



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

Sessione di Laurea: Marzo-Aprile 2024

Metodi fotografici di analisi dell'attività microbica nei suoli

Relatore:

Prof. Fulvio Boano

Correlatrice:

Ing. Elisa Costamagna

Candidata:

Ilaria Menga

(Matricola: 280315)

A.A. 2023/2024

Sommario

Abstract	4
Obiettivi	6
1. Introduzione	7
1.1 <i>Acqua risorsa da tutelare</i>	7
1.2 <i>Processi di trattamento dell'acqua convenzionali</i>	8
1.3 <i>Soluzioni basate su metodi naturali (sistemi di trattamento naturali)</i>	9
1.3.1 <i>Approccio fitodepurativo</i>	10
1.3.2 <i>Constructed wetlands come soluzione di trattamento</i>	10
1.3.3 <i>Ruolo di muri verdi nel trattamento delle acque</i>	12
1.3.4 <i>Il ruolo delle piante</i>	15
1.3.5 <i>Il microbioma</i>	17
1.3.6 <i>Interazione pianta acquatica-microrganismi</i>	17
1.4 <i>Diacetato di fluoresceina nella valutazione della vitalità microbica</i>	18
2. Materiali e metodi	20
2.1 <i>Setup sperimentale</i>	21
2.2 <i>Analisi preliminari</i>	28
2.3 <i>Verifica uniformità luminosa</i>	30
2.4 <i>Preparazione soluzioni acqua-fluoresceina</i>	31
2.5 <i>Calibrazione fluorimetro</i>	32
2.6 <i>Area rappresentativa</i>	33
2.7 <i>Curva di calibrazione</i>	37
2.8 <i>Acquisizione e analisi foto con FDA</i>	37
3. Risultati	39
3.1 <i>Calibrazione</i>	39
3.2 <i>Visualizzazione dell'attività enzimatica</i>	42
4. Conclusioni	69
Ringraziamenti	71
Bibliografia	72
Sitografia	75

A mia sorella Daniela

Abstract

L'acqua, risorsa fondamentale per la vita, affronta sfide crescenti legate ai cambiamenti climatici e all'inquinamento. Per contrastare queste problematiche, sono state sviluppate nuove tecnologie in grado di garantire una gestione idrica sostenibile. Accanto ai metodi convenzionali, efficienti ma onerosi in termini di consumi energetici, sta crescendo l'interesse verso soluzioni naturali come le constructed wetland e i muri verdi, che sfruttano l'azione di microrganismi naturalmente presenti nel terreno per trattare le acque reflue, la cui evoluzione e attività sono attualmente oggetto di ricerche. Le analisi convenzionali dell'attività microbica nel suolo, basate su estrazioni puntuali di campioni di terreno dai sistemi di depurazione, sono distruttive e/o invasive, riducendo la possibilità di una risoluzione spazio-temporale adeguata del fenomeno, focalizzandosi su stadi temporali e punti specifici. Pertanto, l'obiettivo di questo studio è applicare un metodo fotografico innovativo non distruttivo, sviluppato in un ambiente controllato. Il metodo prevede di visualizzare l'evoluzione dell'attività batterica nel tempo mediante scatti fotografici, permettendo di adattare questa procedura in altre applicazioni ambientali, come i muri verdi per il trattamento diretto delle acque in loco. Durante l'attività di tesi è stato usato un tracciante non conservativo, il diacetato di fluoresceina (FDA), che subendo la degradazione dovuta agli enzimi batterici libera fluoresceina, la cui concentrazione può essere ricavata tramite una misura di fluorescenza. Le variazioni della fluorescenza sono state analizzate mediante l'uso di una fotocamera che riprende il mezzo poroso in un contenitore trasparente illuminato con luce blu per stimolare la fluorescenza. Questo metodo permette di ottenere immagini in cui l'intensità di luce emessa per fluorescenza permette di ricavare mappe di concentrazione che si traducono in attività enzimatica, evidenziando aspetti cruciali della relazione tra biofilm e apparato radicale che collaborano in sinergia nei processi depurativi. Nel laboratorio di idraulica del DIATI sono state condotte delle prove preliminari utilizzando concentrazioni di fluoresceina note e definendo il set up per fotocamera e luci, per costruire una curva di calibrazione utilizzata nella fase successiva del progetto. Nella seconda fase sono state eseguite diverse prove: un primo gruppo ha coinvolto l'analisi mediante metodo fotografico e l'uso di FDA nel mezzo poroso in un vaso non vegetato. Le foto sono state elaborate tramite apposito codice Matlab, legando l'intensità luminosa alla concentrazione di fluoresceina prodotta. Le ultime prove hanno coinvolto l'utilizzo dell'FDA in un vaso vegetato, che sviluppa fluorescenza man mano che viene degradato dai microrganismi

presenti su foglie e radici delle piante. L'analisi dei risultati ha dimostrato che il metodo sperimentato consente di valutare l'evoluzione delle reazioni nel mezzo poroso nel tempo e nello spazio. Si è inoltre verificato come la presenza dell'ossigeno rilasciato dalle piante o scambiato attraverso il pelo libero dell'acqua influenza l'attività batterica e il tasso di reazione del tracciante. Tuttavia, si ritiene opportuno condurre ulteriori prove, per identificare i parametri che regolano le variazioni del tasso di reazione, ponendo particolare attenzione a eseguire queste prove su diverse specie vegetali, per ottenere una comprensione più approfondita dei processi in corso.

Obiettivi

La tesi si propone di esplorare una metodologia innovativa per la valutazione dell'attività enzimatica nei suoli, per stimare il potenziale della vegetazione nella rimozione dei contaminanti dalle acque nei processi fitodepurativi. Le piante sono impiegate come supporto ai microrganismi, i quali formano un biofilm lungo la struttura vegetale, dimostrando una notevole capacità depurativa. Infatti, se da un lato i microrganismi contribuiscono alla crescita e benessere delle piante, dall'altro metabolizzano e mobilizzano sostanze chimiche e inquinanti, svolgendo un ruolo chiave nella loro rimozione. Tuttavia, lo studio della loro attività rappresenta ancora un campo di ricerca in via di approfondimento. Esistono metodi tradizionali che comportano analisi di tipo distruttivo, prelevando piccole sezioni dei substrati, con l'esito tuttavia di non poter avere più un modo per confrontare il sistema con se stesso, ma solo in quella precisa frazione di tempo. L'obiettivo principale della tesi è applicare e approfondire un metodo di analisi fotografica in ambiente controllato e a scala ridotta, per studiare l'evoluzione nel tempo dell'attività microbica mediante l'utilizzo di diacetato di fluoresceina. Tale metodologia potrà in seguito essere applicata su sistemi modulari, con beneficio per lo studio del biofilm in contesti applicativi più ampi come possono essere ad esempio i muri verdi per il trattamento di acque grigie.

1. Introduzione

Il presente lavoro di tesi è organizzato in capitoli che, a partire dalle problematiche legate alla scarsità della risorsa idrica, forniscono una panoramica delle soluzioni naturali per il trattamento delle acque e dei meccanismi di rimozione degli inquinanti, per passare allo studio sperimentale di una metodologia innovativa per la visualizzazione dell'attività enzimatica. In particolare, il capitolo 1 si focalizza su una breve spiegazione relativa ai metodi convenzionali di depurazione delle acque e la necessità di usufruire di metodi naturali, che in quanto tali consentono di avere una gestione sostenibile dell'acqua, focalizzando l'attenzione sui metodi di fitodepurazione ed il ruolo delle piante e dei microrganismi. Il capitolo 'Obiettivi' tratta del focus principale della tesi che consiste nell'applicare un metodo di analisi fotografica in grado di studiare l'evoluzione nel tempo dell'attività dei microrganismi presenti lungo gli apparati radicali e lungo la struttura fogliare delle piante acquatiche usate nella fitodepurazione, attraverso l'utilizzo di un tracciante: il diacetato di fluoresceina. Il capitolo 2 affronta nel dettaglio i metodi usati a partire dall'organizzazione del set-up, alla scelta del materiale usato ed i metodi di analisi delle foto acquisite mediante codice Matlab. Nei capitoli 3 e 4 verranno commentati i risultati derivanti dall'attività di laboratorio svolte e le relative conclusioni.

1.1 Acqua risorsa da tutelare

L'acqua è una risorsa universalmente riconosciuta come preziosa e imprescindibile per la vita sulla terra. Si tratta di un elemento fondamentale per attività biologiche, agricole, industriali, nonché per la vita domestica. Senza di essa, piante, animali ed esseri umani non avrebbero possibilità per sopravvivere. Eppure, continuano a persistere problematiche che ne ostacolano la disponibilità e la qualità quali: i cambiamenti climatici e l'inquinamento idrico. Infatti, si prevede in futuro un aumento della carenza idrica a causa dei cambiamenti climatici, che contribuiranno all'aumento delle temperature a livello globale. Simultaneamente, l'incremento delle temperature si riflette in una crescente richiesta idrica per le attività coltivate, contribuendo così ad un ulteriore stress sulle risorse idriche disponibili.

L'avanzamento dell'industrializzazione e lo smaltimento indiscriminato di sostanze inquinanti nel contesto della vita quotidiana hanno scatenato una problematica crescente

riguardante la qualità delle risorse idriche (Ju Lee, s.d.). Infatti c'è una vasta varietà di contaminanti di origine antropica (siano essi di tipo chimico, fisico e biologico), che vengono introdotti nell'ambiente naturale e intaccano la qualità dell'acqua (Deletic & Wang, 2019). Queste sostanze, accumulandosi nei sistemi acquatici possono provocare danni ecologici. La contaminazione di laghi, fiumi, oceani, bacini idrici e acque sotterranee non compromette soltanto gli organismi presenti nei corpi idrici, ma può anche avere un impatto su tutta la biosfera. Tra i più ricorrenti pericoli per gli ecosistemi acquatici rientra il fenomeno dell'eutrofizzazione, un processo attraverso cui un corpo idrico, che sia lago o fiume, diventa eccessivamente ricco di sostanze nutritive (fosfati, nitrati) (Grizzetti et al., 2012), provocando una elevata crescita di alghe che può consumare quantità di ossigeno durante il processo di decomposizione (Aracic et al., 2015) generando squilibrio ecologico e morte nell'habitat acquatico organica (Woodward et al., 2012). Questo fenomeno è spesso alimentato da attività umane, che producono rilascio di nutrienti derivanti da fertilizzanti agricoli, oppure scarichi industriali nelle acque superficiali.

1.2 Processi di trattamento dell'acqua convenzionali

Al fine di depurare le acque contaminate dagli agenti inquinanti possono essere applicati diversi metodi di trattamento convenzionali, tra cui ossidazione, adsorbimento, coagulazione-flocculazione, precipitazione chimica, scambio ionico e filtrazione su membrane. I **processi di ossidazione** sono metodi che comportano l'uso di agenti ossidanti come cloro o ozono per eliminare gli inquinanti organici; tuttavia, nonostante l'efficienza del metodo è possibile che nell'acqua da trattare ci siano sostanze capaci di inibire le reazioni di ossidazione, inficiandone gli effetti purificatori desiderati. (Mantzavinos, 2008). **L'adsorbimento** è un metodo che sfrutta sostanze come carbone attivo o resine a scambio ionico per rimuovere contaminanti come metalli pesanti e molecole organiche dannose dall'acqua (Deletic & Wang, 2019). Tuttavia, risulta una pratica costosa e perciò non sempre sostenibile a lungo tempo. Il **processo di coagulazione-flocculazione** viene impiegato negli impianti di trattamento acque per migliorare la qualità dell'acqua, mediante la rimozione di impurità e particelle sospese. Consiste in un primo step in cui viene aggiunto nell'acqua da trattare un coagulante (es.

solfato di alluminio, solfato ferrico), il quale crea delle particelle, dette fiocchi, costituiti dalle impurità presenti nell'acqua. Dopo l'aggiunta del coagulante, l'acqua viene agitata in modo da creare fiocchi più grandi. In seguito a tale formazione, l'acqua viene lasciata riposare in modo che i fiocchi, più pesanti, si depositino sul fondo. Infine, segue un processo di filtrazione e disinfezione. La **precipitazione chimica** è un metodo usato nel trattamento delle acque rimuovendo specifici inquinanti (particolarmente ioni metallici come ferro, manganese, alluminio). In base alla natura chimica degli inquinanti si utilizzano dei reagenti specifici, i quali reagendo con gli ioni indesiderati, creano dei precipitati insolubili, i quali vengono in un successivo momento separati dall'acqua. Lo scambio ionico è una tecnologia efficace per il trattamento delle acque reflue, particolarmente sfruttato per rimuovere ioni calcio, magnesio e ioni metallici da acque dure. Il processo consiste nell'usare una resina a scambio ionico (materiali polimerico) la quale, quando viene attraversata dall'acqua fa sì che gli ioni indesiderati vengano assorbiti dalla resina stessa. Tuttavia, col tempo la resina si satura, perciò è necessario rigenerarla facendo passare una soluzione costituita da ioni "buoni" necessari per un nuovo ciclo di assorbimento. L'impiego delle **membrane** rappresenta una tecnologia ampiamente adottata per il trattamento delle acque reflue urbane e industriali, con una elevata efficienza depurativa. Tuttavia, il limite di questa tecnologia è rappresentato dalla necessità di pulire periodicamente le membrane, generando costi significativi (Saracco, 2021).

1.3 Soluzioni basate su metodi naturali (sistemi di trattamento naturali)

Per mitigare problematiche sia dal punto di vista biologico che ambientale, sono stati introdotti sistemi di trattamento naturale, che rispetto ai metodi convenzionali sono ritenuti più sostenibili ed a basso costo, in quanto non sempre è economicamente fattibile implementare processi convenzionali, specie in paesi in via di sviluppo oppure in aree remote. Perciò, emerge una necessità di individuare e trattare l'acqua contaminata in loco mediante approcci a basso impatto energetico, ambientale ed economico (Aracic et al., 2015). I sistemi di trattamento delle acque naturali sono metodologie di tipo biologico che sfruttano processi naturali o organismi viventi in grado di aggredire i contaminanti in

acqua, applicando i processi di depurazione presenti in ambienti naturali come fiumi, laghi o zone umide. Queste tecnologie rientrano nella categoria delle infrastrutture di trattamento delle acque, specificamente progettate per depurare le acque piovane o le acque reflue urbane caratterizzate da un basso livello di inquinamento. Tra queste infrastrutture figurano le "*Constructed Wetlands*" e i "*Muri Verdi*".

1.3.1 Approccio fitodepurativo

Il processo fitodepurativo è un metodo di depurazione delle acque che si serve delle piante ed i processi naturali per la rimozione di inquinanti e migliorare la qualità dell'acqua. In questo approccio la vegetazione, i substrati ed i microrganismi associati vengono sfruttati per favorire la degradazione di sostanze inquinanti. Le piante, infatti, mediante il loro apparato radicale contribuiscono alla rimozione di contaminanti attraverso meccanismi quali: filtrazione, sedimentazione, adsorbimento e fitodepurazione.

1.3.2 Constructed wetlands come soluzione di trattamento

Le constructed wetlands (CW), sono sistemi di tipo artificiale realizzati per imitare ed ottimizzare **processi fitodepurativi** che normalmente accadono in ambienti naturali umidi e che necessitano di un basso fabbisogno energetico. Si tratta di sistemi ormai applicati da decenni per trattare le acque reflue (Denisi et al., 2021). Le tipologie di impianto, si distinguono in superficiale e sotterraneo (sommerso), che in base alle direzioni del flusso si suddividono in orizzontale e verticale (Figura 1.1).

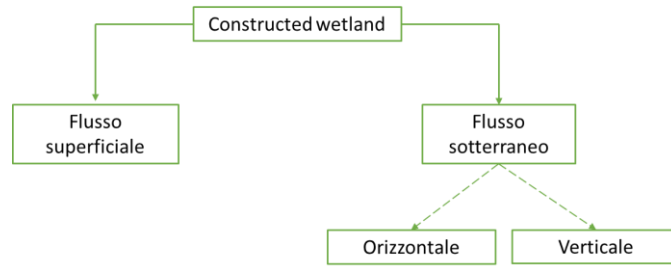


Figura 1.1: Schema di possibili configurazioni delle constructed wetlands

La scelta tra le varie configurazioni è funzione delle esigenze del sito e degli obiettivi di trattamento delle acque reflue (Figura 1.2).

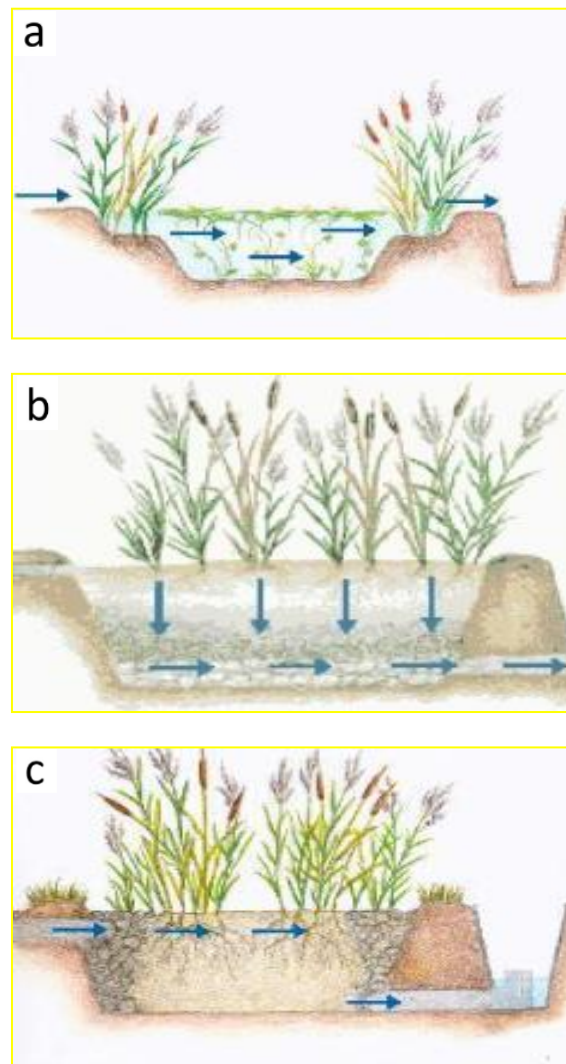


Figura 1.2: Schemi di constructed wetlands costruite a flusso sommerso orizzontale (a) a flusso sommerso verticale (b) e flusso libero superficiale (c), fonte: Iridra s.r.l

Molti dati di letteratura riportano numerose *constructed wetlands* su scala reale progettate per il trattamento delle acque reflue urbane, spesso con l'obiettivo di renderle adatte al riutilizzo. Nonostante l'elevata capacità di depurazione rimuovendo agenti patogeni, è stata dimostrata la necessità di eseguire un ulteriore passaggio di disinfezione aggiuntiva utilizzando ad esempio cloro e UV. Le parti costituenti sono: la parte in ingresso, parte centrale (di filtrazione) e la parte in uscita. Nel caso di una zona umida a flusso sommerso verticale le acque reflue vengono distribuite sulla superficie del mezzo di filtrazione e successivamente percolano in direzione verticale attraverso tale mezzo di filtrazione, noto anche come substrato. La superficie del substrato deve essere pianificata in modo orizzontale per garantire una distribuzione uniforme delle acque reflue. La forma della zona umida a flusso verticale può essere scelta a discrezione, ma i modelli regolari sono preferiti poiché semplificano il sistema di distribuzione, assicurando un'equa distribuzione delle acque reflue su tutta l'area. Nel caso di una zona umida a flusso sommerso orizzontale, le acque reflue vengono distribuite all'ingresso lungo un lato del letto e attraversano orizzontalmente il mezzo di filtrazione verso l'uscita dell'impianto. È essenziale garantire un flusso uniforme delle acque reflue attraverso il letto del sistema e trattenere le stesse per un periodo sufficiente. Inoltre, la superficie superiore del letto deve essere orizzontale in modo che ci sia un'inondazione uniforme. La tipologia di flusso orizzontale di norma può funzionare senza energia aggiuntiva, evitando l'utilizzo di pompe, come invece richiesto in quelle verticali (Kraiem et al., 2021). Nel caso di flusso libero superficiale il livello dell'acqua è poco profondo ed è a diretto contatto con l'atmosfera. Questi sistemi infatti trovano applicazione nel caso di acque debolmente inquinate.

1.3.3 Ruolo di muri verdi nel trattamento delle acque

I tetti e le pareti verdi sono degli elementi architettonici di recente costruzione composti da piante, vegetazione o sistemi di crescita vegetale e stanno diventando parti integrate dell'edilizia moderna in molti paesi (Boano et al., 2020), in quanto offrono una molteplicità di benefici non solo dal punto di vista estetico ma anche funzionale. Permettono di fornire una copertura verde che consente di migliorare la qualità dell'aria, fornire isolamento termico e sono progettati al fine di migliorare la qualità dell'acqua. Il

principio di funzionamento è quello di sfruttare le specie vegetali e substrati come sistema di fitodepurazione rimuovendo o riducendo gli agenti inquinanti presenti nell'acqua. Difatti le piante e il substrato agiscono come un **filtro naturale**, l'acqua da trattare entra nel sistema e durante l'attraversamento le radici delle piante, il substrato e la comunità batterica catturano o assorbono gli inquinanti, rimuovendo perciò sostanze nutritive in eccesso, metalli pesanti, composti organici. Lo scopo è quello di ottenere dell'acqua che dopo aver subito questo processo naturale di trattamento è in grado di poter essere scaricata in modo sicuro in ambiente o persino di essere riutilizzata per specifiche applicazioni come l'irrigazione o altri scopi non potabili, riuscendo ad ottenere un approccio sostenibile e circolare per la gestione delle risorse idriche. Le pareti verdi sono dei filtri vegetali verticali che utilizzano piante e fiori rampicanti coltivati in una trincea riempita di materiale filtrante per creare schermi verdi verticali (Figura 1.3).



Figura 1.3: Esempio di muro verde (Museo Quai Branly di Parigi), fonte: (<https://www.paretiverdi.com/wp/chi-ha-inventato-i-giardini-verticali/>, s.d.)

L'acqua inquinata, scorrendo per gravità attraverso i supporti ingegnerizzati e le radici delle piante, trattiene nutrienti e altri inquinanti all'interno del sistema, consentendo

all'acqua trattata di essere scaricata nei corpi idrici riceventi o di essere riutilizzata per l'irrigazione. (Deletic & Wang, 2019). I tetti verdi (Figura 1.4) sono delle superfici vegetate disposte su un tetto, composte da sistemi modulari realizzati con uno strato isolante, una membrana impermeabile e uno strato vegetale coltivato in un substrato. La profondità del substrato può avere valori che vanno da soli *50 mm* fino a più di *1 metro*, in funzione della capacità di carico del tetto e del tipo di vegetazione utilizzata. Al fine di garantire un alto rendimento dei trattamenti per i quali sono progettati è necessario rispettare diversi criteri per la scelta delle specie vegetali da sfruttare: devono essere adatti alle condizioni climatiche locali e quindi essere anche resistenti, richiedere spazio limitato per lo sviluppo delle radici, avere un peso ridotto e avere una efficace capacità depurativa (Figura 1.5).

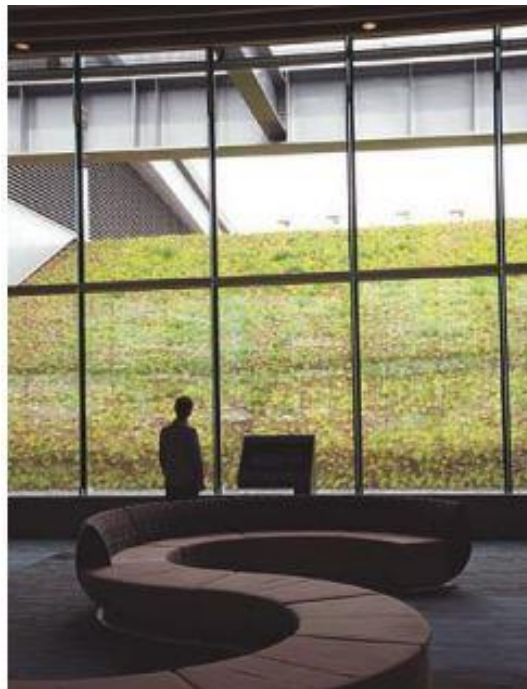


Figura 1.4: Tetto verde al Vancouver convention centre, fonte: (University of Nebraska-Lincoln & Sutton, 2014)



Figura 1.5: Muro verde presso aeroporto internazionale di Vancouver, fonte: (University of Nebraska-Lincoln & Sutton, 2014)

1.3.4 Il ruolo delle piante

Studi recenti hanno riportato che nei processi di fitodepurazione le piante acquatiche negli ecosistemi naturali delle zone umide svolgono un ruolo considerevole nella rimozione di sostanze inquinanti (Pietrangelo L, 2018). Le piante difatti hanno dimostrato la capacità di resistere a concentrazioni moderatamente alte di inquinanti senza subire effetti dannosi. Esse sono in grado di assorbire alcune sostanze nutrienti quali azoto e fosforo e in certi casi riescono a trasformare composti tossici in composti meno tossici. Questo avviene grazie al rilascio degli essudati radicali (composti di carbonio organico come zuccheri semplici, acidi organici ed amminoacidi rilasciati dalle radici delle piante viventi) (Cangioli et al., 2022) ed enzimi che attaccano e degradano le sostanze chimiche organiche nella rizosfera (parte intorno alle radici della pianta in cui si sviluppano gli essudati radicali).

Le piante, perciò, possono essere utilizzate in molteplici metodologie depurative:

La **fitoestrazione**: è una tecnica che consiste nella rimozione di inquinanti presenti nel terreno grazie all'assorbimento degli apparati radicali delle piante e il susseguente trasporto fuori dal sito (Peer et al., 2005). I contaminanti che si concentrano all'interno della pianta vengono perciò rimossi mediante asportazione della pianta. Questa tecnica

trova applicazione principalmente nelle bonifiche di suoli, fanghi e in alcune circostanze anche nel trattamento di acque inquinate. I contaminanti che possono essere estratti includono tipicamente metalli (come argento, cadmio, cobalto, cromo, rame, mercurio, manganese, molibdeno, nichel, piombo, zinco), metalloidi, radionuclidi e anche composti organici.

La **fitostabilizzazione** consiste nell'immobilizzazione degli inquinanti grazie all'assorbimento nelle radici o nella zona dell'apparato radicale. La fitostabilizzazione modifica la solubilità e la mobilità dei metalli sfruttando l'azione di enzimi rilasciati dagli apparati radicali, i quali provocano la precipitazione o l'immobilizzazione degli inquinanti (Menichetti M., 2014).

La **fitodegradazione** rappresenta il processo mediante il quale le piante assorbono contaminanti, che successivamente subiscono una trasformazione attraverso la mineralizzazione o metabolizzazione. Questo processo di trasformazione delle sostanze inquinanti può verificarsi sia internamente alla pianta, contribuendo alla loro rimozione attraverso il metabolismo interno, sia esternamente, nella zona radicale, grazie agli essudati radicali.

La **rizodegradazione** è una tecnica mediante cui avviene la degradazione di contaminanti organici presenti nel suolo, grazie all'azione microbica svolta dai microorganismi localizzati sugli apparati radicali delle piante. Rispetto ad altre tecniche di fitorimediazione, la rizodegradazione ha un vantaggio significativo: la traslocazione dei contaminanti nella pianta e nell'atmosfera è minimizzata, in quanto il processo di degradazione si verifica soprattutto nella zona radicale della pianta stessa.

La **rizofiltrazione** rappresenta una tecnica utilizzata principalmente per il trattamento di acque superficiali, sotterranee e reflue che presentano basse concentrazioni di metalli pesanti e radionuclidi. Questo metodo prevede l'assorbimento e la precipitazione degli inquinanti presenti in soluzione nella regione radicale sulle radici della pianta o all'interno di esse. L'esito di tale processo è il confinamento e l'immobilizzazione dei contaminanti, che possono essere successivamente rimossi mediante l'estrazione della pianta. Questa tecnica può essere applicata sia con piante terrestri che acquatiche, ma le prime hanno dimostrato una capacità superiore nella rimozione di contaminanti.

1.3.5 Il microbioma

Le piante sono composte da una comunità di microrganismi che si trova su diverse superfici quali le foglie di piante sommerse, nella rizosfera e sulla superficie delle radici (Srivastava et al., 2017) L'insieme dei microrganismi che costituiscono il biofilm sulle superfici vegetali è indice di un'interazione tra le cellule microbiche, le radici della pianta e i prodotti radicali sparsi nell'ambiente circostante. È stata studiata infatti, la capacità del biofilm associato alle piante acquatiche di realizzare un processo di degradazione di inquinanti organici e metalli presenti nei corpi idrici. Quindi è fondamentale il coinvolgimento attivo dei microrganismi nel processo di fitodepurazione.

1.3.6 Interazione pianta acquatica-microrganismi

Indagini scientifiche riportano che la maggior parte degli studi riguardanti il miglioramento della qualità dell'acqua sono stati condotti sugli inquinanti ambientali e sulla loro rimozione da parte di piante acquatiche (in situ ed ex situ). All'interno di un sistema acquatico piante e microbi interagiscono tra loro creando benefici reciproci: le piante forniscono ossigeno e carbonio organico ai microbi (Figura 1.6) in cambio i microbi forniscono minerali e metaboliti fondamentali alle piante per la loro crescita, immunità difensiva e scambio di minerali (J. Srivastava et al., 2014). Oltre a questi benefici reciproci, le interazioni pianta-microbo influiscono sulla qualità dell'acqua, soprattutto nella rizosfera, contribuendo alla capacità intrinseca del sistema acquatico di mitigare l'inquinamento proveniente dalla colonna d'acqua (Gagan et al., 2023).

Il **biofilm** è una struttura a matrice melmosa porosa (Weber et al., 1978) costituita da una sostanza polimerica extracellulare, composta da polisaccaridi, proteine, acidi nucleici e lipidi (Branda et al., 2005). All'interno del biofilm, le cellule microbiche trovano una micro-nicchia all'interno di una comunità microbica, caratterizzata da una cooperazione metabolica che conferisce ai microbi una diversità ecologica distintiva (Kraiem et al., 2021).

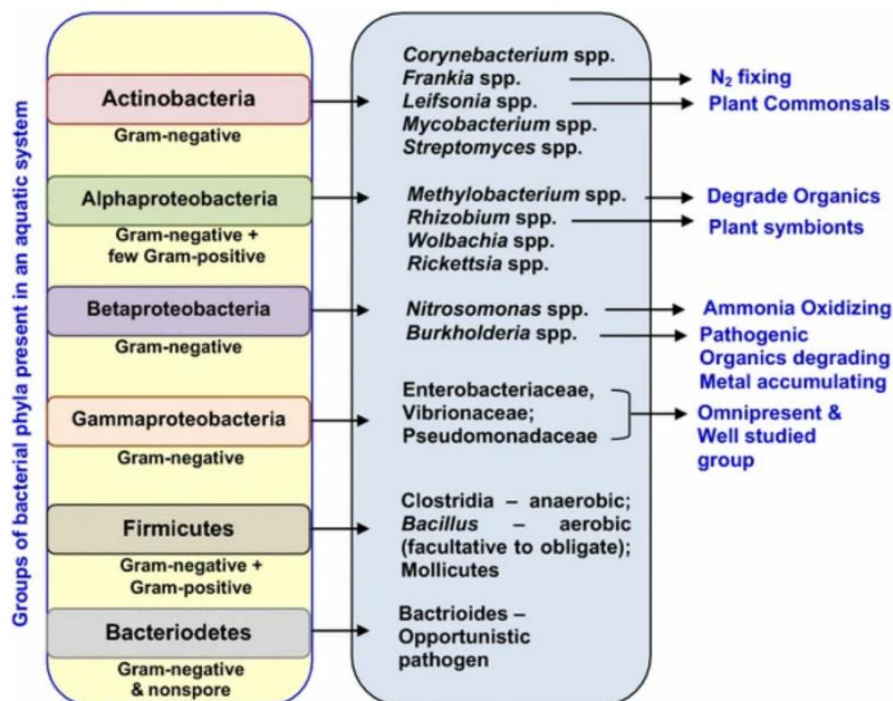


Figura 1.6: Rappresentazione delle specie microbiche presenti nelle piante acquatiche, fonte: (J. K. Srivastava et al., 2017)

1.4 Diacetato di fluoresceina nella valutazione della vitalità microbica

Il diacetato di fluoresceina (Figura 1.7) è un composto chimico ottenuto dalla fluoresceina (è una fluoresceina legata a due radicali di acetato) una **sostanza colorante** di colore giallo-verde che presenta fluorescenza quando è esposta alla luce ultravioletta. In laboratorio e in applicazioni scientifiche, il diacetato di fluoresceina viene spesso utilizzato come tracciante non conservativo per valutare la vitalità cellulare e la funzionalità delle membrane cellulari. La sua capacità di penetrare le membrane cellulari lo rende utile per evidenziare cellule vive, e la successiva conversione in fluoresceina rivela la presenza e la vitalità cellulare attraverso la fluorescenza emessa.

L'idrolisi del diacetato di fluoresceina (FDA) è comunemente utilizzata come metodo preciso e semplice per valutare l'**attività microbica** in vari campioni ambientali, inclusi i suoli. L'FDA inizialmente privo di colore, subisce idrolisi sia da parte degli enzimi liberati che da quelli associati alla membrana, dando luogo alla formazione della

fluoresceina, che emettendo colore caratteristico è indice della presenza di organismi vitali (Adam & Duncan, 2001).

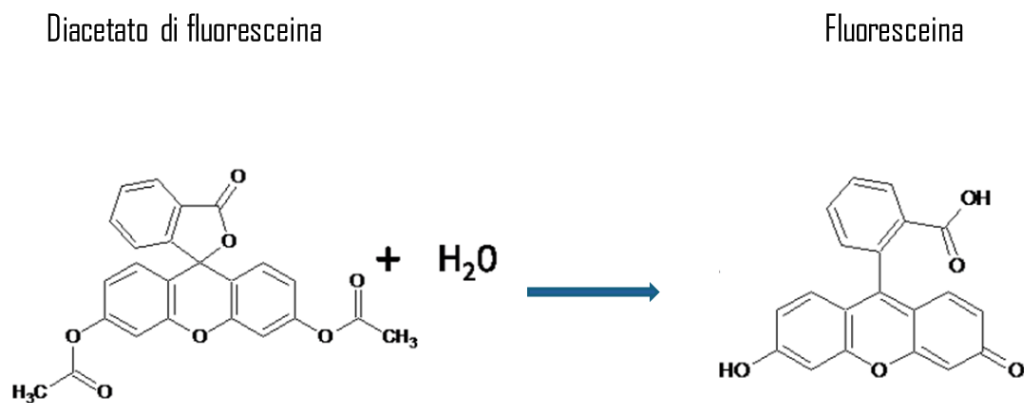


Figura 1.7: Rappresentazione strutture chimiche di diacetato di fluoresceina e fluoresceina

Proprio per la sua intensa fluorescenza, stabilità chimica e mancanza di citotossicità alle concentrazioni di lavoro è stata utilizzata come materiale rilevatore di attività biologiche specifiche come la scissione enzimatica (Le Guern et al., 2020). Un aspetto svantaggioso associato all'uso della fluoresceina è rappresentato dal suo foto-sbiancamento quando esposta alla luce. A causa di questo fenomeno di foto-sbiancamento, è necessario conservare al buio tutti i derivati della fluoresceina (Swisher & Carroll, 1980). Nell'attività di tesi ci si è serviti dell'FDA in quanto la sua degradazione provocata dai microrganismi naturalmente presenti nel suolo genera fluoresceina, elemento chiave per osservare e monitorare nel tempo lo sviluppo dell'attività enzimatica.

2. *Materiali e metodi*

La ricerca condotta in questa tesi si concentra su un approccio fotografico mirato a studiare l'attività batterica naturalmente presente nel suolo e valutarne le variazioni nello spazio e nel tempo. La dinamica dell'attività batterica viene descritta attraverso mappe bidimensionali, offrendo una visione macroscopica dell'attività enzimatica sviluppata dal biofilm che si forma sugli apparati vegetali. Durante le sperimentazioni in laboratorio, sono state condotte una serie di prove utilizzando un vasetto in plexiglass dotato di un pluviale nero sul fondo che consente il corretto drenaggio riempito con palline di vetro trasparente di 2 mm circa, esaminando due scenari: uno privo di vegetazione e l'altro con la presenza di vegetazione. Il punto chiave del metodo sperimentale consiste nell'introdurre una sostanza non conservativa all'interno del vaso, il diacetato di fluoresceina (FDA) in soluzione con l'acqua. I batteri naturalmente presenti nel mezzo poroso rilasciano enzimi che inducono la rottura dei legami molecolari del diacetato, trasformando la soluzione da trasparente a fluorescente (a causa del rilascio di fluoresceina come scarto dell'azione metabolica). Il vasetto viene illuminato attraverso due pannelli costituiti da strisce di luce a LED blu e bianche. Viene innanzitutto scattata una foto in luce naturale per visualizzare la disposizione delle radici e del mezzo poroso senza filtri. La restante e predominante parte della prova viene invece condotta con illuminazione in luce blu, il cui scopo è stimolare l'emissione di luce nella lunghezza d'onda del verde da parte della fluoresceina rilasciata in seguito alla scomposizione di FDA, consentendo l'osservazione dell'attività enzimatica. Utilizzando un codice Matlab appositamente sviluppato per elaborare le immagini nella banda verde, è possibile correlare l'intensità luminosa emessa con la concentrazione di fluoresceina, che rappresenta l'attività biologica presente nel vasetto. Ogni acquisizione fotografica è stata eseguita in una camera oscura, per evitare disturbi luminosi. Gli scatti, effettuati con frequenza di 30 minuti, sono stati preceduti da una fase di calibrazione del sistema per stabilire l'equazione che correla la concentrazione di fluoresceina con i valori di intensità luminosa. L'analisi condotta attraverso la creazione di un apposito codice Matlab e i risultati sono stati rappresentati da mappe di concentrazione di fluoresceina, fornendo una visualizzazione spazio-temporale dell'attività batterica all'interno del vaso. Tutti i dettagli delle fasi del metodo adoperato sono riportati nei paragrafi seguenti.

2.1 *Setup sperimentale*

Il setup sperimentale è stato realizzato in modo da rimanere stabile e invariato per l'intera durata dell'esperimento. Tale configurazione implica la preparazione di una superficie uniforme e livellata (Figura 2.1), su cui viene posizionato un vasetto realizzato in plexiglass dalle dimensioni di 14 cm x 9 cm x 9 cm (Figura 2.2).

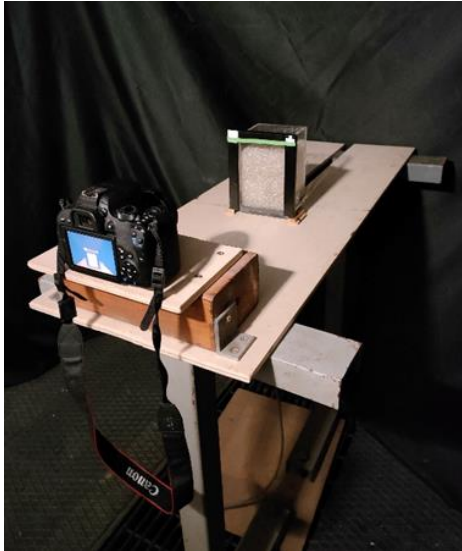


Figura 2.1: Foto base di appoggio per vasetto e fotocamera



Figura 2.2: Vasetto in plexiglass

Il vasetto è stato collegato a un tubo in plastica lungo 1,2 m (Figura 2.3) con un diametro di 0,5 cm, fissato al vaso stesso per consentire il drenaggio e il lavaggio tra una prova e l'altra.



Figura 2.3: Tubo di drenaggio collegato al vasetto

Il materiale di riempimento del vasetto consiste in palline di vetro con un diametro di 2 mm, che garantiscono la possibilità di visualizzare la fluorescenza e la rizosfera all'interno del mezzo. Dopo aver determinato il diametro delle palline di vetro, è stato calcolato il volume del vasetto vuoto e il volume del vaso riempito con le palline (Tabella 2.1), mantenendo un peso netto totale di 1,65 kg. Questo calcolo ha considerato uno spazio libero di circa 0,5 cm dal bordo superiore del vaso.

Tabella 2.1: Calcolo volumi vasetto e mezzo poroso

Volume vasetto netto (l)	Peso mezzo poroso (g)	Volume occupato dal mezzo poroso (l)
1.13	1650.50	0.97

Le seguenti fasi sono state eseguite per misurare il volume dell'acqua in relazione alla porosità del materiale di riempimento del vaso:

1. **Riempimento del vaso con acqua:** Il vaso è stato riempito con acqua, mantenendo uno spazio di circa mezzo centimetro dalla superficie libera al bordo.
2. **Blocco del tubo di drenaggio:** Durante ogni prova, l'uscita del tubo è stata bloccata per impedire il drenaggio dell'acqua.
3. **Misurazione del volume di acqua trasmesso:** Il volume di acqua drenata attraverso il tubo è stato misurato e registrato.
4. **Misurazione del volume effettivo di acqua:** Il volume effettivo di acqua contenuto nel vaso è stato misurato.
5. **Calcolo del valore medio del volume di acqua:** Il valore medio del volume di acqua è stato calcolato considerando la ripetizione dei passaggi per un numero totale di 6 prove.
6. **Calcolo della deviazione standard:** La deviazione standard è stata calcolata per valutare la variabilità dei dati.
7. **Calcolo della porosità:** Conoscendo il volume occupato dalle palline e il volume totale riempito con acqua è stata calcolata la porosità.

Sono state fatte sei prove di misura. I risultati di queste prove sono riportati nella tabella seguente (Tabella 2.2), che mostra il volume di acqua misurato per ciascuna prova, il valore medio del volume, la deviazione standard e il calcolo della porosità complessiva del materiale di riempimento del vaso. Questi dati costituiscono un elemento base per comprendere le caratteristiche del materiale e il suo comportamento nel contesto della ricerca sperimentale.

Tabella 2.2: Calcolo volume medio vasetto e porosità

	Prova volume acqua[l]	Prova porosità [-]
Prova 1	0.324	0.333
Prova 2	0.351	0.361
Prova 3	0.340	0.349
Prova 4	0.351	0.361
Prova 5	0.325	0.334
Prova 6	0.336	0.345
Media volume +/- std	0.338+/- 0.012	
Media porosità +/- std	0.347+/- 0.012	

Per garantire la riproducibilità e la qualità delle prove fotografiche del vasetto, è stata allestita una camera oscura dedicata e un setup fotografico specifico (Figura 2.4 e Figura 2.5).

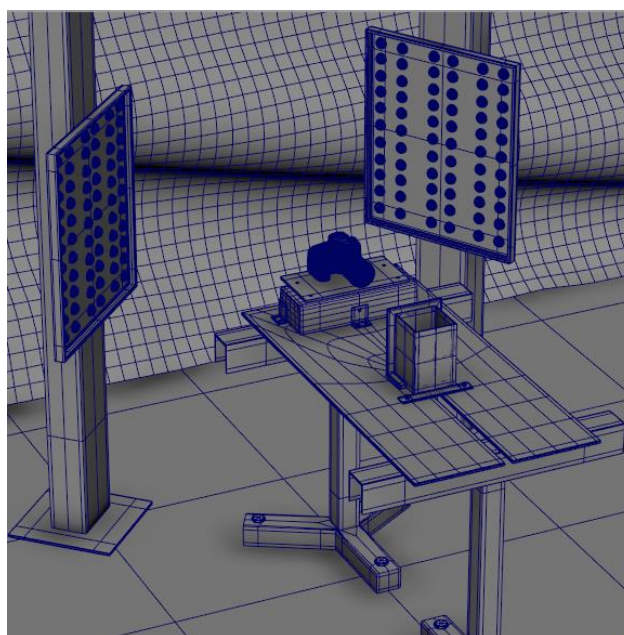


Figura 2.4: Schema del set up (progettazione)

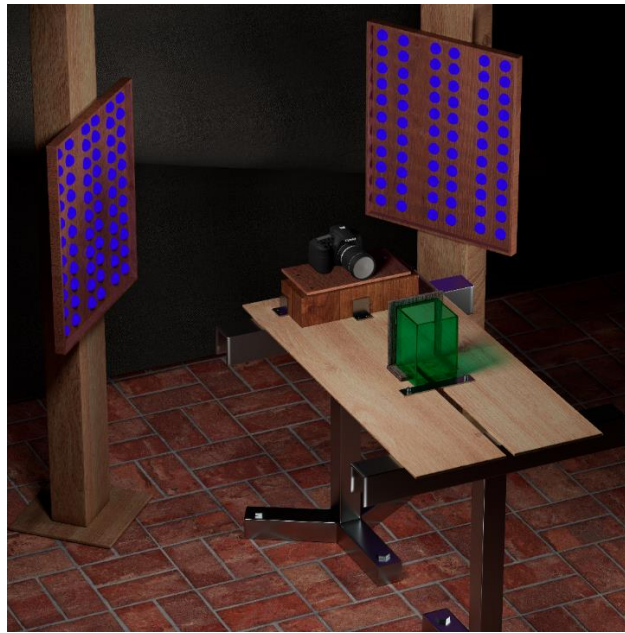


Figura 2.5: Schema di realizzazione del set up (render finale)

L'obiettivo di questa configurazione consiste nel posizionare il vasetto su un tavolo in modo tale che la telecamera possa centrare l'obiettivo in una posizione stabile e fissa, assicurando che il riferimento delle coordinate del centro del vaso sia costante per ogni foto successiva ed evitando qualsiasi rifrazione indesiderata. Il processo di allestimento ha coinvolto i seguenti passaggi:

1. **Scelta della posizione dell'obiettivo:** Dopo vari tentativi e regolazioni, è stata identificata una posizione fissa per l'obiettivo della telecamera che eliminasse completamente le rifrazioni indesiderate.
2. **Posizionamento del vaso:** il vaso è stato fissato sulla tavola utilizzando fissatori metallici ad L in modo che per ogni prova la posizione del vaso fosse esattamente la stessa.
3. **Illuminazione adeguata:** è stata fornita l'illuminazione adeguata ad ottenere immagini più chiare possibili del vaso e del suo contenuto. Si è assicurato che la camera oscura fosse completamente sigillata per evitare l'ingresso di luce esterna, garantendo così condizioni di luce controllata.

Per ottenere una diffusione uniforme della luce senza ombre indesiderate su tutta l'area del vaso, sono state valutate diverse configurazioni, con posizioni differenti per le luci. I

pannelli utilizzati (Figura 2.6). sono stati coperti da carta velina tale da garantire una diffusione della luce più omogenea (Figura 2.7). I tentativi sono stati effettuati sia con luce bianca che con luce blu, sia in condizioni del vasetto privo di acqua che in presenza di acqua.



Figura 2.6: Strisce led montate sui pannelli



Figura 2.7: Carta velina posizionata sui pannelli per rendere la diffusione luminosa più omogenea

Nella prima configurazione, i pannelli sono stati posizionati lateralmente rispetto all'obiettivo, distanziati di circa 1 metro dal vaso. Nella seconda configurazione i pannelli sono stati disposti con un angolo di circa 45 gradi lungo l'asse della macchina fotografica. Nella terza configurazione, i pannelli sono stati posizionati vicino al vasetto con un angolo di 45 gradi, come nella seconda. Dopo aver condotto le tre configurazioni, è emerso che la soluzione con il minor livello di rumore era rappresentata dalla seconda opzione che è stata preferita per acquisire immagini del vasetto minimizzando le interferenze visive.

Per garantire immagini di alta qualità del vaso con le palline, la macchina fotografica (modello CANON EOS 800D) è stata configurata su impostazione manuale. Ciò ha permesso di regolare manualmente la messa a fuoco e lo zoom per catturare le singole palline all'interno del vaso, evitando effetti sfocati.

Sono state regolate tre impostazioni chiave della macchina fotografica:

1. **ISO:** L'ISO rappresenta la sensibilità del sensore alla luce. Valori più alti indicano una maggiore sensibilità alla luce. In generale, valori ISO più elevati sono utilizzati in condizioni di scarsa luminosità.
2. **Apertura del Diaframma:** L'apertura del diaframma controlla la quantità di luce che entra nel sensore e influisce sulla sfocatura e la nitidezza dell'immagine. Aperture più ampie corrispondono a valori inferiori. In condizioni di scarsa luminosità, solitamente si apre il diaframma.
3. **Tempo di Esposizione:** Il tempo di esposizione determina quanto tempo la luce colpisce il sensore. Un tempo di esposizione più lungo permette una maggiore quantità di luce.

Per trovare la combinazione ottimale delle impostazioni sia per la luce bianca che per la luce blu, sono state eseguite 14 diverse combinazioni di illuminazione del vasetto in condizioni sature (Tabella 2.3a e Tabella 2.3b).

Tabella 2.3a: Combinazioni ISO - apertura diaframma - tempo di esposizione in luce bianca (le righe evidenziate in verde rappresentano le combinazioni scelte)

LUCE BIANCA				
Prova N°	Disposizione luci	ISO	Apertura diaframma	Tempo esposizione
1	lontane	800	4	1\13
2	lontane	400	5	1\10
3	lontane	800	5.6	1\15
4	metà	200	5	1\15
5	metà	400	6.3	1\20
6	metà	800	7.1	1\30
7	metà	400	6.3	1\15

Tabella 2.4b: Combinazioni ISO - apertura diaframma – tempo di esposizione in luce blu
(le righe evidenziate in verde rappresentano le combinazioni scelte)

LUCE BLU				
Prova N°	Disposizione luci	ISO	Apertura diaframma	Tempo esposizione
8	lontane	800	5	1\8
9	lontane	800	4	1\8
10	lontane	400	5	1\4
11	metà	400	6.3	1\8
12	metà	400	5	1\10
13	metà	800	4.5	1\15
14	metà	800	4	1\20

Le variazioni considerate coinvolgono differenti impostazioni di ISO, apertura del diaframma e tempo di esposizione, tenendo conto della distanza delle luci. I risultati dell'analisi hanno indicato che, nel caso dell'illuminazione con luce bianca, la prova n°5 ha rappresentato la scelta più efficace, mentre la prova n°13 ha dato riscontro positivo per la luce blu. Per lo svolgimento delle prove è stata usata la configurazione n°13.

2.2 *Analisi preliminari*

Nell'ambito delle indagini preliminari, le immagini acquisite sono state importate in Matlab con l'obiettivo di individuare la forma e le dimensioni dell'area rappresentativa del vasetto. Tale area è definita come quella avente una dimensione tale da racchiudere pori e grani in modo significativo all'interno del vasetto, permettendo di considerare il fenomeno a scala macroscopica, ma rimanendo contemporaneamente sufficientemente piccola per operare con dimensioni ridotte. L'area viene selezionata a partire dal ritaglio della faccia frontale del vasetto ripresa dall'obiettivo della fotocamera eliminando le bordature opache del plexiglass. Dopo aver caricato le immagini del vasetto in luce blu è stata estratta la banda verde colore della luminosità emessa dalla fluoresceina. L'intensità luminosa nella banda verde, rappresentata in Numeri Digitali (DN) a 16 bit, è stata analizzata per convalidare l'uniformità della distribuzione luminosa, individuare l'area minima rappresentativa e sviluppare curve di calibrazione. Per misurare la distribuzione

spettrale delle luci blu (ovvero la distribuzione della lunghezza d'onda e l'intensità complessiva emessa) (Figura 2.8) è stato impiegato uno spettrometro (Sekonic C-700) (Figura 2.9).



Figura 2.8: Curva di distribuzione della luce blu misurata



Figura 2.9: Spettrometro modello Sekonic C-700

2.3 Verifica uniformità luminosa

Tramite codice Matlab, la verifica dell'uniformità della luce è stata eseguita analizzando nella banda del verde la media dei DN all'interno di un'area di controllo. Quest'area è stata spostata lungo due direzioni distinte: una verticale e una orizzontale attraverso l'immagine. Questo processo ha consentito di valutare la consistenza e uniformità della distribuzione luminosa nel contesto dell'esperimento (Figura 2.10 e Figura 2.11).

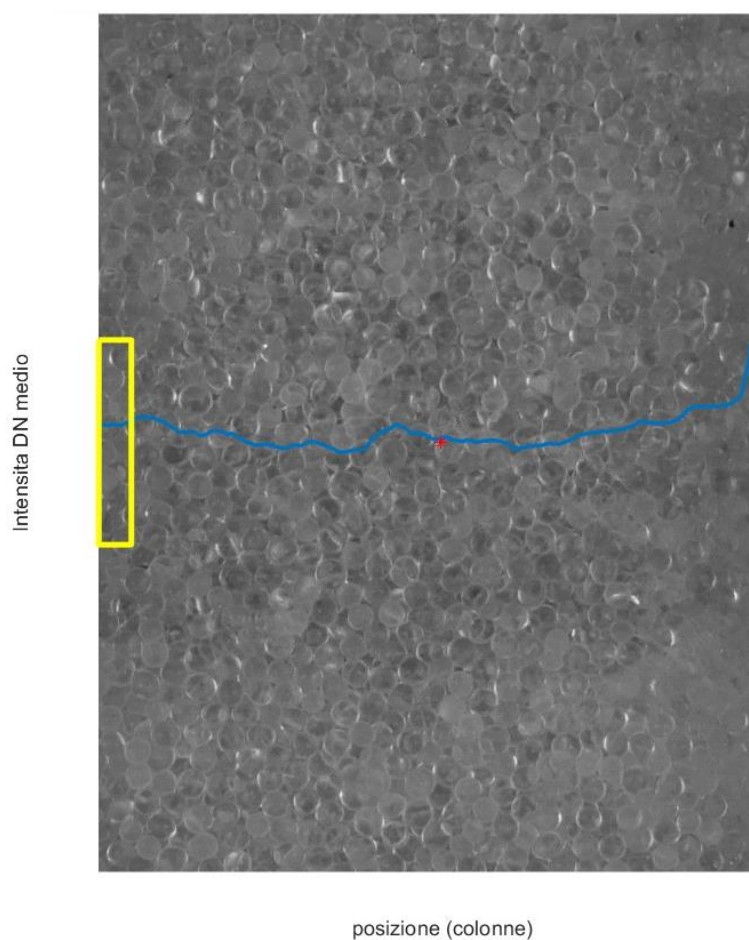


Figura 2.10: Variazione dei DN in base allo spostamento orizzontale del rettangolo rappresentativo

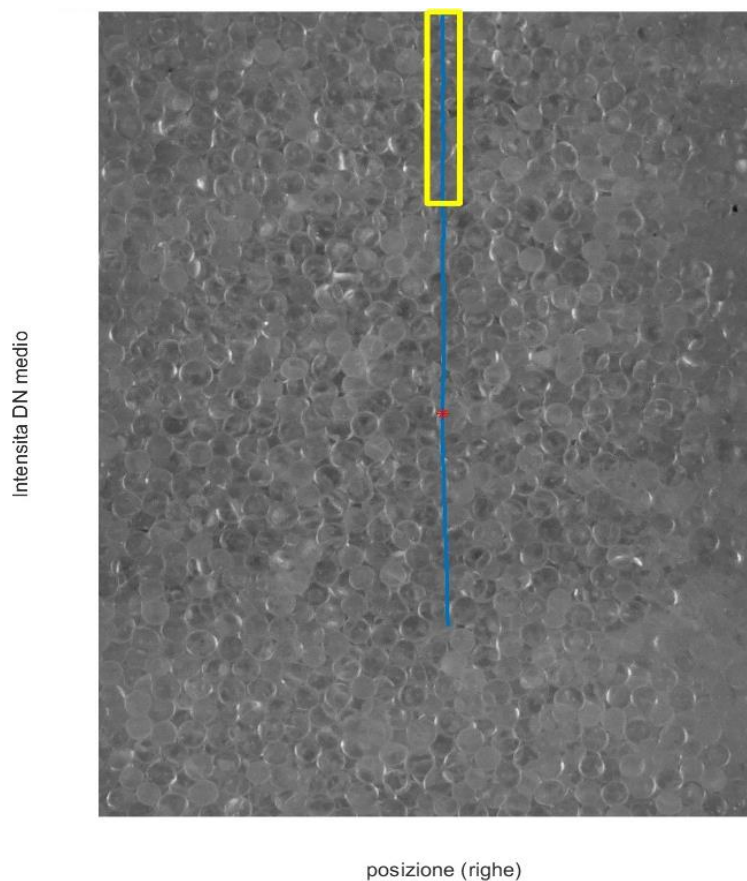


Figura 2.11: Variazione dei DN in base allo spostamento verticale del rettangolo rappresentativo

2.4 Preparazione soluzioni acqua-fluoresceina

Nella fase iniziale dell'attività di laboratorio è stata impiegata fluoresceina in pastiglie, necessaria per ricavare l'equazione che permette di correlare l'intensità luminosa prodotta e la concentrazione di fluoresceina attraverso l'analisi fotografica mediante Matlab. Dopo aver ottenuto la soluzione di acqua e fluoresceina, sono stati compiuti diversi passaggi nell'ambito dell'analisi. Inizialmente, sono state scattate foto preliminari del vasetto sia in luce bianca che in luce blu, sia vuoto che saturo d'acqua fino a raggiungere una capacità massima di 400 ml. Successivamente, sono state preparate soluzioni con concentrazioni di fluoresceina note da 0 a 10 mg/l, scattando foto con il vaso riempito dalla miscela acqua-fluoresceina sotto luce blu. Infine, per eliminare eventuali residui di fluoresceina dalle palline, in quanto sostanza molto persistente, è stato eseguito il risciacquo del vaso.

2.5 Calibrazione fluorimetro

Il fluorimetro, un dispositivo fondamentale per l'analisi e la quantificazione di sostanze o concentrazioni che emettono fluorescenza, è stato impiegato per eseguire misura di concentrazioni in termini di mg/l di fluoresceina. Le soluzioni a concentrazione nota utilizzate per la calibrazione dello strumento (0 mg/l, 0.1 mg/l, 0.2 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l, 10 mg/l) sono state ottenute per diluizioni a partire da una soluzione a 10 mg/l prodotta con polvere di fluoresceina pura (Figura 2.12).



Figura 2.12: Diluizioni concentrazioni note di fluoresceina

La misura è stata effettuata, dopo opportuno oscuramento dei contenitori, mantenendo la superficie ottica del sensore immersa in modo perpendicolare rispetto alla superficie del recipiente di misura a una distanza di almeno sei/sette centimetri dal fondo, al fine di evitare possibili errori nelle misurazioni. Infine, una curva interpolante del secondo ordine è stata selezionata tra le opzioni disponibili (Figura 2.13).

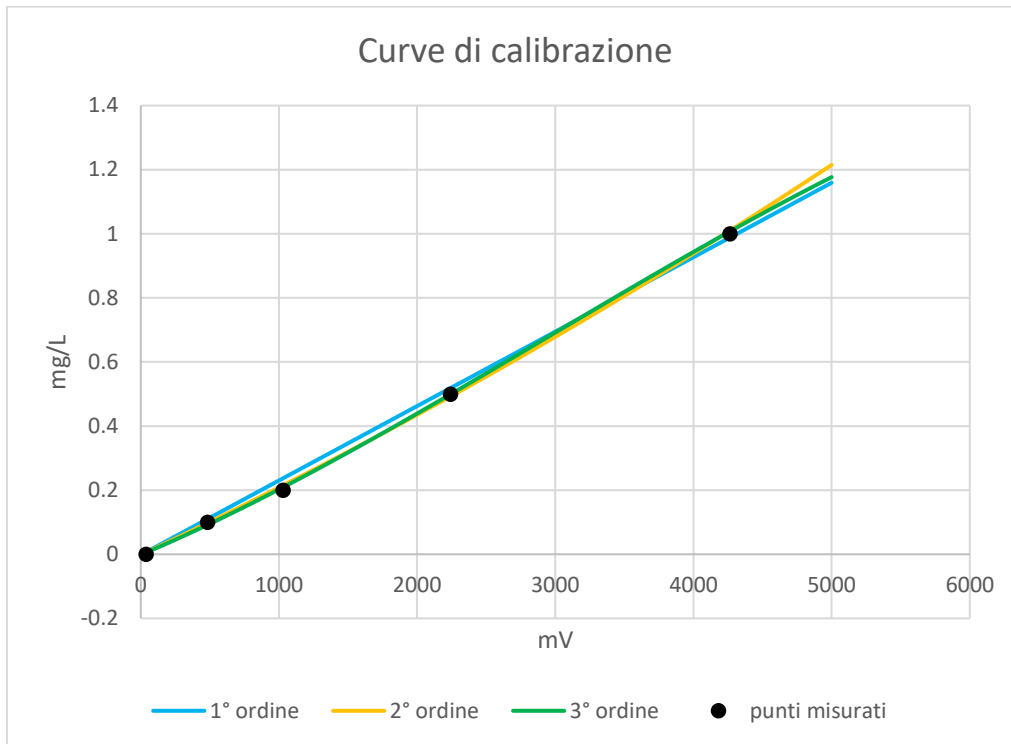


Figura 2.13: Tracciamento curva di calibrazione a partire da 5 valori di concentrazione (da 0 mg/l a 1 mg/l di fluoresceina)

2.6 Area rappresentativa

Per ogni foto acquisita, è stato individuato il baricentro della superficie frontale del vaso, delimitando successivamente il perimetro per escludere i bordi in plexiglass e l'impluvio. Questo approccio mira a garantire la nitidezza e la pulizia dei risultati, eliminando elementi che potrebbero influire sulla corretta interpretazione delle prove con FDA.

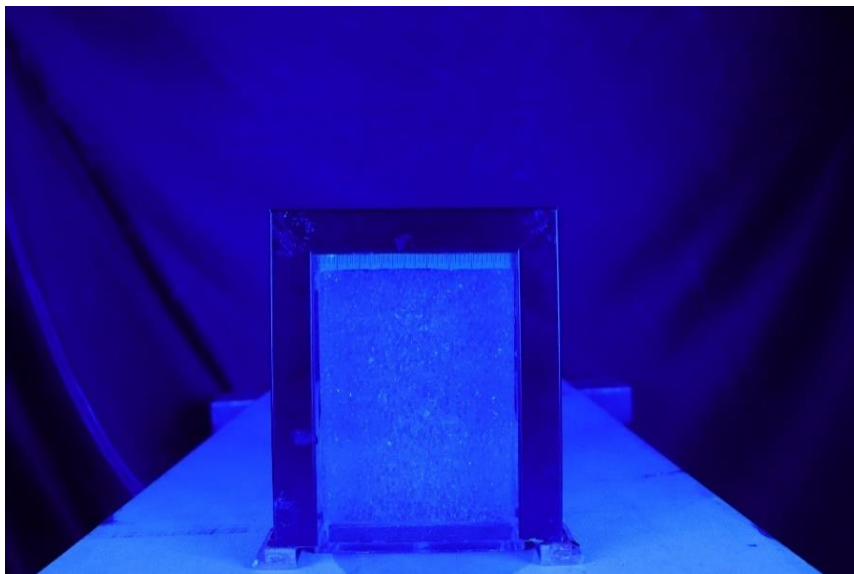


Figura 2.14: Esempio di acquisizione di una foto in luce blu

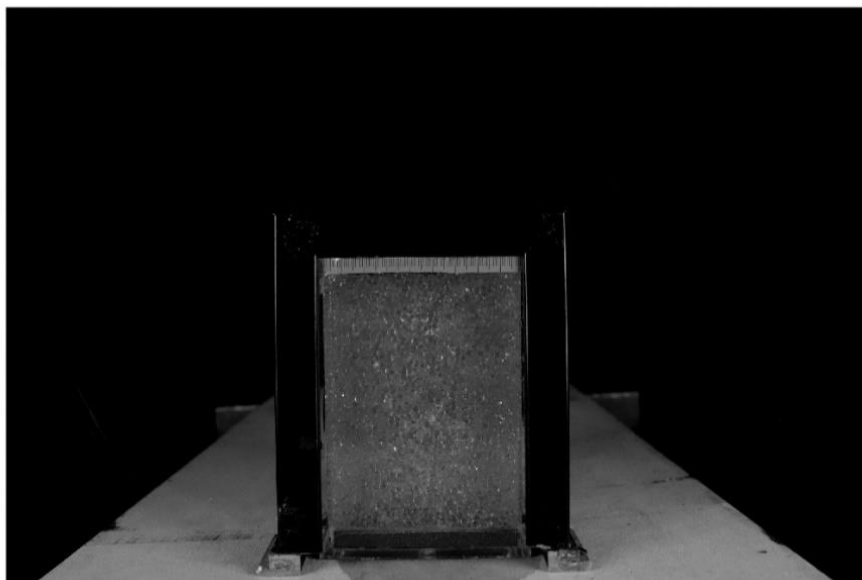


Figura 2.15: Estrazione della banda verde mediante codice Matlab

Partendo dall'area iniziale (Figura 2.14 e Figura 2.15), è stato eseguito un processo di rimpicciolimento progressivo (Figura 2.16 e Figura 2.17) mediante la riduzione di 4 righe e 4 colonne di pixel per ogni area.

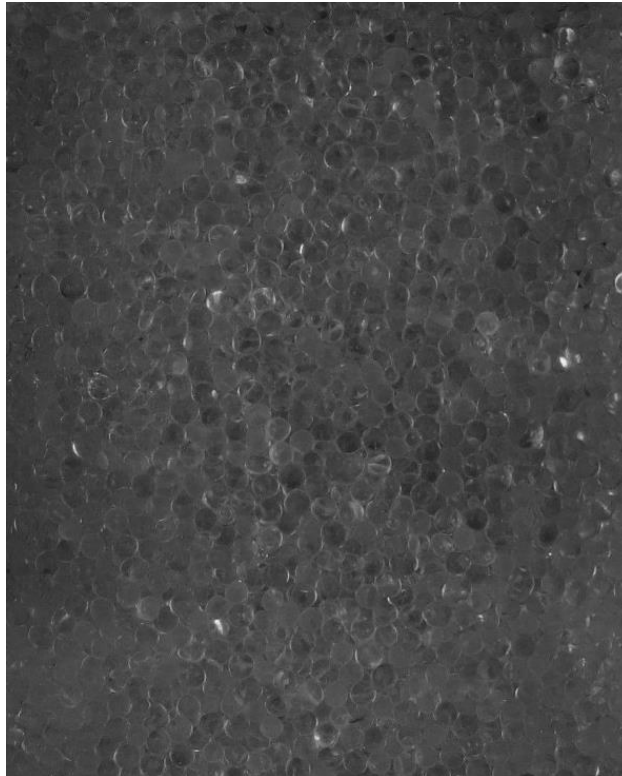


Figura 2.16: Facciata frontale del vasetto vista in banda verde

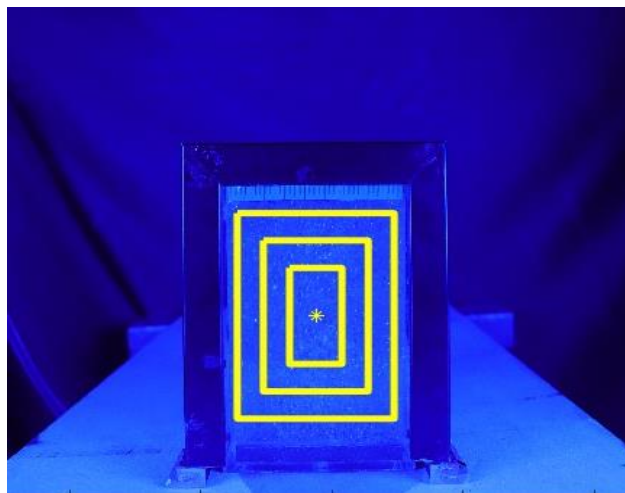


Figura 2.17: Rimpicciolimenti progressivi delle aree rispetto all'area di riferimento di partenza

Per ciascuna di queste aree, sono stati calcolati il valore medio di DN e la deviazione standard in ciascuna area. Si ottiene poi il valore della deviazione standard tra le medie di tutti i DN. Dal valore ottenuto si ricava un valore limite con cui identificare l'area rappresentativa, che deve essere sufficientemente piccola da permettere un'analisi

spaziale, ma non troppo da subire l'influenza della granulometria. A tal fine, è stata calcolata la differenza tra i valori medi dei DN delle aree contigue (Figura 2.18):

$$\text{differenza } \overline{DN} \text{ aree} = \overline{DN} \text{Area}_i - \overline{DN} \text{Area}_{i-1}$$

per valutare quanto la dimensione dell'area di riferimento influisca sulla variazione di intensità luminosa in un vasetto uniformemente riempito con soluzione di fluoresceina e si è scelta come rappresentativa l'area più grande tra quelle in cui la differenza di intensità luminosa tra l'area stessa e la precedente fossero inferiori alla soglia limite ragionevolmente stabilita in funzione della variabilità di tali differenze.

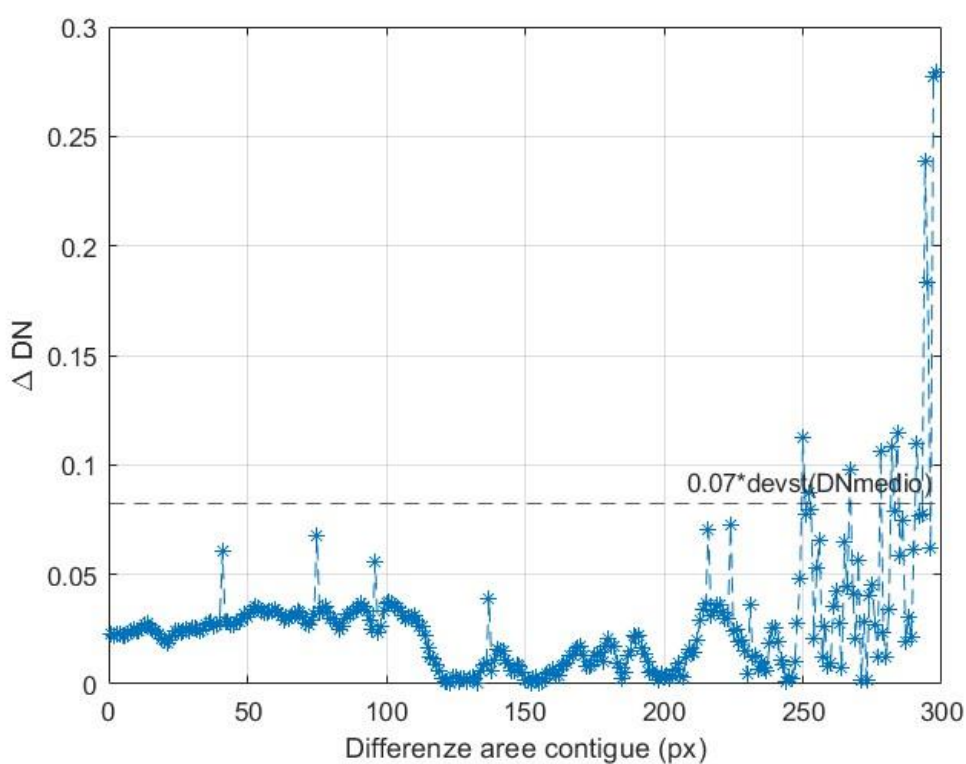


Figura 2.18: Rappresentazione della differenza delle aree contigue e rispettivi DN medi e soglia limite per la scelta dell'area rappresentativa

2.7 Curva di calibrazione

Il processo di calibrazione del sistema è stato condotto per ottenere l'equazione di conversione dell'intensità luminosa in concentrazione di fluoresceina. A tal fine sono state acquisite immagini a concentrazioni di fluoresceina note: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 mg/l calcolando il valore medio e deviazione standard dei DN corrispondenti a ciascuna concentrazione su tutta la faccia disponibile del vasetto, per poi interpolare i dati ottenuti con un'equazione di secondo grado.

2.8 Acquisizione e analisi foto con FDA

Dopo aver derivato l'equazione di calibrazione, la fase successiva dello studio si è concentrata sull'acquisizione e sull'analisi delle immagini utilizzando il diacetato di fluoresceina (FDA). Questo composto, sottoposto all'azione degli enzimi batterici presenti nel sistema in esame, ha rilasciato fluoresceina, la cui concentrazione è stata determinata in funzione dell'intensità luminosa secondo la relazione ottenuta in fase di calibrazione. Sono state eseguite diverse prove. In ciascuna di esse la sequenza di acquisizione delle immagini del vasetto contenente FDA ha compreso una fase preliminare di acquisizione delle foto, che ha coinvolto il riempimento del vaso in plexiglass con il mezzo poroso. Sono state acquisite foto del vaso sia a vuoto che riempito d'acqua, sia sotto luce bianca che luce blu in modo da avere la possibilità di analizzare la disposizione geometrica del sistema pianta-rizosfera-mezzo poroso. Successivamente, è stata selezionata una quantità di FDA pari a 0.25 g dopo aver completato le fasi preliminari. Una prova iniziale, che ha coinvolto acquisizioni fotografiche a intervalli di 1, 2, 5 e 10 minuti, ha orientato la decisione di adottare una risoluzione temporale di 30 minuti. Questa scelta ha garantito un tasso di reazione adeguato alla sensibilità del metodo fotografico, evitando allo stesso tempo la perdita di informazioni che avrebbe potuto verificarsi con intervalli di acquisizione più lunghi, come ad esempio uno scatto ogni ora. L'acquisizione delle foto è stata eseguita con modalità automatica in condizioni idrostatiche, nel corso di 7 prove (Tabella 2.5) successive a quella preliminare, di cui la prima prova (prova 1) è stata usata solo come pilota per determinare la frequenza di acquisizione adatta. Le prove n°2, n°3, n°4 e n°5 sono state eseguite su vasetto non vegetato, mentre le ultime due prove hanno coinvolto due tipologie diverse di specie

vegetali (*Rotala Macrandra* ed *Alternanthera Rosanervig*) per valutare l'influenza dell'apparato radicale e delle foglie nella reazione di degradazione dell'FDA ad opera dei microrganismi.

Tabella 2.5: Durata prove FDA, concentrazioni usate e numero di scatti totali eseguiti per ciascuna prova, con frequenze di uno scatto pari ad uno ogni 30 minuti

Prova	1	2	3	4	5	<i>Rotala</i>	<i>Alternanthera</i>
n° scatti	74	217	118	198	132	157	194
Durata prova (giorni)	1.50	4.50	2.50	4.00	3.00	3.50	4.00
Conc. FDA [g/l]	0.250	0.255	0.252	0.255	0.255	0.302	0.300

Mediante codice Matlab è stata creata una matrice 3D per ogni prova, contenente in ogni strato la banda verde di ogni singola foto, per tutti gli scatti eseguiti, da cui è stato eseguito il ritaglio della superficie di interesse. Successivamente, per ogni foto, è stata ridotta la risoluzione in modo tale da rendere l'analisi rappresentativa a scala macroscopica, creando una griglia tale che ogni cella racchiudesse almeno tre grani del mezzo poroso, ciascuno di dimensioni pari a 2 mm, sezionando così l'area di interesse in celle di 20 x 20 pixel. Per ogni cella è stato assegnato il valore medio di DN dei pixel in esso racchiusi. Utilizzando l'equazione di calibrazione della fluoresceina (come descritto nel paragrafo precedente) i valori dei DN ottenuti per ciascuna foto sono stati trasformati in valori effettivi di concentrazione di fluoresceina rilasciata in ogni singola immagine, costruendo così delle mappe di concentrazione 2D dell'attività enzimatica sull'arco temporale di ciascuna prova.

3. Risultati

In questa sezione, si presentano i risultati delle indagini fatte, focalizzando l'attenzione su mappe di concentrazione ottenute da 4 prove condotte su un vasetto non vegetato e 2 prove eseguite sullo stesso vasetto, ma utilizzando diverse specie di piante acquatiche (*Rotala* ed *Alternanthera*). Come delineato negli obiettivi della tesi, lo scopo principale di queste analisi è esaminare la relazione tra le reazioni della fluoresceina, rappresentate in termini di concentrazione, e l'eventuale attività microbica riscontrata nei diversi campioni. Questa valutazione si basa sull'acquisizione di fotografie e sull'analisi dei dati mediante metodi fotografici, supportati dall'impiego del software Matlab.

3.1 Calibrazione

Da ogni foto acquisita è stata estratta la banda verde. Successivamente, sono stati eseguiti una serie di rimpicciolimenti progressivi dell'area di riferimento, consentendo di operare con aree sempre più ridotte rispetto a quella di partenza. Per garantire un controllo più accurato, una volta individuato il valore rappresentativo dell'area più piccola, sono state esaminate tre forme diverse: un quadrato, un rettangolo verticale (che segue la forma del vasetto) e un rettangolo orizzontale (Figura 3.1). Per ciascuna di queste tre aree definite, è stato calcolato il valore medio dei Numeri Digitali (DN). Dall'analisi comparativa dei tre valori, è emerso che, a parità di area, la forma di rappresentazione non ha un impatto significativo.

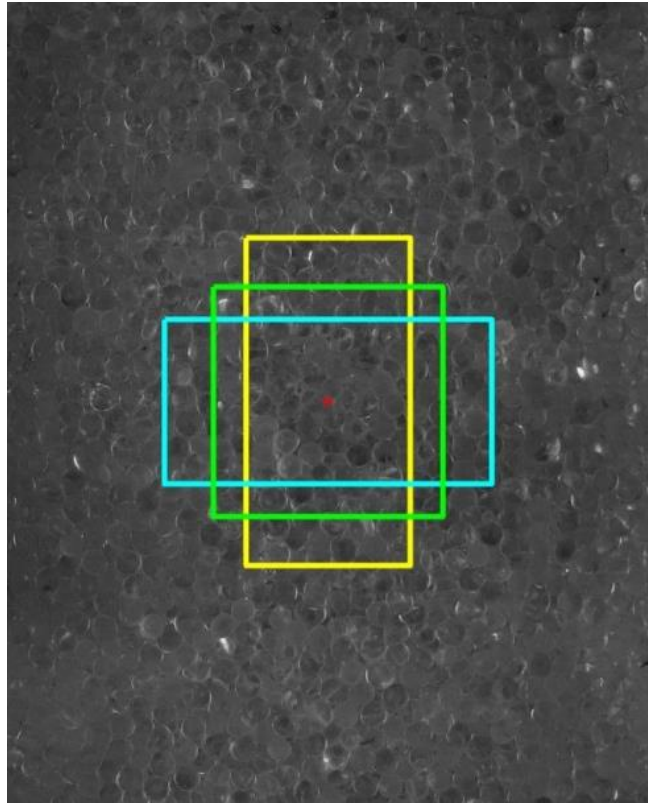


Figura 3.1: Rappresentazione di 3 forme di aree diverse

La variazione percentuale tra i valori medi dei DN delle tre diverse aree è risultata essere dello 0,02%. Considerando che si tratta di una variazione trascurabile, è stata scelta come area rappresentativa quella che segue fedelmente la reale forma del vasetto.

Per preparare le sperimentazioni con le soluzioni di Diacetato di Fluoresceina (FDA) all'interno del vasetto, è stato condotto un iniziale studio che comprendeva scatti fotografici e analisi dei valori dei DN relativi a soluzioni con concentrazioni di fluoresceina già conosciute: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 mg/l. Questo approccio ha permesso di calcolare il DN medio associato a ciascuna concentrazione (Tabella 3.1) e successivamente di interpolare i dati attraverso un'equazione di secondo grado (Figura 3.2). Tale equazione è stata essenziale per convertire i valori di intensità luminosa generati in corrispondenti concentrazioni di fluoresceina. Questo passaggio risulta determinante per le prove con l'FDA poiché consente di determinare i valori di concentrazione di fluoresceina generata dalla decomposizione dell'FDA ad opera dei batteri.

Tabella 3.1: Concentrazioni fluoresceina vs DN medio corrispondente e deviazione standard

Concentrazioni (mg/l)	Media DN	Media St.Dev
0	48	15.28
0.10	208	14.85
0.20	367.36	13.04
0.50	834.85	11.22
1	1587	11.78
2	2990	12.19
4	5389	12.26
6	7248	28.26
10	9342.23	13.02

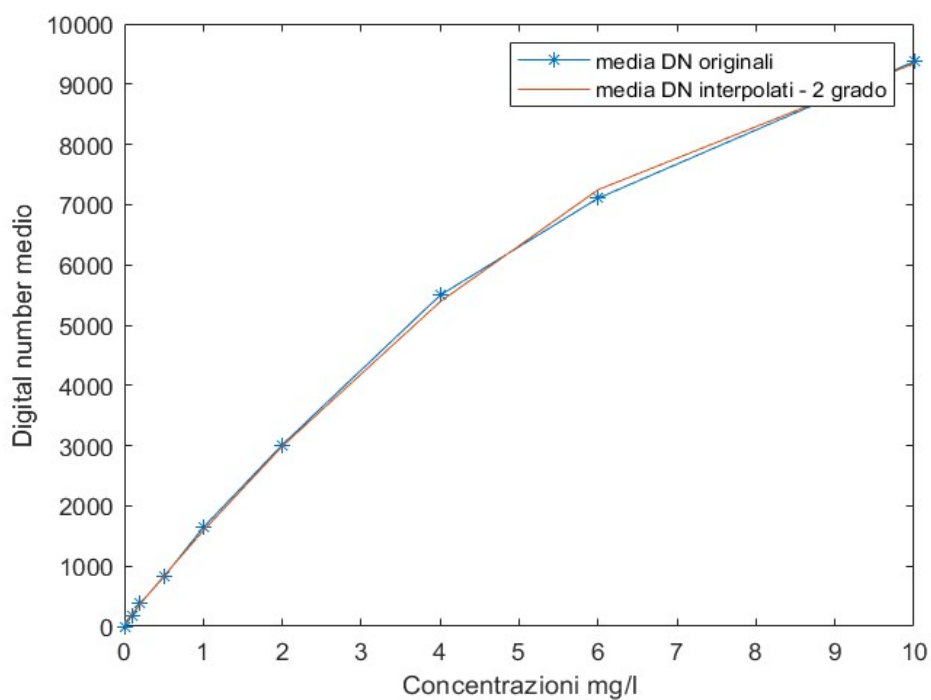


Figura 3.2: Rappresentazione della curva di calibrazione

L'equazione che meglio interpola i dati è una equazione di secondo grado:

$$y = -67.641x^2 + 1605.8x + 48.559$$

I coefficienti ricavati dall'equazione saranno necessari per l'ultima fase dell'attività che riguarda l'utilizzo del diacetato di fluoresceina, per poter risalire alla concentrazione di fluoresceina rilasciata dall'attività enzimatica del biofilm.

3.2 *Visualizzazione dell'attività enzimatica*

Durante ciascun esperimento, è stata acquisita una fotografia ogni mezz'ora. Nel dettaglio, l'analisi della prova numero 5, che ha comportato la raccolta di un totale di 132 fotografie, è stata presentata attraverso una selezione rappresentativa di immagini fotografate (Figura 3.3a, Figura 3.3b, Figura 3.3c, Figura 3.3d).

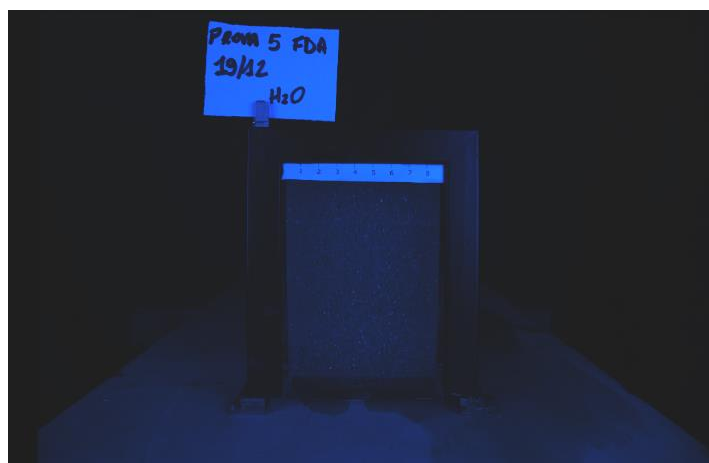


Figura 3.3a: Primo scatto della serie di foto al tempo 0



Figura 3.3b: Scatto dopo 10h



Figura 3.3c: Scatto dopo 30h



Figura 3.3d: Scatto dopo 60h

Il modello iniziale considerato come riferimento è caratterizzato da una configurazione omogenea, priva di vegetazione, in cui il contenitore è riempito con il mezzo poroso costituite dalle palline descritte nel capitolo 2 e Il modello iniziale considerato come riferimento è caratterizzato da una configurazione omogenea, priva di vegetazione, in cui il contenitore è riempito con il mezzo poroso. Le reazioni della fluoresceina non sono sempre facilmente percepite a occhio nudo. Pertanto, è stato necessario ricorrere all'elaborazione delle immagini tramite Matlab, mediante la quale sono state generate le mappe di concentrazione di cui si riporta traccia relative alla prova numero 5. Nella sequenza di figure sottostanti (Figura 3.4a, Figura 3.4b, Figura 3.4c, Figura 3.4d, Figura 3.4e, Figura 3.4f), vengono presentate le mappe di concentrazione della fluoresceina,

rappresentate in termini di distribuzione spaziale di concentrazioni di fluoresceina nei diversi pixel di ciascuna immagine. Queste mappe illustrano l'evoluzione della reazione nel tempo. Si riportano come esempio dei plot raffiguranti acquisizioni in diversi frangenti di tempo.

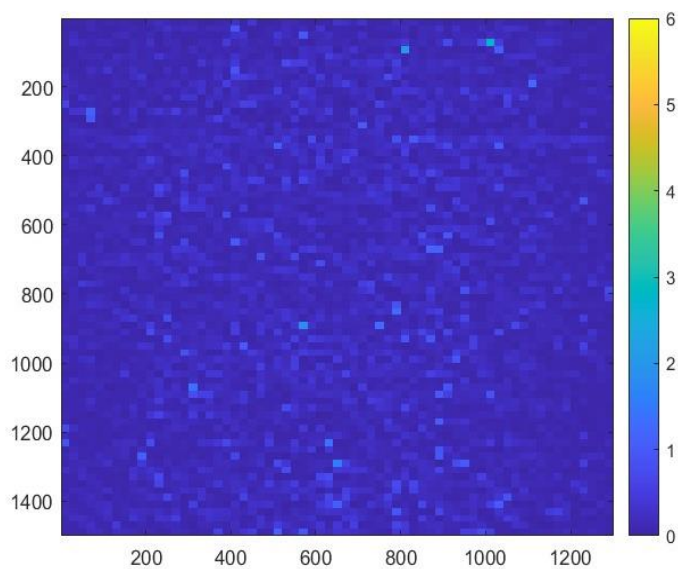


Figura 3.4a: Matrice di concentrazione relativa allo scatto eseguito al tempo 0

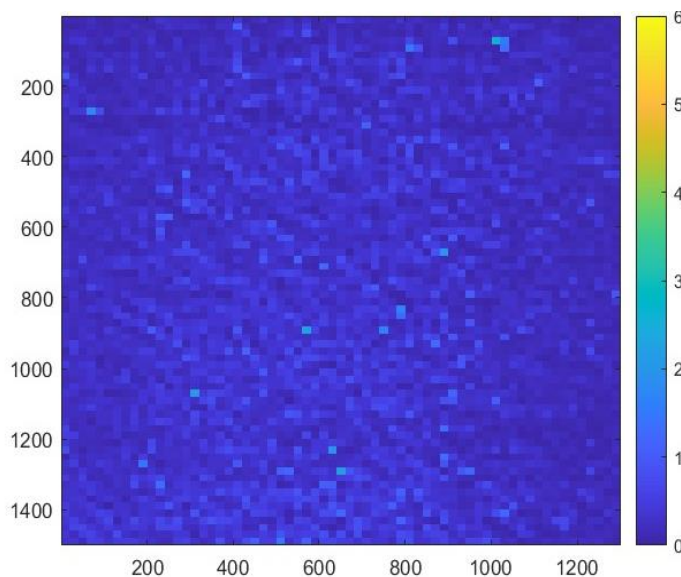


Figura 3.4b: Matrice di concentrazione relativa allo scatto eseguito dopo 10h

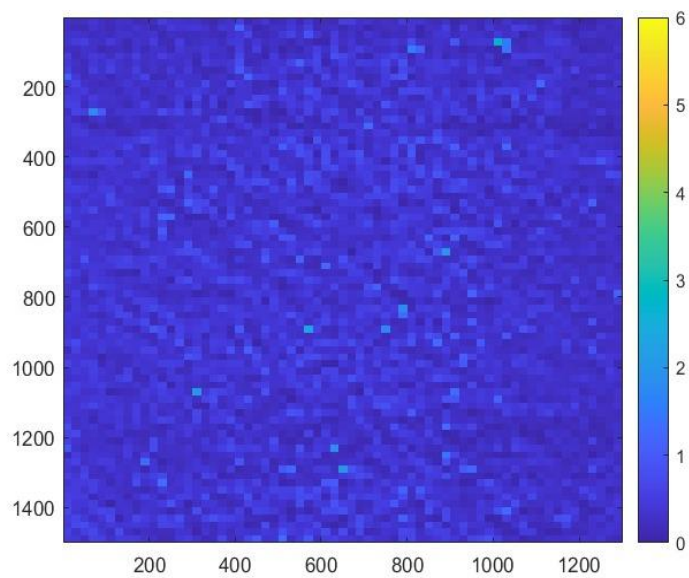


Figura 3.4c: Matrice di concentrazione relativa allo scatto eseguito dopo 22h

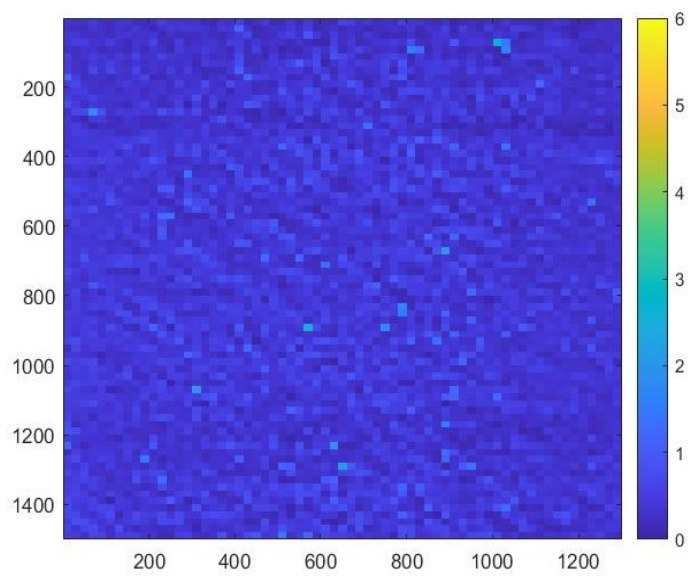


Figura 3.4d: Matrice di concentrazione relativa allo scatto eseguito dopo 30h

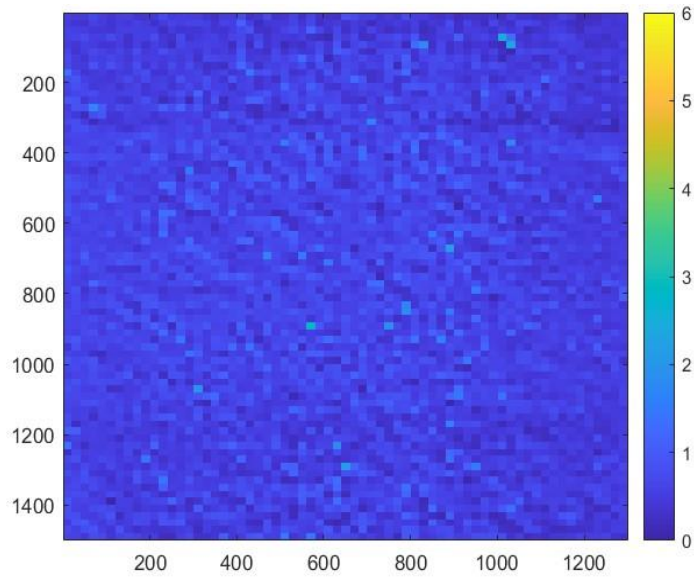


Figura 3.4e: Matrice di concentrazione relativa allo scatto eseguito dopo 48h

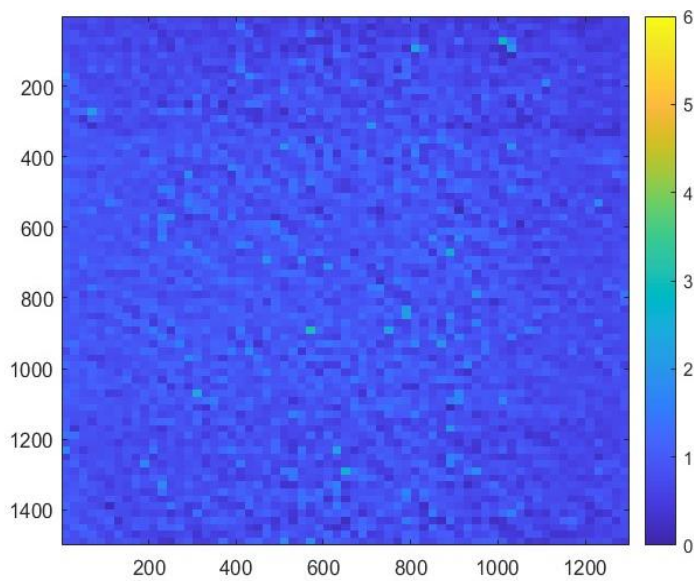


Figura 3.4f: Matrice di concentrazione relativa all'ultimo scatto eseguito (dopo 66h)

Figura 3.4 a - f: Mappe di concentrazione di fluoresceina della prova 5. I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel, con scatti eseguiti all'istante 0, dopo 10h, 22h, 30h, 48h ed ultimo scatto).

Dalle mappe di concentrazione, emerge chiaramente che nel corso del tempo i valori di concentrazione della fluoresceina aumentano. Questo fenomeno può essere attribuito alle

reazioni con eventuali microrganismi presenti sulla superficie del mezzo poroso o sulle pareti del vaso.

I risultati di tutte le prove (Figura 3.5a, Figura 3.5b, Figura 3.5c, e Figura 3.5d) eseguite con il vaso non vegetato sono stati confrontati, considerando che ciascuna prova ha avuto un tempo di acquisizione delle foto variabile. La prova più lunga è stata la n°2 (Figura 3.5a), che ha registrato un periodo massimo di acquisizione dati pari a 5 giorni.

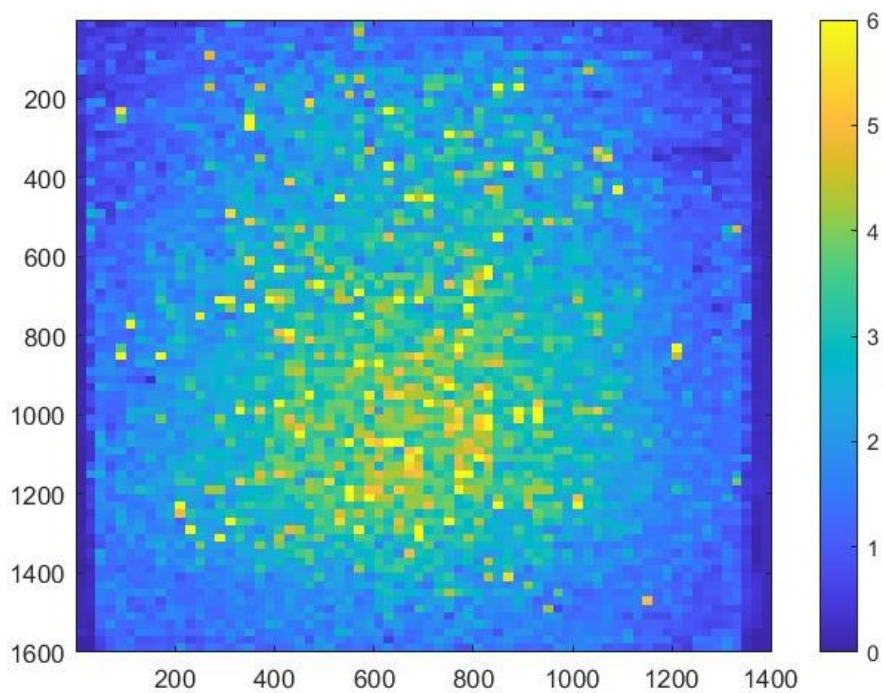


Figura 3.5a: Prova 2 matrice di concentrazione di fluoresceina, la matrice rappresenta l'ultima acquisizione fatta (t=6510min) I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel

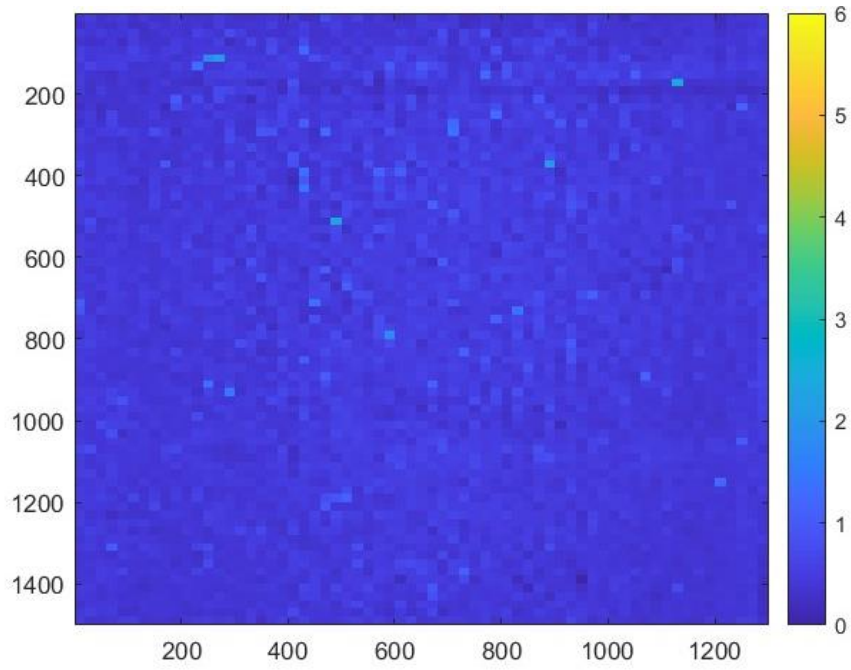


Figura 3.5b: Prova 3 matrice di concentrazione di fluoresceina, la matrice rappresenta l'ultima acquisizione fatta ($t=3540\text{min}$). I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel

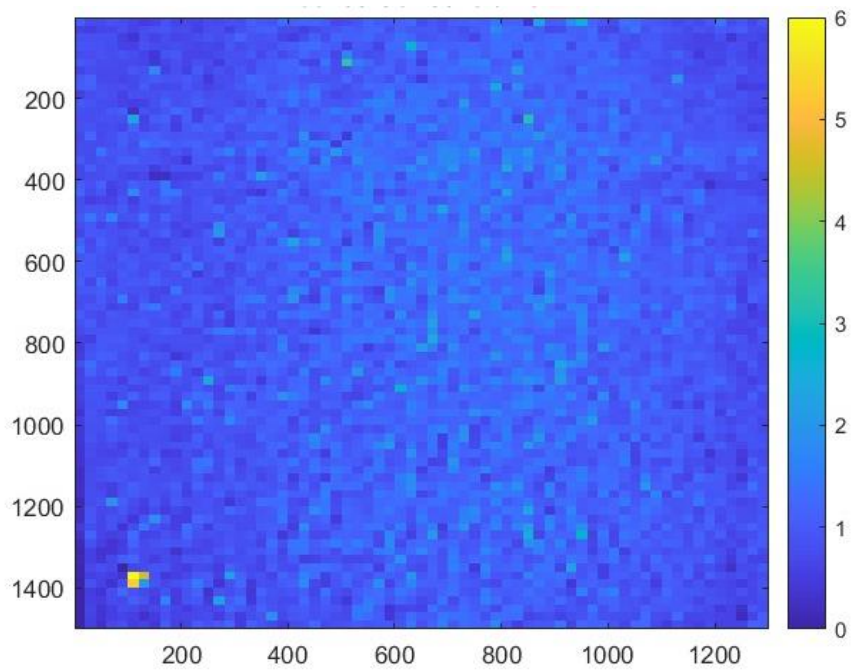


Figura 3.5c: Prova 4 matrice di concentrazione di fluoresceina, la matrice rappresenta l'ultima acquisizione fatta ($t=5940$) I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel

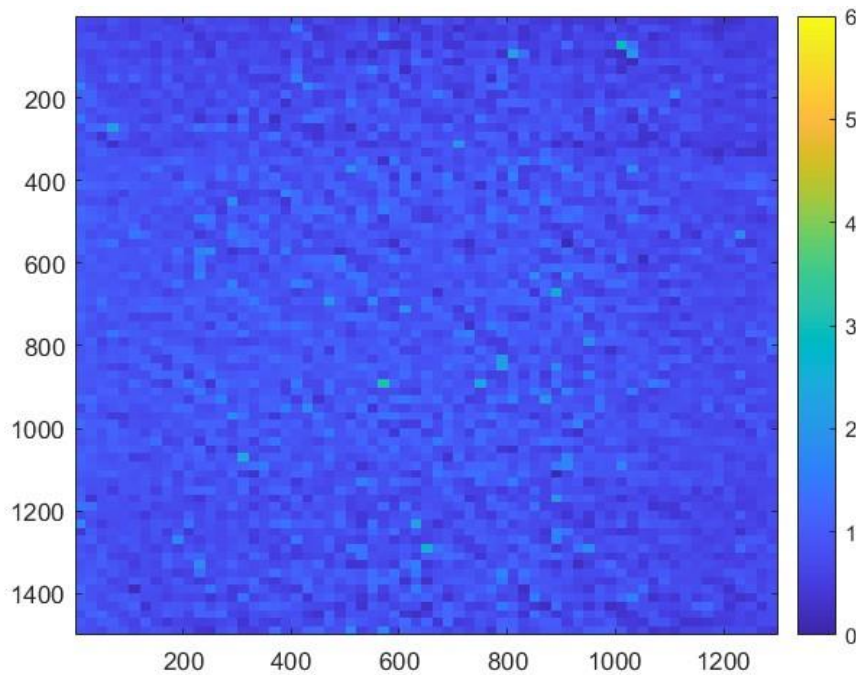


Figura 3.5d: Prova 5 matrice di concentrazione di fluoresceina, la matrice rappresenta l'ultima acquisizione fatta ($t=3960$). I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel

Le mappe di concentrazione evidenziano somiglianze qualitative tra le quattro prove eseguite sul vaso non vegetato, suggerendo che in tutti i casi si è vista una trasformazione di FDA in fluoresceina e che la reazione di sviluppo della fluoresceina è proseguita per l'intera durata di ogni prova. Tuttavia, la seconda prova si distingue dalle altre per un evento particolare. Durante questa prova, si è verificato un drenaggio dell'acqua, determinando un abbassamento progressivo del livello dell'acqua nel tempo. La concentrazione rilevata è stata maggiore che in altre prove (Figura 3.6b, Figura 3.6c, Figura 3.6d). Questo indica che la maggior presenza di ossigeno dovuta alle condizioni insature ha permesso un maggiore sviluppo di fluoresceina nonostante il volume di soluzione fosse inferiore (Figura 3.6a).

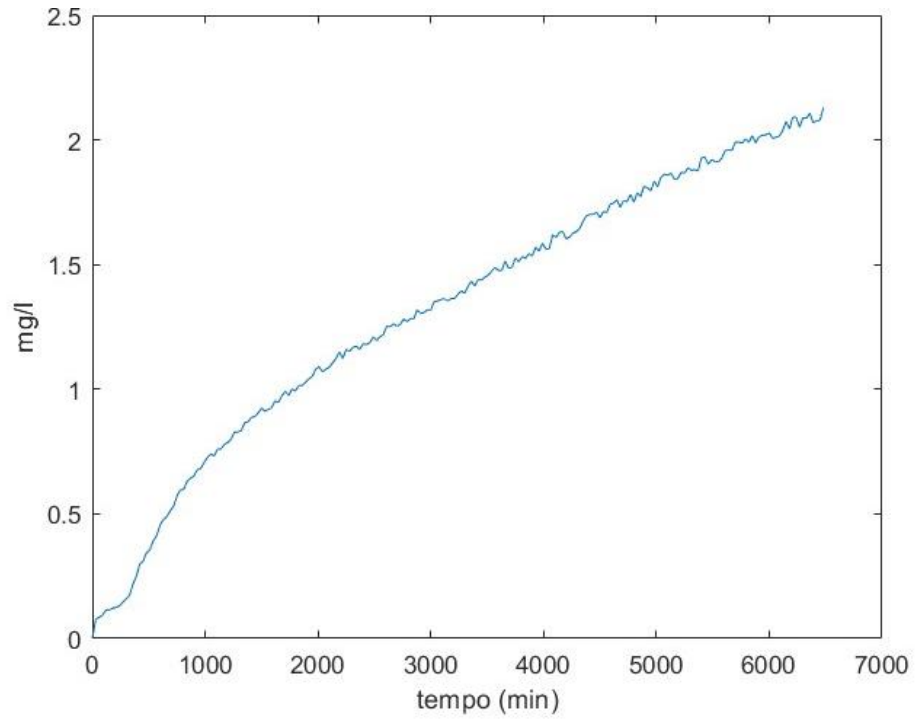


Figura 3.6a: Concentrazione di fluoresceina media nel tempo calcolata per ogni foto (prova2)

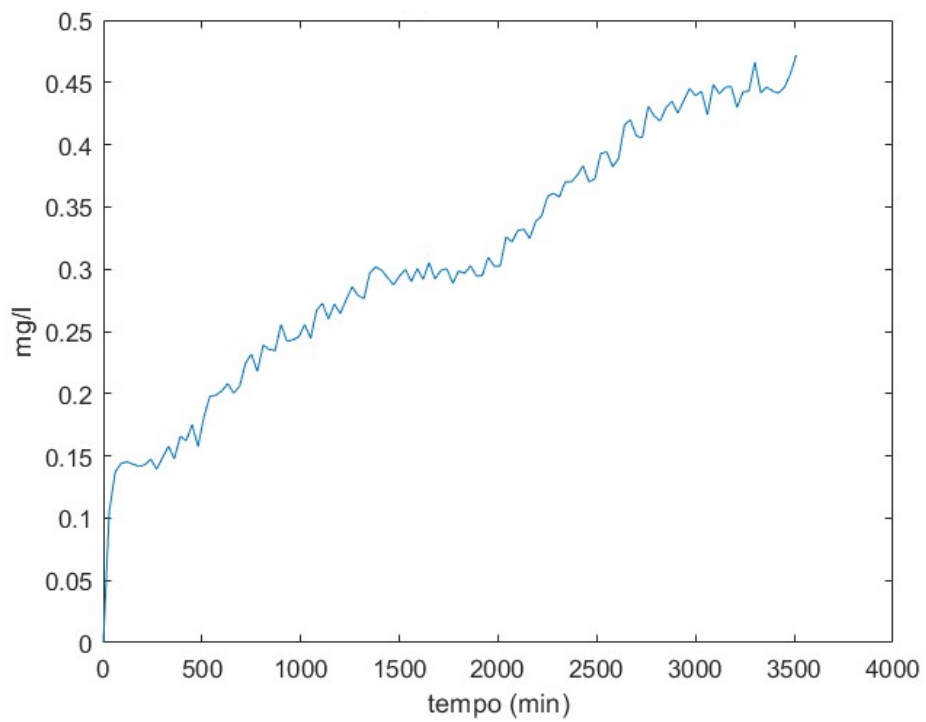


Figura 3.6b: Concentrazione di fluoresceina media nel tempo calcolata per ogni foto (prova3)

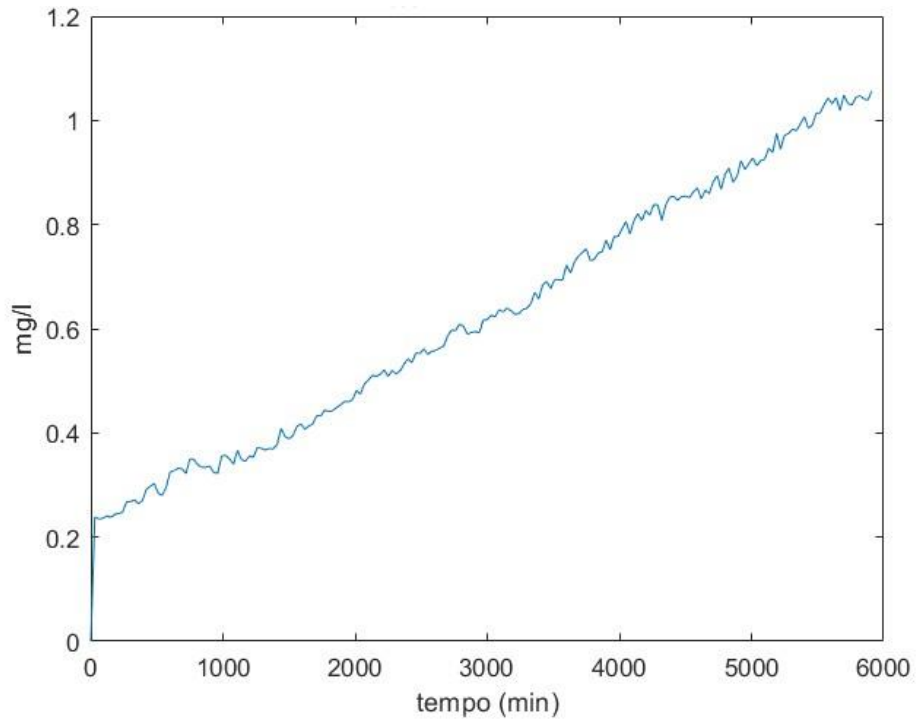


Figura 3.6c: Concentrazione di fluoresceina media nel tempo calcolata per ogni foto (prova4)

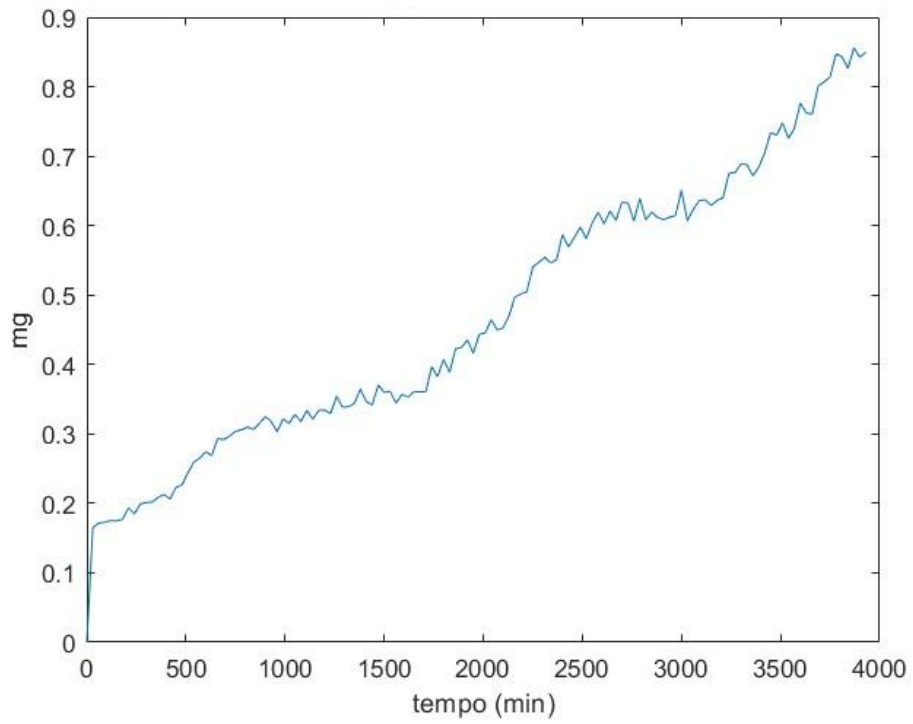


Figura 3.6d: Concentrazione di fluoresceina media nel tempo calcolata per ogni foto (prova5)

Dall'analisi dei quattro grafici emerge che il tasso di reazione della fluoresceina è particolarmente elevato negli istanti iniziali (come riportato in Figura 3.7). Tuttavia, si può osservare che i tassi di crescita tendono ad oscillare, con fluttuazioni periodiche particolarmente nelle prove n°3 e n°5, probabilmente dovute a fluttuazioni di temperatura o luminosità all'interno della camera oscura.

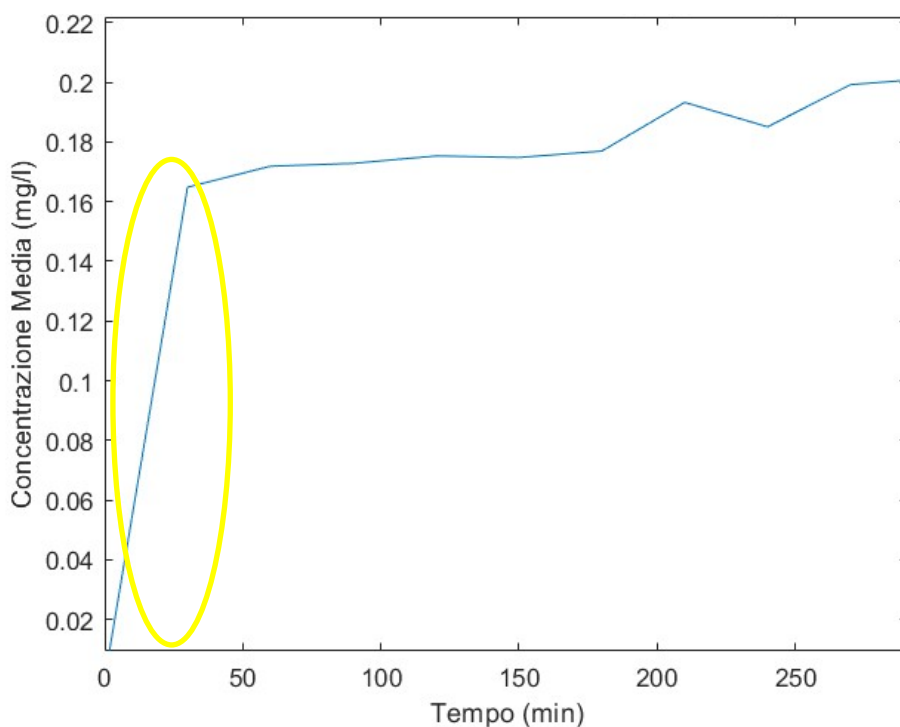


Figura 3.7: Dettaglio dell'andamento della concentrazione di fluoresceina nel tempo - prova 5

Questo suggerisce che, per raggiungere concentrazioni di fluoresceina a saturazione, potrebbe essere necessario un periodo di raccolta dati più prolungato, forse richiedendo settimane di osservazioni per ciascuna prova.

Nell'ultima fase della tesi, sono state eseguite due prove considerando il vasetto vegetato con l'utilizzo di due specie di piante acquatiche diverse: *Rotala Macrandra* (Figura 3.8) e *Alternanthera Reineckii*.



Figura 3.8: Foto Rotala

La Rotala Macrandra è una classica rappresentante delle piante d'acquario, nota per il suo colore rosso-violaceo che assume in presenza di luce. Quando cresce in forma emersa, le foglie della pianta sono rotonde e verdi (Figura 3.9). Può essere utilizzata in sistemi di fitodepurazione grazie alle sue proprietà di assorbire nutrienti e sostanze inquinanti presenti nell'acqua.

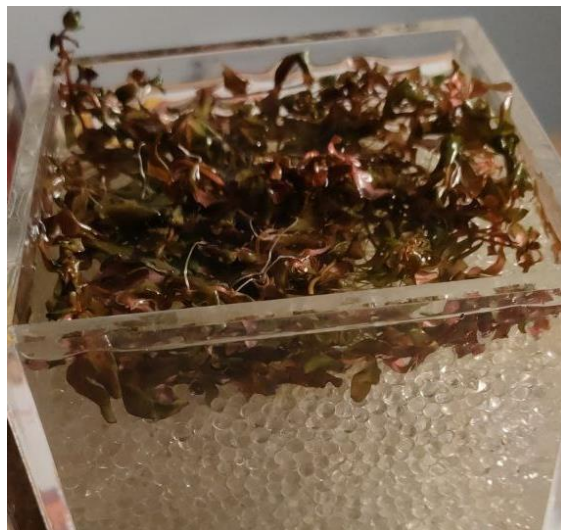


Figura 3.9: Foto Rotala nel vasetto di prova

Nel caso della suddetta prova si riportano dei grafici di concentrazione (Figure 3.10a-f) che mostrano l'evoluzione della fluoresceina nel tempo e nello spazio all'interno del vasetto.

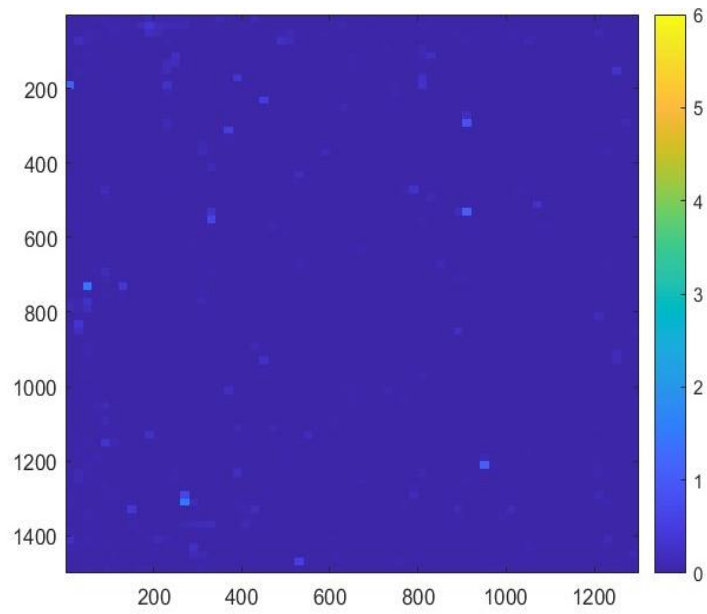


Figura 3.10a: Matrice di concentrazione relativa al tempo 0

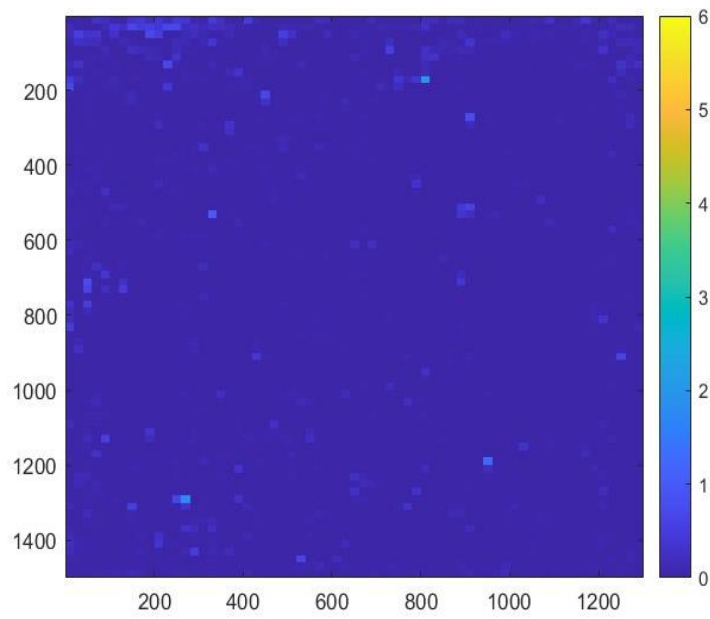


Figura 3.10b: Matrice di concentrazione relativa allo scatto dopo 7h

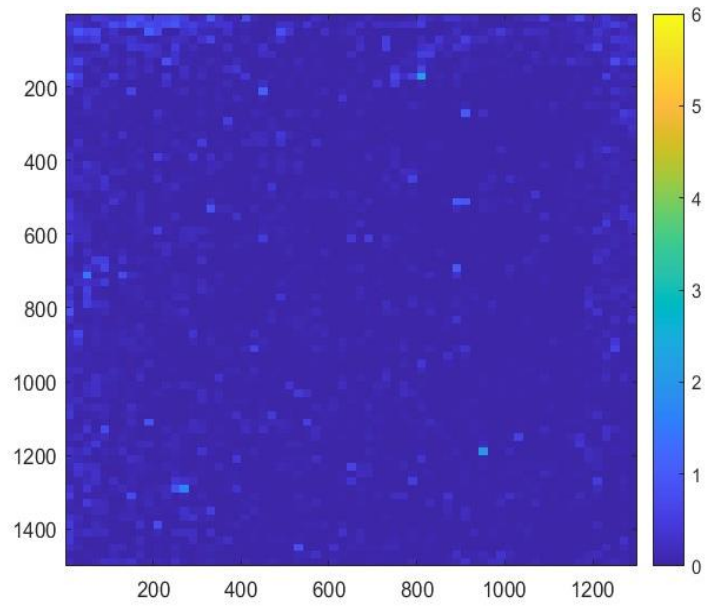


Figura 3.10c: Matrice di concentrazione relativa allo scatto dopo 20h

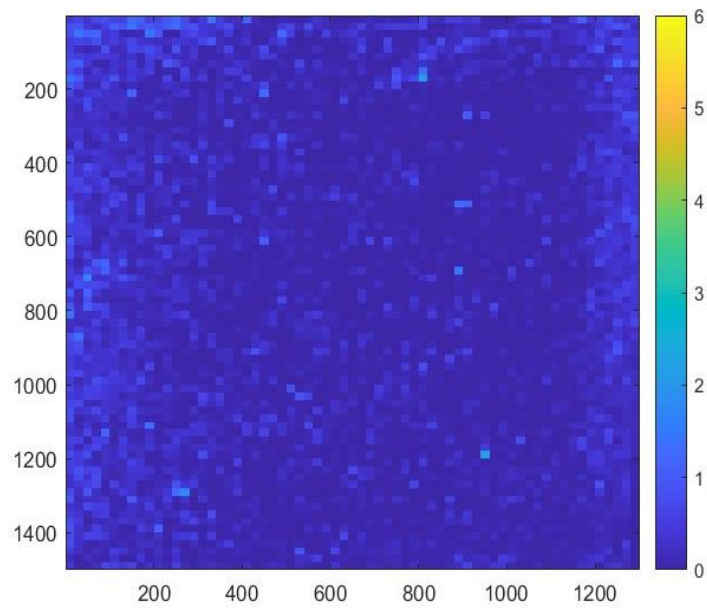


Figura 3.10d: Matrice di concentrazione relativa allo scatto dopo 38h

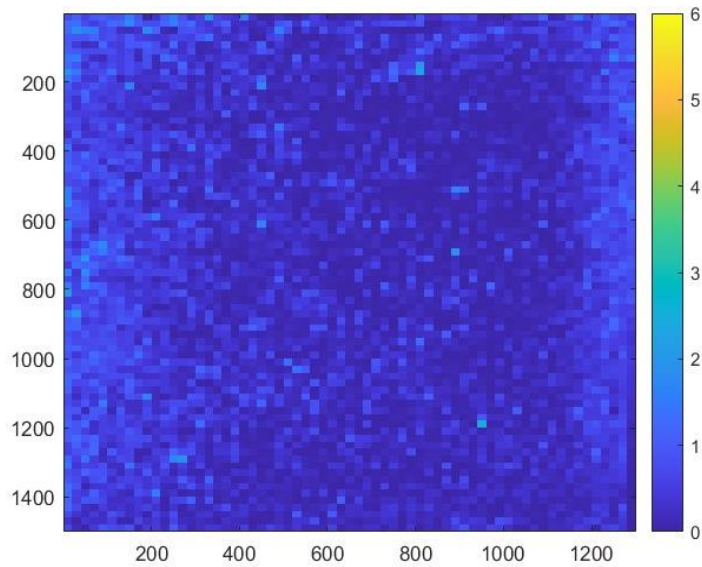


Figura 3.10e: Matrice di concentrazione relativa allo scatto dopo 60h

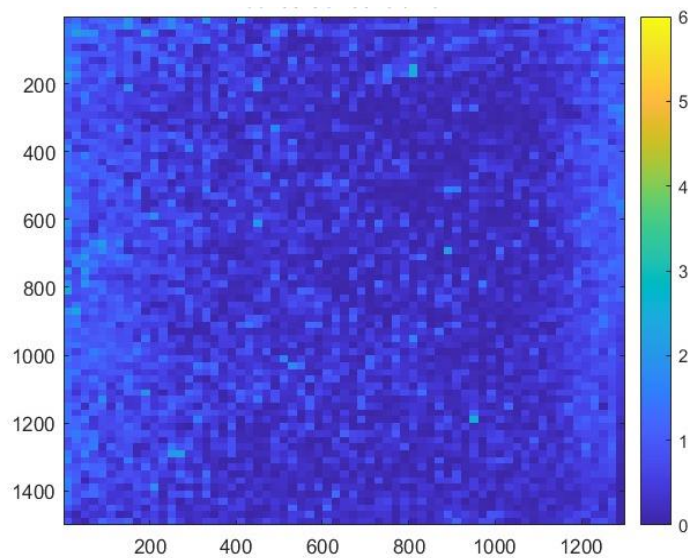


Figura 3.10f: Matrice di concentrazione relativa all'ultima acquisizione dopo 78h

Figura 3.10a-f: Mappe di concentrazione di fluoresceina della prova con la Rotala. I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel con scatti eseguiti all'istante 0, dopo 7h, 20h, 38h, 60h, ultima acquisizione)

In presenza di elementi vegetali è evidente la persistenza della reazione della fluoresceina. Tuttavia, confrontando le immagini acquisite con le stesse frequenze di scatto tra il vasetto vegetato e quello privo di vegetazione, emerge che, anche se si verifica la reazione

di degradazione dell'FDA e produzione di fluoresceina, questa avviene con velocità confrontabili a quelle delle prove senza vegetazione.

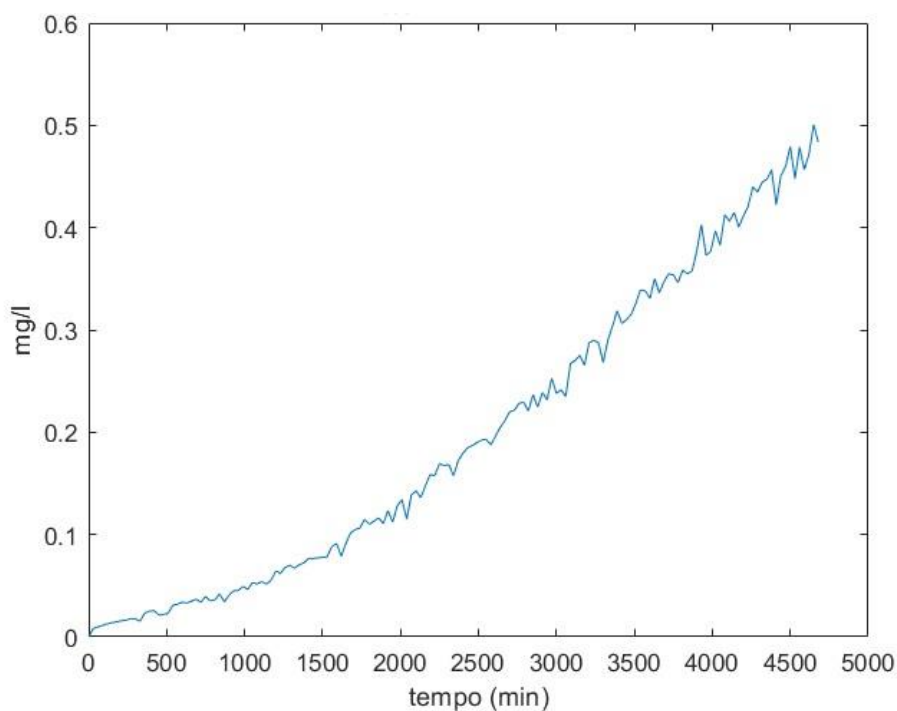


Figura 3.11: Concentrazione di fluoresceina media nel tempo calcolata per ogni foto nella prova con la Rotala

L'andamento della curva nella Figura 3.11, che rappresenta il valore medio di concentrazione calcolato per ogni foto ad intervalli di mezz'ora, evidenzia un tasso di reazione paragonabile a quello delle prove precedenti, (si veda ad esempio l'andamento in figura 3.6b) probabilmente dovuto allo scarso sviluppo dell'apparato radicale della pianta.

La seconda prova con vasetto vegetato è stata eseguita con la specie *Alternanthera Reineckii*, varietà *Rosanervig* (Figure 3.12 e 3.13).



Figura 3.12: Alternanthera Reineckii Rosanervig

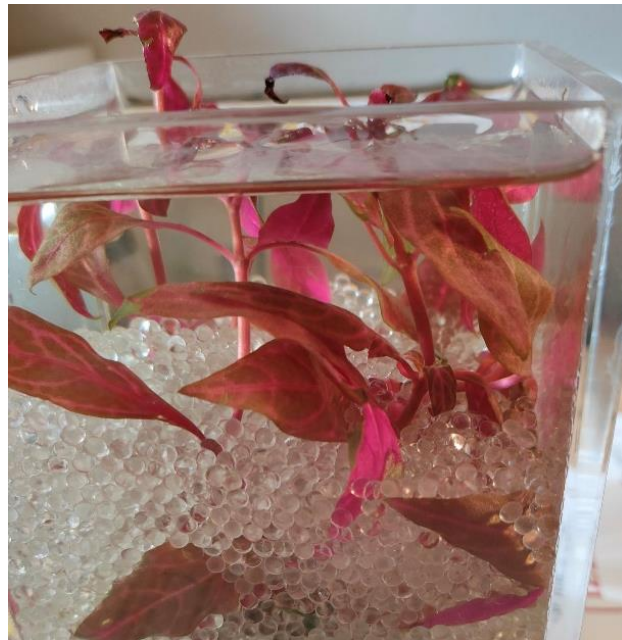


Figura 3.13: Foto Alternanthera nel vasetto di prova

In presenza di intensa illuminazione e con la pianta sommersa, sia la pagina superiore (superficie delle foglie) che il fusto dell'*Alternanthera Reineckii Rosanervig* assumono un colore rosso vivo, tendente al rosa acceso. Le radici di questa specie sono ben sviluppate e fungono da ancoraggio al substrato. In condizioni di elevata umidità o immersione, la pianta emette anche numerose radici avventizie dai nodi. Come nella prova esemplificativa 5 anche in questo caso si riportano esempi di mappe di concentrazioni analizzate (Figure 3.14a-f).

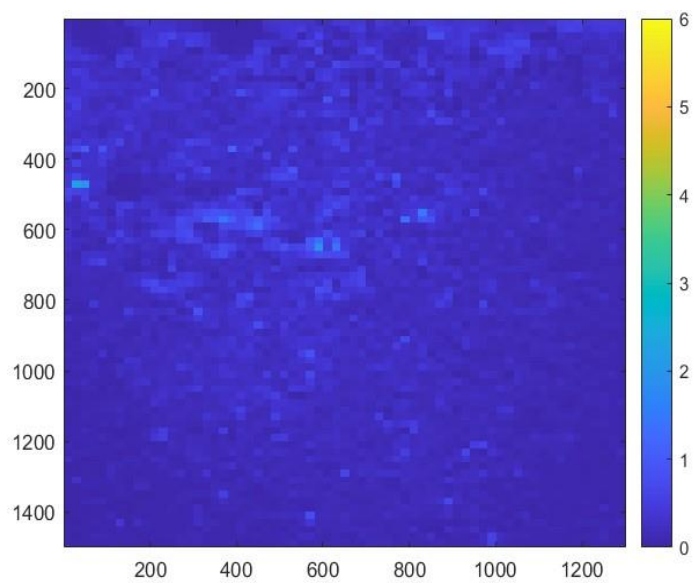


Figura 3.14a: Matrice di concentrazione risultante dall'acquisizione al tempo 0

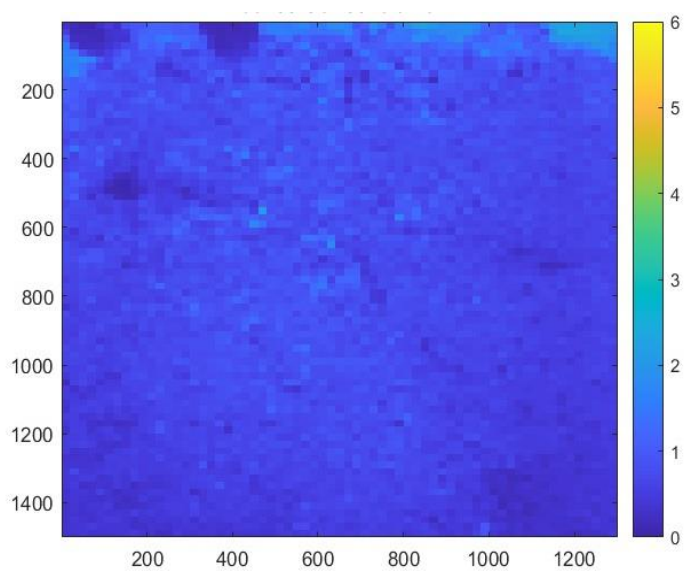


Figura 3.14b: Matrice di concentrazione relativa all'acquisizione dopo 10h

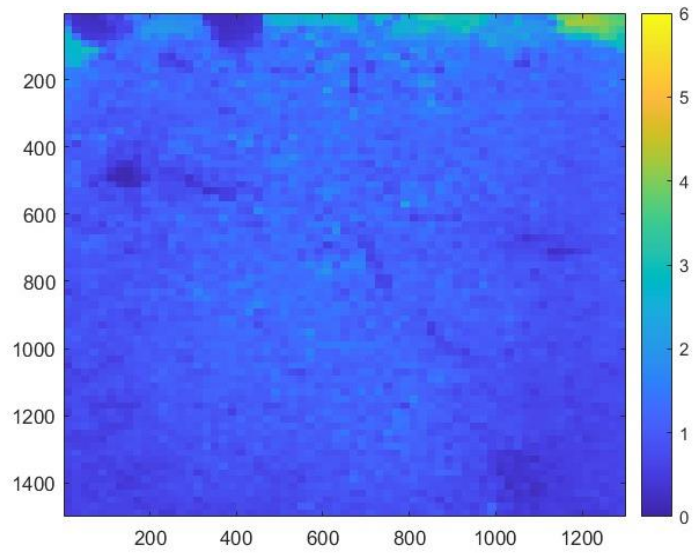


Figura 3.14c: Matrice di concentrazione relativa all'acquisizione dopo 24h

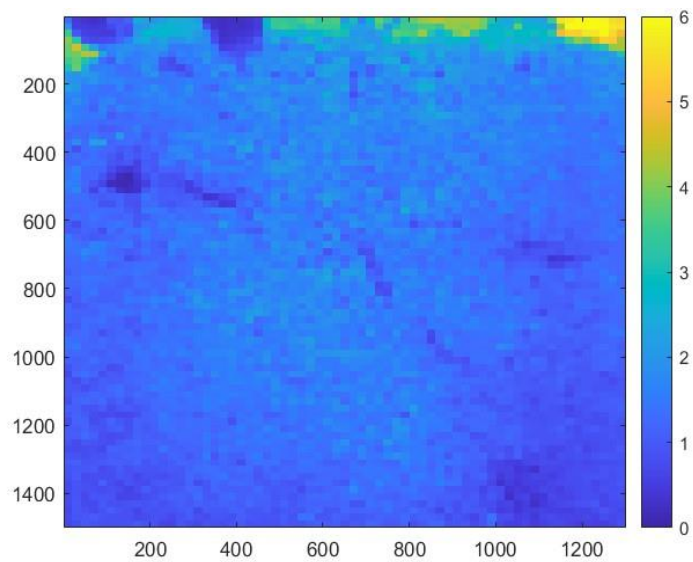


Figura 3.14d: Matrice di concentrazione relativa all'acquisizione dopo 40h

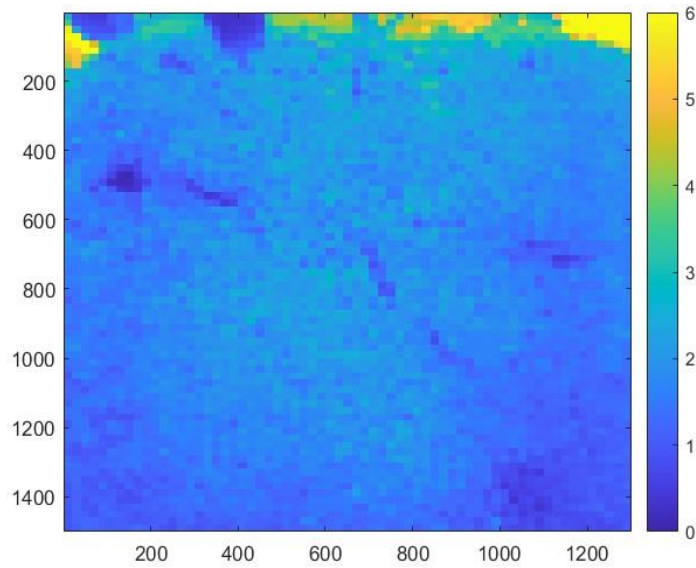


Figura 3.14e: Matrice di concentrazione relativa all'acquisizione dopo 60h

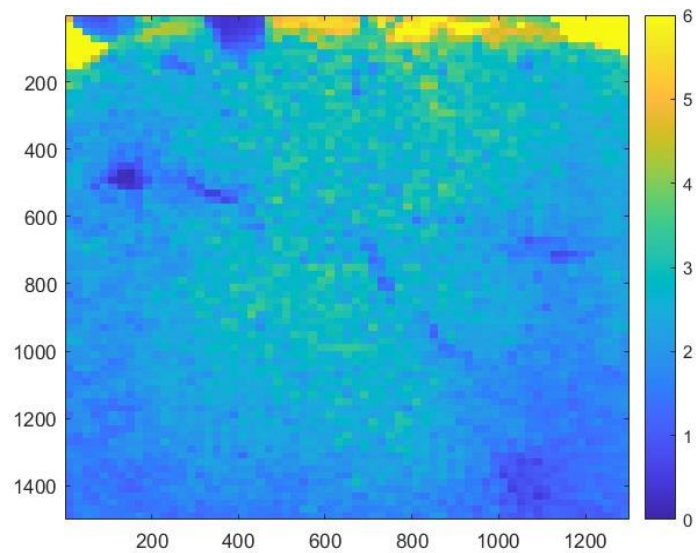


Figura 3.14f: Matrice di concentrazione relativa all'ultima acquisizione dopo 97h

Figure 3.14a-f: Mappe di concentrazione di fluoresceina della prova con l'Alternanthera. I valori sugli assi indicano le coordinate progressive dei diversi pixel con scatti eseguiti all'istante 0, dopo 7h, 20h, 38h, 60h, ultima acquisizione)

Nel caso dell'Alternanthera le reazioni sono molto più repentine rispetto alle reazioni manifestata per la specie Rotala (Figure 3.15, 3.16a e 3.16b), questo probabilmente per la differenza morfologica delle due piante.

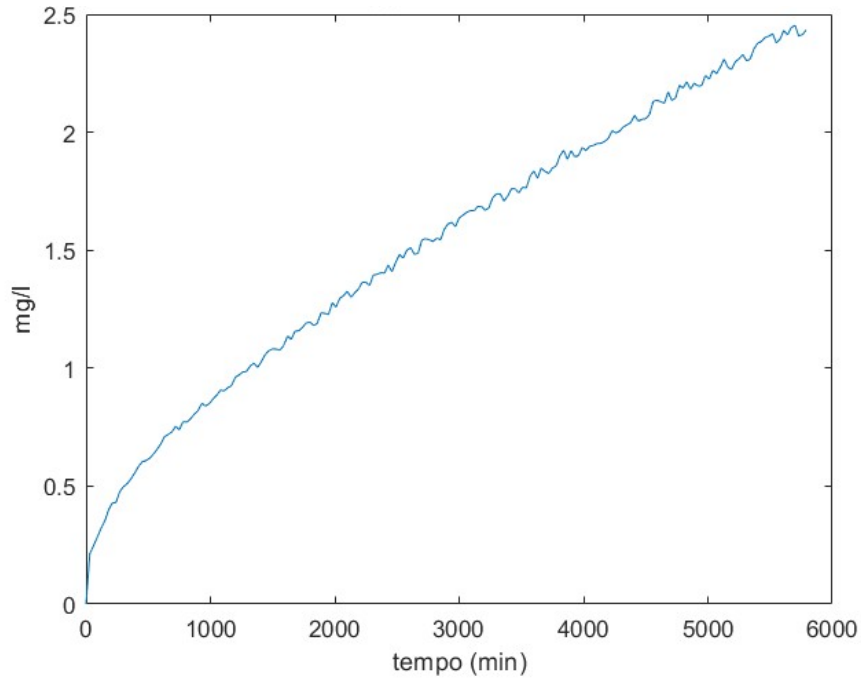


Figura 3.15: Concentrazione di fluoresceina media nel tempo calcolata per ogni foto nella prova con l'Alternanthera

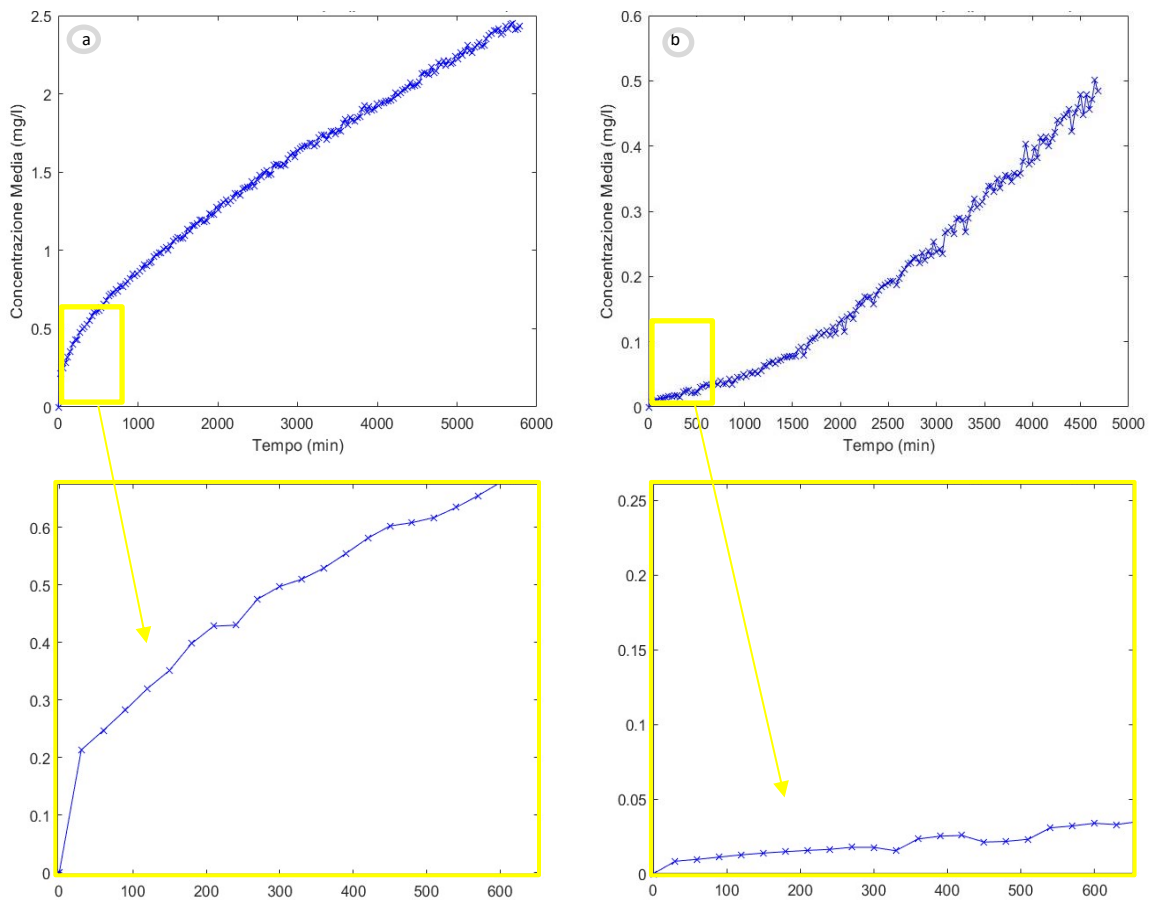


Figura 3.16a e Figura 3.16b: Confronto concentrazioni medie prova Alternanthera (3.16a) e prova Rotala (3.16b) con dettaglio nei primi 600 minuti di acquisizione

La Rotala presenta una struttura della pianta più compatta (Figura 3.17) le radici infatti sono molto concentrate; invece, nel caso dell'Alternanthera le radici si sviluppano lungo i nodi e all'estremità (Figura 3.18). Probabilmente le diverse conformazioni degli apparati radicali nelle due piantine hanno avuto una loro influenza sulle reazioni e le velocità che si vengono ad innescare.

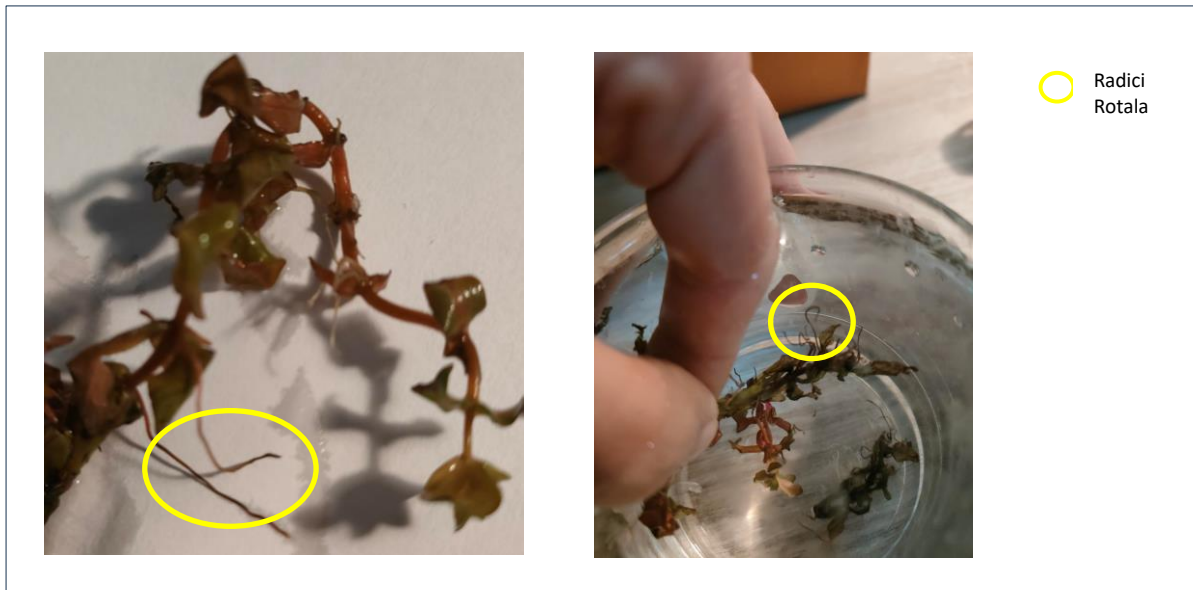


Figura 3.17: Particolare su pianta Rotala (dettaglio su radici)



Figura 3.18: Particolare su pianta Alternanthera (dettaglio su radici)

Inoltre, nel caso dell'*Alternanthera*, sono stati individuati punti di reazione particolarmente evidenti in prossimità del pelo d'acqua e lungo l'area fogliare come si evidenzia nelle aree cerchiare in rosso in Figura 3.19.

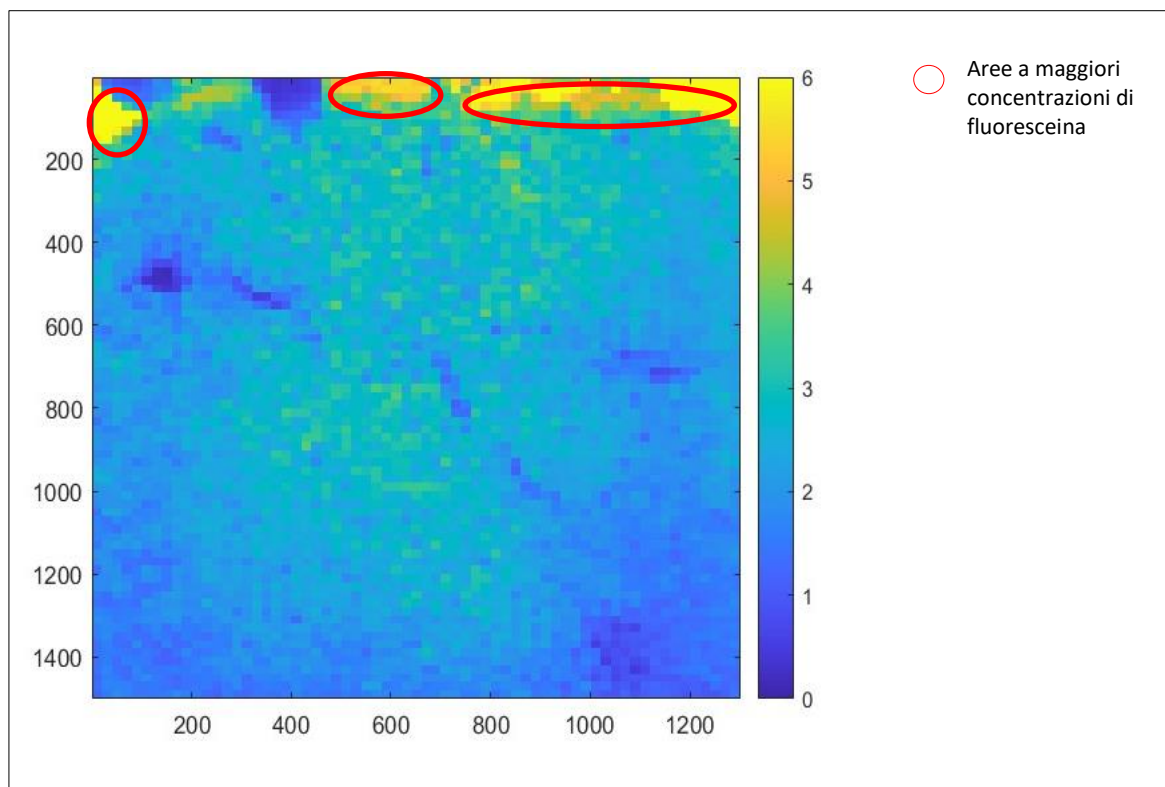


Figura 3.19: Matrice di concentrazioni di fluoresceina per la prova Alternanthera con evidenziazione dei punti di maggior reazione

Studi scientifici (Franken et al., 2005) hanno dimostrato che lo sviluppo del biofilm non si limita all'apparato radicale, ma si estende anche lungo la superficie fogliare. Nella serie di grafici sottostanti (Figure 3.20a, 3.20b, 3.20c, 3.20d, 3.20e, 3.20f) vengono illustrati i confronti tra i risultati delle prove, evidenziando le variazioni temporali delle concentrazioni di fluoresceina e la variabilità spaziale dei valori di concentrazione per ciascuna esecuzione.

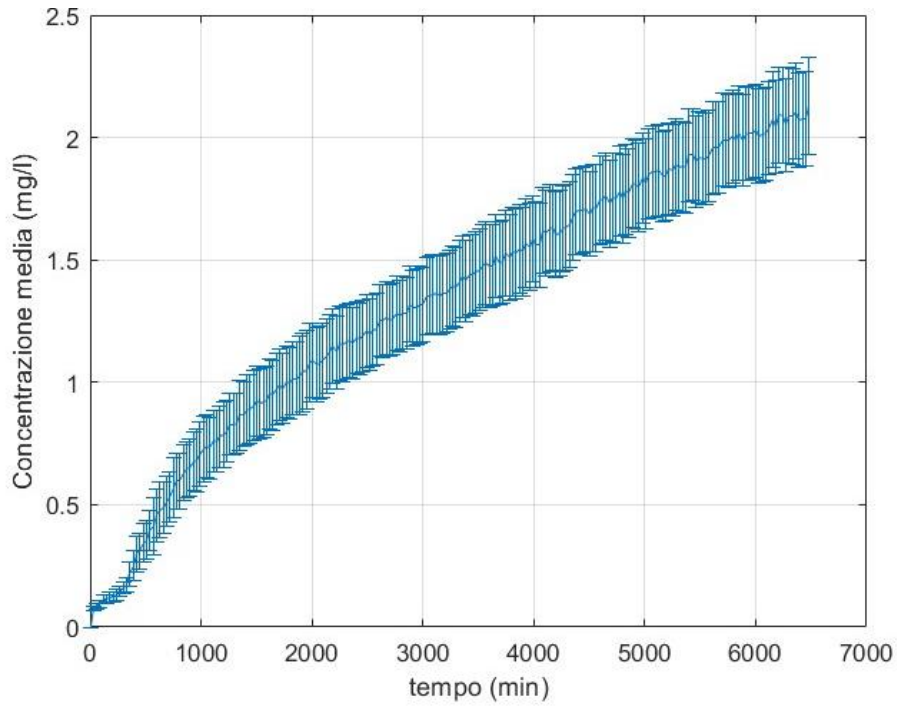


Figura 3.20a: Variabilità tasso reazione fluoresceina prova 2

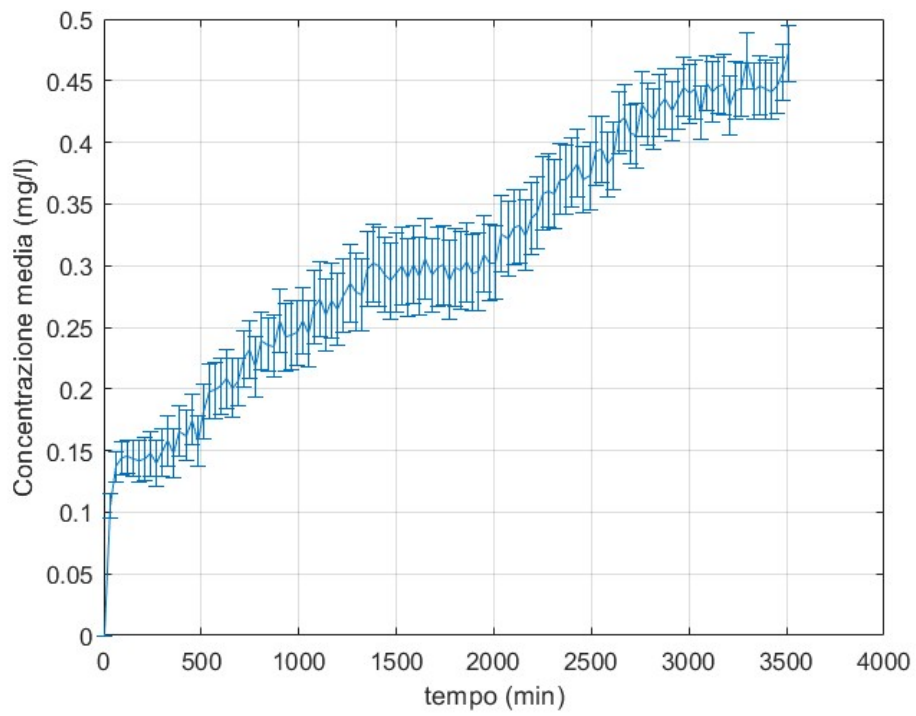


Figura 3.20b: Variabilità tasso reazione fluoresceina prova 3

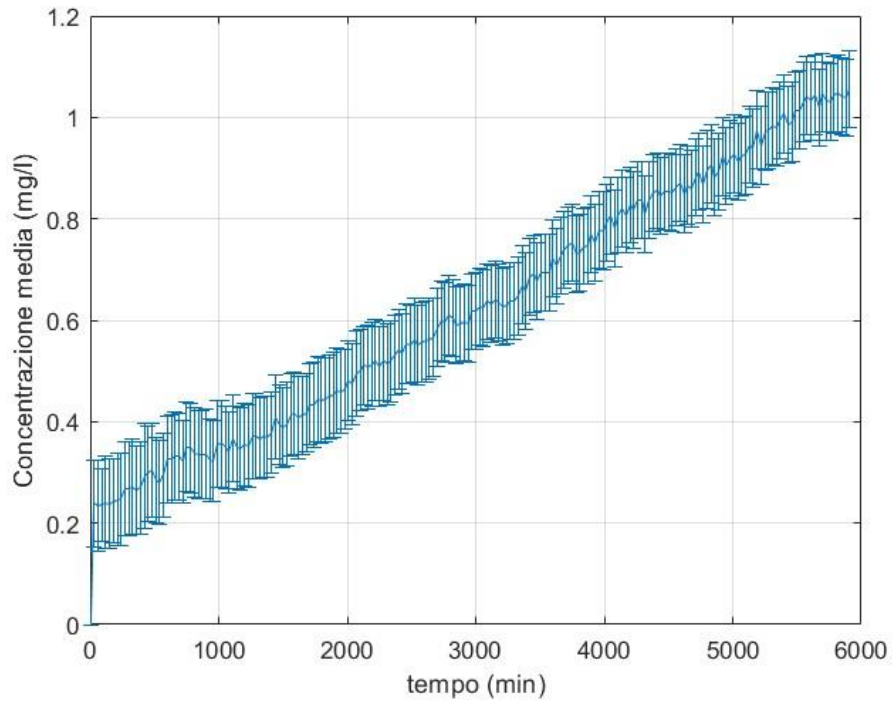


Figura 3.20c: Variabilità tasso reazione fluoresceina prova 4

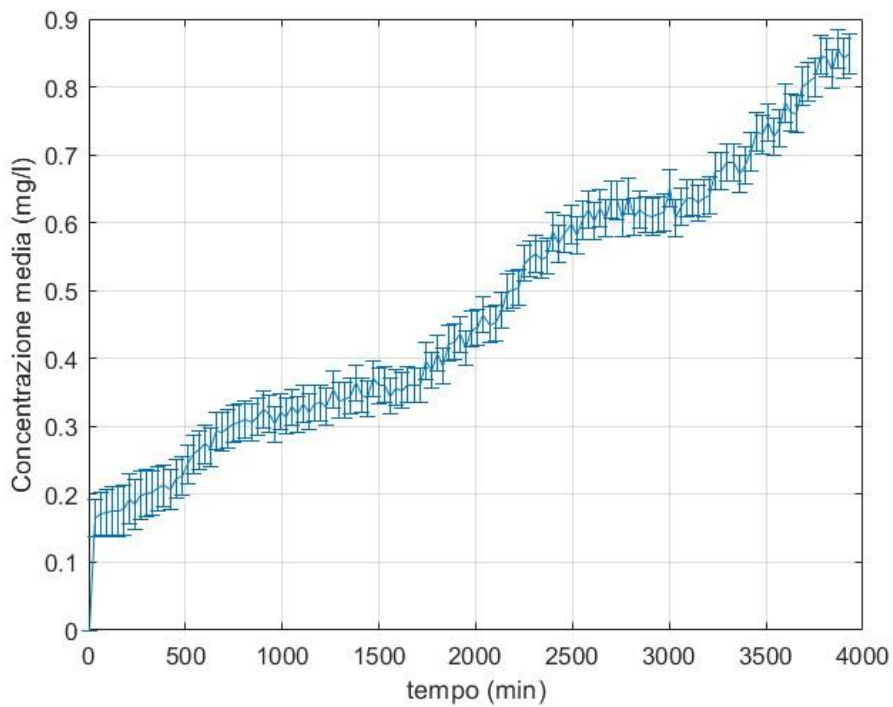


Figura 3.20d: Variabilità tasso reazione fluoresceina prova 5

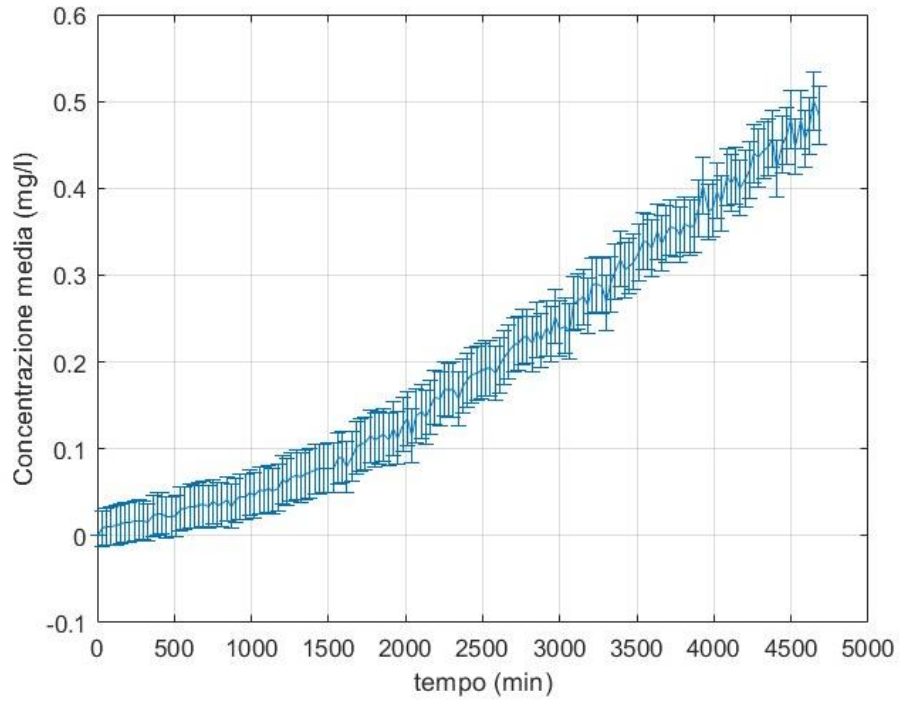


Figura 3.20e: Variabilità tasso reazione fluoresceina prova Rotala

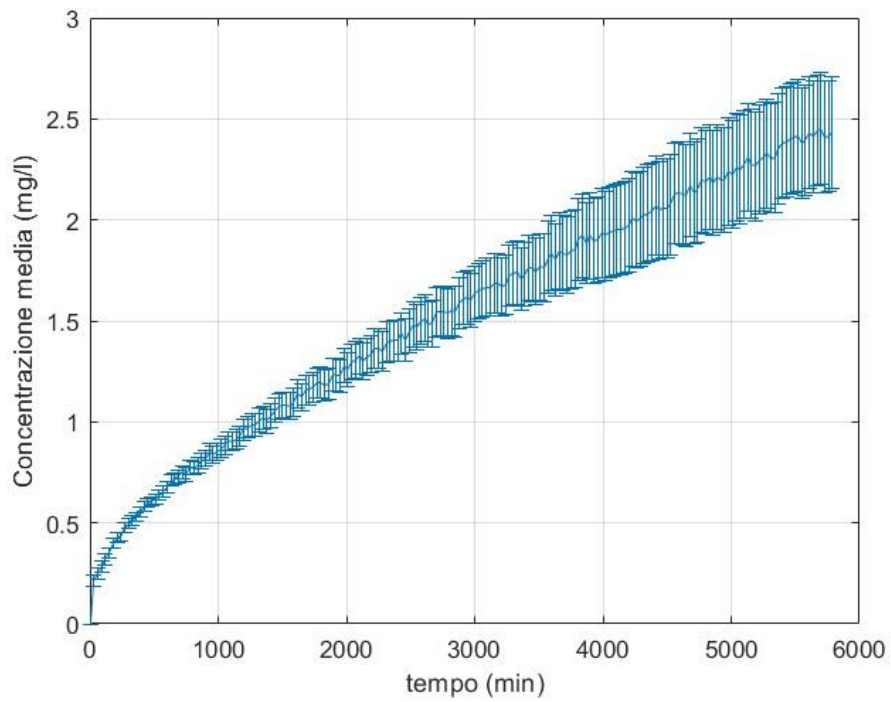


Figura 3.20f: Variabilità tasso reazione fluoresceina prova Alternanthera

Dall'analisi dei grafici risulta che il profilo relativo alla prova con l'*Alternanthera* segue una tendenza più lineare in aumento. Questo andamento potrebbe essere attribuito all'apporto significativo delle radici e del biofilm sviluppato su di esse e sulle foglie, con maggiore estensione, consentendo così una reazione più pronunciata della fluoresceina. In contrasto, l'esito della prova con la *Rotala*, caratterizzata da una conformazione radicale più superficiale e compatta, mostra comunque un tasso di reazione positivo della fluoresceina, sebbene con concentrazioni inferiori rispetto alla prova con l'*Alternanthera*. Degna di nota è la similitudine tra i risultati della prova numero 2 e la prova con l'*Alternanthera*. Nonostante la prova numero 2 abbia registrato un abbassamento del livello dell'acqua, i due tassi di reazione risultano essere simili. Nella prova con l'*Alternanthera*, le radici delle piante acquatiche immerse potrebbero contribuire al rilascio di ossigeno attraverso processi associati alla fotosintesi. Analogamente, nella seconda prova, la reazione della fluoresceina si è manifestata in condizioni aerobiche. Pertanto, nelle prove con il vaso vegetato, utilizzando la pianta acquatica *Alternanthera*, si è constatato che la presenza di vegetazione con un apparato radicale più sviluppato ha intensificato e accelerato le reazioni della fluoresceina. In particolare, l'*Alternanthera* ha mostrato una reazione più rapida, probabilmente dovuta alla sua morfologia, con radici sviluppate lungo lo stelo e nodi. La presenza di hotspot di reazione in prossimità del pelo d'acqua e lungo l'area fogliare ha evidenziato il coinvolgimento del biofilm anche sulla superficie delle foglie. I confronti tra le prove hanno evidenziato la persistenza della fluoresceina nel tempo, con un aumento dei valori di concentrazione nel corso delle osservazioni. Tuttavia, si ritrova interesse nel fare prove più lunghe per permettere alla reazione di procedere nel tempo e completarsi.

4. Conclusioni

Lo studio affrontato in questa tesi punta a fornire un supporto valido per le attività di ricerca sui meccanismi di trattamento delle acque reflue attraverso l'impiego di processi di filtrazione in substrati vegetati. Il metodo testato si basa sulla misura del tasso di produzione di fluoresceina derivante dalla degradazione di un tracciante non conservativo, il diacetato di fluoresceina (FDA). Questo tracciante libera fluoresceina in seguito alla sua degradazione ad opera degli enzimi batterici presenti nel biofilm che si sviluppa nel mezzo poroso, su foglie e radici delle piante. La concentrazione di fluoresceina prodotta viene quantificata mediante immagini fotografiche con un opportuno sistema di illuminazione che ne stimola la fluorescenza. Questo metodo ha coinvolto una fase di calibrazione, durante la quale, mediante l'uso di concentrazioni note di fluoresceina e un apposito codice Matlab, è stata definita una correlazione tra l'intensità luminosa emessa dalla fluoresceina e i corrispondenti valori effettivi di concentrazione della stessa. In questo modo si è dimostrato che tale metodologia è idonea a generare mappe bidimensionali dell'attività enzimatica, consentendo un'analisi spaziale e temporale dello sviluppo del fenomeno. Ciò permette di ottenere risultati significativi riguardo allo studio dei processi analizzati. Durante le attività di laboratorio, sono state esplorate le dinamiche della relazione tra l'attività batterica e la rizosfera. Sono stati considerati diversi modelli sia in assenza che in presenza di specie vegetali, evidenziando l'importanza dell'ossigeno all'interno del contenitore che ha rivelato il ruolo significativo nello sviluppo e nella progressione delle attività enzimatiche.

Questo è stato dimostrato in particolar modo in una delle prove con vaso privo di vegetazione (prova 2), in cui a seguito di drenaggio dell'acqua l'attività enzimatica si è manifestata in modo consistente, e nel vasetto in presenza specie vegetali, (prova con l'*Alternanthera reneckii*) per cui si è osservata una reazione enzimatica evidente sia grazie alla presenza di un fitto apparato radicale in grado di fornire ossigeno, sia lungo il pelo libero dell'acqua. Questi risultati sono stati confermati attraverso i grafici di distribuzione spaziale ed evoluzione temporale di concentrazione di fluoresceina, evidenziando le zone con elevata attività batterica. Inoltre, è emerso che nelle prove con le specie vegetali *Rotala* ed *Alternanthera*, l'attività batterica associata al biofilm degli apparati radicali e fogliari ha generato reazioni con intensità diversa nel corso del tempo e nello spazio a seconda del maggiore sviluppo della biomassa vegetale. Ciò evidenzia chiaramente che

radici e foglie creano micro-condizioni specifiche che influenzano e/o potenziano la loro interazione con i microrganismi.

In sintesi, i risultati degli esperimenti confermano la teoria che l'attività batterica sia promossa dalla presenza di ossigeno e dimostrano la possibilità di quantificare l'attività enzimatica dei microrganismi presenti nel substrato. Tuttavia, è fondamentale considerare in studi futuri altri potenziali fattori che possono influire sui meccanismi in esame. Inoltre, l'analisi dei risultati suggerisce la necessità di prolungare i tempi di indagine per osservare la progressione delle reazioni fino a raggiungere condizioni di saturazione. È altresì importante considerare diverse specie vegetali per ottenere una gamma più ampia di scenari di indagine.

Ringraziamenti

Ringrazio il mio relatore il professor Fulvio Boano e la mia correlatrice l'ingegnere Elisa Costamagna per avermi proposto questo argomento di tesi, dandomi la possibilità di lavorare a un progetto originale ed interessante e per avermi spronato a vedere il bicchiere sempre mezzo pieno anche di fronte agli imprevisti capitati durante questo percorso dandomi ancora più grinta.

Ringrazio mamma papà e Dani che sono stati il mio porto sicuro e sempre lo saranno.

Ringrazio i miei ormai amici, compagni di questa avventura che ormai è giunta al termine, Beatrice, Edoardo M, Federico, Giorgia, Silvia e Simone per aver passato momenti di studio in compagnia ma anche di divertimento.

Ringrazio Edoardo per essermi stato vicino nei momenti belli e di tensione, per aver condiviso gioie e agitazioni (particolarmente di questo periodo) e per essere stato la mia spalla... "Perché dove non arrivo io arrivi tu e viceversa" ... Anche se a volte sono un po' testarda e dico sempre che posso fare tutto da sola, ammetto che con Edo c'è più gusto.

Ringrazio infine Marianna, la mia responsabile di Avio Aero, un nuovo capitolo iniziato da mesi, per avermi accolta e per avermi dimostrato tanta disponibilità, per essere ormai il mio mentore, sperando un giorno di poter diventare grintosa e forte almeno la metà di quanto sia lei.

Bibliografia

Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7–8), 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)

Aracic, S., Manna, S., Petrovski, S., Wiltshire, J. L., Mann, G., & Franks, A. E. (2015). Innovative biological approaches for monitoring and improving water quality. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00826>

Boano, F., Caruso, A., Costamagna, E., Ridolfi, L., Fiore, S., Demichelis, F., Galvão, A., Piscoiro, J., Rizzo, A., & Masi, F. (2020). A review of nature-based solutions for greywater treatment: Applications, hydraulic design, and environmental benefits. *Science of The Total Environment*, 711, 134731. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134731>

Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>

Cangioli, L., Salobehaj, M., Del Duca, S., Fagorzi, C., Berardi, C., Coppini, E., Fibbi, D., Fani, R., & Vassallo, A. (2022). Effect of Wastewater on the Composition of Bacterial Microbiota of *Phragmites australis* Used in Constructed Wetlands for Phytodepuration. *Plants*, 11(23), 3210. <https://doi.org/10.3390/plants11233210>

Deletic, A., & Wang, H. (2019). Water Pollution Control for Sustainable Development. *Engineering*, 5(5), 839–840. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.07.013>

Denisi, P., Biondo, N., Bombino, G., Folino, A., Zema, D. A., & Zimbone, S. M. (2021). A Combined System Using Lagoons and Constructed Wetlands for Swine Wastewater Treatment. *Sustainability*, 13(22), 12390. <https://doi.org/10.3390/su132212390>

Gagan, M., Gaurav, P., Dhingra, G. K., Avinash, K., Anjali, N., & Pawan, K. (2023). Plant-Microbe Interaction in Freshwater Ecosystem for Improving Water Quality.

In R. Soni, D. C. Suyal, L. Morales-Oyervides, & J. Sungh Chauhan (A c. Di), *Current Status of Fresh Water Microbiology* (pp. 117–133). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-5018-8_5

Grizzetti, B., Bouraoui, F., & Aloe, A. (2012). Changes of nitrogen and phosphorus loads to European seas. *Global Change Biology*, 18(2), 769–782. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02576.x>

Ju Lee. (s.d.). *Water Pollution Prevention Engineering Device Based on Intelligent Recognition*.

Kraiem, K., Kallali, H., Ammeri, R. W., Bessadok, S., & Jedidi, N. (2021). *Effects of Partial Saturation on Nitrogen Removal and Bacterial Community in Vertical-Flow Constructed Wetlands* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-854531/v1>

Le Guern, F., Mussard, V., Gaucher, A., Rottman, M., & Prim, D. (2020). Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9217. <https://doi.org/10.3390/ijms21239217>

Menichetti M, (2012). *Capacità fitoestrattive della specie Dittrichia viscosa su suoli derivanti da attività mineraria*, Tesi di laurea magistrale, Alma Mater Studiorum Universita' Di Bologna

Pietrangelo L, (2018). *Analysis and characterization of microbial biofilm associated with the roots of Phragmites australis and Typha latifolia*, Doctoral Thesis, University of Molise

Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L., & Murphy, A. S. (2005). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In M. J. Tamas & E. Martinoia (A c. Di), *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* (Vol. 14, pp. 299–340). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/4735_100

Saracco, R. (2021). *Gli ultrasuoni: Tecnologia innovativa per il controllo del fouling delle membrane* [Preprint]. Preprints. <https://doi.org/10.22541/au.163673232.26047585/v1>

Srivastava, J. K., Chandra, H., Kalra, S. J. S., Mishra, P., Khan, H., & Yadav, P. (2017). Plant–microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: A review. *Applied Water Science*, 7(3), 1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0415-2>

Srivastava, J., Naraian, R., Kalra, S. J. S., & Chandra, H. (2014). Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 1787–1800. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0412-z>

Swisher, R., & Carroll, G. C. (1980). Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbial Ecology*, 6(3), 217–226. <https://doi.org/10.1007/BF02010387>

University of Nebraska-Lincoln, & Sutton, R. (2014). Aesthetics for Green Roofs and Green Walls. *Journal of Living Architecture*, 1(2), 1–20. <https://doi.org/10.46534/jliv.2014.01.02.001>

Weber, J., Pirbazari, M., & Melson, G. (1978). Biological growth on activated carbon: An investigation by scanning electron microscopy. *Environmental science & technology*, 12(7), 817–819.

Woodward, G., Gessner, M. O., Giller, P. S., Gulis, V., Hladyz, S., Lecerf, A., Malmqvist, B., McKie, B. G., Tiegs, S. D., Cariss, H., Dobson, M., Elozegi, A., Ferreira, V., Graça, M. A. S., Fleituch, T., Lacoursière, J. O., Nistorescu, M., Pozo, J., Risnoveanu, G., ... Chauvet, E. (2012). Continental-Scale Effects of Nutrient Pollution on Stream Ecosystem Functioning. *Science*, 336(6087), 1438–1440. <https://doi.org/10.1126/science.1219534>

Sitografia

<https://www.ecoplants.it/wp-content/uploads/Trattamento-acqua-potabile-1.pdf>

(consultato il 30/11/23)

<https://www.aquaplantarumshop.it/alternanthera-reineckii-rosanervig-cup/> (consultato il

27/12/23)

[https://ibrio.it/piante-acquario/4994-rotala-rotundifolia-vietnam-h-ra-in-vitro-](https://ibrio.it/piante-acquario/4994-rotala-rotundifolia-vietnam-h-ra-in-vitro-8712001013096.html)

[8712001013096.html](https://ibrio.it/piante-acquario/4994-rotala-rotundifolia-vietnam-h-ra-in-vitro-8712001013096.html) (consultato il 27/12/23)

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13201-016-0415-2> (consultato il 03/01/24)

<https://paretiverdi.com/wp/chi-ha-inventato-i-giardini-verticali/> (consultato il 07/01/24)