolte possono essere esportata in formato Excel, così da poterle analizzare tramite il software *Matlab*.

#### 3.2.4.2 Matlab

*MATLAB* è una piattaforma di programmazione e calcolo numerico utilizzata per l'analisi di dati, lo sviluppo di algoritmi e la creazione di modelli.

Per analizzare, elaborare e visualizzare graficamente i dati raccolti, durante questo lavoro di tesi si è utilizzata la versione R2021b.

#### 3.2.4.3 EISSA

Il focus della tesi è stato soprattutto il calcolo della resistenza di trasporto di carica  $R_{CT}$  che, come visto nel paragrafo 2.2.2, è il diametro della semicirconferenza nel diagramma di Nyquist.

Il software *EISSA* è stato utilizzato per interpolare i dati raccolti e per calcolare i parametri circuitali del modello di interfaccia utilizzato. Infatti, questo programma permette di progettare il circuito elettrico ottimale per modellare i dati, osservando la stima dell'errore e i test di coerenza tra i dati.

Il circuito utilizzato è quello della cella Randles, illustrata in figura 2.12. Per ottenere una miglior stima dei parametri, con un errore intorno al 4%, il modello è stato modificato sostituendo l'elemento di Warburg e la capacità di diffusione con degli elementi circuitali a fase costante (CPE).

In figura 3.7 viene presentata l'interfaccia grafica del software, dove in alto a sinistra vengono riportati i valori dei parametri con rispettivi errori, in basso a sinistra il diagramma di Nyquist sperimentale con il relativo fit e in alto a destra il circuito utilizzato.

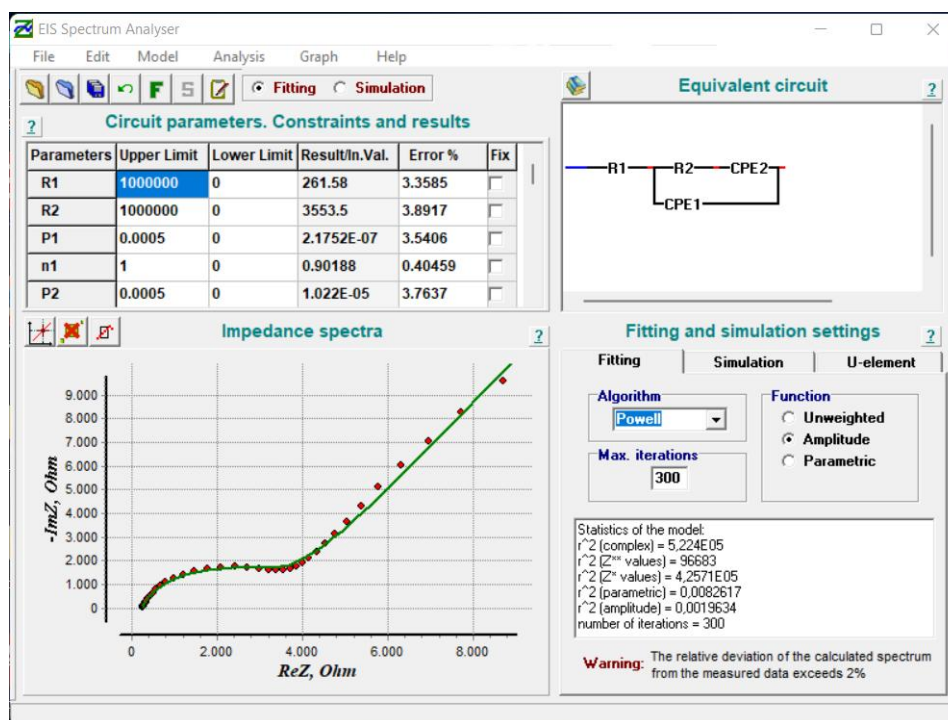


Figura 3.7: Software EISSA.

## 3.3 Protocolli biologici

### 3.3.1 Terreno di coltura M17

La crescita di microrganismi dipende dalla disponibilità di nutrienti e dalla presenza di condizioni ambientali favorevoli. Le soluzioni contenenti i nutrienti necessari vengono definite *terreni di coltura*, possono essere solidi o liquidi a seconda della presenza o meno di un agente solidificante (Agar), che solidifica a  $T < 41^{\circ}\text{C}$ .

I terreni solidi sono usati per osservare o isolare le colture di microrganismi. Questi terreni, contenenti agar, vengono distribuiti in piastre coperte, dette *piastre di Petri*, che permettono di vedere la crescita delle colonie. Affinchè non ci sia contaminazione esterna il terreno deve essere versato sotto cappa sterile.

Il protocollo per preparare 1L di terreno di coltura da mettere nelle piastre è il seguente:

- pesare 42g di M17 e 15g di Agar;
- inserire le polveri all'interno di un beker;
- aggiungere un magnete e versare 500mL di milliQ, metà del volume totale;
- agitare fino a totale scioglimento delle polveri e portare a volume aggiungendo milliQ;
- separare la soluzione ottenuta in due beker, chiudere con della carta stagnola, mettere il nastro adesivo da autoclave;
- inserire in autoclave per 20 minuti a  $121^{\circ}C$  alla pressione di 1 atm;
- raffreddare la soluzione fino a  $45^{\circ}C$  e poi versare nelle piastre.

Per preparare le Falcon<sup>®</sup> contenenti il terreno di coltura con l'Agar si usa lo stesso protocollo, ma con 1/4 delle dosi.

Invece, per preparare la coltura di solo M17, per le misure elettrochimiche, si utilizza lo stesso protocollo, senza aggiungere l'Agar. La soluzione inoltre deve essere divisa in più vasetti, riempiti solo per 3/4 e chiusi con un tappo. Il tappo non deve essere chiuso perfettamente, ma si deve svitare di mezzo giro; successivamente deve essere coperto con carta stagnola e segnato con il nastro adesivo apposito. Infine il tutto viene inserito in autoclave.

### 3.3.2 Crescita di colonie batteriche

Grazie ai terreni solidi di coltura su piastra è possibile isolare una colonia di batteri. Per farlo si deve eseguire il seguente protocollo sempre vicino ad un bunsen portatile per lavorare in un ambiente sterile:

- diluire la colonia di batteri di partenza con M17 liquido;
- prelevare  $50\mu L$  di soluzione con un'ansa sterile o un puntale sterile;
- depositare la goccia e strisciarla sulla piastra, siglare e chiudere la piastra;
- mettere in incubatore  $32^{\circ}C$  per almeno una giornata;
- dopo la crescita la piastra viene chiusa con parafilm e riposta in frigorifero.

In incubatore, oltre alla piastra contenente la colonia di batteri, viene messa anche una piastra di controllo, per vedere che non ci siano contaminazioni dall'ambiente esterno.

Il giorno prima di eseguire le misure elettrochimiche i batteri devono essere diluiti in una fiasca sterile con del terreno di coltura liquido, siglati e infine messi in crescita in un incubatore a  $30^{\circ}\text{C}$  e in agitazione 150 RPM.

### 3.3.3 Titolazione fagi

Per preparare la crescita dei fagi il procedimento è lo stesso utilizzato per la crescita batterica: si preparano due piastre con  $100\mu\text{L}$  di soluzione contenente i batteri e ad una di queste si aggiunge  $100\mu\text{L}$  di fagi, si siglano le due piastre e si pongono in incubatore a  $32^{\circ}\text{C}$  per almeno una giornata. Se le cose sono andate correttamente una piastra mostrerà un alone opaco, indice della crescita batterica, mentre l'altra mostrerà un alone chiaro, indice dell'attività di lisi dei fagi.

Dopo la crescita, per prelevare i fagi il protocollo è il seguente:

- depositare sulla piastra dei fagi 3.5mL di buffer fagico;
- mettere la piastra in agitazione 250 RPM per 4 ore minimo alla temperatura di  $30^{\circ}\text{C}$ ;
- inclinare la piastra e raccogliere il liquido in provette da centrifuga;
- centrifugare per 10 minuti a 5'000 RPM, in modo da formare un pellet sul fondo della provetta, contenente i batteri che sono rimasti in soluzione;
- filtrare la soluzione: prelevare il contenuto della provetta con una siringa, prestando attenzione a non toccare il pellet, e inserirlo in un filtro da  $0.4\mu\text{m}$  appoggiato ad una Falcon<sup>®</sup>;
- fare la titolazione dei fagi della soluzione ottenuta.

Per la titolazione dei fagi il protocollo da seguire è presentato in seguito:

- sciogliere il terreno di coltura con l'Agar, preparato nelle Falcon<sup>®</sup>;
- preparare le piastre: una per il controllo negativo (privo di materiali biologici), una per il controllo positivo (con i batteri) e quelle per la diluizione di fagi. Aggiungere  $200\mu\text{L}$  di buffer fagico nella piastra del controllo negativo e positivo;

- diluire i batteri nell'Agar sciolto e inserirne  $350\mu L$  in tutte le piastre meno quella del controllo negativo;
- procedere con la diluizione dei fagi nelle provette:
  - inserire  $300\mu L$  di soluzione di fagi iniziale ottenuta in una provetta siglata -1;
  - prelevare  $30\mu L$  dalla provetta -1 e inserirla nella provetta -2 contenente  $270\mu L$  di buffer fagico, così da avere una diluizione 1:10;
  - prelevare  $30\mu L$  dalla provetta -2 e inserirla nella provetta -3 contenente  $270\mu L$  di buffer fagico, così da avere una diluizione 1:100 dalla concentrazione iniziale di batteri;
  - procedere in questo modo fino a diluizione desiderata.
- depositare  $200\mu L$  di soluzione fagica nelle piastre con i batteri e agitare delicatamente;
- lasciare in incubatore  $32^{\circ}C$  per almeno una notte;
- dalla piastra con il minor numero di placche di lisi, indice dell'attività fagica, procedere con la conta delle placche che tipicamente si presentano come dei cerchi ben visibili attornati da un alone opaco, che indica la crescita batterica;
- calcolare il titolo della coltura di fagi con la formula:

$$Concentrazione = \frac{\#placche}{\text{volume di fagi aggiunto} * diluizione} \quad (3.1)$$

- diluire il 50% della soluzione totale di fagi iniziale con il glicerolo, titolare la fialetta e riporre in freezer.



## Capitolo 4

### Risultati degli esperimenti

L'obiettivo di questa tesi è quello di ottimizzare e caratterizzare un sensore elettrochimico per rilevare la presenza di batteriofagi nei campioni di latte tramite misure elettrochimiche. Il metodo di rilevamento utilizzato si basa su batteri vivi del *Lactococcus Lactis* che ricoprono gli elettrodi del sensore; infatti, le proprietà elettriche del sistema variano in base alla quantità di batteri depositati sull'elettrodo. La presenza di batteriofagi nelle soluzioni induce la lisi dei batteri, riducendone la concentrazione sopra il sensore. Questo fenomeno è rilevabile sia tramite le misure elettrochimiche sia con le misure di assorbanza ottica.

La tecnica elettrochimica utilizzata è la *Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)*, in grado di monitorare il comportamento superficiale della cella elettrochimica e modellarlo con modelli circuitali specifici.<sup>1</sup>

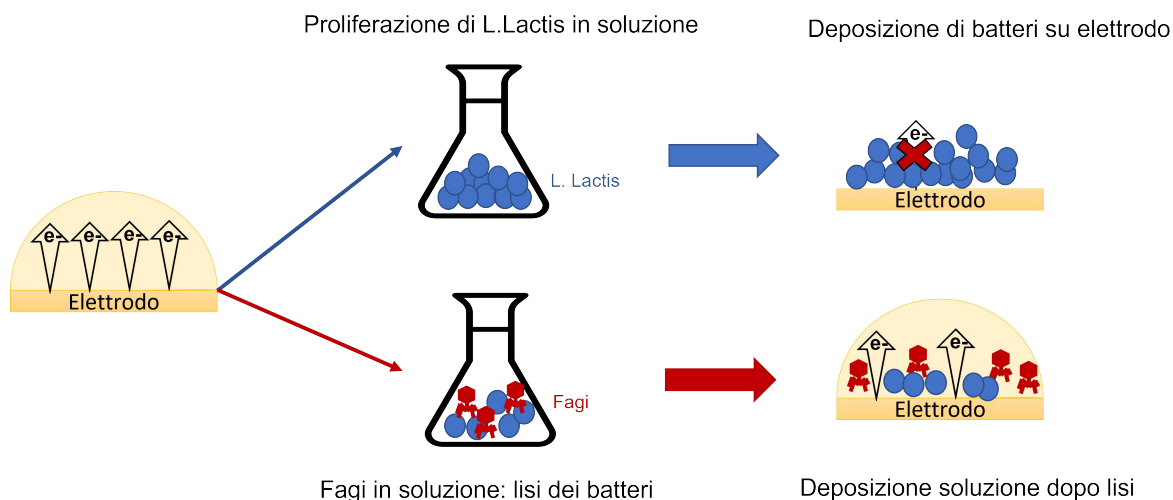
Sopra il sensore viene depositata la soluzione contenente i batteri (illustrazione 4.1), questi si posizionano sull'area di rilevamento ostacolando il passaggio di elettroni, aumentando così la resistenza di trasferimento della carica,  $R_{CT}$ . Se invece nel campione sono presenti i fagi, questi riducono la quantità di batteri depositati sul sensore, provocando una diminuzione di  $R_{CT}$ .

Per monitorare la crescita batterica sono state effettuate misure EIS, analizzando la risposta del sensore al progressivo aumento delle cellule batteriche, e misure di assorbanza ottica (OD- *optical density*) alla lunghezza d'onda di  $600nm$ , perchè, teoricamente, all'aumentare della concentrazione di batteri in soluzione corrisponde un aumento della misura di OD.

Questo fenomeno è anche osservabile direttamente dal fatto che la cuvetta con-

---

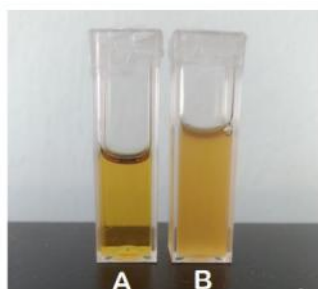
<sup>1</sup>Non sono state utilizzate tecniche voltammetriche perchè possono comportare correnti troppo elevate che provocherebbero uno stress elettrico sulle cellule batteriche in soluzione.



**Figura 4.1:** Spiegazione grafica: nel caso in cui sull'elettrodo venga depositata la soluzione di soli batteri, il passaggio di corrente viene bloccato; nel caso in cui sull'elettrodo venga depositata la soluzione in cui sono presenti i fagi ed è avvenuta la lisi c'è passaggio di carica.

tenente la soluzione con batteri è più torbida di quella senza, figura 4.2.

Nei vari esperimenti pertanto sono state eseguite le due misure in contemporanea così da verificare la coerenza delle misure elettrochimiche con quelle di assorbanza.



**Figura 4.2:** Cuvette utilizzate per misura l'assorbanza del sistema: cuvetta **A** contenente il campione senza batteri, cuvetta **B** contenente i batteri.

Per i test sono stati utilizzati sensori interdigerati, già caratterizzati in lavori precedenti, [28] e [29], che hanno mostrato una buona stabilità, riproducibilità e capacità di rilevamento.

Per ottimizzare la capacità e il tempo di rilevamento è stato utilizzato il metodo di *Spill-out*, in cui le cuvette con le soluzioni vengono tenute a 30°, viene

cambiata la goccia ad ogni misurazione e il dispositivo, tra una misura e l'altra, viene pulito con milliQ. Il protocollo è così strutturato:

- pulizia del sensore con milliQ;
- deposizione della goccia di soluzione ( $90\mu L$ ) sul sensore;
- misura dell'OD;
- attesa tra i 15-17 minuti;
- misura EIS;
- rimozione goccia e pulizia con milliQ;
- attesa di 30 minuti;
- riposizionamento della goccia e ripetizione del protocollo.

## 4.1 Campioni nel caso ideale

Per prima cosa si è osservato l'andamento di batteri e fagi in un caso ideale, privo di latte. Poichè i fagi sono sospesi in una soluzione salina, *phages buffer (PB)*, nei campioni di controllo negativo (CN) e di batteri (L.L.) viene aggiunta una quantità di PB, tabella (4.1). Questo permette di valutare la variazione di  $R_{CT}$  dovuta unicamente al cambiamento della concentrazione di batteri, escludendo altre cause.

Componenti	CN	L.L	L.L. + Fagi
20mM FeCN in M17	$1000\mu L$	$2000\mu L$	$2000\mu L$
Buffer	$160\mu L$	$320\mu L$	/
Batteri (L.Lactis)	/	$1400\mu L$	$1400\mu L$
Fagi $1e09$ PFU/ml	/	/	$320\mu L$
M17	$840\mu L$	$280\mu L$	$280\mu L$
<b>Volume finale</b>	$2000\mu L$	$4000\mu L$	$4000\mu L$

**Tabella 4.1:** Composizione delle soluzioni nel caso ideale.

La concentrazione di batteri viene calcolata secondo la formula:

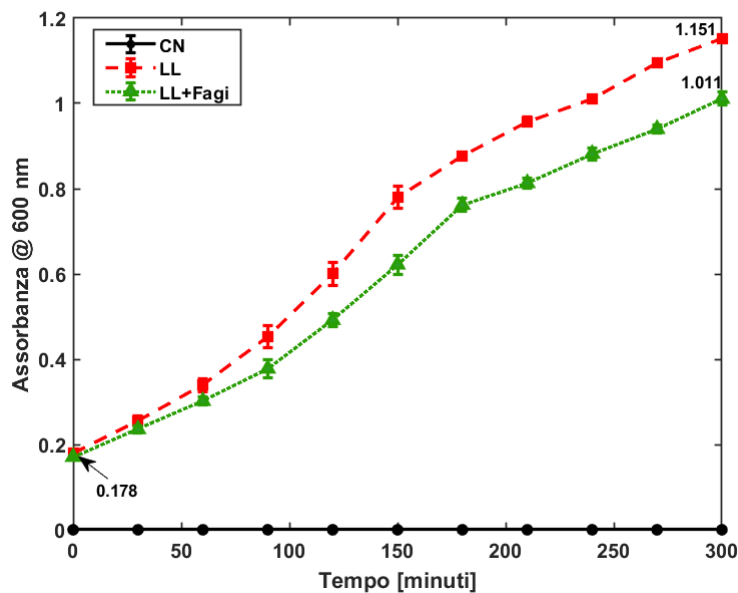
$$C_{in}V_{in} = C_{fin}V_{fin} \quad (4.1)$$

dove  $C$  e  $V$  sono rispettivamente concentrazione e volume della soluzione.

Quindi, dall'OD iniziale dei batteri nel flacone, ovvero i batteri che sono stati lasciati crescere la notte in incubatore a  $30^\circ$  e agitati a 150 RPM, si calcola il volume da inserire in soluzione per avere un  $OD \sim 0.15$ .

Per le misure è stato utilizzato il protocollo di *spill-out* descritto precedentemente: le soluzioni sono state misurate ogni 30 minuti.

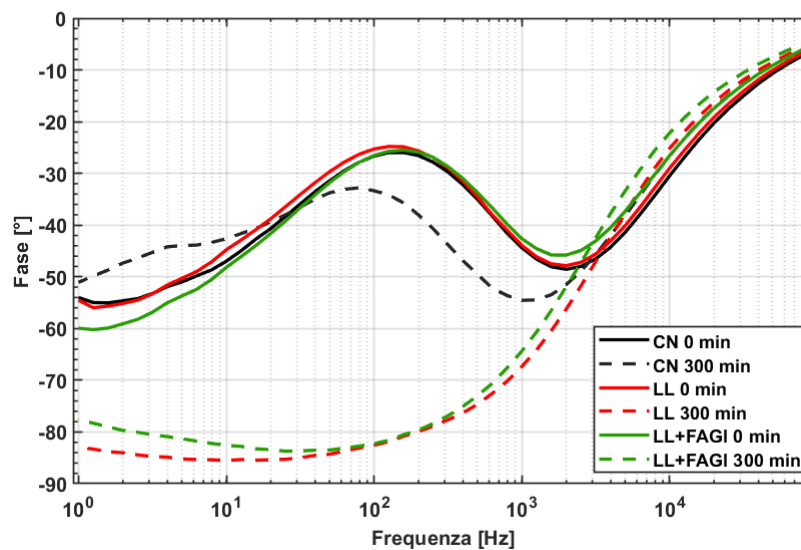
Nella figura 4.3 viene mostrata l'evoluzione della crescita batterica in assorbanza.



**Figura 4.3:** Misura di assorbanza a  $600nm$  in funzione del tempo del controllo negativo, dei batteri e dei fagi.

La soluzione di controllo (linea nera) è stata utilizzata come *base line* per le altre misure e, come si può osservare, rimane costante a 0, quindi non c'è stata contaminazione esterna. Osservando invece la curva rossa e verde, rispettivamente dei batteri e dei fagi, si può notare come nei primi 60 minuti la differenza è trascurabile entro gli errori statistici di misura. Successivamente, il tasso di crescita dei batteri risulta superiore a quello dei fagi, diventando sempre più importante. Questo distacco tra le due curve indica che i fagi rallentano la crescita batterica senza inibirla completamente; ciò può essere dovuto al fatto che i fagi in esame sono virus del latte e quindi in una condizione ideale, priva di latte, non riescono a replicarsi fino a raggiungere una quantità tale da ottenere una completa lisi dei batteri.

Nella figura 4.4 è messo in evidenza il comportamento dei tre campioni nel diagramma di Bode delle fasi. L'andamento mostra come all'aumentare della quantità di batteri presenti in soluzione la fase diminuisce. Infatti, si può notare che a 300 minuti le curve di fagi e batteri sono abbassate notevolmente rispetto alla soluzione di controllo e tra loro non mostrano grande differenza, a conferma del fatto che i fagi non stanno inibendo completamente la crescita batterica.

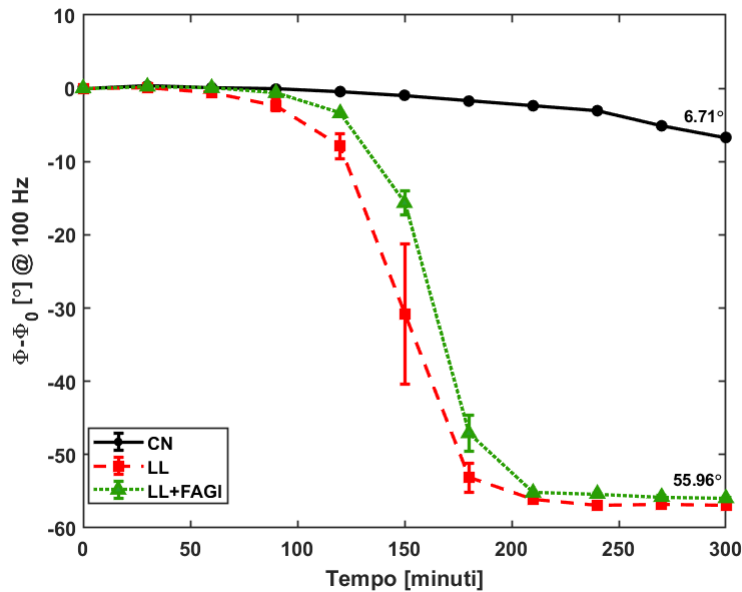


**Figura 4.4:** Diagramma di Bode delle fasi del controllo negativo, dei batteri e dei fagi.

Si può quindi concludere che anche la fase è un buon metodo per rilevare una variazione elettrochimica data dal cambiamento della concentrazione di microrganismi nella soluzione.

Per questo è stata analizzata più approfonditamente la fase in funzione del tempo ad una determinata frequenza. Si è scelto 100 Hz perchè, visivamente, è il punto in cui la differenza tra caso iniziale e finale è massimo, figura 4.5. Dalla figura risalta che nei primi 60 minuti la differenza tra le curve è trascurabile, come si era visto anche in assorbanza; dopo 120 minuti la differenza inizia a notarsi fino ad arrivare a 300 minuti dove il controllo negativo (curva nera) mostra una differenza di fase di  $6.71^\circ$ , mentre i fagi e i batteri (rispettivamente curva verde e rossa) hanno una differenza di fase di circa  $56^\circ$ .

Un altro parametro che permette di rilevare la presenza di contaminanti in soluzione è la resistenza di trasporto di carica,  $R_{CT}$ ; infatti, aumentando la quantità

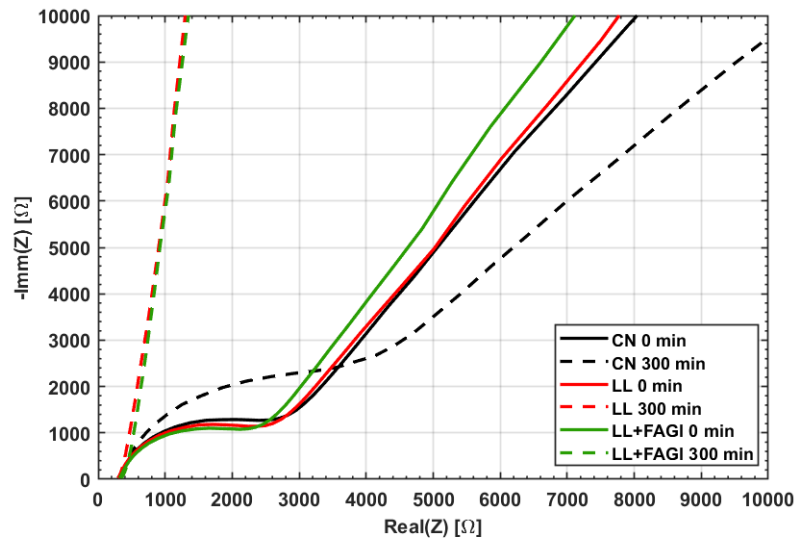


**Figura 4.5:** Differenza di fase misurata a 100 Hz del controllo negativo, dei batteri e dei fagi.

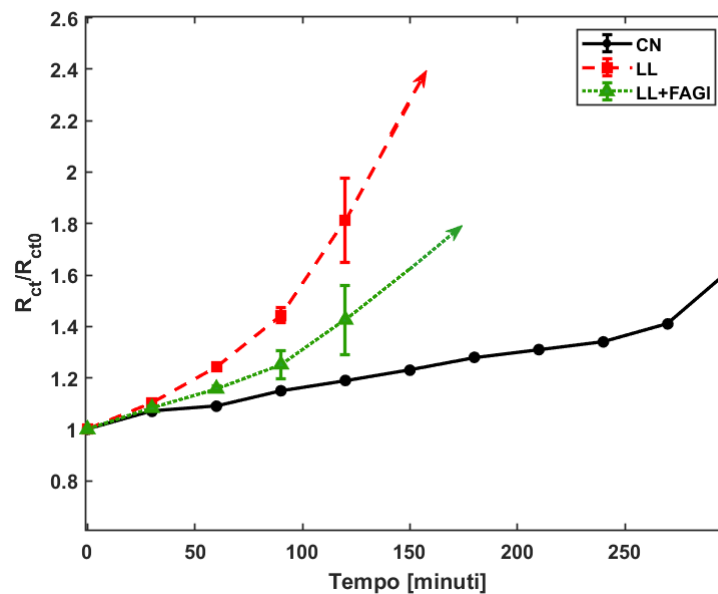
di batteri che si depositano sul sensore diminuisce il passaggio di elettroni, aumentando la resistenza. Questo è visibile con il diagramma di Nyquist perchè, come visto nel capitolo 2, l'aumento del diametro della semicirconferenza corrisponde ad un aumento della  $R_{CT}$  e quindi della concentrazione di batteri in soluzione.

Nella figura 4.6 si osserva il diagramma di Nyquist: all'inizio i tre campioni mostrano un comportamento simile, infatti le curve si sovrappongono, dopo 300 minuti invece, nel caso di batteri e fagi, non è più possibile osservare una semicirconferenza, perchè la quantità di batteri depositata sul sensore blocca completamente il passaggio di carica. In questo caso non è possibile descrivere il sistema con il modello di Randles, quindi non si riesce a calcolare la resistenza di trasporto di carica.

Nella figura 4.7 viene mostrato l'andamento di  $R_{CT}$ , normalizzato rispetto al valore iniziale a tempo 0, in funzione del tempo. Quello che si osserva è che il controllo negativo rimane circa costante nel tempo, il lieve aumento osservabile è dovuto al fatto che mano a mano che vengono eseguite le misure, anche se i sensori vengono lavati, comunque qualche componente rimane a coprire il sensore, aumentando la resistenza, ma in maniera trascurabile. Al contrario, nelle curve dei campioni in cui sono presenti i batteri (rossa dei soli batteri, verde batteri e fagi) c'è un aumento notevole del rapporto  $\frac{R_{CT}}{R_{CT0}}$  in funzione del tempo.



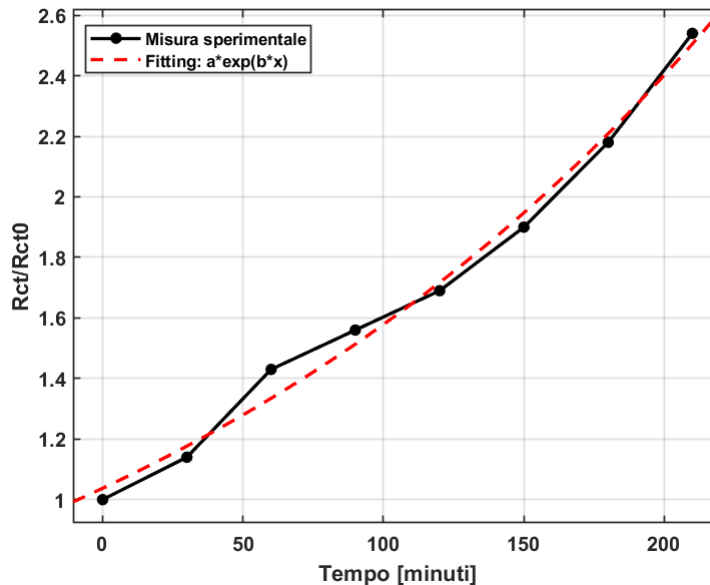
**Figura 4.6:** Diagramma di Nyquist del controllo negativo, dei batteri e dei fagi.



**Figura 4.7:**  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo del controllo negativo, dei batteri e dei fagi.

Questo conferma l'andamento della crescita batterica osservata anche in assenza. La differenza tra la curva rossa e verde inoltre conferma che c'è attività di lisi, ma non sufficiente da inibire completamente la crescita batterica. Nel caso in esame la resistenza dei batteri e dei fagi non è più calcolabile dopo 120 minuti, ma, eseguendo un fit delle curve, esempio in figura 4.8, si può vedere come l'an-

damento sia esponenziale.



**Figura 4.8:** Esempio di fit con modello esponenziale per il rapporto  $\frac{R_{CT}}{R_{CT_0}}$ .

La resistenza di trasporto di carica quindi risulta un utile strumento di rilevamento per la presenza di batteri e fagi in soluzione, in quanto si è dimostrata essere un parametro sensibile alla crescita batterica e alla lisi dei fagi.

In conclusione si può affermare che il principio di rilevamento si basa principalmente su una misura differenziale tra una soluzione di riferimento non contaminata e una contenente microrganismi da valutare. Quindi, se analizzando la soluzione di interesse si nota una variazione sostanziale dei parametri elettrochimici, si può confermare la presenza di batteri e di fagi.

## 4.2 Campioni con latte

Poichè il focus della tesi è la caratterizzazione di un biosensore per rilevare la presenza di batteriofagi del latte, nei prossimi paragrafi si analizzeranno casi sempre più prossimi ad una situazione reale.

### 4.2.1 Latte purificato

Come primo studio, si è osservato il comportamento di un sistema in cui, in soluzione, viene aggiunto del latte precedentemente trattato, *latte purificato*, da



cui è stata rimossa la parte grassa e la caseina. Il protocollo è il seguente (le quantità si riferiscono a 15mL di latte):

- centrifugare a 10'000 RPM per 5 minuti il latte da frigo, 6/7°C;
- estrarre il surnatante ( $\sim 9mL$ ): rimossa la parte grassa;
- abbassare da 6.5 a 4.6 il pH del surnatante per far precipitare la caseina: aggiungere circa 70 $\mu L$  di HCl 37% al surnatante, eventualmente aggiungere NaOH per alzare il pH. In questo modo il latte caglia;
- centrifugare a 10'000 RPM per 5 minuti il latte cagliato;
- prelevare il surnatante e conservare in frigorifero.

Le soluzioni sono state preparate sempre aggiungendo del *phages buffer* nel campione del controllo negativo e dei batteri, inoltre è stato aggiunto a tutte e tre le soluzioni del latte purificato, tabella 4.2.

Componenti	M	M+L.L	M+L.L.+Fagi
20mM FeCN in M17	1000 $\mu L$	2000 $\mu L$	2000 $\mu L$
Buffer	120 $\mu L$	240 $\mu L$	/
Batteri (L.Lactis)	/	500 $\mu L$	500 $\mu L$
Fagi 1e09 PFU/ml	/	/	240 $\mu L$
M17	760 $\mu L$	1020 $\mu L$	1020 $\mu L$
Latte purificato	120 $\mu L$	240 $\mu L$	240 $\mu L$
<b>Volume finale</b>	2000 $\mu L$	4000 $\mu L$	4000 $\mu L$

**Tabella 4.2:** Composizione delle soluzioni nel caso del latte purificato.

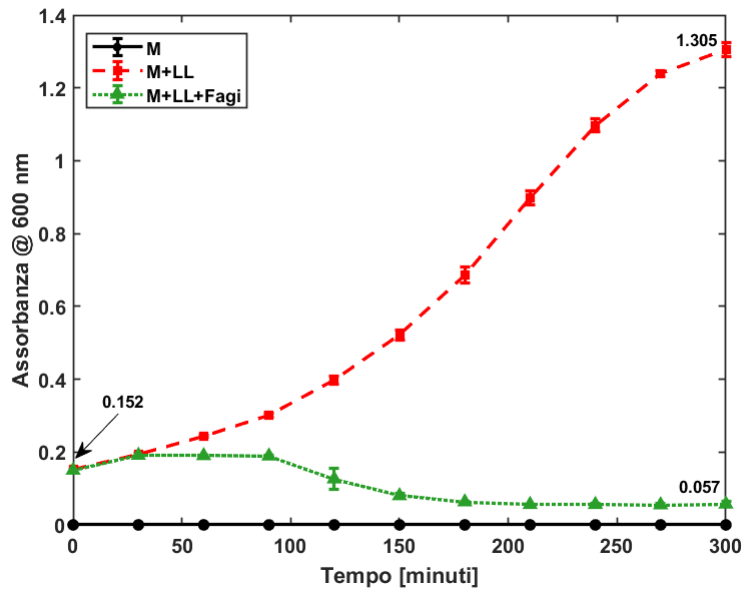
La concentrazione dei batteri viene sempre calcolata utilizzando la formula 4.1, per ottenere un OD di circa 0.15.

La concentrazione di fagi effettiva è  $\sim 6 \cdot 10^7$  PFU/mL, calcolata con 4.1.

Per le misure è stato utilizzato il protocollo *spill-out*, misurando le soluzioni ogni 30 minuti.

Nella figura 4.9 viene mostrato l'andamento della crescita nel tempo dei batteri e dei fagi in assorbanza. La soluzione di controllo<sup>2</sup> (linea nera) è stata utilizzata come *base line* per le altre misure ed è approssimativamente stabile a 0 per tutti e 300 minuti, confermando che non è avvenuta una contaminazione indesiderata. La curva rossa dei batteri (M+LL) e quella verde dei fagi (M+LL+Fagi) nei primi

<sup>2</sup>Il controllo negativo viene indicato con M, perchè si riferisce alla soluzione ideale a cui è stato aggiunto il latte purificato.

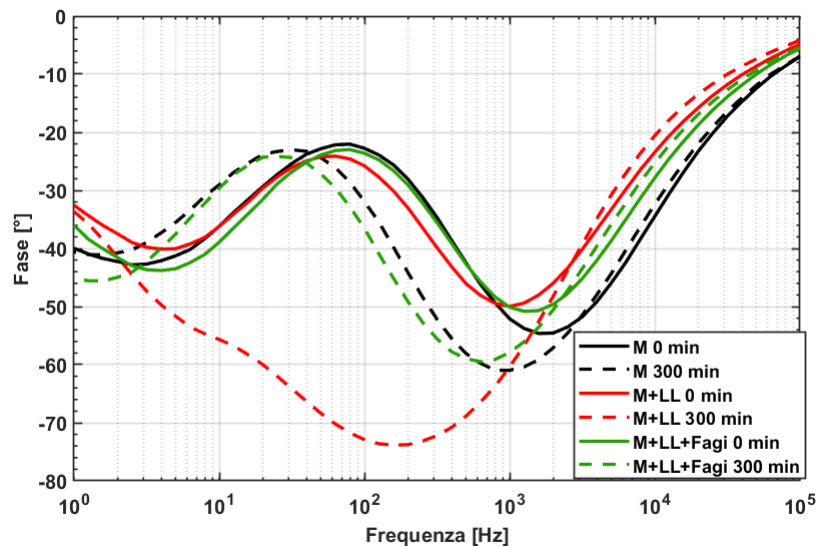


**Figura 4.9:** Misura di assorbanza a  $600\text{nm}$  in funzione del tempo del controllo negativo, dei batteri e fagi con latte purificato.

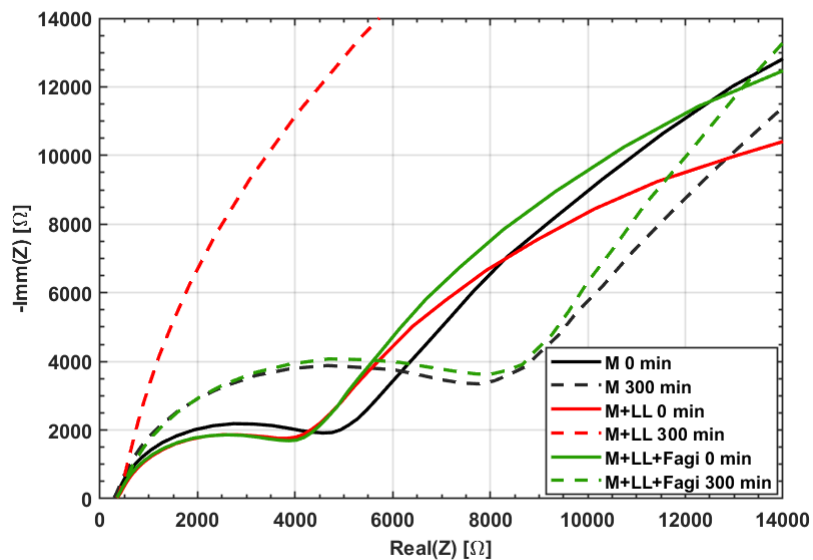
minuti mostra uno stesso andamento; dopo 90 minuti: la curva dei batteri inizia ad aumentare rapidamente fino ad arrivare ad un OD di  $\sim 1.3$ , mentre quella della soluzione contenente i fagi inizia a diminuire fino a raggiungere un OD quasi uguale a zero ( $\sim 0.057$ ). Questo mostra, in maniera evidente, che l'attività di lisi dei fagi domina sulla crescita dei batteri, fino ad inibirli completamente.

Nella figura 4.10 viene mostrato il diagramma di Bode delle fasi per il controllo negativo (curva nera), il campione dei batteri (curva rossa) e quello dei fagi (curva verde). La curva del controllo negativo evidenzia un notevole spostamento in frequenza rispetto al caso ideale (figura 4.4), dovuto alla deposizione di alcuni componenti residui del latte sulla superficie del sensore, che aumentano la resistenza di trasporto di carica. La curva rossa, a 300 minuti, evidenzia un notevole slittamento di fase, analogo al caso ideale, che conferma la proliferazione dei batteri; al contrario quella dei fagi si comporta come il controllo negativo, evidenziando come i fagi blocchino completamente la crescita batterica.

Questo è evidente anche dal diagramma di Nyquist, figura 4.11, in cui, nel caso del campione dei fagi (curva verde), alle alte/medie frequenze dopo 300 minuti è ancora chiaramente visibile un semicerchio. La curva rossa dei batteri, invece, mostra un grande aumento dell'impedenza a 300 minuti, come succede nel caso ideale (figura 4.6). Questo dimostra che la presenza di latte purificato non influenza la crescita batterica, ma aiuta l'attività di lisi dei fagi.

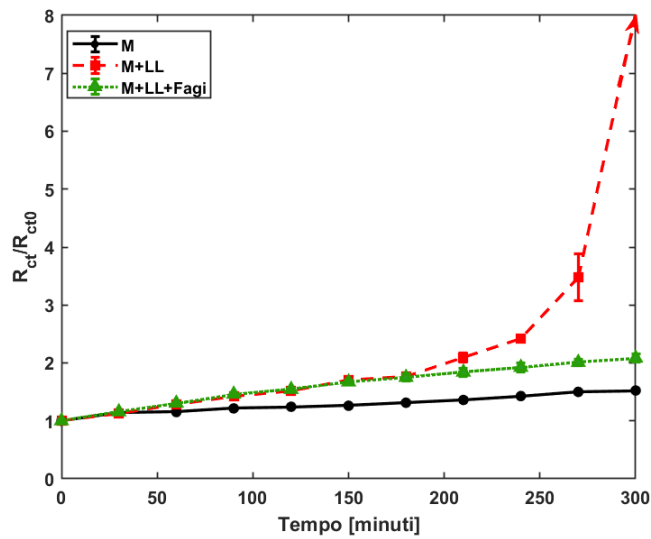


**Figura 4.10:** Diagramma di Bode delle fasi per il controllo negativo (M), i batteri (M+LL) e i fagi (M+LL+Fagi) con latte purificato.



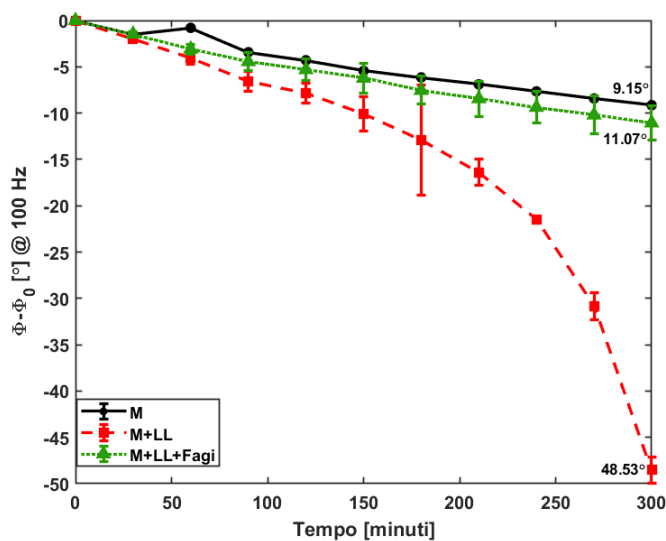
**Figura 4.11:** Diagramma di Nyquist del controllo negativo (M), dei batteri (M+LL) e dei fagi (M+LL+Fagi) con latte purificato.

La crescita batterica e la sua totale inibizione sono osservabili chiaramente anche dai valori normalizzati di  $R_{CT}$ , figura 4.12. Dal grafico è evidente che dopo 180 minuti l'impedenza del campione dei batteri si distacca da quello dei fagi. Infatti, a 240 minuti la resistenza normalizzata dei batteri arriva ad essere circa



**Figura 4.12:**  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo del controllo negativo (M), dei batteri (M+LL) e dei fagi (M+LL+Fagi) con latte purificato.

2.5, mentre quella dei fagi di circa 1.9. La freccia tratteggiata per la curva rossa indica un aumento non quantificabile di  $R_{CT}$ , infatti non è più possibile calcolarla usando il modello di Randles. Invece, la resistenza dei fagi, come del controllo negativo, mostra un aumento lineare, dovuto ai residui di latte che rimangono sull'elettrodo dopo ogni misura.



**Figura 4.13:** Differenza di fase misurata a 100 Hz del controllo negativo (M), dei batteri (M+LL) e dei fagi (M+LL+Fagi) con latte purificato.

Un ulteriore studio per osservare la differenza di risposta tra batteri e fagi è quello della differenza di fase nel tempo a 100 Hz, figura 4.13. In questo caso, similmente al grafico dell'assorbanza, si nota un distanziamento tra la curva rossa dei batteri e quella verde dei fagi già dopo 150 minuti. A 300 la fase dei batteri ha subito una notevole diminuzione, la differenza si stima essere di circa  $49^\circ$ , mentre il campione di fagi non si è scostato di molto, rimanendo intorno gli  $11^\circ$ .

Da questo esperimento si può quindi affermare che il latte purificato non influenza la crescita dei batteri, che aumenta similmente al caso ideale, ma influenza notevolmente l'attività dei fagi.

#### 4.2.1.1 Diverse concentrazioni di fagi

A questo punto, verificato che il latte purificato funziona, si è provato a vedere la sensibilità del sensore analizzando la risposta del sistema a diverse concentrazioni di fagi. Si è quindi diluita<sup>3</sup> 1:10 e 1:100 la concentrazione di fagi iniziale,  $10^9$  PFU/mL.

Le soluzioni utilizzate per questo esperimento sono riportate in tabella 4.3.

Componenti	Batteri	Fagi	Fagi 1a10	Fagi 1a100
20mM FeCN in M17	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Buffer	120 $\mu$ L	/	/	/
Batteri (L. Lactis)	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Fagi 1e09 PFU/ml	/	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
M17	260 $\mu$ L	260 $\mu$ L	260 $\mu$ L	260 $\mu$ L
Latte purificato	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
<b>Volume finale</b>	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L

**Tabella 4.3:** Composizione delle soluzioni a diverse concentrazioni di fagi con il latte purificato.

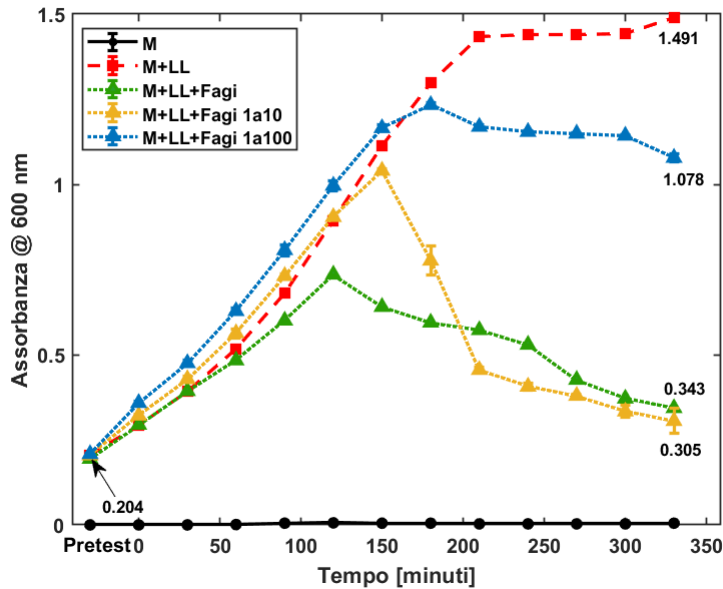
La soluzione del controllo negativo è rimasta invariata rispetto a quella riportata in tabella 4.2, per questo non è stata inserita in tabella 4.3.

Le effettive concentrazioni di fagi rilevate dal sensore sono minori rispetto a quelle inserite, perchè vengono ulteriormente diluite dai componenti della soluzione; pertanto la concentrazione finale di fagi in soluzione, nei tre casi, risulta essere rispettivamente, secondo la formula 4.1, di  $6 \cdot 10^7$  PFU/mL,  $6 \cdot 10^6$  PFU/mL e  $6 \cdot 10^5$  PFU/mL.

<sup>3</sup>Diluizioni 1:10: a partire da una soluzione contenente la concentrazione iniziale si prelevano 30 $\mu$ L che verranno inseriti in una provetta contenente 270 $\mu$ L di phages buffer. A seguire, per avere una diluizione 1:100, da quest'ultima provetta verranno nuovamente prelevati 30 $\mu$ L e inseriti in un'ulteriore provetta contenente phages buffer 270 $\mu$ L.

Dalle misure di assorbanza, figura 4.14, eseguite ogni 30 minuti seguendo il protocollo di *spill-out*, quello che si riscontra è che la crescita batterica (curva rossa) è ben visibile. Dopo 300 minuti l'assorbanza raggiunge  $\sim 1.5$ .

Il controllo negativo, linea nera, rimane costante a zero, quindi sappiamo che

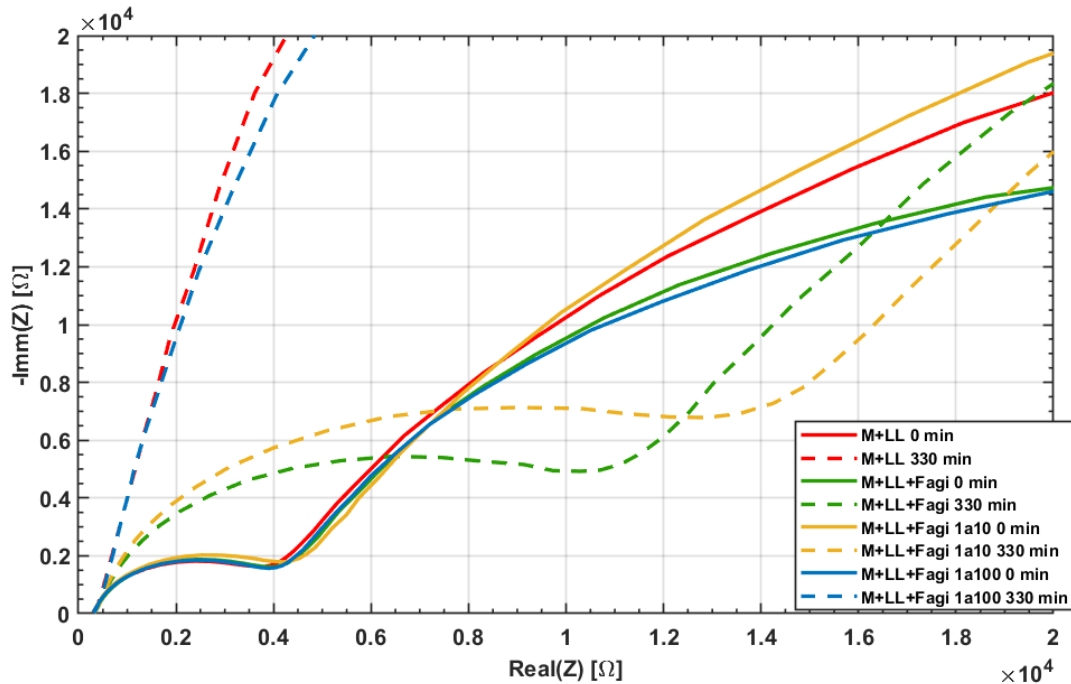


**Figura 4.14:** Misura di assorbanza a  $600\text{nm}$  in funzione del tempo dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

le cuvette non hanno avuto contaminazioni esterne. Dalle curve dei fagi si può notare che quella con la concentrazione iniziale (curva verde) e quella con i fagi diluiti 1:10 (curva gialla) nei primi minuti seguono l'andamento della curva batterica, ma rispettivamente a 120 ( $OD \sim 0.8$ ) e 150 ( $OD \sim 1$ ) minuti la loro attività di lisi inizia, fino all'annichilimento dei batteri: dopo 300 minuti le OD risultano intorno a 0.3. Al contrario i fagi diluiti 1:100 (curva blu) non sono sufficienti a bloccare la proliferazione dei batteri; si nota però chiaramente la presenza dei fagi perchè dopo 300 minuti l'OD risulta essere più bassa rispetto a quella dei batteri ( $\sim 1$ ), quindi c'è attività di lisi, ma non abbastanza da portare ad una inibizione della crescita batterica.

Queste considerazioni sono confermate anche dalle misure elettrochimiche. Il diagramma di Nyquist, in figura 4.15, infatti mostra che, nel caso dei fagi a concentrazione iniziale (linea verde tratteggiata) e quelli diluiti 1:10 (linea gialla tratteggiata), la semicirconferenza è cresciuta rispetto al tempo 0, ma è ancora ben visibile, quindi è possibile utilizzare il modello di Randles per calcolare la  $R_{CT}$ . L'aumento della semicirconferenza è dovuta al fatto che la crescita bat-

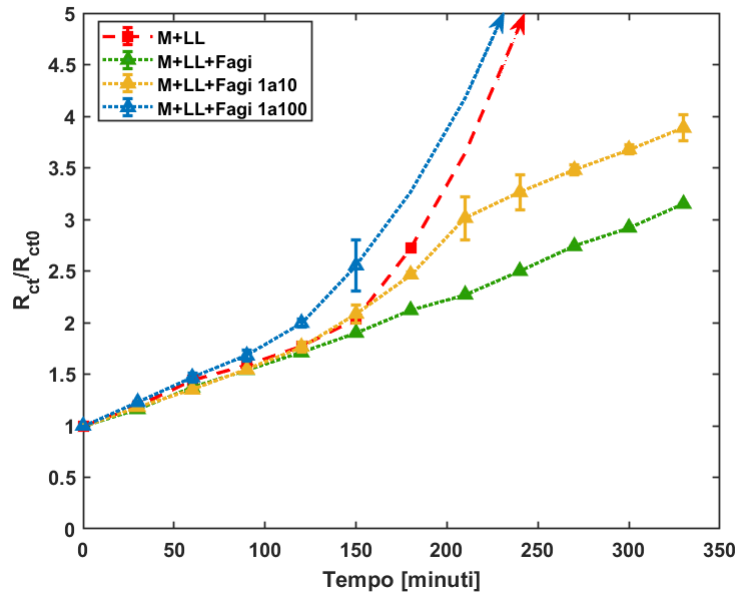
terica arriva ad un'alta concentrazione prima di venir inibita, questo comporta quindi che sull'elettrodo rimangono dei residui di batteri che, insieme a quelli del latte, diminuiscono il trasporto di carica. Al contrario, per i batteri (linea rossa



**Figura 4.15:** Diagramma di Nyquist dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

tratteggiata) e per i fagi diluiti 1:100 (linea blu tratteggiata) la curva non è più modellabile con la cella di Randles, in quanto la semicirconfenza alle alte/medie frequenze non è più visibile, la resistenza di trasporto di carica risulta quindi aumentata di ordini di grandezza. Questo conferma il fatto che i batteri crescono e che i fagi diluiti 1:100 non sono sufficienti per bloccare la loro proliferazione.

Un'ulteriore conferma si può ottenere dall'andamento nel tempo dell'impedenza  $R_{CT}$  normalizzata, calcolata utilizzando il modello di Randles, figura 4.16. In questa immagine è ben visibile l'aumento incontrollato della resistenza nel caso dei batteri, linea rossa, e dei fagi diluiti 1:100, linea blu, infatti dopo 180 minuti il modello di Randles non è più utilizzabile e le resistenze mostrano un andamento di crescita esponenziale, coerente anche con i valori di OD misurati in assorbanza. Le curve dei fagi primari (linea verde) e quelli diluiti 1:10 (linea gialla), invece, confermano l'andamento visto con il diagramma di Nyquist, ovvero che la resistenza cresce, ma rimane comunque modellabile con il circuito di Randles.



**Figura 4.16:**  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

Queste considerazioni sono osservabili anche nel diagramma di Bode delle fasi (figura 4.17) e ancora meglio con l'andamento nel tempo della fase rispetto a quella al tempo 0 ad 100 Hz, figura 4.18. Quello che viene evidenziato, da entrambe le figure, è la considerevole diminuzione di fase sia per i batteri (linea rossa tratteggiata) che per i fagi diluiti 1:100 (linea blu tratteggiata): nel loro caso infatti, tra i 40 e 400 Hz, si arriva ad avere una differenza di fase, rispetto al caso a tempo 0, di circa  $55^\circ$ . I fagi primari e quelli diluiti 1:10, contrariamente, mostrano una variazione di fase, rispetto al caso  $t = 0$ , rispettivamente, di  $\sim 11^\circ$  e  $\sim 23^\circ$ . Con questi valori si conferma nuovamente che la concentrazione di fagi più alta, sia quella iniziale che quella diluita 1:10, interrompe totalmente la crescita batterica, diversamente la concentrazione di fagi più diluita non è sufficiente per bloccare la proliferazione dei batteri.

Si può quindi concludere che, in accordo tra le misure di assorbanza e le misure elettrochimiche, la concentrazione di fagi minima che si può rilevare con il latte purificato è di  $10^6$  PFU/mL; con questa concentrazione inoltre il fenomeno è visibile già a 210 minuti.

#### 4.2.1.2 Produzione di nuovi fagi

Utilizzando il protocollo di crescita fagica (cap.3) è stata calcolata una nuova concentrazione di fagi. Da figura 4.19, in cui viene mostrato un controllo negativo,



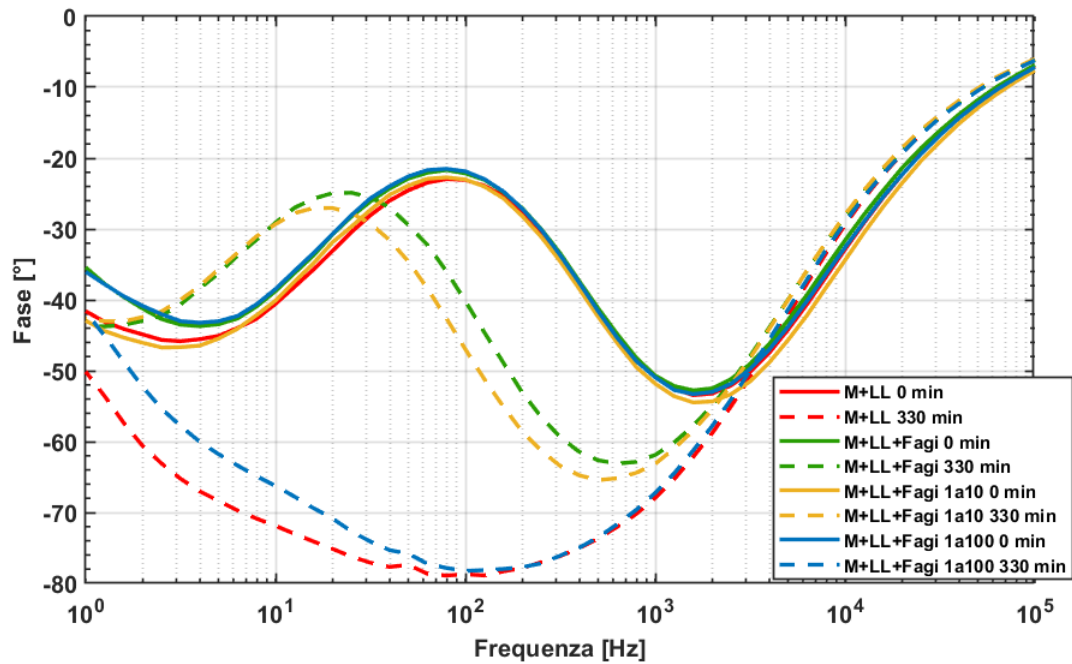


Figura 4.17: Diagramma di Bode delle fasi dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

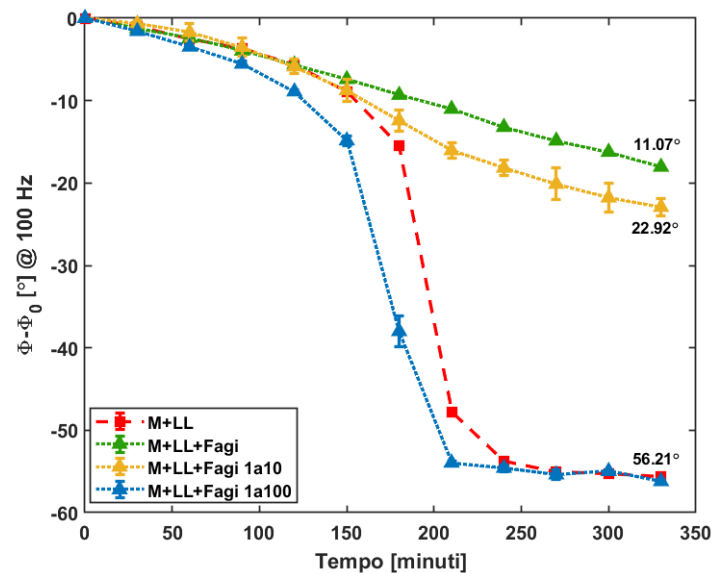


Figura 4.18: Differenza di fase misurata a 100 Hz dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

una crescita batterica e la diluizione di fagi, si è visto che la concentrazione della nuova produzione di fagi diluita, utilizzando phages buffer, a  $1:10^7$ , valore usato precedentemente, inibisce completamente la crescita batterica; non sono infatti



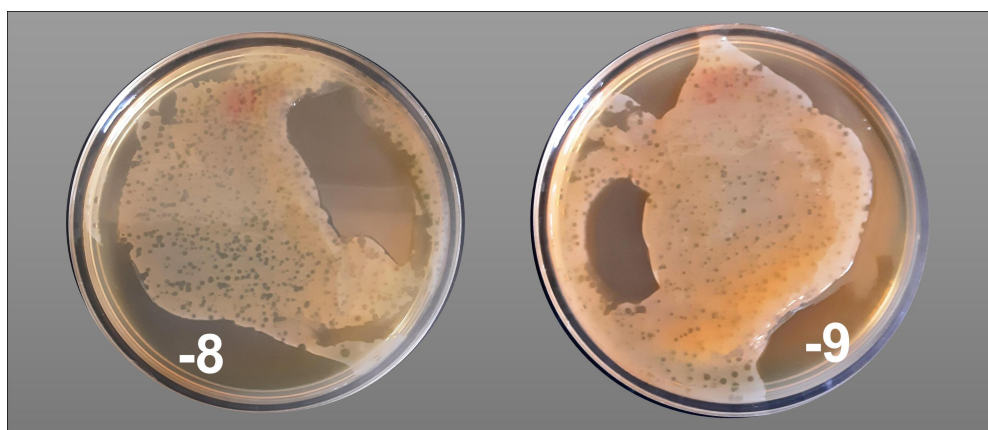
**Figura 4.19:** Calcolo della nuova concentrazione di fagi: controllo negativo (CN), crescita batterica (LL), diluizione della concentrazione di fagi (-7).

La diluizione di fagi mostra una completa interruzione della proliferazione dei batteri; infatti, dalla piastra -7 non si vede segno di zone opache, che indica la presenza di batteri, bensì la piastra è trasparente, quasi come quella del CN.

visibili segni di lisi, cerchi che consentono di calcolare le placche di fagi. Questo significa che la concentrazione iniziale di fagi della nuova produzione è più alta di quella utilizzata finora,  $10^9$  PFU/mL.

La concentrazione di fagi è stata quindi ulteriormente diluita per arrivare ad avere placche di lisi calcolabili. In figura 4.20 viene mostrato il confronto tra diluizione  $1:10^8$ , in cui le placche sono troppe per essere calcolate, e  $1:10^9$ , in cui la quantità di cerchi è misurabile.

Dopo aver calcolato il numero di placche,  $\#placche = 511$  nel caso della di-



**Figura 4.20:** Confronto diluizione dei fagi  $1:10^8$  e  $1:10^9$ .

luizione  $1:10^9$ , si calcola la concentrazione di fagi secondo la formula seguente:

$$C = \frac{\#placche}{V * diluizione} * 50\% \sim 10^{12} PFU/ml \quad (4.2)$$

dove  $C$  è la concentrazione finale di fagi diluita 50% in glicerolo, in modo tale che si possa conservare in freezer senza che avvenga cristallizzazione e quindi rottura dei fagi.  $V = 0.2mL$  è il volume di fagi aggiunto sulla piastra.

Questa è quindi la concentrazione di fase che è stata utilizzata nei successivi esperimenti.

## 4.2.2 Diluzione dei fagi nel latte

Il passo successivo consiste nel diluire i fagi direttamente nel latte da frigo e successivamente applicare il protocollo di purificazione.

### 4.2.2.1 Batteri con solo latte purificato

Per prima cosa si è analizzato il comportamento dei batteri con il solo latte purificato, senza phages buffer.

Nella tabella 4.4 vengono riportare le soluzioni utilizzate<sup>4</sup>.

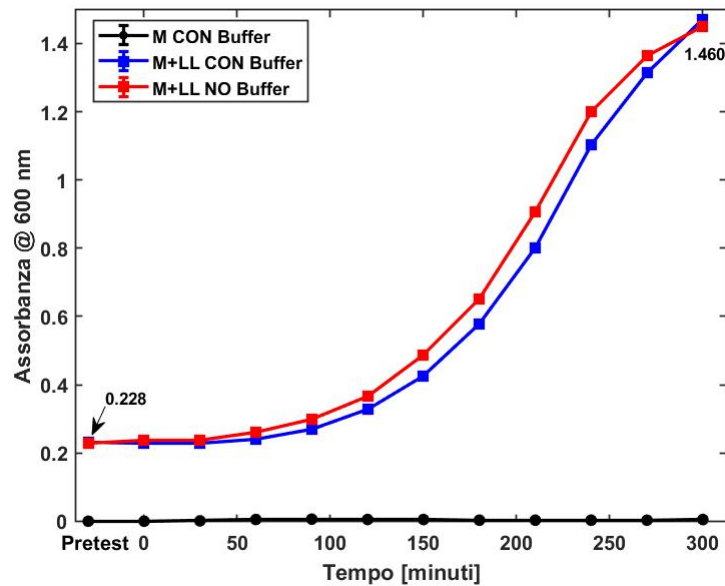
Componenti	M	M+LL CON buffer	M+LL NO buffer
20mM FeCN in M17	1000 $\mu L$	1000 $\mu L$	1000 $\mu L$
Buffer	120 $\mu L$	120 $\mu L$	/
Batteri (L.Lactis)	/	400 $\mu L$	400 $\mu L$
M17	760 $\mu L$	360 $\mu L$	360 $\mu L$
Latte purificato	120 $\mu L$	120 $\mu L$	240 $\mu L$
<b>Volume finale</b>	2000 $\mu L$	2000 $\mu L$	2000 $\mu L$

**Tabella 4.4:** Composizione delle soluzioni dei batteri con solo latte purificato e con latte purificato e phages buffer. M indica il controllo negativo.

Le misure di assorbanza, in figura 4.21, mostrano che la crescita batterica non è influenzata dalla presenza del phages buffer.

Le misure elettrochimiche confermano quanto si evince dalle misure di assorbanza. Osservando il diagramma di Bode delle fasi (figura 4.22) si vede chiaramente che dopo 300 minuti entrambi i campioni hanno una diminuzione di fase: a 100 HZ, la fase, rispetto alla fase iniziale, è diminuita di  $\sim 54^\circ$ . Questo conferma

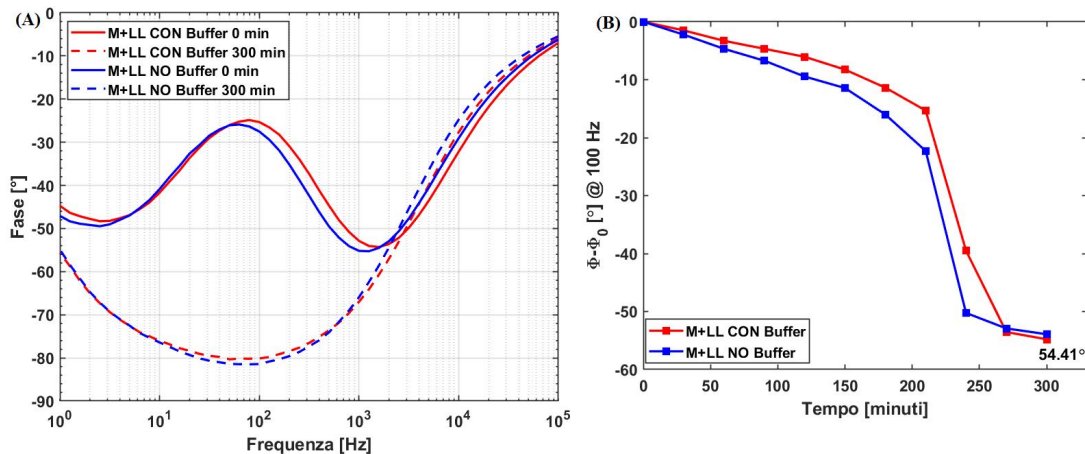
<sup>4</sup>La concentrazione di batteri da mettere in soluzione viene sempre calcolata utilizzando l'equazione 4.1



**Figura 4.21:** Misura di assorbanza a  $600nm$  in funzione del tempo del controllo negativo, batteri CON buffer e NO buffer.

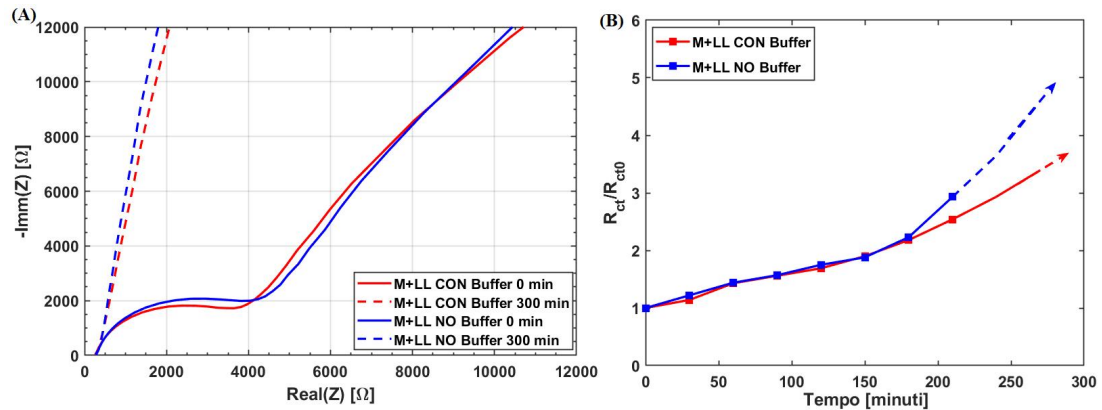
che la presenza del phages buffer è ininfluyente per la crescita batterica.

Il diagramma di Nyquist è un'ulteriore conferma; infatti, in figura 4.23 si vede



**Figura 4.22:** (A) Diagramma di Bode delle fasi per i campioni di batteri CON e NO buffer. (B) Differenza di fase nel tempo calcolata a 100 Hz (destra) per i campioni di batteri CON e NO buffer.

chiaramente che dopo 300 minuti c'è un considerevole aumento della resistenza di trasporto di carica. Si conclude quindi che i batteri possono essere diluiti direttamente con il latte purificato.



**Figura 4.23:** (A) Diagramma di Nyquist per i campioni di batteri CON e NO buffer. (B)  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo per i campioni di batteri CON e NO buffer.

#### 4.2.2.2 Confronto diluizioni di fagi PRE e POST purificazione del latte

Per avere una situazione il più possibile prossima ad un caso reale, si sono diluiti i fagi direttamente nel latte.

Il sistema qui analizzato confronta la risposta del sensore nel caso in cui i fagi vengano diluiti nel latte già purificato (POST) e nel caso in cui i fagi vengano inseriti prima nel latte e poi avvenga la purificazione (PRE).

Il protocollo utilizzato per il caso PRE è il seguente:

- diluizione di  $200\mu L$  di fagi  $10^{12} PFU/ml$  su  $1000\mu L$  di latte da frigo ( $6/7^\circ C$ );
- purificazione del latte, seguendo il protocollo presentato nel paragrafo 4.2.1

Utilizzando l'equazione 4.1 si è stimata la concentrazione di fagi che si ottiene dopo la purificazione del latte:

$$200[\mu L] \cdot 10^{12}[PFU/mL] = 1200[\mu L] \cdot C_{FIN} \Rightarrow C_{FIN} \sim 10^{11} PFU/mL \quad (4.3)$$

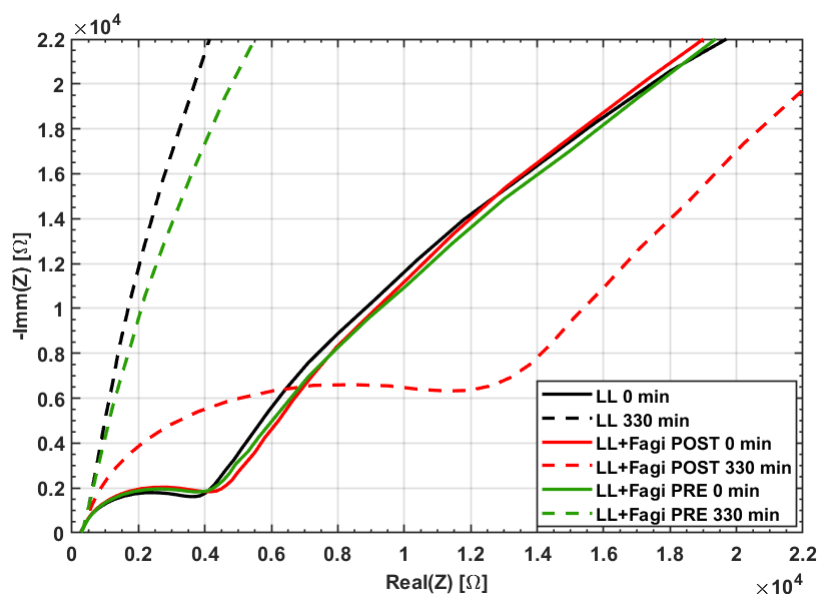
Viene quindi stimato che con la purificazione avvenga una diluizione 1:10 della concentrazione di fagi di partenza, pertanto, anche nelle soluzioni in cui i fagi vengono inseriti dopo la purificazione (POST), si diluirà la concentrazione di 1:10. Le soluzioni utilizzate sono riportate in tabella 4.5.

Dalle misure elettrochimiche si vede che diluendo i fagi prima della purificazione (PRE) non si riesce ad ottenere una completa inibizione della crescita batterica. Infatti, come si può osservare dal diagramma di Nyquist, figura 4.24, i fagi PRE (curva verde) si comportano come i batteri (curva nera): dopo 330

Componenti	CN	Batteri	Fagi POST	Fagi PRE
20mM FeCN in M17	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Batteri (L. Lactis)	/	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Fagi 1e18 PFU/ml	/	/	12 $\mu$ L	/
M17	760 $\mu$ L	360 $\mu$ L	360 $\mu$ L	360 $\mu$ L
Latte purificato	240 $\mu$ L	240 $\mu$ L	240 $\mu$ L	/
(Latte+Fagi) purificato	/	/	/	240 $\mu$ L
<b>Volume finale</b>	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L

**Tabella 4.5:** Composizione delle soluzioni: **POST** indica il campione in cui i fagi sono stati diluiti nel latte già purificato, **PRE** indica il campione in cui i fagi sono stati purificati insieme al latte.

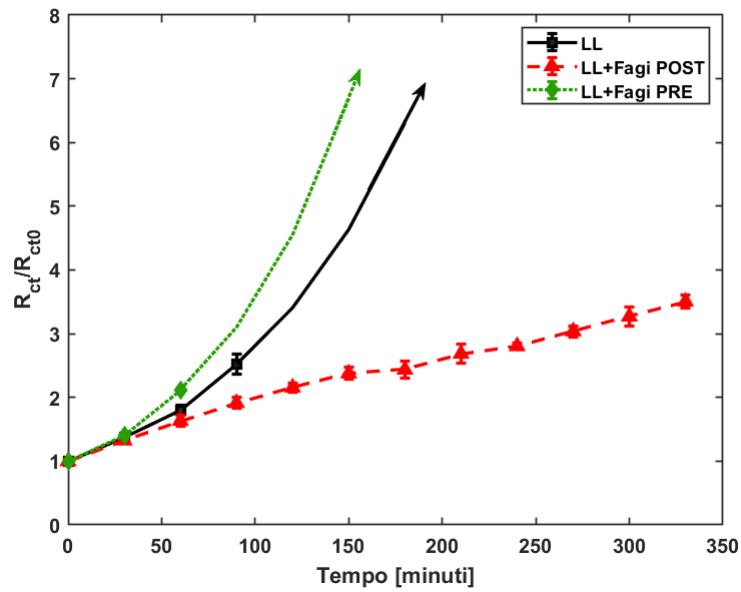
minuti la semicirconferenza della cella di Randles non è più visibile, quindi la resistenza di trasporto di carica è "esplosa", portando alla conclusione che c'è stata una crescita incontrollata di batteri.



**Figura 4.24:** Diagramma di Nyquist del confronto fagi PRE e POST.

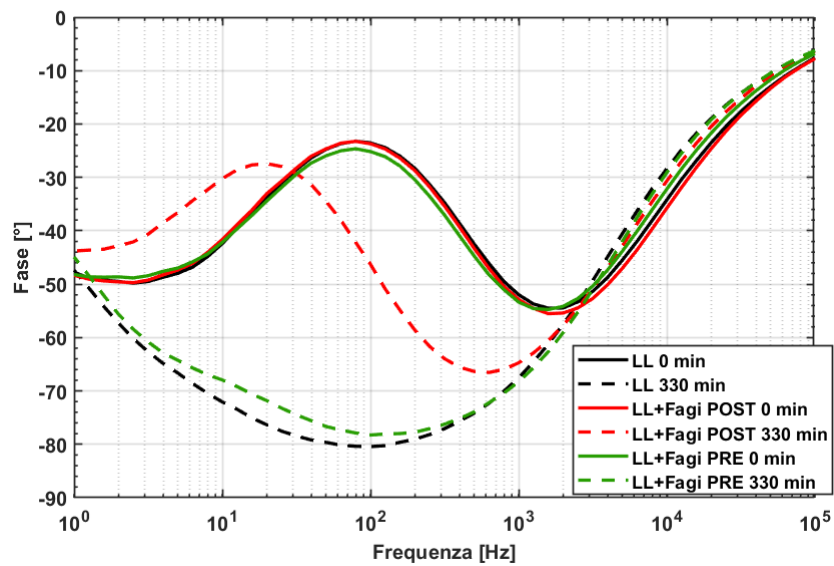
Questo si vede anche dall'andamento nel tempo di  $R_{CT}$  normalizzata, figura 4.25: dove la resistenza di fagi POST (linea rossa) cresce nel tempo in modo lineare a causa dei residui di latte, ma rimane comunque modellabile con Randles per tutto il tempo di rilevazione. Al contrario batteri e fagi PRE hanno un rapporto di impedenza che cresce con andamento esponenziale già dopo 100 minuti.

A sostegno di queste considerazioni viene in aiuto un'analisi sulle fasi. In figura 4.26 viene mostrato il diagramma di Bode delle fasi: dopo 330 minuti i fagi



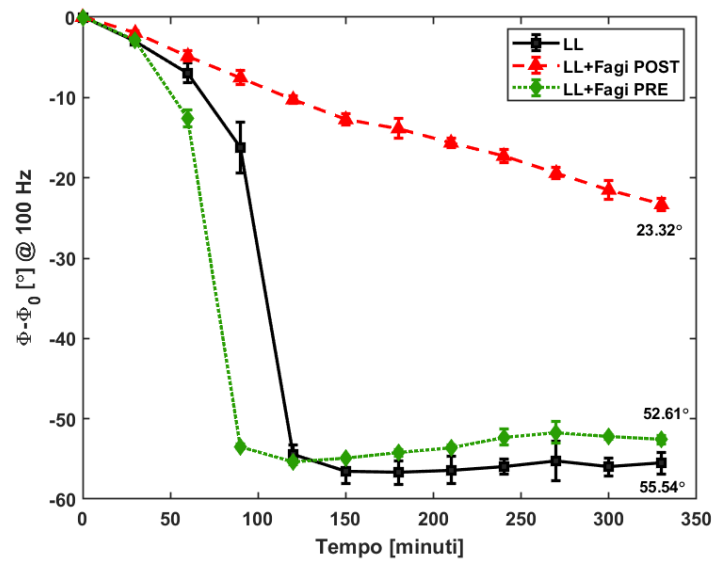
**Figura 4.25:**  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo del confronto fagi PRE e POST.

PRE, similmente ai batteri, presentano una considerevole diminuzione di fase: infatti, calcolando la differenza di fase tra il tempo iniziale e quello finale (figura 4.27), si ottiene un abbassamento di fase di circa  $55^\circ$ . Al contrario i fagi POST



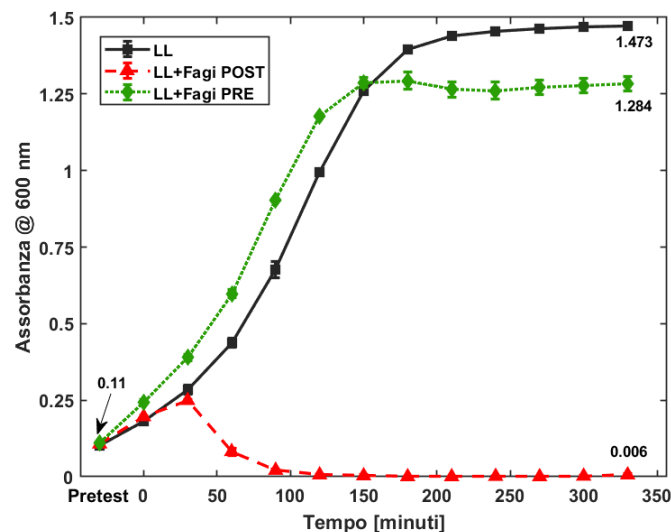
**Figura 4.26:** Diagramma di Bode delle fasi del confronto fagi PRE e POST.

risentono di un lieve slittamento della fase, circa di  $23^\circ$  dopo 330 minuti.



**Figura 4.27:** Differenza di fase nel tempo calcolata a 100 Hz del confronto fagi PRE e POST.

Le misure di assorbanza, in figura 4.28, sono coerenti con quanto visto per le misure elettrochimiche. Il livello più basso di OD dei fagi PRE indica che sono presenti i fagi, ma la quantità non è abbastanza per interrompere la crescita batterica; invece, il campione POST mostra che la crescita viene completamente inibita già dopo 90 minuti.



**Figura 4.28:** Misura di assorbanza a 600nm in funzione del tempo del controllo negativo, batteri, fagi PRE e POST.

Si conclude quindi che il protocollo di diluizione dei fagi nel latte prima della



purificazione non permette di osservare l'inibizione batterica. Probabilmente la doppia centrifuga per rimuovere parte grasse e caseina, elimina gran parte dei fagi diluiti.

### Modifica protocollo e analisi della stabilità

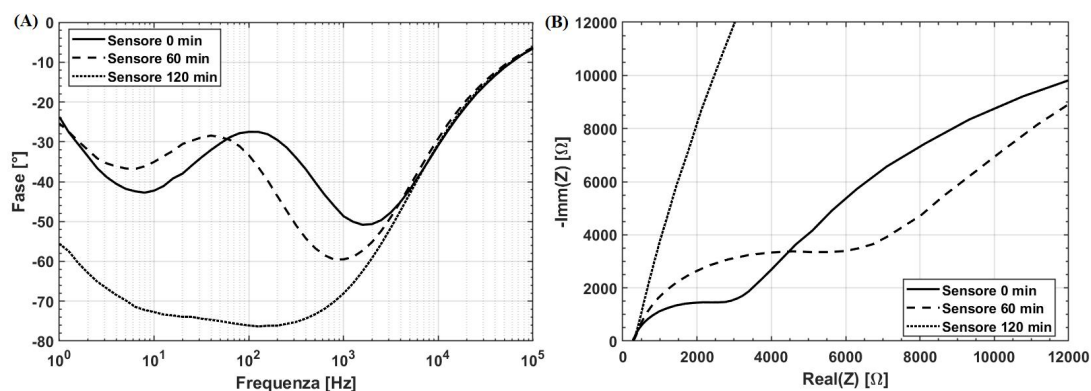
Si è provato a cambiare il protocollo di diluizione di fagi nel latte, facendo una sola centrifuga per 5 minuti a 10'000 RPM invece di due, così da rimuovere solamente la parte grassa.

Per prima cosa è stata studiata, utilizzando il protocollo di *spill-out*, la stabilità del sensore nel tempo utilizzando una concentrazione di latte che mantenesse un basso OD ( $5\mu L$  per un  $OD \sim 0.076$ ).

Componenti	Soluzione
20mM FeCN in M17	$500\mu L$
M17	$495\mu L$
Latte centrifugato	$5\mu L$
<b>Volume finale</b>	<b><math>1000\mu L</math></b>

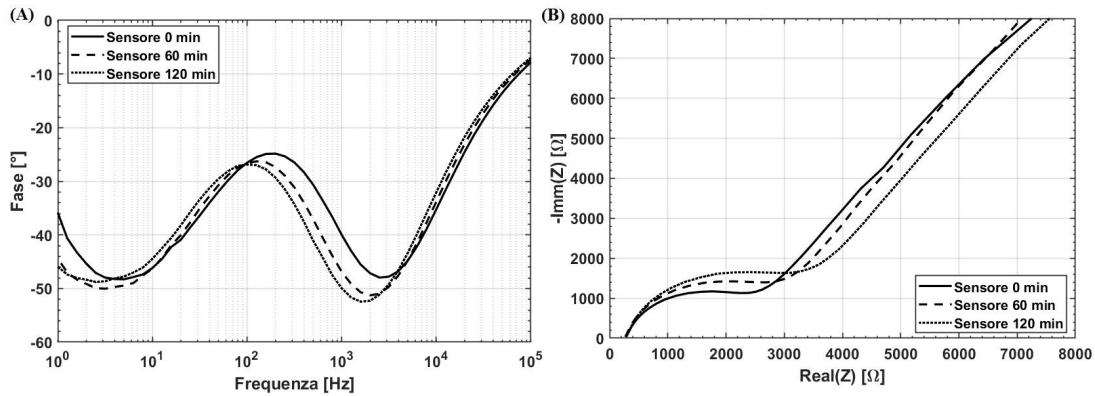
**Tabella 4.6:** Soluzione per verificare la stabilità del sensore con il latte centrifugato una volta sola.

Quello che risulta però è che il sistema non rimane stabile, infatti, come si evince anche dai diagrammi di Bode e Nyquist in figura 4.29, c'è un aumento rilevante della resistenza di trasporto di carica già dopo 120 minuti; questo perché la proteina del latte, che non è stata rimossa, dopo poco tempo ha completamente ricoperto l'elettrodo, impedendo così il passaggio di carica.



**Figura 4.29:** Studio della stabilità del sensore con diagramma di Bode delle fasi (A) e diagramma di Nyquist (B).

Per avere stabilità nelle misure si è provato a diluire 1:10 il latte centrifugato una volta sola con del phages buffer. Utilizzando questa diluizione il sistema risulta stabile, come si può vedere dai diagrammi di Bode e Nyquist in figura 4.30: c'è un aumento della  $R_{CT}$  ma viene considerata accettabile.



**Figura 4.30:** Studio della stabilità del sensore con diagramma di Bode delle fasi (A) e diagramma di Nyquist (B).

Il passo successivo è verificare che il nuovo protocollo non interferisca con la crescita batterica e l'attività di lisi dei fagi.

### Diluizione del latte centrifugato con il phages buffer: analisi della crescita batterica e l'attività fagica.

Al fine di testare se il nuovo protocollo funziona si è analizzato il comportamento dei batteri e dei fagi  $10^{12}$  PFU/mL, diluiti nel latte prima della centrifuga (PRE) e diluiti nel latte già centrifugato (POST). In tutti i casi il latte centrifugato è stato diluito 1:10 con il phages buffer prima di essere inserito in soluzione.

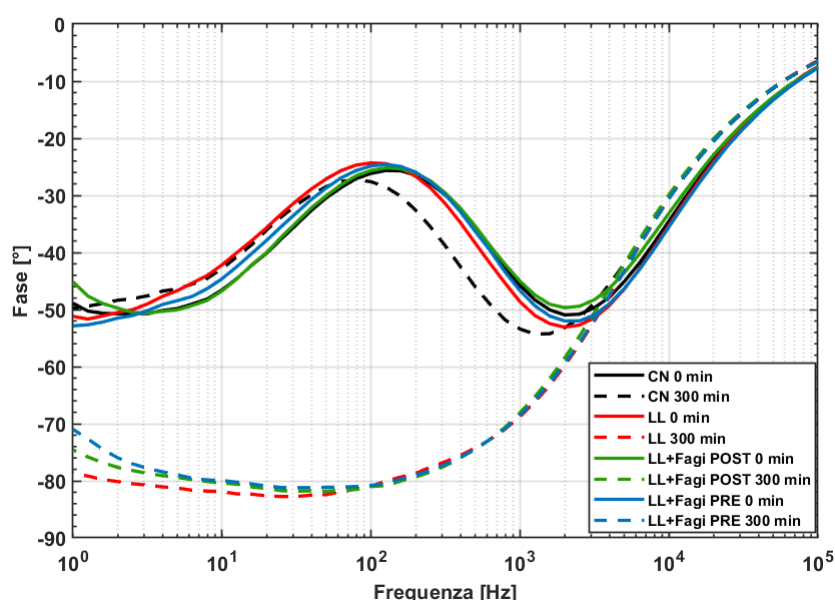
Le soluzioni utilizzate sono riportate in tabella 4.7, dove i due diversi modi di diluizione dei fagi nel latte vengono indicati come:

- ①  $\Rightarrow$  diluizione 1:10 dei fagi nel latte già centrifugato
  - ②  $\Rightarrow$  diluizione 1:10 dei fagi nel latte da frigo  $\Rightarrow$  poi centrifuga
- (4.4)

La figura 4.31, diagramma di Bode delle fasi, dimostra che questo protocollo di diluizione dei fagi non funziona: i batteri crescono in tutti e tre i campioni senza alcuna interferenza da parte dei fagi. Infatti, come si può osservare, sia per la soluzione di batteri che di fagi, c'è un grande spostamento della fase, dopo 300 minuti, verso valori più negativi.

Componenti	CN	Batteri	Fagi POST	Fagi PRE
20mM FeCN in M17	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Batteri (L. Lactis)	/	320 $\mu$ L	320 $\mu$ L	320 $\mu$ L
M17	980 $\mu$ L	660 $\mu$ L	660 $\mu$ L	660 $\mu$ L
Latte centrifugato	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	/	/
Latte centrifugato + fagi	/	/	20 $\mu$ L ①	20 $\mu$ L ②
<b>Volume finale</b>	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L

**Tabella 4.7:** Composizione delle soluzioni di batteri e fagi PRE e POST con il latte centrifugato e diluito nel phages buffer.



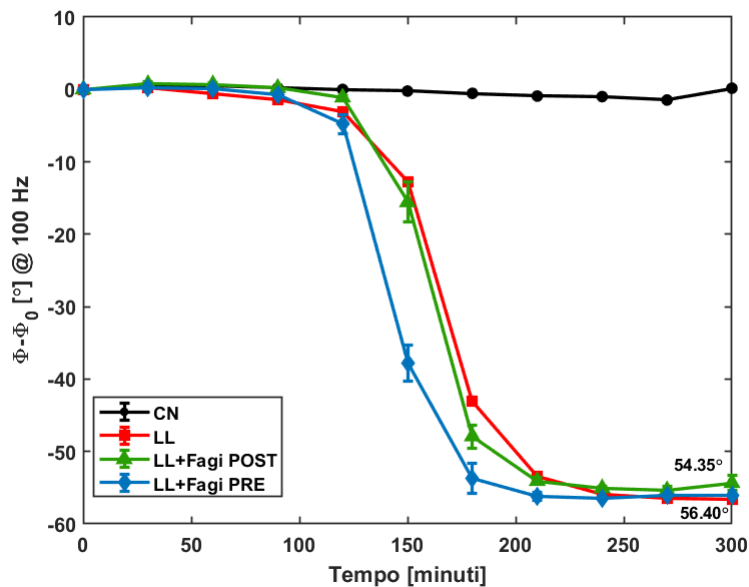
**Figura 4.31:** Diagramma di Bode delle fasi del confronto fagi PRE e POST diluiti con phages buffer.

Rispetto alla fase iniziale si può calcolare che, in tutti e tre i casi, c'è una variazione di circa  $55^\circ$  (si veda la figura 4.32, che mostra l'andamento nel tempo della differenza di fase rispetto alla fase iniziale).

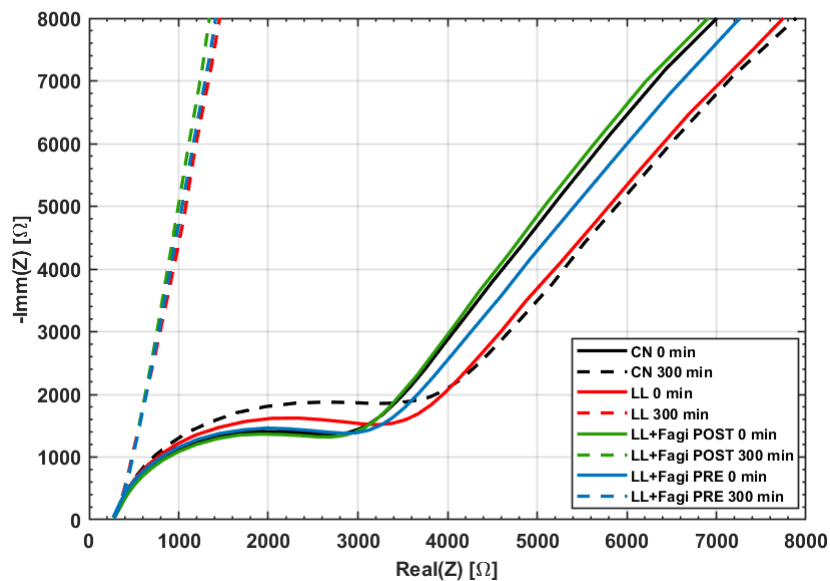
Questo, assieme all'esplosione di  $R_{CT}$  dopo 300 minuti, visibile dal diagramma di Nyquist in figura 4.33, porta a dire che la diluizione del latte centrifugato con il phages buffer non influisce sulla crescita batterica, ma, come si era già visto nel caso ideale (sezione 4.1), non aiuta l'attività fagica.

Le misure di assorbanza, figura 4.34, confermano ciò che è stato visto in elettrochimica: non è possibile fare una distinzione tra l'andamento dei fagi e l'andamento dei batteri.

Risulta necessario definire un nuovo protocollo.



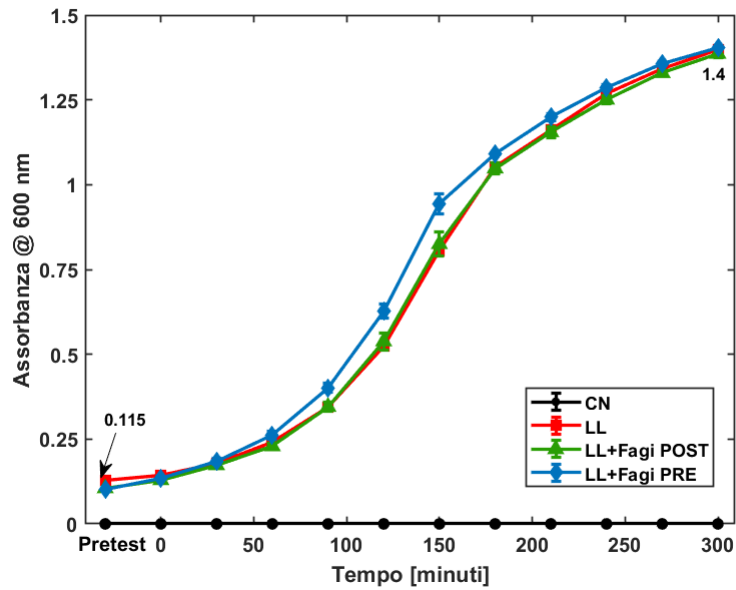
**Figura 4.32:** Differenza di fase nel tempo calcolata a 100 Hz del confronto fagi PRE e POST diluiti con phages buffer.



**Figura 4.33:** Diagramma di Nyquist del confronto fagi PRE e POST diluiti con phages buffer.

### Modifica protocollo e analisi della stabilità

Si è pensato di usare come diluente il latte purificato, perchè nelle soluzioni in cui era presente il latte purificato l'attività fagica era ben visibile. Il protocollo consiste nel fare una diluizione 1:10 del latte, centrifugato una volta sola per 5



**Figura 4.34:** Misura di assorbanza a  $600nm$  in funzione del tempo del controllo negativo, batteri, fagi PRE e POST diluiti con phages buffer.

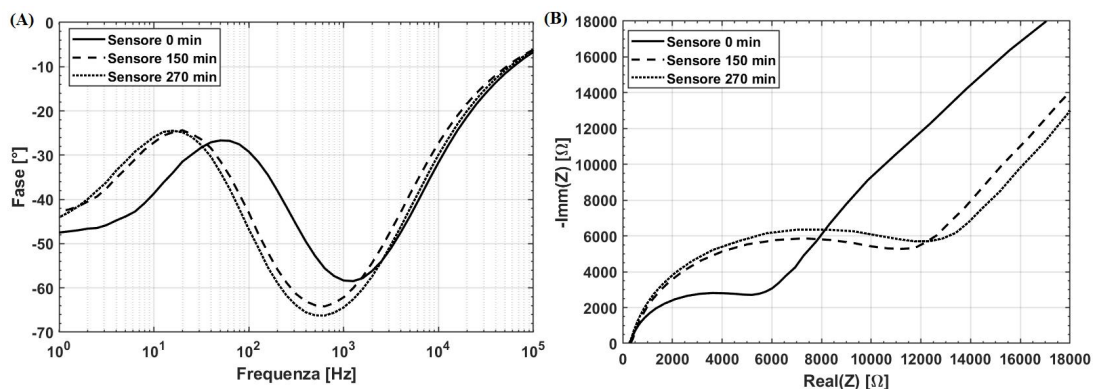
minuti a  $10'000$  RPM, con il latte purificato, trattato secondo il protocollo al paragrafo 4.2.1.

Per prima cosa si è verificata la stabilità del sensore utilizzando la soluzione in tabella 4.8.

Componenti	Soluzione
20mM FeCN in M17	$1500\mu L$
M17	$1320\mu L$
Latte centrifugato	$18\mu L$
Latte purificato	$162\mu L$
<b>Volume finale</b>	<b><math>3000\mu L</math></b>

**Tabella 4.8:** Soluzione per verificare la stabilità del sensore con il latte centrifugato una volta sola diluito nel latte purificato.

Come si può vedere dai diagrammi di Bode e Nyquist, in figura 4.35, utilizzando questa diluizione il sistema rimane stabile anche dopo 270 minuti; c'è un aumento della  $R_{CT}$ , dovuta principalmente ai residui di latte, che viene considerata accettabile.



**Figura 4.35:** Studio della stabilità del sensore con i diagrammi di Bode delle fasi (A) e di Nyquist (B).

### Diluizione del latte centrifugato con il latte purificato: analisi della crescita batterica e l'attività fagica

Si verifica a questo punto se questa nuova diluizione permette di rilevare l'inibizione dei batteri. In questo caso si è voluto vedere direttamente il comportamento dei fagi in una situazione simil reale: prima i fagi vengono diluiti 1:10 nel latte da frigo ( $6/7^{\circ}\text{C}$ ), successivamente vengono centrifugati una volta sola per 5 minuti a  $10'000$  RPM, successivamente il surnatante ottenuto viene diluito 1:10 con il latte purificato.

Le soluzioni usate per i tre campioni sono riportate nella tabella 4.9.

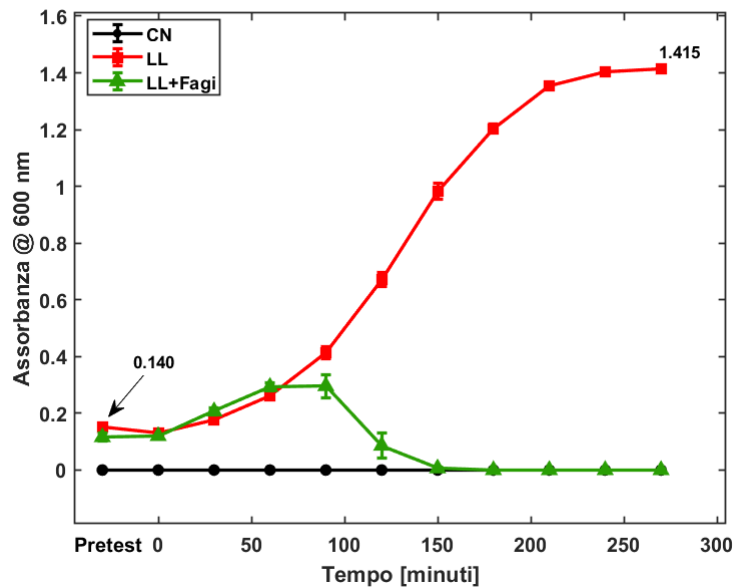
Componenti	CN	LL	LL+Fagi
20mM FeCN in M17	$1000\mu\text{L}$	$1000\mu\text{L}$	$1000\mu\text{L}$
Batteri (L.Lactis)	/	$400\mu\text{L}$	$400\mu\text{L}$
M17	$880\mu\text{L}$	$480\mu\text{L}$	$480\mu\text{L}$
Latte centrifugato	$12\mu\text{L}$	$12\mu\text{L}$	/
(Latte+fagi) centrifugato	/	/	$12\mu\text{L}$
Latte purificato	$108\mu\text{L}$	$108\mu\text{L}$	$108\mu\text{L}$
<b>Volume finale</b>	$2000\mu\text{L}$	$2000\mu\text{L}$	$2000\mu\text{L}$

**Tabella 4.9:** Composizione delle soluzioni in cui viene usato il latte purificato come diluente.

Per le misure è stato utilizzato il protocollo di *spill-out*, misurando le soluzioni ogni 30 minuti. Utilizzando la formula 4.1, si stima una concentrazione di fagi in soluzione di circa  $6 \cdot 10^7$  PFU/mL.

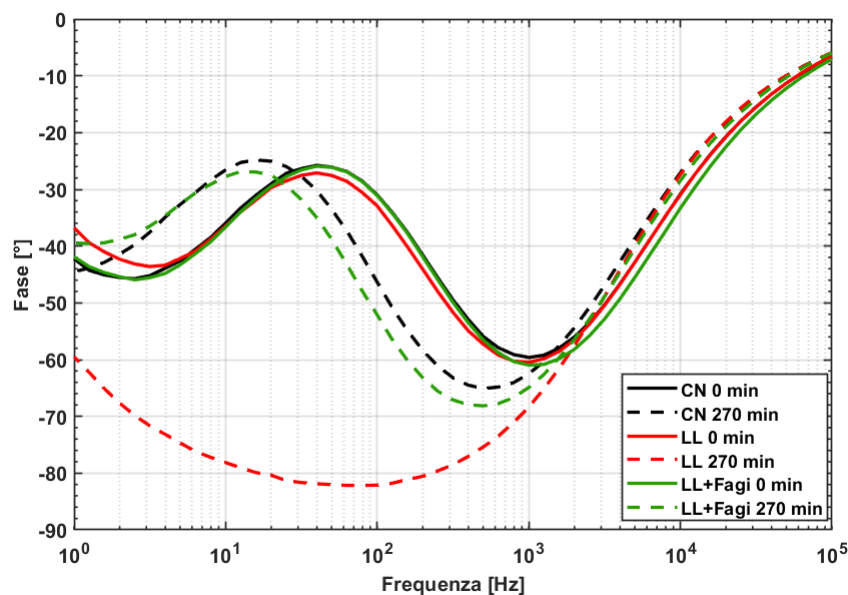
Come si può osservare dalle misure di assorbanza, figura 4.36, la curva rossa dei batteri cresce fino a stabilizzarsi a 1.4, mentre i fagi (linea verde), dopo 90

minuti iniziano ad attivarsi inibendo la crescita batterica; dopo già 150 minuti i batteri sono tutti annichiliti.



**Figura 4.36:** Misura di assorbanza a  $600nm$  in funzione del tempo del controllo negativo, batteri e fagi

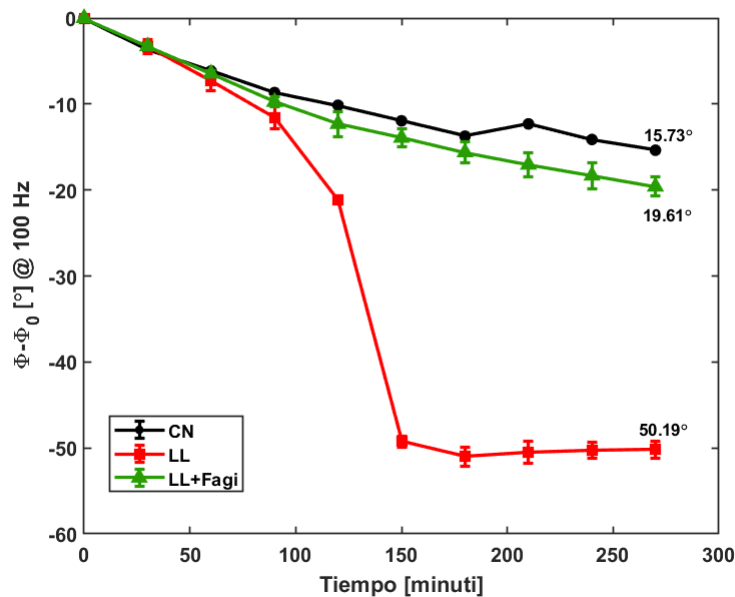
Le misure elettrochimiche confermano quanto osservato in assorbanza. Nella



**Figura 4.37:** Diagramma di Bode delle fasi del controllo negativo, batteri e fagi

figura 4.37 viene mostrato il diagramma di Bode delle fasi: la curva del controllo

(linea nera) mostra uno spostamento di fase dovuto alla deposizione sull'elettrodo di componenti residui del latte; la curva rossa dei batteri, dopo 150 minuti, evidenzia una considerevole diminuzione di fase, mentre i fagi allo stesso minuto si comportano come il campione del controllo negativo, evidenziando una completa interruzione della proliferazione dei batteri. La differenza delle fasi (figura 4.38)

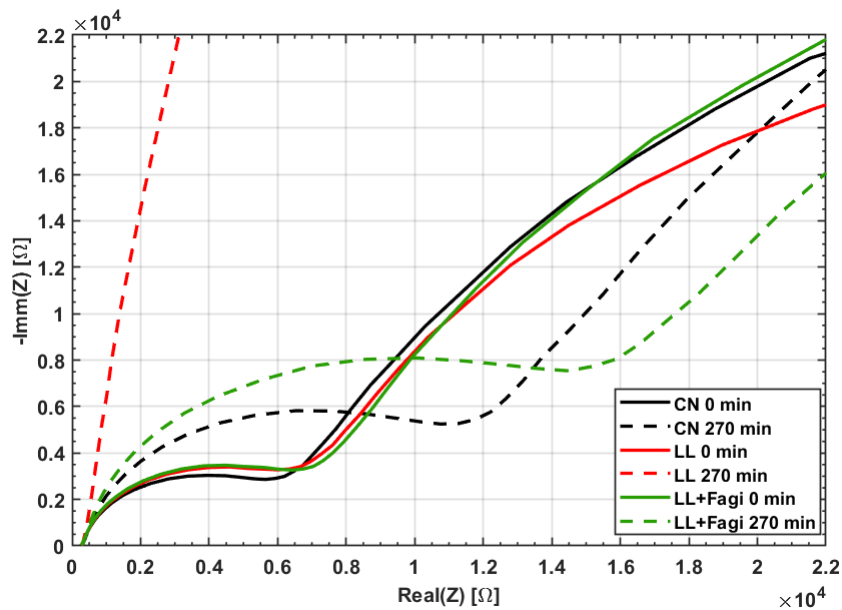


**Figura 4.38:** Differenza di fase misurata a 100 Hz del controllo negativo, batteri e fagi

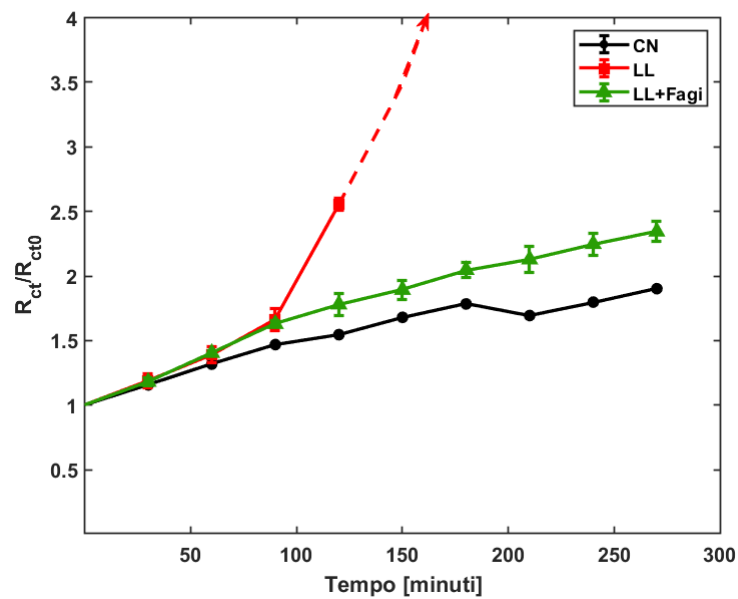
a 150 minuti rispetto a quella al tempo iniziale, alla frequenza di 100 Hz, mostra come la fase dei batteri sia diminuita di circa  $50^\circ$ , mentre i fagi e il controllo abbiano subito una diminuzione di  $\sim 13^\circ$ .

Il diagramma di Nyquist (figura 4.39) e il grafico dell'andamento nel tempo di  $R_{CT}$  normalizzata rispetto alla resistenza calcolata a tempo zero (figura 4.40), sono un'ulteriore conferma del fatto che l'attività di lisi dei fagi domina rispetto alla crescita batterica. Infatti, la curva rossa dei batteri dopo 270 minuti, alle alte/medie frequenze, non mostra più una semicirconferenza, questo significa che la concentrazione di batteri depositati sull'elettrodo è talmente grande da non permettere il passaggio di carica, quindi la resistenza di trasporto di carica risulta essere non più modellabile con Randles. Come si vede in figura 4.40, la resistenza normalizzata dopo 90 minuti cresce con un andamento esponenziale. Invece i fagi (curva verde) crescono in maniera lineare; nel diagramma di Nyquist si vede chiaramente la semicirconferenza della cella di Randle dopo 270 minuti.





**Figura 4.39:** Diagramma di Nyquist del controllo negativo, batteri e fagi



**Figura 4.40:**  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo del controllo negativo, dei batteri e dei fagi

In conclusione, osservando i test eseguiti e confrontandoli con il latte purificato, si evince che è la presenza del latte purificato che permette la crescita dei fagi e quindi la totale inibizione dei batteri. Tuttavia, sebbene il sistema funzioni e il sensore permetta di rilevare la presenza di questi batteriofagi del latte, rimane il problema della difficoltà del protocollo per ottenere il latte purificato, che richiede

manualità ed esperienza.

Si è quindi cercato un modo che permettesse di rendere la rilevazione più *user-friendly*.

### 4.3 Campioni con latte e $CaCl_2$

Da studi in letteratura, si è visto che la crescita della concentrazione di fagi è favorita dalla presenza del calcio in soluzione. In particolare N.N. Potter e F.E. Nelson [39] affermano che:

*«Calcium is necessary for multiplication of several strains of lactic streptococcus bacteriophage while not required for growth of host bacteria.»*

Poichè con il protocollo di purificazione del latte si rimuovono la parte grassa e la caseina, ma rimangono gli altri componenti, tra cui il calcio, questo spiegherebbe perchè il comportamento dei fagi sia più efficiente quando è presente in soluzione: basta vedere la differenza tra il caso in cui il latte con i fagi centrifugato viene diluito nel phages buffer e nel latte purificato [40].

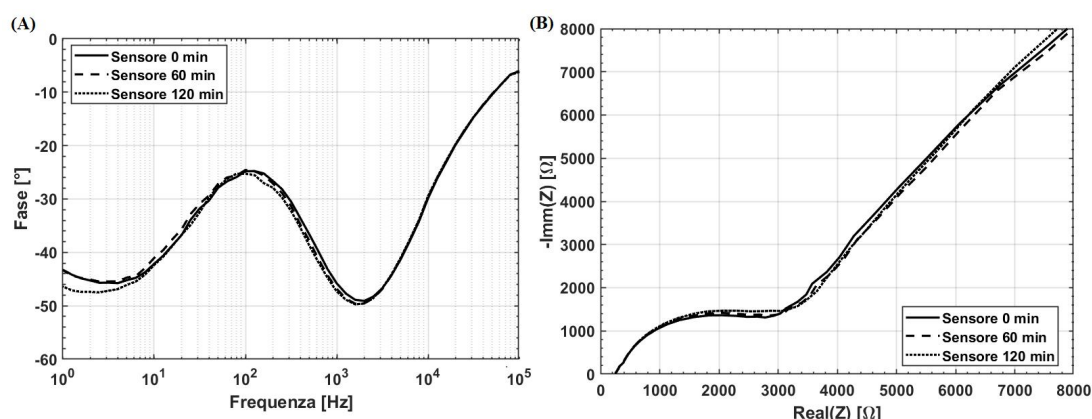
Per le misure successive si è quindi usato come diluente, al posto del latte purificato, un composto del calcio, in particolare si è usato il cloruro di calcio,  $CaCl_2$ . Come primo passo si è studiata la stabilità del sistema quando in soluzione vengono aggiunti  $32\mu M$  di  $CaCl_2$ , [39].

Le soluzioni utilizzate sono riportata in tabella 4.10.

Componenti	Soluzione
20mM FeCN in M17	1000 $\mu L$
M17	931 $\mu L$
Latte centrifugato	5 $\mu L$
Latte purificato	/
100mM $CaCl_2$	64 $\mu L$
<b>Volume finale</b>	<b>2000<math>\mu L</math></b>

**Tabella 4.10:** Soluzione per verificare la stabilità del sensore con il latte centrifugato nel  $CaCl_2$ .

Come si vede dai diagrammi di Bode e Nyquist, figura 4.41, il sistema in 120 minuti risulta perfettamente stabile. Verificato che non ci sono comportamenti anomali del sensore a causa del  $CaCl_2$  e che l'elettrodo di working non viene rovinato dal cloro, si procede con l'analisi della crescita batterica.



**Figura 4.41:** Studio della stabilità del sensore con i diagrammi di Bode (A) e di Nyquist (B).

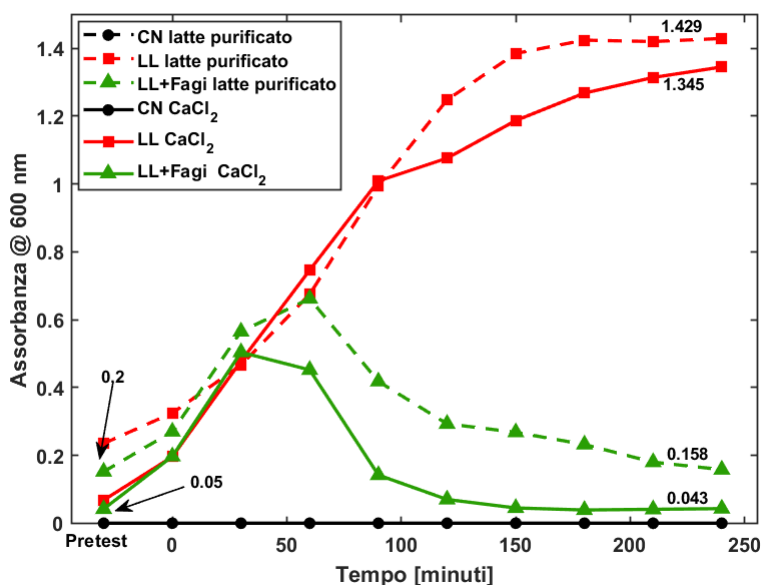
Nel test che segue viene messo a confronto il comportamento dei batteri e dei fagi nel caso in cui il latte centrifugato venga diluito 1:10 nel latte purificato e nel caso in cui in soluzione siano presenti  $32\mu M$  di  $CaCl_2$ .

Le soluzioni con il  $CaCl_2$  sono riportate in tabella 4.11, mentre quelle con il latte centrifugato diluito con il latte purificato sono le stesse riportate in tabella 4.9.

Componenti	CN	LL	LL+Fagi
20mM FeCN in M17	$1000\mu L$	$1000\mu L$	$1000\mu L$
Batteri (L.Lactis)	/	$400\mu L$	$400\mu L$
M17	$924\mu L$	$524\mu L$	$524\mu L$
Latte centrifugato	$12\mu L$	$12\mu L$	/
(Latte+fagi) centrifugato	/	/	$12\mu L$
100mM $CaCl_2$	$64\mu L$	$64\mu L$	$64\mu L$
<b>Volume finale</b>	$2000\mu L$	$2000\mu L$	$2000\mu L$

**Tabella 4.11:** Composizione delle soluzioni in cui viene usato il  $CaCl_2$  come diluente.

Dalle misure di assorbanza, figura 4.42, si può vedere che la presenza del  $CaCl_2$  anticipa l'attività fagica (linea verde continua), portando alla totale inibizione dei batteri dopo soli 120 minuti. Al contrario per il latte purificato (linea verde tratteggiata) non sono sufficienti 240 minuti per avere un totale annichilimento dei batteri. Inoltre, il cloruro di calcio risulta ininfluenza sulla crescita batterica (linea rossa continua), come già citato in letteratura [39]. Quello però che si nota è che, a partire da una stessa concentrazione di batteri inseriti in soluzione,  $OD \sim 0.16$ , il  $CaCl_2$  sembrerebbe abbassare all'inizio l'OD di batteri e fagi, per poi ritornare dopo 30 minuti nell'intorno dei valori del latte purificato.

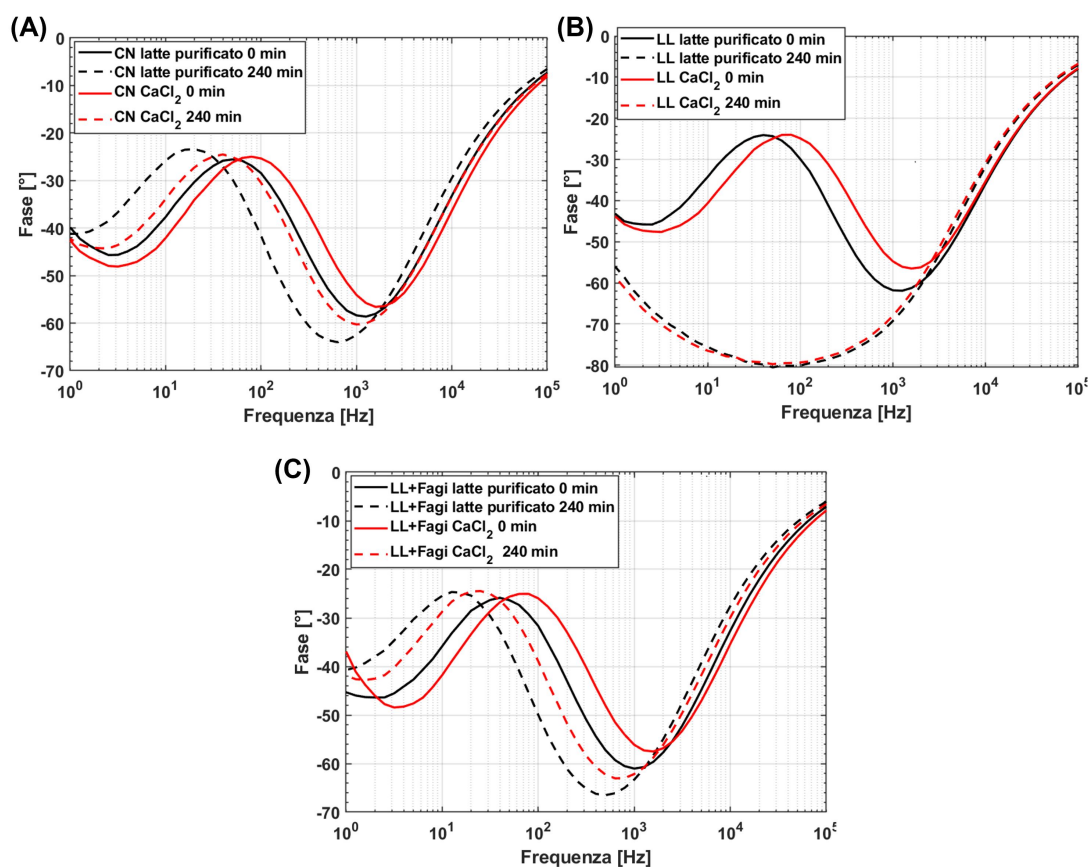


**Figura 4.42:** Misura di assorbanza a  $600nm$  in funzione del tempo del controllo negativo, L. Lactis e Fagi confrontando il comportamento con il latte purificato (linee tratteggiate) e con il  $CaCl_2$  (linea continua).

Si presti ora attenzione alle misure elettrochimiche.

In figura 4.43, viene mostrato il diagramma di Bode delle fasi per ogni campione: dal controllo negativo risulta evidente la stabilità del sensore, infatti rispetto al latte purificato c'è un minor discostamento della fase rispetto alla misura iniziale, perchè ci sono meno residui del latte che vengono a depositarsi sul sensore; confermato anche nel diagramma di Nyquist, figura 4.44, in cui, per il controllo negativo, si vede che la  $R_{CT}$  nel caso del latte purificato (linea nera tratteggiata) cresce di più, dopo 240 minuti, rispetto al  $CaCl_2$  (linea rossa tratteggiata): la semicirconferenza infatti è visibilmente più grande.

Coerente con le misure di assorbanza si vede nel diagramma di Nyquist (figura 4.44) l'abbassamento di concentrazione iniziale di batteri causato dal  $CaCl_2$ , infatti la semicirconferenza della prima misura è minore rispetto a quella nera del latte purificato; questa differenza non è più visibile dopo 240 minuti in cui in entrambi i casi c'è stata un'esplosione dei batteri. Si conclude che, anche se abbassa inizialmente la concentrazione, la crescita batterica non è influenzata dalla presenza del calcio. Invece, per quanto riguarda i fagi, si vede, sia nel diagramma di Nyquist (figura 4.44) che nel diagramma di Bode (figura 4.43), che dopo 240 minuti in entrambi i casi c'è stata interruzione della crescita dei batteri, infatti non si vede nè una esplosione della resistenza di trasporto di carica, nè è visibile

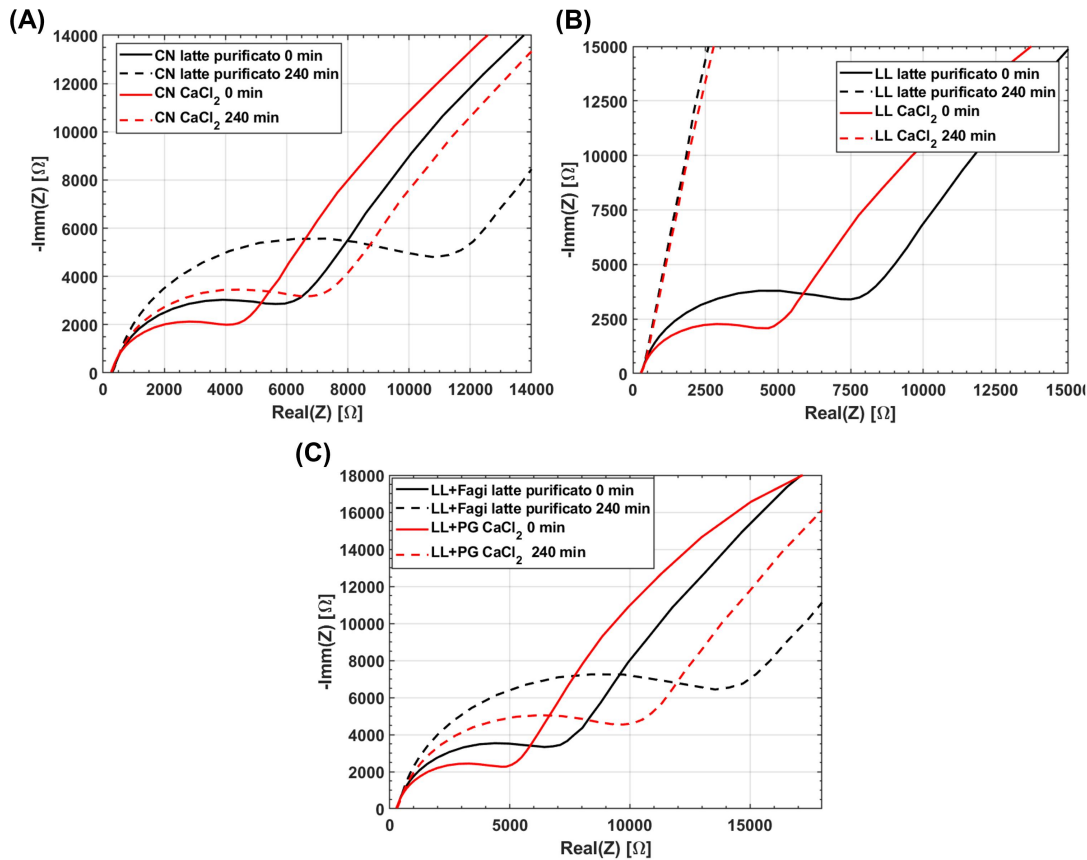


**Figura 4.43:** Diagramma di Bode delle fasi del controllo negativo (A), dei batteri (B) e dei fagi (C) confrontando il comportamento nel latte purificato (nero) e nel  $CaCl_2$  (rosso).

un abbassamento della fase.

Questo risulta più chiaro osservando sia la figura 4.45 dell'andamento nel tempo di  $R_{CT}$  normalizzata rispetto alla resistenza iniziale, dove è presente una crescita lineare della resistenza, dovuta al fatto che ad ogni misura sul sensore si depositano dei residui della soluzione, che la figura 4.46 dell'andamento nel tempo della differenza di fase rispetto alla fase iniziale a 100 Hz, in cui si può vedere che la fase dopo 240 minuti si è abbassata solamente di  $\sim 15^\circ$ . Si conclude quindi che in entrambi i casi la crescita batterica è stata bloccata. I batteri infatti, se non sono presenti i fagi, crescono rapidamente, come dimostra la crescita esponenziale di  $\frac{R_{CT}}{R_{CT_0}}$  e la diminuzione di fase di circa  $50^\circ$ .

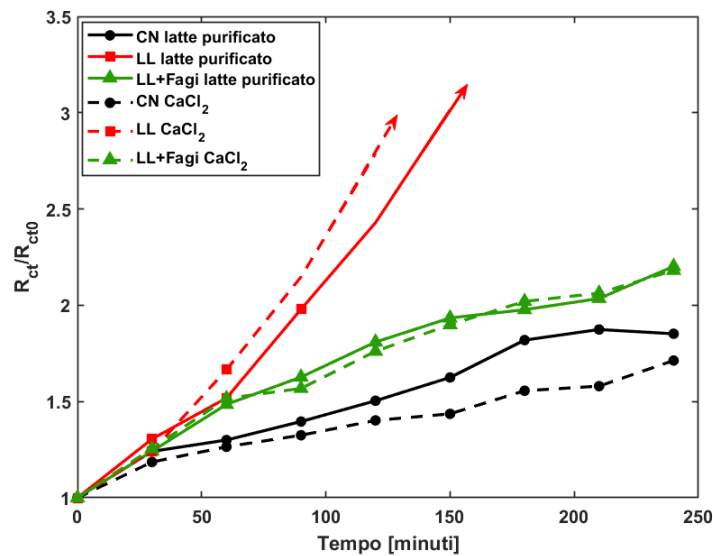
Questi risultati confermano che il  $CaCl_2$  può essere un ottimo sostituto del latte purificato per rilevare la presenza di batteriofagi in soluzione, rendendo più semplice e *user-friendly* il protocollo di misura.



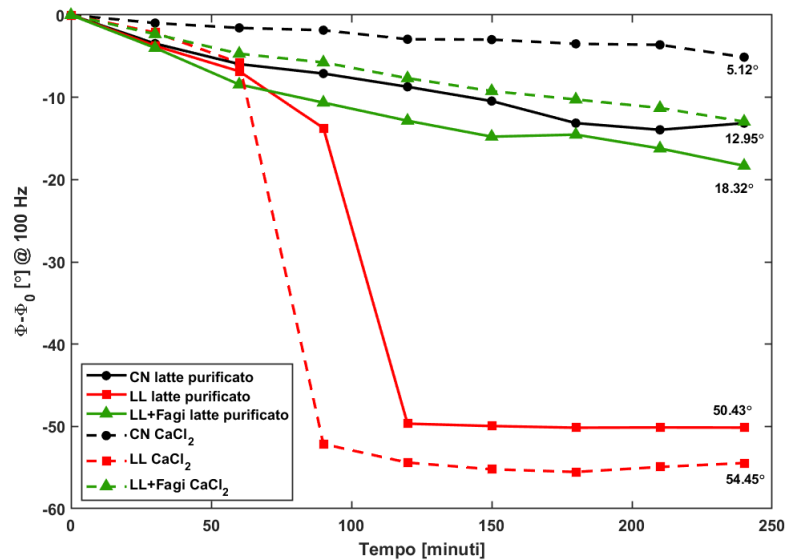
**Figura 4.44:** Diagramma di Nyquist del controllo negativo (A), dei batteri (B) e dei fagi (C) confrontando il comportamento nel latte purificato (nero) e nel  $CaCl_2$  (rosso).

### 4.3.1 Diverse concentrazioni di fagi

Come ultimo punto, si è studiato il limite della sensibilità del sistema diluendo le concentrazioni di fagi. Le nuove concentrazioni di fagi vengono diluite 1:10, 1:100 e 1:1000 con il latte centrifugato prima di essere inserite in soluzione. Il procedimento è strutturato nel modo seguente: i fagi, a concentrazione iniziale  $10^{12}$  PFU/mL, vengono diluiti 1:10 nel latte da frigo, si centrifuga la soluzione e si estrae il surnatante, ottenendo così una concentrazione di fagi di  $10^{11}$  PFU/mL (la quantità di fagi che si perde con la centrifuga si considera irrilevante rispetto al totale). Successivamente vengono prelevati  $5\mu L$  di surnatante ottenuto e diluiti in  $45\mu L$  di latte centrifugato, così da ottenere una diluizione 1:10, la concentrazione dei nuovi fagi risulta  $10^{10}$  PFU/mL. Per ottenere le successive diluizioni si procede allo stesso modo, ottenendo così concentrazioni di fagi di  $10^9$  e  $10^8$  PFU/mL. Tuttavia, queste concentrazioni non sono quelle che poi vengono rilevate dal sensore, perchè vengono diluite ulteriormente dai componenti della soluzione.



**Figura 4.45:**  $R_{CT}$  normalizzata in funzione del tempo del controllo negativo, dei batteri e dei fagi confrontando il comportamento con il latte purificato (linea continua) e con il  $CaCl_2$  (linea tratteggiata).



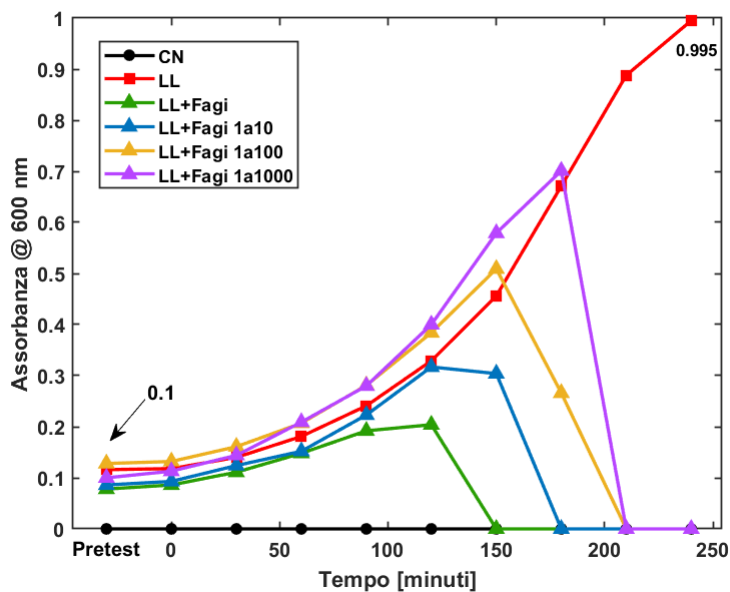
**Figura 4.46:** Differenza di fase misurata a 100 Hz del controllo negativo, dei batteri e dei fagi confrontando il comportamento con il latte purificato (linea continua) e con il  $CaCl_2$  (linea tratteggiata).

Per ottenere un valore più verosimile della concentrazione che viene percepita dall'elettrodo si deve usare l'equazione 4.1. Le concentrazioni finali quindi risultano essere: nel caso iniziale  $\sim 6 \cdot 10^8$  PFU/mL e a scalare di 1:10 tutte le altre, quindi  $\sim 6 \cdot 10^7$  PFU/mL,  $\sim 6 \cdot 10^6$  PFU/mL e  $\sim 6 \cdot 10^{15}$  PFU/mL.

Le soluzioni utilizzate sono quelle riportate in tabella 4.11. Per ogni campione di

fagi viene usata la corrispettiva diluizione di fagi.

A partire dalla misura di assorbanza, figura 4.47, risalta subito come l'inibizione dei batteri sia totale e che, dopo 120 minuti, scali di 30 minuti per ogni concentrazione. Inoltre, più passa il tempo, più la produzione di fagi è veloce, come dimostra l'ultima concentrazione di fagi (linea viola) in cui il crollo dei batteri è rapidissimo: in 30 minuti l'OD passa da 0.7 a 0.



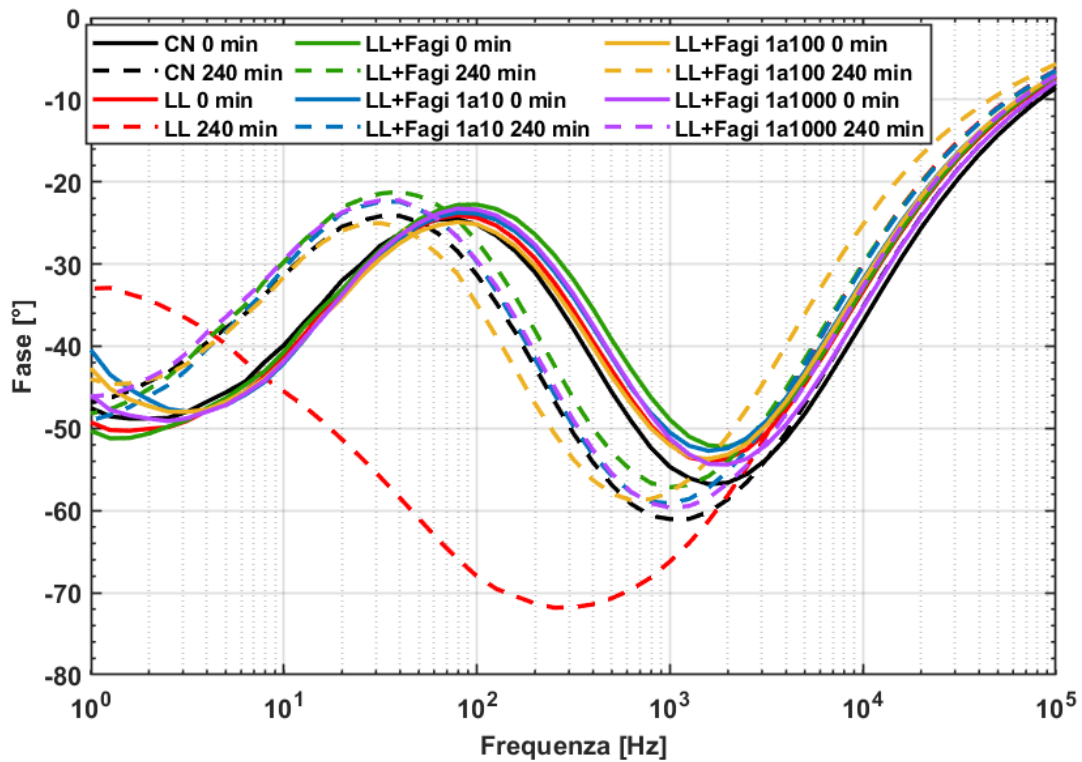
**Figura 4.47:** Misura di assorbanza a  $600\text{nm}$  in funzione del tempo del controllo negativo, dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

Il diagramma di Bode, figura 4.48, mostra che le soluzioni contenenti i fagi hanno solo un lieve slittamento della fase dopo 240 minuti, al contrario dei batteri, che, come visto nell'esperimento precedente, crescono indisturbati mostrando una diminuzione di fase di circa  $45^\circ$ .

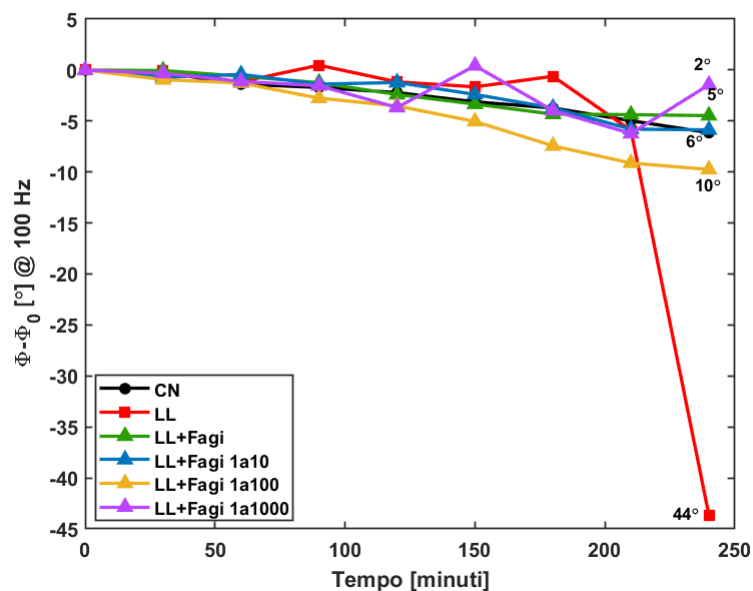
Concentrando l'attenzione su una sola frequenza, 100 Hz, la differenza delle fasi a tempo 0 e 240 minuti (figura 4.49) evidenzia l'annichilimento dei batteri, infatti lo scostamento è di pochi gradi.

Infine, il diagramma di Nyquist (figura 4.50) conferma quanto detto in precedenza: dopo 240 minuti tutte le concentrazioni di fagi bloccano la crescita dei batteri. I batteri, linea rossa tratteggiata, sono gli unici che hanno un'esplosione di  $R_{CT}$ , mentre tutte le altre soluzioni continuano ad avere una chiara semicirconfenza alle alte/medie frequenze.

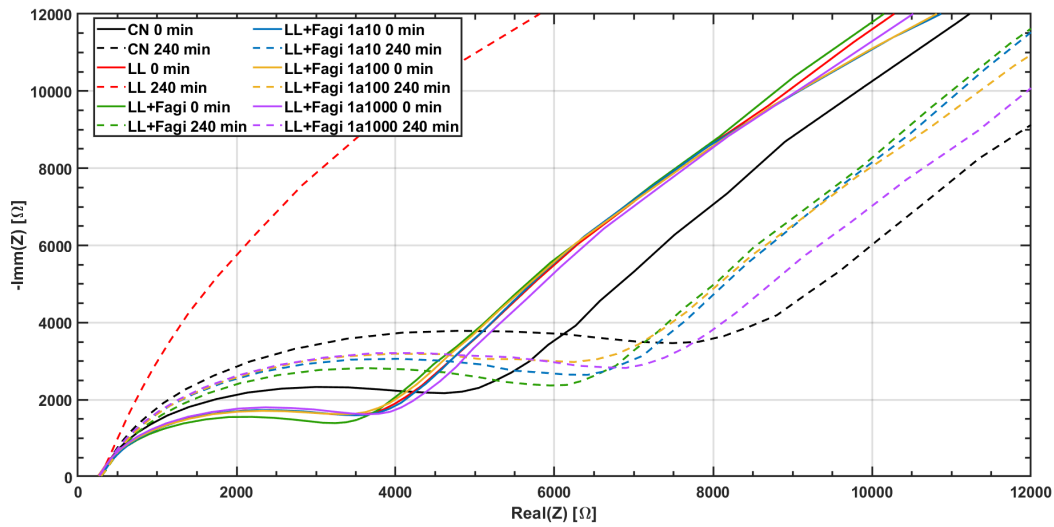




**Figura 4.48:** Diagramma di Bode delle fasi del controllo negativo, dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.



**Figura 4.49:** Differenza di fase misurata a 100 Hz nel tempo del controllo negativo, dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.



**Figura 4.50:** Diagramma di Nyquist del controllo negativo, dei batteri e delle diverse concentrazioni di fagi.

In conclusione, il sensore mostra una elevata sensibilità e riesce a rilevare, in meno di 240 minuti, una concentrazione di fagi di  $\sim 10^5$  *PFU/mL* in soluzione; concentrazione limite perchè i fagi causino l'interruzione del processo di fermentazione [16].

# Capitolo 5

## Conclusioni

L'obiettivo di questa tesi è stata la caratterizzazione e la definizione di un nuovo protocollo di misura per un biosensore elettrochimico adatto a rilevare la presenza di batteriofagi nelle soluzioni contenenti del latte. Questi ultimi, interrompendo il processo di fermentazione, provocano uno spreco dei prodotti, ritardi nella produzione, inquinamento ambientale e consistenti perdite economiche per le industrie lattiero-casearie. Risulta quindi importante rilevare, il più velocemente possibile, la presenza di questi fagi per poter isolare e sanificare il lotto di latte da loro contaminato, così da evitarne la diffusione.

Le tecniche molecolari e microbiologiche fino ad ora conosciute, come PCR e Spot Test, presentano tempi di risposta lunghi, richiedono personale specializzato, una specifica strumentazione, non sono facilmente trasportabili e hanno alti costi di utilizzo. La tecnica elettrochimica qui proposta è una soluzione ottimale per la sua rapida risposta, la facilità di utilizzo, la portabilità e l'economicità.

Il biosensore utilizzato per la sperimentazione è un DRP-C223AT prodotto da *Metrohm DropSens*, per le misure è stato utilizzato il protocollo di *Spill-out* e le soluzioni testate in lavori precedenti, con il brodo di coltura M17, ottimale per la crescita batterica, e un mediatore RedOx,  $Fe(CN)_6^{-3/-4}$ . Le misure elettrochimiche effettuate in regime sinusoidale hanno confermato la proliferazione dei batteri in caso ideale, privo di latte, e l'aggiunta di latte purificato non ha evidenziato differenze dal caso ideale, mostrando un abbassamento di fase e una crescita esponenziale dell'impedenza del trasporto di carica all'interfaccia. La successiva misurazione con l'aggiunta di fagi ha rilevato elettrochimicamente l'inibizione batterica, confermando la presenza di fagi in soluzione. Il sensore permette quindi di rilevare la presenza o meno di fagi osservando le variazioni di  $R_{CT}$  e di fase.

Successivamente, per avvicinare il più possibile il sistema ad un caso reale, si è modificato il protocollo di preparazione del latte, centrifugandolo una sola volta. La conseguente rimozione della sola parte grassa ha evidenziato un'instabilità della risposta del sensore, mostrando una crescita di  $R_{CT}$  anomala. Dopo aver trovato il metodo per stabilizzare il sensore, diluendo il latte centrifugato con il latte purificato, si è testata la soluzione così ottenuta con la presenza di fagi e batteri. Le misure elettrochimiche hanno dimostrato che questo nuovo protocollo non interferisce con la crescita batterica. Per rilevare la presenza di fagi, si è testata una soluzione ove i fagi sono dispersi direttamente nel latte prima della centrifuga. L'analisi di  $R_{CT}$  e fase mostrano l'interruzione della crescita dei batteri, confermando l'attività fagica.

Per velocizzare la risposta dei sensori e semplificare il protocollo della preparazione del latte, si è sostituito al latte purificato, come diluente, il cloruro di calcio, che favorisce l'attività di lisi dei fagi.

I test con  $CaCl_2$  come diluente rilevano una normale crescita batterica ed evidenziano la loro inibizione, dovuta ai fagi, dopo solo 60-90 minuti, contro tempi di risposta di circa 120 minuti nei test precedenti. Diminuendo la concentrazione di fagi in soluzione fino a  $\sim 10^5$  PFU/mL, concentrazione limite perchè i fagi causino l'interruzione del processo di fermentazione [16], si è visto che il sensore è ancora in grado di rilevare la presenza di batteriofagi, pur con tempi di risposta intorno ai 200 minuti.

Si conclude quindi che questa tesi ha raggiunto alcuni risultati essenziali:

1. un nuovo protocollo di trattamento del latte efficace per il rilevamento di batteriofagi, osservabile mediante la variazione di fase e di  $R_{CT}$ ;
2. l'utilizzo del cloruro di calcio che ha:
  - velocizzato la risposta del sensore,
  - aumentato la sensibilità del sensore.

I risultati ottenuti portano a prospettive future che prevedono: rendere il protocollo applicabile anche per altre coppie batterio-fago dell'industria lattiero-casearia, la verifica del funzionamento del protocollo anche con altri tipi di sensori, ad esempio l'utilizzo di ChemFET o ISFET, e infine l'ingegnerizzazione del sistema per una sua futura portabilità.

# Bibliografia

- [1] Alessandro Paccagnella. Corso di biosensori. *Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione*, 2020.
- [2] Wikipedia. Ferrocyanide/ferricyanide.
- [3] Wikipedia. Cloruro di calcio.
- [4] Richard J. Lehmann, Robert Reiche, and Gerhard Schiefer. Future internet and the agri-food sector: State-of-the-art in literature and research. *Computers and Electronics in Agriculture*, 89:158–174, 2012.
- [5] Elizabeth Caplice and Gerald F Fitzgerald. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1):131–149, 1999.
- [6] Khalisanni Khalid et al. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci*, 1(3):1–13, 2011.
- [7] Seppo Salminen and Atte Von Wright. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press, 2004.
- [8] Thomas Müller. Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 145(5):363–366, 1990.
- [9] Adelene Ai-Lian Song, Lionel LA In, Swee Hua Erin Lim, and Raha Abdul Rahim. A review on lactococcus lactis: from food to factory. *Microbial cell factories*, 16(1):1–15, 2017.
- [10] Jan Kok, Lieke A van Gijtenbeek, Anne de Jong, Sjoerd B van der Meulen, Ana Solopova, and Oscar P Kuipers. The evolution of gene regulation research in lactococcus lactis. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp\_1):S220–S243, 2017.

- [11] Jan Willem Sanders, Gerard Venema, and Jan Kok. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4):483–501, 1999.
- [12] Michiel Wels, Roland Siezen, Sacha Van Hijum, William J Kelly, and Herwig Bachmann. Comparative genome analysis of *Lactococcus lactis* indicates niche adaptation and resolves genotype/phenotype disparity. *Frontiers in microbiology*, 10:4, 2019.
- [13] Gwen E. Allison and Todd R. Klaenhammer. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 8(3):207–226, 1998.
- [14] B. del Rio, A.G. Binetti, M.C. Martín, M. Fernández, A.H. Magadán, and M.A. Alvarez. Multiplex pcr for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology*, 24(1):75–81, 2007.
- [15] Josiane E Garneau and Sylvain Moineau. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial cell factories*, 10(1):1–10, 2011.
- [16] Leo ML Nollet and Fidel Toldrá. *Handbook of dairy foods analysis*. CRC press, 2009.
- [17] S Schnell and C Mendoza. Theoretical description of the polymerase chain reaction. *Journal of theoretical biology*, 188(3):313–318, 1997.
- [18] Ana G Binetti, Beatriz Del Río, M Cruz Martín, and Miguel A Alvarez. Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10):6096–6103, 2005.
- [19] Florence Postollec, Hélène Falentin, Sonia Pavan, Jérôme Combrisson, and Danièle Sohier. Recent advances in quantitative pcr (qpcr) applications in food microbiology. *Food microbiology*, 28(5):848–861, 2011.
- [20] Claude P Champagne and Nancy Gardner. The spot test method for the in-plant enumeration of bacteriophages with paired cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *International Dairy Journal*, 5(5):417–425, 1995.

- [21] Ole Michelsen, Álvaro Cuesta-Dominguez, Bjarne Albrechtsen, and Peter Ruhdal Jensen. Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23):7575–7581, 2007.
- [22] Kavita Rathee, Vikas Dhull, Rekha Dhull, and Sandeep Singh. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and biophysics reports*, 5:35–54, 2016.
- [23] T Rincken and H Riik. Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 66(1-3):13–21, 2006.
- [24] Giulio Rosati, Marco Ravarotto, Matteo Scaramuzza, Alessandro De Toni, and Alessandro Paccagnella. Silver nanoparticles inkjet-printed flexible biosensor for rapid label-free antibiotic detection in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 280:280–289, 2019.
- [25] Yating Chai, Suiqiong Li, Shin Horikawa, Mi-Kyung Park, Vitaly Vodyanoy, and Bryan A Chin. Rapid and sensitive detection of salmonella typhimurium on eggshells by using wireless biosensors. *Journal of food protection*, 75(4):631–636, 2012.
- [26] Cristina García-Aljaro, Xavier Muñoz-Berbel, and Francisco J Muñoz. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(6):1712–1716, 2009.
- [27] Lucian Rotariu, Florence Lagarde, Nicole Jaffrezic-Renault, and Camelia Bala. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants—trends and perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79:80–87, 2016.
- [28] Giulio Rosati, Arianna Cunego, Fabio Fracchetti, Antonio Del Casale, Matteo Scaramuzza, Alessandro De Toni, Sandra Torriani, and Alessandro Paccagnella. Inkjet printed interdigitated biosensor for easy and rapid detection of bacteriophage contamination: A preliminary study for milk processing control applications. *Chemosensors*, 7(1):8, 2019.
- [29] Elisabetta Pasqualotto Matteo Scaramuzza Erica Cretaio Lara Franchin Sara Poggi Stefano Bonaldo, Erica Cretaio and Alessandro Paccagnella. Screen-

- printed electrochemical biosensor for the detection of bacteriophage of lactococcus lactis for dairy production. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 2022.
- [30] Christopher R. Lowe. Biosensors. *Trends in Biotechnology*, 2(3):59–65, 1984.
- [31] Parikha Mehrotra. Biosensors and their applications – a review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2):153–159, 2016.
- [32] UB Trivedi, D Lakshminarayana, IL Kothari, NG Patel, HN Kapse, KK Maikhija, PB Patel, and CJ Panchal. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(1):260–266, 2009.
- [33] Sergey M Borisov and Otto S Wolfbeis. Optical biosensors. *Chemical reviews*, 108(2):423–461, 2008.
- [34] Yong Zhao, Rui-jie Tong, Feng Xia, and Yun Peng. Current status of optical fiber biosensor based on surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 142:111505, 2019.
- [35] Betty E Terzaghi and WE187084 Sandine. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied microbiology*, 29(6):807–813, 1975.
- [36] Pierre Germain. Mémoire de magister. miloud benaissa.
- [37] Suresh Seethapathy and Tadeusz Gorecki. Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review. *Analytica chimica acta*, 750:48–62, 2012.
- [38] Lutz Stratmann, Brendan Heery, and Brian Coffey. Emstat pico: Embedded electrochemistry with a miniaturized, software-enabled, potentiostat system on module.
- [39] Norman N Potter and FE Nelson. Role of calcium and related ions in proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 66(5):508–516, 1953.
- [40] DI Shew. Effect of calcium on the development of streptococcal bacteriophages. *Nature*, 164(4168):492–493, 1949.