

**EDITORIALE**

La contaminazione degli ecosistemi causata da farmaci e da loro prodotti di trasformazione biologicamente attivi è diventata una problematica ambientale emergente grazie allo sviluppo di metodiche analitiche sempre più sensibili che hanno consentito la rilevazione di questi inquinanti in differenti matrici (acqua, suolo, sedimento). Trattandosi di molecole caratterizzate da elevata reattività biochimica, in grado di attraversare le membrane biologiche e di esercitare azione terapeutica a basse concentrazioni su siti bersaglio della cellula, e da relativa persistenza nell'organismo, la loro presenza nell'ambiente, seppure in concentrazioni molto basse (ng/L-µg/L), può costituire un rischio per la salute dell'uomo e degli ecosistemi. A questo riguardo alcuni farmaci destano particolare preoccupazione per le loro caratteristiche di alteratori endocrini (es. alcuni ormoni steroidei sintetici) ed altri, come gli antibiotici, per la loro capacità di indurre farmaco-resistenza nei microrganismi patogeni. Quest'ultimo fenomeno è particolarmente allarmante in quanto può rendere inefficace il trattamento terapeutico con conseguente diffusione di malattie nella popolazione.

Agli effetti sugli ecosistemi della contaminazione da farmaci è dedicato appunto questo numero del Notiziario. In particolare, nel primo contributo vengono riportati alcuni risultati relativi alla biodegradazione di due farmaci per uso umano (Naproxene, Gemfibrozil) da parte della comunità microbica autoctona dell'ecosistema fluviale Tevere.

Questa importante funzione svolta, che contribuisce a mantenere la salute dell'ecosistema con benefici diretti e/o indiretti che interessano l'uomo, ha fornito lo spunto per una riflessione e un inquadramento generale delle diverse funzioni svolte dagli ecosistemi ricomprese nel concetto di servizi ecosistemici, definiti come *"la capacità dei processi e delle componenti naturali di fornire beni e servizi che soddisfino direttamente e indirettamente diverse necessità della popolazione umana"*. Ad oggi non esiste ancora un approccio unico ed integrato alla valutazione e alla stima dei servizi ecosistemici e le applicazioni pratiche, che stimano contemporaneamente i valori ambientali, economici e sociali sono numericamente limitate. Tuttavia, gli sforzi di ricerca rivolti alla conservazione della natura e alla gestione dell'ambiente stanno evolvendo verso approcci sempre più integrati che vedono il coinvolgimento di diverse competenze.

Nel secondo contributo viene affrontato, attraverso una rassegna bibliografica aggiornata, il tema degli effetti degli antibiotici sugli ecosistemi del suolo e delle acque in termini sia di modifiche nella struttura filogenetica delle comunità batteriche che di alterazione di funzioni ecologiche fondamentali, quali la trasformazione dell'azoto, la metanogenesi e la solfato-riduzione.

Altro tema affrontato è quello dell'antibiotico-resistenza, destinato a rimanere di cruciale importanza anche in futuro nonostante l'avvio di programmi nazionali per il controllo del fenomeno attraverso un uso razionale di questi principi attivi.

Infine, viene descritto un protocollo analitico per la determinazione di nove principi attivi farmaceutici appartenenti a diverse classi terapeutiche e tre ormoni steroidei in acque superficiali e di scarico. Il metodo si basa su un'estrazione in fase solida (SPE) mediante cartucce pre-impaccate con una fase polimerica ed analisi in HPLC con rivelazione simultanea UV-fluorescenza. Il protocollo sviluppato richiede strumentazioni meno sofisticate e costose rispetto a quelli basati sull'impiego di HPLC-MS o GC-MS e può costituire un'alternativa per analisi routinarie di farmaci in acque inquinate o reflue.

Dr. Maurizio Pettine  
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, dicembre 2012

**INDICE**

<b>CONTAMINAZIONE DA MICROCONTAMINANTI EMERGENTI E SERVIZI ECOSISTEMICI FORNITI DALLE COMUNITÀ MICROBICHE: UN CASO DI STUDIO</b>	2-9
<b>DESTINO AMBIENTALE DEGLI ANTIBIOTICI NEGLI ECOSISTEMI DEL SUOLO E DELLE ACQUE E LORO EFFETTI SUI MICRORGANISMI</b>	9-27
<b>DETERMINAZIONE DI PRINCIPI ATTIVI FARMACEUTICI NELLE ACQUE MEDIANTE SPE ED ANALISI IN HPLC-UV/FLUORESCENZA</b>	27-36
<b>ANNUNCIO</b>	
<b>CORSO "ANALISI DELLA MICROFAUNA E APPLICAZIONE DELL'INDICE BIOTICO DEL FANGO (SBI) NELLA STIMA DI EFFICIENZA DEI FANGHI ATTIVI"</b>	37-39
<b>CORSO "CONTAMINATED SITE REMEDIATION: APPLICATION OF ADVANCED TOOLS TO CONTROL BIOLOGICAL PROCESSES"</b>	40-42
<b>CORSO "CONTROLLO E GESTIONE DEL PROCESSO A FANGHI ATTIVI TRAMITE METODI MICROBIOLOGICI"</b>	43-48

## CONTAMINAZIONE DA MICROCONTAMINANTI EMERGENTI E SERVIZI ECOSISTEMICI FORNITI DALLE COMUNITÀ MICROBICHE: UN CASO DI STUDIO

a cura di Battaglia A. e Barra Caracciolo A.

CNR-IRSA, Area Ricerca Roma 1 - Montelibretti, Monterotondo (RM)

### RIASSUNTO

Dalla fine degli anni '90 il riconoscimento dell'importanza degli ecosistemi naturali e delle loro molteplici funzioni, che generano una serie di beni e servizi per la popolazione umana, ha ottenuto un crescente consenso e ha trovato sempre maggior spazio nelle decisioni riguardanti la gestione delle risorse naturali e la pianificazione del territorio.

I processi biologici che producono tali servizi operano a varie scale, da quella subcellulare a quella di popolazione, ma è l'effetto a livello di ecosistema che determina il loro valore (Schulze e Mooney, 1993).

Costanza e coautori (1997) sulla rivista "Nature" hanno riportato che il valore annuo stimato dei servizi ecosistemici è di 16-54 trilioni di dollari, con una media stimata di 33 trilioni di dollari. Il riconoscimento del valore ecologico, economico e sociale dei servizi ecosistemici è oggi una sfida per il mantenimento della qualità della vita sul pianeta. Sebbene i servizi e i beni ecosistemici siano teoricamente riconducibili a diverse categorie funzionali (regolazione, habitat, produzione e informazione) nonché sottoclassi, ad oggi non sono sufficientemente studiati ed individuati. Lo sviluppo della ricerca e delle sue applicazioni verso tale tematica è considerato uno degli obiettivi da raggiungere secondo quanto recentemente suggerito dalla Comunità Europea (Horizon 2020, COM 2011- 809 final).

Il presente lavoro intende fornire un contributo all'individuazione di un servizio ecosistemico di *Regolazione* fornito dall'ecosistema fluviale Tevere, attraverso lo studio della degradazione di microcontaminanti emergenti, da parte delle comunità microbiche naturalmente presenti nel corpo idrico.

La maggior parte della ricerca sulla biodiversità e sulla conservazione degli ecosistemi rivolge l'attenzione verso i grandi organismi eucarioti, tuttavia è importante sottolineare il ruolo svolto dalle comunità microbiche nel fornire molti servizi ecosistemici insostituibili.

In particolare le popolazioni batteriche, grazie all'elevata abbondanza, all'ampia diffusione, al rapido tasso di crescita e alla loro vasta versatilità funzionale, mostrano grandi capacità omeostatiche verso i disturbi ambientali e in particolare verso i contaminanti xenobiotici.

### INTRODUZIONE

La valutazione della capacità degli ecosistemi di fornire funzioni, beni e servizi è oggetto di studio ed interesse al fine di considerarne il valore ecologico, sociale ed economico. In questo contesto le funzioni ecosistemiche vengono definite come "*la capacità dei processi e delle componenti naturali di fornire beni e servizi che soddisfino direttamente e indirettamente diverse necessità della popolazione umana*" (de Groot, 1992).

Sebbene in letteratura ci si riferisca ad un'ampia varietà di funzioni ecosistemiche e dei loro servizi e beni associati, alcuni Autori (de Groot et al., 2002) le organizzano in 4 categorie principali:

1) Funzioni di Regolazione: correlate alla capacità degli ecosistemi naturali e seminaturali di regolare i processi ecologici attraverso i cicli biogeochimici ed altri processi essenziali per la biosfera. Oltre a mantenere la salute generale degli ecosistemi queste funzioni di regolazione forniscono servizi che rappresentano, direttamente o indirettamente, benefici per l'uomo (come la qualità dell'aria, dell'acqua, del suolo e i servizi di controllo biologico).

Il mantenimento della qualità dell'acqua, attraverso la biodegradazione e la rimozione dei contaminanti, è riconosciuto come un servizio di Regolazione. Il biorecupero dalla contaminazione è possibile nei limiti in cui la tossicità del contaminante non comprometta l'attività microbica (Artigas et al., 2012).

2) Funzioni di Habitat: gli ecosistemi naturali forniscono il rifugio e il luogo di riproduzione per le piante e gli animali e perciò contribuiscono alla conservazione *in situ* della diversità biologica e genetica e all'attuazione dei processi evolutivi.

3) Funzioni di Produzione: la fotosintesi e l'assorbimento dei nutrienti da parte degli organismi autotrofi permettono la trasformazione di energia luminosa, anidride carbonica, acqua e nutrienti in un'ampia varietà di carboidrati che sono in seguito utilizzati dai produttori secondari per produrre biomassa.

Tale varietà fornisce molti beni ecosistemici per il consumo umano, che vanno dal cibo e dalla materia prima a risorse energetiche e materiale genico.

4) Funzioni di Informazione: l'evoluzione dell'uomo ha avuto luogo principalmente in habitat naturali. Gli ecosistemi naturali hanno una "funzione di riferimento" e contribuiscono al mantenimento della salute dell'uomo fornendo opportunità di riflessione, arricchimento spirituale, sviluppo cognitivo, ricreazione ed esperienza estetica.

Sebbene il raggruppamento delle funzioni ecosistemiche in categorie sia in qualche modo arbitrario, esiste una logica alla base della sequenza indicata. Le prime due funzioni- (Regolazione ed Habitat) sono essenziali nel mantenere i processi naturali e le sue componenti e condizionano a loro volta il mantenimento delle altre due funzioni-gruppi (Produzione e Informazione). Naturalmente la vita dell'uomo sulla Terra è dipendente da tutte queste funzioni e la gerarchia proposta non deve essere interpretata rigidamente. Una volta che le funzioni di un ecosistema sono note, la natura e l'importanza del valore per la società umana possono essere pertanto analizzate e valutate attraverso beni e servizi forniti dalle funzioni ecosistemiche. Le funzioni ecosistemiche osservate vengono riconcettualizzate in "beni e servizi ecosistemici" quando vengono presi in considerazione i valori umani.

L'importanza e il valore degli ecosistemi è approssimativamente riconducibile a tre parametri di riferimento: Valore ecologico, socio-culturale, economico (de Groot et al., 2002). Il Valore ecologico è strettamente connesso al concetto di sostenibilità: l'uso dei beni e dei servizi associati deve essere limitato a livelli d'uso sostenibili; i limiti dell'uso sostenibile sono determinati da criteri ecologici come l'integrità, la resilienza e la resistenza (de Groot et al., 2000). Il Valore socio-culturale discende dal fatto che i sistemi naturali sono una sorgente cruciale di benessere non materiale e sono indispensabili per una società sostenibile (Norton, 1987). Infine, il Valore economico assegna un valore monetario ai servizi ecosistemici offerti (de Groot et al., 2002).

In questo articolo vengono riportati alcuni risultati relativi ad una ricerca svolta presso l'IRSA-CNR finalizzata a valutare il servizio ecosistemico di biodegradazione di due farmaci ad uso umano (Naproxene e Gemfibrozil) da parte della comunità microbica autoctona dell'ecosistema fluviale Tevere. Tali molecole sono state studiate poiché riscontrate come microcontaminanti emergenti degli ecosistemi acquatici.

I contaminanti emergenti sono molecole non necessariamente di nuova generazione, al momento non incluse in programmi di monitoraggio di routine a livello europeo, ma che possono essere oggetto, in futuro, di regolamentazione in ragione dei risultati di ricerche finalizzate alla valutazione della loro presenza nei diversi comparti ambientali e dei loro effetti sulla salute dell'uomo e degli ecosistemi (Bottoni et al., 2010).

## PARTE SPERIMENTALE

### Farmaci oggetto di studio

Gemfibrozil e Naproxene si trovano comunemente nelle acque superficiali a causa del loro uso diffuso e della scarsa rimozione negli impianti di depurazione.

Sono considerati farmaci di interesse prioritario sulla base del loro consumo, proprietà chimico-fisiche, tossicità e soprattutto per la loro presenza e persistenza in acqua (de Voogt et al., 2009). Inoltre risultano scarse le informazioni circa il loro destino ambientale e gli effetti sugli ecosistemi acquatici.

Il Gemfibrozil è un farmaco acido, prescritto come regolatore lipidico per la diminuzione dei livelli di trigliceridi nel plasma, ma è anche utilizzato per ridurre i livelli di lipoproteine a bassa densità (LDL) e il colesterolo totale e per incrementare i livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) (Araujo et al., 2011). Questo ipolipemizzante appartiene alla classe dei fibrati. Alcuni studi ecotossicologici mostrano che i fibrati sono in grado di inibire la differenziazione cellulare a concentrazioni micromolari; Raldù e coautori (2008) hanno dimostrato una riduzione significativa nella lunghezza del corpo, alterazione di alcune caratteristiche morfologiche e comportamenti letargici nella fase giovanile dell'organismo test *Danio rerio*. Tra tutti i fibrati (es. Fenofibrato, Bezafibrato, Acido Clofibrato), Gemfibrozil è quello riscontrato nell'ambiente a maggiori concentrazioni (4,76 µg/L, Isidori et al., 2007). Alcuni autori ritengono che la sua resistenza alla biodegradazione (Stumpf et al., 1999; Isidori et al., 2007) sia la causa della sua ampia diffusione nelle acque superficiali.

Quinn e coautori (2008) propongono la classificazione di Gemfibrozil come tossico per gli organismi non bersaglio poiché la sua EC<sub>50</sub> (Concentrazione di Effetto 50) è nel range di 1-10 mg/L. Tra le sue proprietà tossiche vi è l'inibizione della luminescenza del batterio *Vibrio fischeri*, della crescita dell'alga *Chlorella vulgaris*, e l'immobilizzazione di *D.magna* (Zurita et al., 2007).

Il Naproxene è un farmaco acido comunemente usato come anti-infiammatorio, analgesico e antipiretico (Araujo et al., 2011). Appartiene alla classe dei farmaci anti-infiammatori non steroidei che agiscono per inibizione, reversibile e/o irreversibile, di una o di entrambe le forme isomeriche dell'enzima ciclossigenasi (COX1 o COX2) coinvolto nella sintesi di diverse prostaglandine a partire dall'acido arachidonico (Vane e Botting, 1998).

Test di tossicità acuta effettuati su alcuni macroinvertebrati hanno mostrato per il Naproxene valori di LC<sub>50</sub> (Concentrazione Letale mediana) e di EC<sub>50</sub> compresi tra 1 e 100 mg/L, con la presenza dei prodotti di fotolisi significativamente più tossici del farmaco stesso. Sono stati riscontrati anche effetti di tossicità cronica in organismi meno sensibili come le alghe (Isidori et al., 2005).

Questo farmaco è rapidamente demetilato e coniugato in vivo, mentre nell'ambiente subisce biodegradazione e fototrasformazione e proprio quest'ultimo processo sembra essere la principale forma di rimozione (Tixier et al., 2003).

In un recente studio (Radke, 2010) è stata riportata una DT<sub>50</sub> (tempo di dimezzamento) in un ambiente fluviale di circa 3-5 giorni e dimostrato il ruolo dei processi biotici nella sua scomparsa. La biodegradazione del Naproxene è stata riscontrata anche nel suolo, dove porta alla formazione del corrispondente metabolita O-demetilato ad opera di enzimi catalizzatori presenti in microrganismi terricoli (microfunghi del genere *Aspergillus* e *Cunninghamella* e batteri, Topp et al., 2008).

Nonostante il crescente interesse verso il problema della contaminazione delle acque causata da farmaci e i relativi processi di rimozione negli impianti di depurazione, pochi studi focalizzano l'attenzione sull'impatto che queste sostanze xenobiotiche hanno sui microrganismi e sulle loro attività. Anche se i microrganismi sono in grado di esplicitare la loro azione autodepurativa attraverso processi di biodegradazione metabolica e cometabolica, è importante che la presenza di molecole esogene di natura antropica non comprometta o inibisca la loro attività. In uno studio effettuato su diversi farmaci, tra cui Naproxene e Gemfibrozil, è stato dimostrato che farmaci acidi polari possono incidere sulla sopravvivenza di alcuni ceppi batterici con una conseguente riduzione della diversità di specie (Kraigher et al., 2008). In particolare essi possono inibire l'attività nitrificante in *Nitrosomonas europaea* o uccidere le cellule agendo sull'integrità delle membrane citoplasmatiche.

## Apparato sperimentale

Per gli esperimenti di degradazione sono stati utilizzati campioni di acqua di fiume prelevati nel mese di ottobre 2010 in un tratto del fiume Tevere, posto nella zona sud di Roma (Magliana). Le principali caratteristiche chimico-fisiche dei campioni d'acqua erano: temperatura 18°C, ossigeno disciolto 7,5 mg/L, pH 7,8 e concentrazione di carbonio organico disciolto (DOC) 3,5mg/L.

I criteri di scelta del sito di campionamento fanno riferimento ai risultati di analisi precedenti dalle quali il sito risultava contaminato dai farmaci Gemfibrozil e Naproxene a concentrazioni, espresse in ng/L, rispettivamente di 65±13 e di 264±9 (Patrolecco et al., 2012).

Per ognuno dei due farmaci è stato condotto un esperimento di degradazione, in cui sono stati allestiti microcosmi distruttivi (64 repliche). Sono state realizzate tre diverse condizioni sperimentali:

- Microcosmi Microbiologicamente Attivi (MA): acqua di fiume contenente la comunità microbica naturalmente presente e trattata con 100 µg/L di farmaco;
- Microcosmi con acqua sterile (Sterile): acqua di fiume precedentemente sterilizzata (autoclave, 120°C) e trattata con 100 µg/L di farmaco;
- Microcosmi Microbiologicamente Attivi (Controllo microbiologico): acqua di fiume contenente la comunità microbica naturalmente presente non trattata.

I microcosmi sono stati chiusi e mantenuti in una camera termostata (20°C), al buio, sotto agitazione (80 giri/min) per tutta la durata dell'esperimento. Alcuni microcosmi sono stati allestiti alle stesse condizioni sopra descritte, ma utilizzati esclusivamente per monitorare nel tempo la concentrazione di ossigeno ed il pH.

Dopo circa 3 ore dall'aggiunta del farmaco, ad intervalli regolari, sono stati effettuati campionamenti sia per le analisi chimiche, al fine di valutare la scomparsa di ogni singolo farmaco almeno fino al 50% della sua concentrazione iniziale, sia per le analisi microbiologiche, al fine di analizzare la struttura della comunità batterica in termini di abbondanza e composizione filogenetica (identificazione dei principali taxa microbici presenti).

La concentrazione dei farmaci nei microcosmi è stata monitorata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelazione in fluorescenza (Patrolecco et al., 2012).

Le analisi microbiologiche effettuate sui campioni hanno preso in esame la caratterizzazione filogenetica della comunità batterica, tramite la tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) (Barra Caracciolo et al., 2010). Questa tecnica permette di determinare la morfologia e l'abbondanza di microrganismi non coltivati, di analizzare la loro distribuzione spaziale *in situ*, nonché di monitorare le dinamiche di popolazioni microbiche nell'ambiente (Barra Caracciolo et al., 2005; Barra Caracciolo et al., 2010). Inoltre, sono state determinate anche l'abbondanza batterica, tramite il metodo della conta diretta in epifluorescenza, e la vitalità batterica, tramite la tecnica di colorazione *Live/Dead* (dati non riportati).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel grafico in Fig. 1 è riportata la concentrazione media del farmaco Gemfibrozil nel tempo, espressa in percentuale rispetto alla concentrazione iniziale, nelle due diverse condizioni sperimentali: MA (microcosmi Microbiologicamente Attivi) e Sterile (microcosmi Sterili).

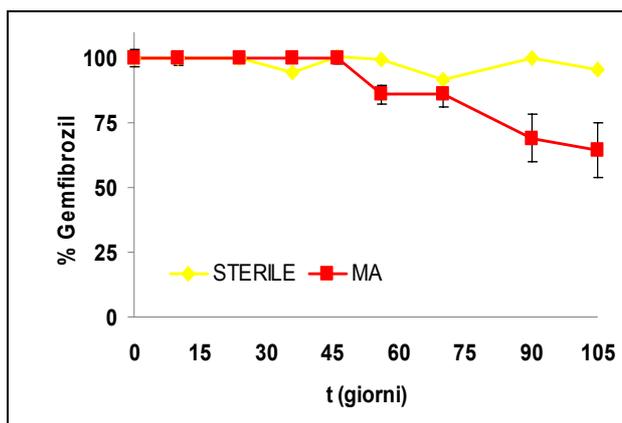


Fig. 1 - Concentrazione in percentuale del farmaco Gemfibrozil nei microcosmi Microbiologicamente Attivi (MA) e Sterili durante il periodo di incubazione di 105 giorni. Le linee verticali rappresentano le deviazioni standard calcolate sulla media di 4 valori.

Come si può notare dal grafico alla fine dell'esperienza non si giunge al dimezzamento del composto parentale nei microcosmi microbiologicamente attivi (MA). Dopo 105 giorni è ancora presente il 64% della concentrazione iniziale di Gemfibrozil.

Nella condizione Sterile non si osservano variazioni nella concentrazione del farmaco, che rimane invariata..

La caratterizzazione della comunità batterica tramite la tecnica di ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) è stata effettuata sui campioni di acqua di fiume naturale (prima del trattamento) e a 57 giorni, in prossimità del tempo in cui la concentrazione del farmaco Gemfibrozil all'interno dei microcosmi comincia a diminuire. I dati vengono espressi come percentuali di batteri positivi alla sonda oligonucleotidica fluorescente applicata rispetto al numero totale di cellule rilevate con la conta totale DAPI.

Sono state utilizzate le seguenti sonde. ARCH915 per il dominio degli *Archaea* e EUB338I-III per quello dei *Bacteria*. Inoltre, all'interno dei *Bacteria* sono state applicate altre sonde (ALF1b, BET42a, GAM42a, PLA46, PLA886, CF319a, LGC354a,b,c, HGC69a) per identificare i seguenti *taxa*: Alpha-, Beta-, Gamma-*Proteobacteria*, *Planctomycetes* (Pla), *Bacteroidetes* (CF), *Firmicutes* (LGC) e *Actinobacteria* (HGC).

L'ibridazione con le sonde per il dominio dei *Bacteria* ha rilevato sui campioni naturali del fiume più del 60% dei batteri positivi rispetto a quelli totali rilevati dalla conta totale DAPI (Fig. 2).

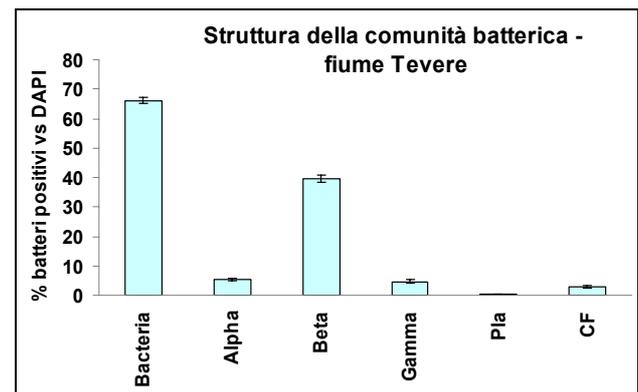


Fig. 2 - Struttura della comunità batterica nel fiume Tevere caratterizzata tramite tecnica FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization). Le barre verticali rappresentano gli errori standard.

I *Beta-Proteobacteria* rappresentano inizialmente il gruppo dominante (circa il 40% dei batteri totali) della comunità batterica (Fig. 2).

La sonda per il dominio degli *Archea* (ARCH915) non ha fornito nessun segnale positivo e questo implica l'assenza di tale gruppo nell'ambiente acquatico di studio o una sua presenza in una condizione di scarsa o bassa attività.

I dati riguardanti i batteri Gram-positivi non sono stati riportati nel grafico poiché i valori percentuali riscontrati sono risultati inferiori all'1% sia per quanto riguarda i *Firmicutes* (LGC) che gli *Actinobacteria* (HGC). La composizione filogenetica della comunità batterica presente nei campioni trattati con Gemfibrozil a 57 giorni dal trattamento (Fig. 3), momento in cui la concentrazione del farmaco comincia a diminuire, risulta influenzata dalla presenza del farmaco, con un incremento significativo (*t* test,  $p < 0,01$ ) del gruppo *Alpha-Proteobacteria* che diventa il gruppo dominante (Fig. 3).

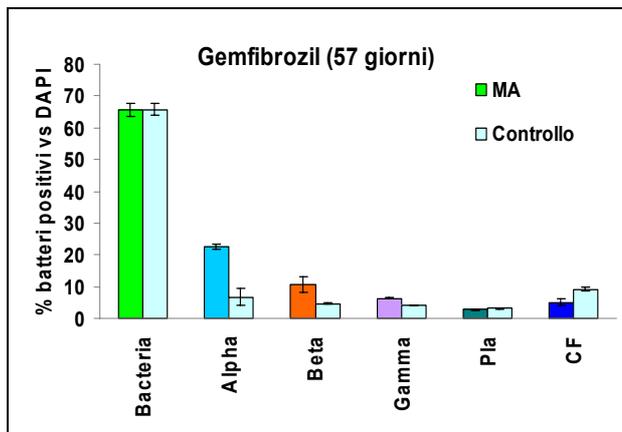


Fig. 3 - Struttura della comunità batterica dopo 57 giorni nei microcosmi trattati con il farmaco (MA) e in quelli non trattati (Controllo microbiologico).

Tale incremento, non essendo osservato nel controllo, può essere attribuibile alla presenza del farmaco. Questo risultato potrebbe essere correlato ad un coinvolgimento del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* nel processo di degradazione del farmaco. Sebbene il Gemfibrozil sia stato inizialmente descritto come una molecola resistente alla biodegradazione (Stumpf et al., 1999), altri studi suggeriscono il ruolo dei microrganismi nella sua degradazione. Infatti, in un recente studio in cui è stato utilizzato un fungo modello, *Cunninghamella elegans* ATCC 9245, selezionato perché già in grado di biodegradare un altro farmaco (Kang et al., 2008), si è riscontrato che tale molecola può essere biotrasformata, attraverso processi di idrossilazione, in diversi metaboliti (Kang et al., 2009). Il nostro studio, pertanto, sembra confermare che Gemfibrozil può essere biodegradato ad opera di popolazioni batteriche, sebbene alla fine dell'esperimento (105 giorni) si osservi circa il 60% della concentrazione iniziale del farmaco.

Nel grafico in Fig. 4 è riportata la concentrazione media del farmaco Naproxene nel tempo, espressa in percentuale rispetto alla concentrazione iniziale (100 µg/L), nelle due diverse condizioni sperimentali: MA (microcosmi Microbiologicamente Attivi) e Sterile (Microcosmi Sterili).

Nei microcosmi microbiologicamente attivi (MA) dopo una fase *lag* di 7 giorni; si osserva una diminuzione della concentrazione del farmaco che diventa più rapida intorno al ventiduesimo giorno fino alla sua completa scomparsa dopo 36 giorni dal trattamento. Il tempo di dimezzamento del Naproxene è di circa 22 giorni.

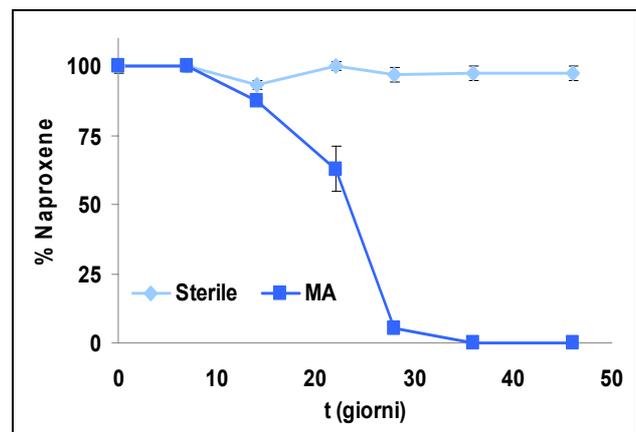


Fig. 4 - Concentrazione in percentuale del farmaco Naproxene nei microcosmi microbiologicamente attivi (MA) e Sterili durante il periodo di incubazione di 46 giorni. Le linee verticali rappresentano le deviazioni standard calcolate sulla media di 4 valori.

Nei microcosmi Sterili, al contrario, non si osservano variazioni significative della concentrazione iniziale del farmaco. Il Naproxene pertanto viene completamente biodegradato dopo 36 giorni dalla comunità microbica naturalmente presente nel fiume Tevere.

Il confronto tra la struttura della comunità batterica sui campioni di acqua di fiume naturale (prima del trattamento, Fig. 1) e quella rilevata dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento con il farmaco Naproxene (Fig. 5), ci consente di evidenziare, anche in questo caso, una variazione dell'abbondanza relativa e della dominanza dei diversi gruppi batterici analizzati.

In particolare a 14 giorni si osserva un incremento significativo (*t* test,  $p < 0,01$ ) dei gruppi *Alpha-Proteobacteria* e *Gamma-Proteobacteria* (Fig. 5) rispetto sia al numero iniziale che al controllo analizzato nello stesso giorno. Questo incremento suggerisce il coinvolgimento di entrambi i gruppi batterici nella degradazione del Naproxene.

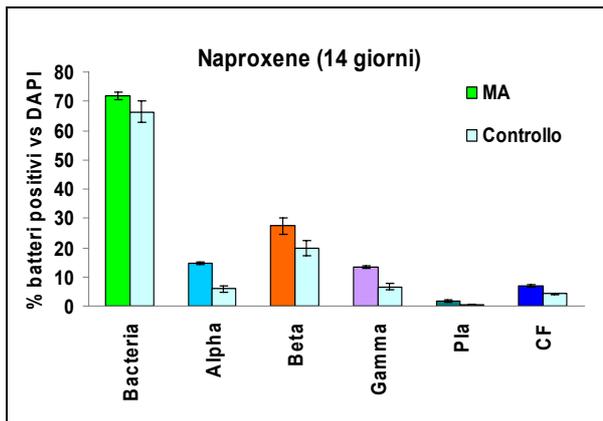


Fig. 5 - Struttura della comunità batterica nei microcosmi trattati (MA) e non trattati (Controllo) con il farmaco, a 14 giorni, caratterizzata tramite tecnica FISH.

La biodegradazione del Naproxene ad opera di microrganismi è stata osservata in suoli aerobici, con un'emivita tra 17 e 69 giorni (Lin e Gan, 2011). In un altro studio sul suolo di Topp et al., (2008) alcuni consorzi microbici, incluse specie di microfunghi del genere *Cunninghamella* e *Aspergillus*, sono stati individuati come responsabili di processi cometabolici in grado di trasformare il farmaco. Pertanto il nostro studio conferma la possibilità che tale molecola sia biodegradata in ecosistemi naturali e che nel fiume Tevere esista la funzione di biodegradazione ad opera della comunità microbica presente.

I risultati dei due esperimenti di degradazione mostrano che i due farmaci hanno una persistenza e biodegradabilità diversa e che il Gemfibrozil è più persistente del Naproxene. Tuttavia, il fatto che il Naproxene si riscontri a concentrazioni più elevate nell'ecosistema fluviale studiato ( $1079 \pm 8$  ng/L rispetto ai  $578 \pm 10$  ng/L di Gemfibrozil), nonostante la sua maggiore degradabilità, è ascrivibile alla sua pseudo-persistenza, conseguente alla sua continua immissione nell'ambiente dagli impianti di trattamento. Infatti, l'utilizzo di tale farmaco è assai diffuso tra la popolazione anche grazie al fatto che non è necessaria alcuna prescrizione medica per il suo acquisto. Tale risultato mette in luce come la continua immissione di farmaci nell'ambiente faccia sì che anche molecole intrinsecamente non persistenti possano essere costantemente presenti negli ecosistemi (Araujo et al., 2011).

## CONCLUSIONI

Sebbene ad oggi non esista ancora un approccio unico ed integrato alla valutazione e alla stima dei servizi ecosistemici e le applicazioni pratiche che stimano contemporaneamente i valori ambientali, economici e sociali siano numericamente limitate, gli sforzi di ricerca rivolti alla conservazione della natura e alla gestione dell'ambiente stanno evolvendo verso approcci sempre più integrati (de Groot et al., 2010).

I risultati riportati nel presente lavoro permettono di evidenziare che lo studio delle comunità microbiche naturali e la valutazione dei servizi ecosistemici che esse forniscono (Regolazione della qualità dell'acqua) possono darci indicazioni su nuove strategie di studio e conservazione degli ecosistemi. Negli esperimenti di degradazione dei farmaci, il servizio ecosistemico di regolazione della qualità dell'acqua fornito dalle comunità batteriche fluviali autoctone riflette la loro capacità nel degradare contaminanti ambientali e quindi ne enfatizza un loro possibile utilizzo in processi di biorecupero ambientale.

## BIBLIOGRAFIA

ARAUJO L., VILLA N., CAMARGO N., BUSTOS M., GARCIA T. (2011). : "Persistence of gemfibrozil, naproxen and mefenamic acid in natural waters", *Environ. Chem. Lett.*, **9**, 13-18.

ARTIGAS J., ARTS G., BABUT M., BARRA CARACCILO A., CHARLES S., CHAUMOT A., COMBOURIEU B., DAHLÖF I., DESPRÉAUX D., FERRARI B., FRIBERG N., GARRIC J., GEFFARD O., GOURLAY-FRANCÉ C., HEIN M., HJORTH M., KRAUSS M., DE LANGE H.J., LAHR J., LEHTONEN K.K., LETTIERI T., LIESS M., LOFTS S., MAYER P., MORIN S., PASCHKE A., SVENDSEN C., USSEGLIO-POLATERA P., VAN DEN BRINK N., VINDIMIAN E., WILLIAMS R. (2012): "Towards a renewed research agenda in ecotoxicology", *Environ. Pollut.*, **160**, 201-206.

BARRA CARACCILO A., GRENNI P., CUPO C., ROSSETTI S. (2005): "In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads", *FEMS Microbiol. Lett.*, **253**, 55-58.

BARRA CARACCILO A., BOTTONI P., GRENNI P. (2010): "The use of the Fluorescence *In Situ* Hybridization method in soil and water ecosystems: a new approach for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure", *Toxicol. Environ. Chem.*, **92**, 567-579.

- BOTTONI P., CAROLI S., BARRA CARACCILOLO A. (2010): "Pharmaceuticals as priority water contaminants *Toxicol. Environ. Chem.*, **92**, 549 – 565.
- COSTANZA R., D'ARGE R., de GROOT R., FARBER S., GRASSO M., HANNON B., LIMBURG K., NAEEM S., O'NEILL R.V., PARUELO J., RASKIN R.G., SUTTON P., VAN DEN BELT M. (1997): "The value of the world's ecosystem services and natural capital", *Nature*, **387**, 53-260.
- de GROOT R.S. (1992): "*Functions of Nature: Evaluation of Nature in Environmental Planning, Management and Decision Making*", Wolters-Noordhoff BV, Groningen, the Netherland, 345 pp.
- de GROOT R.S., VAN DER PERK J., CHIESURA A., MARGULIEW S. (2000): "*Ecological functions and socio-economic values of critical natural capital as a measure for ecological integrity and environmental health*", in: Crabbe P., Holland A., Ryszkowski L., Westra L. (Eds.), *Implementing Ecological Integrity: NATO-Science Series, Environmental Security*, Kluwer Ac. Publ. BV, Dordrecht, 191-214.
- de GROOT R.S., WILSON M.A., BOUMANS R.M.J. (2002): "A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods, services, *Ecol. Econ.*, **41**, 393-408.
- de GROOT R.S., ALKEMADE R., BRAAT L., HEIN L., WILLEMEN L. (2010): "Challenges in integrating the concept of ecosystem services and values in landscape planning, management and decision making", *Ecol. Complex.*, **7**, 260-272.
- de VOOGT P., JANEX-HABIBI M-L., SACHER F., PUIJKER L., MONS M. (2009): "Development of a common priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle", *Water Sci. Technol.*, **59**, 39-46.
- ISIDORI M., LAVORGNA M., NARDELLI A., PARRELLA A., PREVITERA L., RUBINO M. (2005): "Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products", *Sci. Total Environ.*, **348**, (1-3), 93-101.
- ISIDORI M., NARDELLI A., PASCARELLA L., RUBINO M., PARRELLA A. (2007): "Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on nontarget organisms", *Environ. Int.*, **33**, 635-641.
- KANG S.I., KANG S.Y. (2008): "Identification of fungal metabolites of anticonvulsant drug carbamazepine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 663-669.
- KANG S.I., KANG S.Y., KANALY R.A., LEE E., LIM Y., HUR H.G. (2009): "Rapid oxidation of ring methyl groups is the primary mechanism of biotransformation of Gemfibrozil by the fungus", *Arch. Microbiol.*, **191**, 509-517.
- KRAIGHER B., KOSJEK T., HEATH E., KOMPARE B., MANDIC-MULE I. (2008): "Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors", *Water Res.*, **42**, 4578-4588.
- LIN K. & GAN J. (2011): "Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils", *Chemosphere*, **83**, 240-246.
- NORTON B.G. (1987): "*Why preserve natural variety?*" Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- PATROLECCO L., ADEMOLLO N., GRENNI P., TOLOMEI A., BARRA CARACCILOLO A., CAPRI S. (2012): "Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by soil phase extraction and HPLC with UV-Fluorescence detection", *Microchem. J.*, **107**, 165-171.
- QUINN B., GAGNE F., BLAISE C. (2008): "An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian *Hydra attenuate*", *Sci. Total Environ.*, **389**, 306-314.
- RADKE M. (2010): "Dynamics and Attenuation of Acidic Pharmaceuticals along a River Stretch", *Environ. Sci. Technol.*, **44** (8), 2968-2974.
- RALDÙA D., ANDRÈ M., BABIN P.J. (2008): "Clofibrate and Gemfibrozil induce an embryonic malabsorption in zebrafish", *Toxicol. Appl. Pharm.*, **228**, 301-314.
- SCHULZE E-D. & MOONEY H.A. (1993): "Biodiversity and Ecosystem Function", *Ecological Studies*, **99**, Berlin, Springer.
- STUMPF M., TERNES T.A., WILKEN R.D., RODRIGUES S.V., BAUMANN W. (1999): "Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil", *Sci. Total Environ.*, **225**, (1/2), 135-141.

TIXIER C., SINGER H.P., OELLERS S., MULLER S.R. (2003): "Occurrence and fate of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters", *Sci. Total Environ.*, **37**, (6), 1061-1068.

TOPP E., HENDEL J.G, LAPEN D.R, CHAPMAN R. (2008): "Fate of the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen in agricultural soil receiving liquid municipal biosolids", *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**, (10), 2005-2010.

VANE J.R. & BOTTING R.M. (1998): "Mechanisms of action of anti-inflammatory drugs", *Int. J. Tissue React.*, **20**, (1), 3-15.

ZURITA J.L., REPETTO G., JOS Á., SALGUERO M., LÓPEZ-ARTÍGUEZ M., CAMEÁN A.M. (2007): "Toxicological effects of the lipid regulator Gemfibrozil in four aquatic systems", *Aquat. Toxicol.*, **81**, 106-115.

## DESTINO AMBIENTALE DEGLI ANTIBIOTICI NEGLI ECOSISTEMI DEL SUOLO E DELLE ACQUE E LORO EFFETTI SUI MICRORGANISMI

a cura di Pirredda M. e Grenni P.

CNR-IRSA, Area Ricerca Roma 1 - Montelibretti, Monterotondo (RM)

### RIASSUNTO

Gli antibiotici una volta entrati nell'ambiente possono agire sulle comunità microbiche naturali. Gli effetti includono non solo l'aumento della resistenza, ma anche l'alterazione della struttura filogenetica e delle funzioni ecologiche. La relazione causa-effetto tra l'input di antibiotici e l'aumento della resistenza antibiotica è ancora in fase di studio. Numerose ricerche hanno evidenziato cambiamenti nella struttura di comunità microbiche presenti nel suolo e nelle acque, causati dalla presenza di antibiotici e messo in luce effetti su funzioni ecologiche fondamentali, come la trasformazione dell'azoto, la metanogenesi e la solfato-riduzione. Diversi sono i fattori che influenzano l'entità di tali effetti tra i quali la concentrazione del farmaco, il tempo d'esposizione, i diversi substrati e, non ultimi, la co-presenza di diversi antibiotici e di altri contaminanti.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, tra i diversi contaminanti emergenti, notevole attenzione è stata riservata alla possibile presenza di farmaci negli ecosistemi.

In particolare, gli antibiotici sono oggetto di numerosi studi in quanto il loro crescente uso e il conseguente sviluppo di batteri multi-resistenti pongono seri rischi per la salute umana e degli animali.

Gli antibiotici sono sostanze utilizzate nella medicina umana e veterinaria per trattare o prevenire le malattie infettive e, nel caso di antibiotici veterinari, in alcuni Paesi vengono forniti a bassa concentrazione attraverso il mangime come promotori della crescita degli animali allevati. Il termine antibiotico si riferisce ad ogni agente che esercita attività biologica nei confronti di organismi viventi, in particolare attività antibatterica, antifungina o antiparassitaria.

L'introduzione degli antibiotici nella medicina umana (nel 1940 con la penicillina) e veterinaria ha rappresentato un fattore importante per il miglioramento delle condizioni di salute dell'uomo e di quelle degli animali negli allevamenti. In natura tali molecole sono prodotte da microrganismi (batteri e funghi) allo scopo di inibire la crescita o eliminare altri microrganismi loro competitori (effetto batteriostatico o battericida). Molte molecole antibiotiche sono state isolate ed utilizzate anche per altri usi terapeutici, come antitumorali o antiparassitari o per la promozione della crescita negli animali e nelle piante (Demain, 2000).

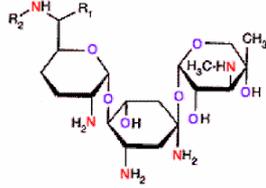
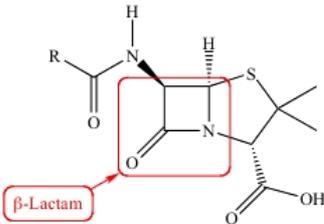
Gli antibiotici che attualmente vengono utilizzati possono essere naturali, prodotti principalmente da microrganismi come ad esempio i funghi, (Benzilpenicillina e Gentamicina), di sintesi (agenti antimicrobici o chemioterapici) o semi-sintetici, cioè composti naturali alterati chimicamente mediante l'inserimento di un additivo sintetico all'interno della formulazione farmacologica, che ne migliora l'efficacia rendendoli più stabili e meno degradabili dai batteri.

In generale gli antibiotici si possono dividere in differenti categorie farmaceutiche (Tab. 1), oppure in base al loro meccanismo di azione (inibizione della sintesi della parete cellulare, alterazione delle membrane cellulari, inibizione della sintesi proteica, inibizione della sintesi degli acidi nucleici, attività anti-metabolica o antagonismo competitivo (Kümmerer, 2009; Fig. 1). Si tratta di molecole complesse che possono avere diversi gruppi funzionali al loro interno. In condizioni diverse di pH possono perciò comportarsi come composti neutri, cationici, anionici o zwitterionici (che presentano sia cariche positive sia negative localizzate) (Kümmerer, 2009). Inoltre le loro caratteristiche chimico-fisiche e biologiche, come il log  $K_{ow}$  (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, indicatore della tendenza del composto ad essere adsorbito al suolo), assorbimento, reattività alla luce, attività antibiotica e tossicità possono cambiare con il pH (Kümmerer, 2009).

La contaminazione ambientale da parte di antibiotici avviene attraverso diverse modalità (Boxall, 2004). La più rilevante è quella dovuta a trattamenti terapeutici umani e veterinari; infatti, una volta somministrati, gli antibiotici vengono solo parzialmente metabolizzati dall'organismo trattato e perciò in buona parte vengono eliminati, come tali o come prodotti di degradazione, attraverso le urine e le feci (Kemper, 2008). I farmaci ad uso umano, una volta escreti vengono convogliati attraverso i condotti fognari agli impianti di depurazione, dove possono influenzare negativamente la comunità microbica dei fanghi attivi e quindi l'efficienza del trattamento depurativo (Louvet et al., 2010).

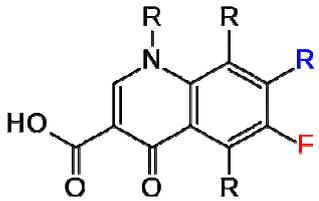
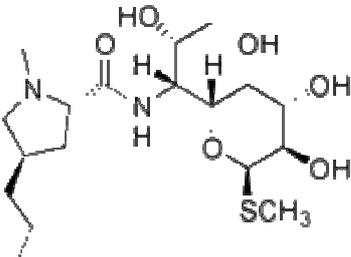
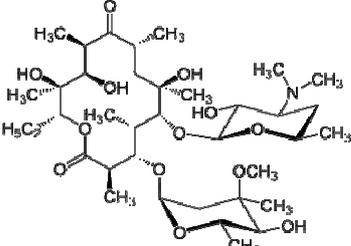
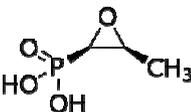
Se poi non vengono adeguatamente trattenuti o degradati negli impianti di depurazione, passano negli effluenti degli impianti stessi e da qui possono contaminare gli ecosistemi fluviali riceventi (Halling-Sørensen et al., 1998; Zuccato et al., 2007; Zuccato et al., 2010; Singer et al., 2008), e persino le acque potabili (Watkinson et al., 2009).

Tab. 1 - Principali classi, principi attivi e loro principale utilizzo (informazioni dal sito EMA, European Medicines Agency <http://www.ema.europa.eu/ema>, da *The FOOTPRINT Pesticide Properties Database* <http://www.eu-footprint.org/ppdb.html> e da PUBCHEM <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Classe e meccanismo d'azione	Principio attivo	Uso principale
<b>Aminoglicosidi</b> <i>Inibitori della sintesi delle proteine</i> 	Apramicina	Veterinario
	Gentamicina	Umano, veterinario
	Kanamicina	Veterinario
	Neomicina	Veterinario
	Sisomicina	Umano
	Spectinomicina	Veterinario
	Streptomicina	Umano, veterinario, agricolo
<b><math>\beta</math>-Lattamici</b> <i>Inibitori della sintesi della parete cellulare</i> 	Amoxicillina	Umano, veterinario
	Ampicillina	Veterinario
	Azlocillina	Umano
	Benzilpenicillina	Veterinario
	Cloxacillina	Veterinario
	Dicloxacillina	Veterinario
	Flucloxacillina	Umano
	Meticillina	Umano
	Mezlocillina	Umano
	Nafcillina	Umano
	Oxacillina	Veterinario
	Piperacillina	Umano
	Penicillina	Veterinario, umano
	Cefalexina	Umano, veterinario
	Cefalotina	Umano
	Cefazolina	Umano, veterinario
	Ceftiofur	Veterinario
	Cefotaxime	Umano
Cefotiam	Umano	
Cefquinome	Veterinario	

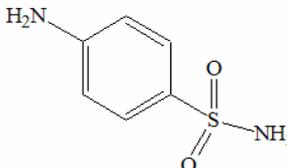
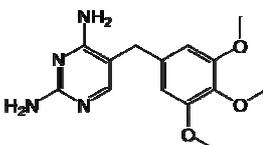
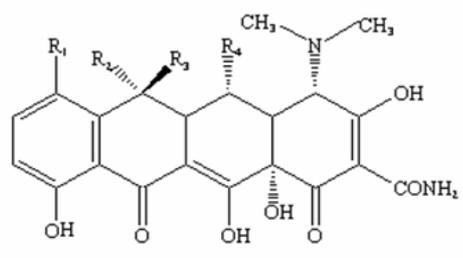
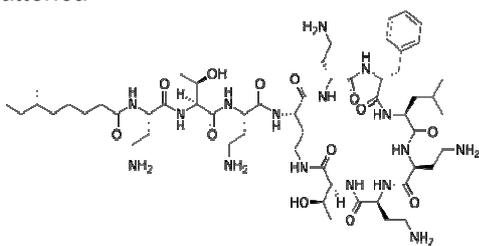
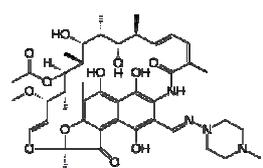
segue

segue

Classe e meccanismo d'azione	Principio attivo	Uso principale
<b>Chinoloni e Fluorochinoloni</b> <i>Inibiscono la replicazione del DNA</i> 	Ciprofloxacina	Umano
	Enrofloxacina	Veterinario
	Marbofloxacina	Veterinario
	Flumequina	Veterinario
	Ofloxacina	Umano
<b>Lincosamidi</b> <i>Inibiscono la sintesi proteica legandosi reversibilmente alla subunità ribosomiale 50S</i> 	Clindamicina	Umano, Veterinario
	Lincomicina	Veterinario
<b>Macrolidi</b> <i>Inibiscono la sintesi proteica legandosi reversibilmente alla subunità ribosomiale 50S</i> 	Azitromicina	Umano
	Claritromicina	Umano
	Eritromicina	Umano, Veterinario
	Roxithromycin	Umano
	Spiramicina	Veterinario
	Tilosina	Veterinario
	Vancomicina	Umano
<b>Fosfonici</b> <i>Inibitori della sintesi della parete cellulare</i> 	Fosfomicina	Umano

segue

segue

Classe e meccanismo d'azione	Principio attivo	Uso principale
<b>Sulfamidici</b> Bloccano la sintesi dell'acido folico, precursore degli acidi nucleici 	Sulfanilamide	Umano
	Sulfadimetossina	Veterinario
	Sulfadimidina (Sulfametazina)	Veterinario
	Sulfametossazolo	Umano
	Sulfapiridina	Veterinario
	Sulfatiazole	Umano
<b>Diaminopirimidine</b> Inibiscono la sintesi delle Purine e Pirimidine 	Trimetoprim	Umano
<b>Tetracicline</b> Bloccano la sintesi proteica 	Clortetraciclina	Veterinario
	Doxycycline	Umano, Veterinario
	Oxytetraciclina	Umano, , Veterinario, pesticida
	Tetraciclina	Umano, Veterinario
<b>Glicopeptidi</b> Inibiscono la sintesi del peptidoglicano costituente fondamentale della parete batterica 	Vancomicina, Teicoplanina	Umano
	Polimixine (Polimixina Polimixina E)	A, Umano, veterinario
<b>Rifamicine</b> Bloccano la sintesi degli acidi nucleici 	Rifampimicina	Umano, veterinario

segue

segue

Classe e meccanismo d'azione	Principio attivo	Uso principale
<b>Nitrofurani</b> <i>inibizione della sintesi degli acidi nucleici</i>	nitrofurantoina nifurtoinolo, nifurfolina, nifuratel, furazolidone, nifuroxazide, nifurzide	Umano, veterinario

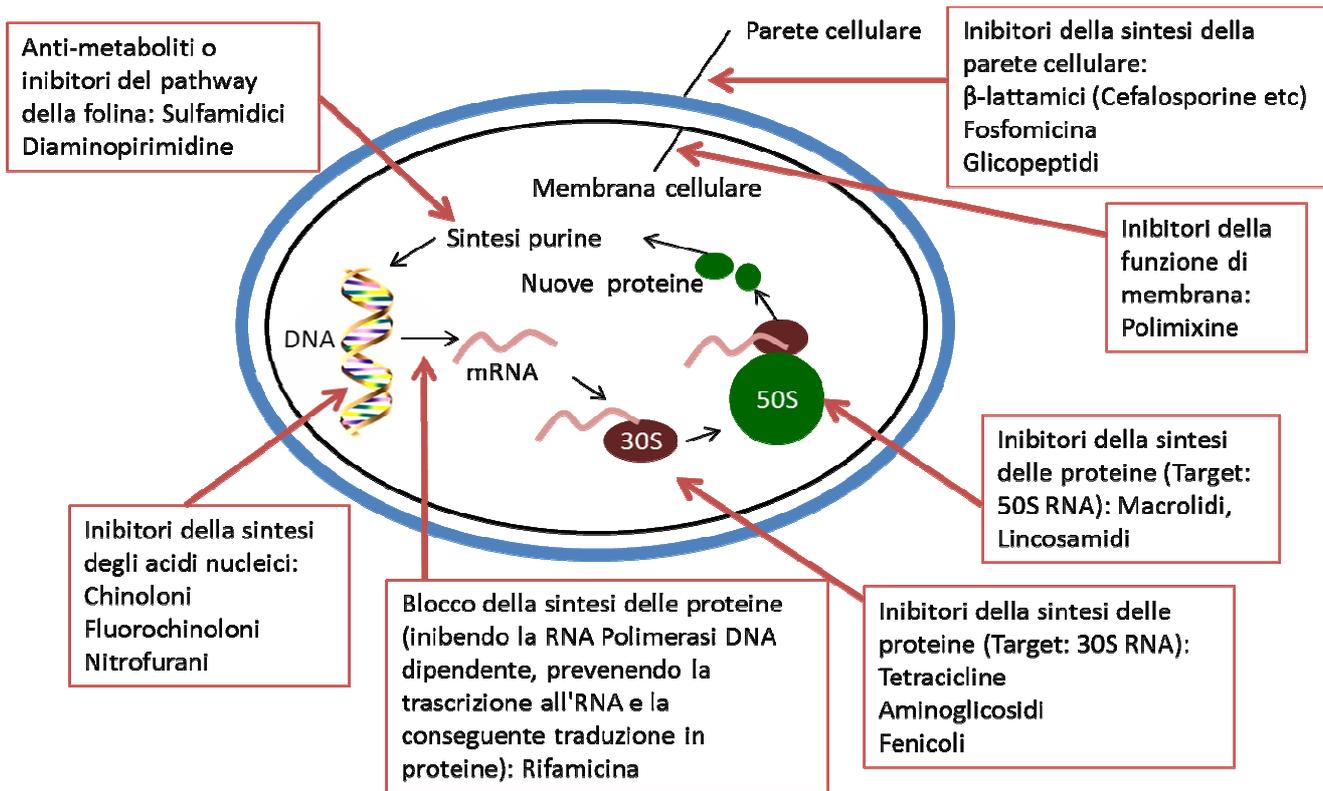
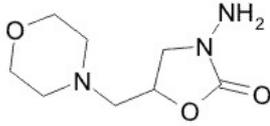


Fig. 1 - Principali meccanismi di azione degli antibiotici.

Gli impianti di trattamento vengono perciò considerati la principale fonte di diffusione degli antibiotici umani nell'ambiente, e per questo motivo molti studi sono focalizzati sulla messa a punto di soluzioni tecnologiche innovative per la loro rimozione negli impianti stessi (ossidazioni addizionali, coagulazione, microfiltrazioni su membrane o carboni attivi, trattamenti ionici o sistemi micelle-argilla). Questi trattamenti addizionali innalzano chiaramente i costi di gestione degli impianti e, per questo motivo, sono attualmente poco utilizzati (Doerr-MacEwen & Haight, 2006).

L'applicazione al suolo di fanghi di depurazione domestica, di acque provenienti da impianti di trattamento e di residui delle deiezioni animali provenienti da allevamenti intensivi, volta ad apportare composti azotati e sostanza organica utile per la sua fertilizzazione, può contribuire alla diffusione di questi contaminanti nel suolo. Dal suolo superficiale, a seconda delle caratteristiche della molecola e del suolo ricevente, possono passare agli strati più profondi e, attraverso processi di lisciviazione, raggiungere anche le acque sotterranee (Daz-Cruz et al., 2003; Kwon, 2011; Dollivera & Gupta, 2008).

Le maggiori concentrazioni di antibiotici si ritrovano solitamente nelle acque reflue, nei terreni trattati con letame o liquame e nei suoli utilizzati per l'allevamento di bestiame. Concentrazioni elevate sono presenti in zone caratterizzate da forti pressioni antropiche, mentre gli ambienti naturali hanno normalmente basse concentrazioni. La presenza di concentrazioni residuali di antibiotici nell'ambiente a livelli di tracce ( $<1 \mu\text{g/L}$ ) e subtracce ( $<1 \text{ ng/L}$ ) è dovuta non solo alla continua immissione nell'ambiente, ma anche all'elevata persistenza di alcune molecole (ad esempio, la tilosina in un suolo franco-argilloso ha mostrato una  $\text{DT}_{50}$  di 95 giorni) (Blackwell et al., 2005).

Le difficoltà a livello analitico legate alla varietà dei formulati, alla presenza simultanea di più classi di composti nelle diverse matrici ambientali (suolo, acqua, sedimento, biota) e alle basse concentrazioni rilevate ( $<1 \mu\text{g/L}$ ) si riflettono sulla scarsità di dati ambientali disponibili. La maggior parte dei lavori pubblicati riguarda infatti la determinazione di questi contaminanti nelle acque di scarico di impianti di depurazione (Batt et al., 2006). In Italia, pochi sono gli studi sistematici riguardanti la presenza di antibiotici in corpi idrici del nostro Paese (Calamari et al., 2003). In Tab. 2 sono riportate le concentrazioni di questi farmaci riscontrate nel fiume Po e in un suo affluente (Lambro) fortemente antropizzato.

Tab. 2 - Concentrazione di antibiotici riscontrati in due fiumi italiani (da Calamari et al., 2003)

Principio Attivo	Categoria	Concentrazione (ng/L)	
		Po	Lambro
tilosina	macrolidi	0,30	2,77
oleandomicina	lincosamidi	0,09	2,79
eritromicina	macrolidi	4,74	4,50
claritromicina	macrolidi	4,21	8,31
ossitetraciclina	tetracicline	7,96	14,35
ciprofloxacina	fluoroquinolonici	26,15	14,36
lincomicina	lincosamidi	79,65	24,40
spiramicina	macrolidi	26,80	74,20
tilmicosina	macrolide	0,43	nd

Negli USA l'Agenzia per la protezione dell'ambiente (USEPA) ha compilato nel 2010 una nuova lista di sostanze prioritarie per l'acqua potabile su cui avviare studi finalizzati alla definizione di nuovi Standard di Qualità Ambientali. La lista ("Current Contaminant Candidate List") include per la prima volta anche i farmaci, e, fra questi, sostanze antibiotiche (es. Eritromicina, Quinolone).

La mancanza di protocolli analitici armonizzati a livello europeo per la loro analisi nelle matrici ambientali rende difficoltosa l'interpretazione e la comparazione dei risultati raccolti da parte degli organismi di controllo e la loro traduzione in normative finalizzate alla regolamentazione di questi contaminanti. Si avverte la necessità di definire protocolli analitici che uniscano caratteristiche di sensibilità e accuratezza adeguate a doti di robustezza analitica e speditezza operativa. Inoltre, una migliore armonizzazione tra tecniche chimico-fisiche di analisi, tecniche di biomonitoraggio (biosaggi) e tecniche di monitoraggio ecologico ("community survey") risultano necessari per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti. A causa della loro introduzione nell'ambiente in modo continuo e costante, la presenza di antibiotici può non essere necessariamente correlata ad una persistenza intrinseca (si parla di pseudo-persistenza); in ogni caso gli organismi acquatici o del suolo sono esposti a un contatto cronico che si prolunga per tutto il loro ciclo vitale. Inoltre, essendo sostanze attive a bassissime concentrazioni, possono avere comunque un effetto tossico, sia il principio attivo che gli additivi utilizzati nella formulazione dell'antibiotico per prevenire l'antibiotico-resistenza. La presenza simultanea di diversi formulati antibiotici insieme ad altri farmaci e ad altre sostanze xenobiotiche può determinare un effetto sinergico (l'effetto sinergico di diversi farmaci è ben noto in farmacologia). L'European Medicines Agency ha prodotto una Linea guida per il rischio ambientale dei farmaci ad uso umano (EMA, 2006) secondo la quale il potenziale rischio viene stimato utilizzando un approccio a livelli successivi. Se nella fase I della valutazione la concentrazione prevista in acqua superficiale di un farmaco o dei suoi principali metaboliti è  $>10 \text{ ng/L}$  o se il  $\log k_{ow} >4,5$ , allora si rende necessaria una fase II di previsione quantitativa del rischio legato al destino ambientale e agli effetti del farmaco (Christen et al., 2010). Sebbene, dunque, l'EMA suggerisca un limite di concentrazione per i farmaci nelle acque superficiali di  $10 \text{ ng/L}$ , al di sotto del quale non è necessario effettuare ulteriori test per la tossicità dei farmaci, ci si domanda se questo limite sia sufficientemente cautelativo anche per gli antibiotici, dato che l'effetto di antibiotico-resistenza può esplicarsi anche a basse concentrazioni ( $<1 \text{ ng/L}$ ), limite che viene spesso superato negli scenari reali di contaminazione.

## ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Per resistenza batterica si indica la capacità di un microrganismo di sopravvivere e di moltiplicarsi, nonostante l'antibiotico venga somministrato in quantità e concentrazione tale da eliminare, solitamente,

microrganismi del suo stesso ceppo o affini (Martinez, 2009). La resistenza antibiotica è un adattamento naturale dei microrganismi nei confronti dei prodotti che cercano di inibire la loro crescita. La storia ci mostra interessanti esempi: già nei pochi anni successivi all'introduzione nel mercato degli antibiotici a base di penicillina (anni Quaranta), erano stati segnalati i primi ceppi di batteri resistenti a questo principio attivo come lo *Stafilococcus aureus*. Questo batterio è stato studiato poiché capace di secernere una sostanza (che prima venne chiamata "penicillinasi" e poi "beta-lattamasi") in grado di bloccare la penicillina. Da allora una percentuale crescente di *Stafilococcus aureus* è divenuto resistente non solo alla penicillina, ma anche all'ampicillina e ad altre penicilline. Oggi più del 95% dei ceppi di *S. aureus* sono resistenti alla penicillina. Nel corso del tempo questo fenomeno divenne ancora più interessante: negli anni Settanta l'industria farmaceutica mise in campo le penicilline semisintetiche, come la meticillina e già nei primi anni Ottanta si segnalavano in Inghilterra, Polonia e Danimarca e, successivamente, negli Stati Uniti ceppi di *S. aureus* resistenti anche alla meticillina. La sigla scientifica di questi nuovi ceppi resistenti è MRSA (Meticillino Resistenti *Stafilococcus Aureus*). Tipicamente gli antibiotici si ritrovano nell'ambiente a concentrazioni sub-terapeutiche, che infatti promuovono la resistenza batterica (Kummerer, 2003). Lo sviluppo di fenomeni di resistenza è da attribuire in parte all'impiego non sempre oculato di questi farmaci, pratica ricorrente sia in medicina umana che veterinaria. La selezione di popolazioni resistenti, in grado di riprodursi e di rafforzare ulteriormente tale resistenza, è molto preoccupante soprattutto per la facilità con cui la resistenza viene trasmessa, e conseguentemente diffusa, da un ceppo batterico ad un altro, talvolta anche distanti filogeneticamente. In generale i batteri sviluppano la resistenza più velocemente verso gli antibiotici naturali, in quanto potrebbero essere già stati pre-esposti a tali molecole in natura.

I geni di resistenza agli antibiotici possono essere originati sia in seguito a forte pressione selettiva antibiotica durante il trattamento di infezioni (Martinez e Baquero, 2000; Martinez et al., 2007), sia attraverso l'Horizontal Gene Transfer (HGT) da batteri ambientali (Davies, 1997). Infatti, i geni di resistenza agli antibiotici naturalmente presenti nei cromosomi dei batteri ambientali (D'Acosta et al., 2006; Wright, 2007; Fajardo et al., 2008) possono essere trasferiti a batteri patogeni attraverso i plasmidi. I determinanti della resistenza, presenti nelle unità di trasferimento dei geni, sono elementi auto-replicativi che possono essere mantenuti in popolazioni microbiche, a meno che essi non implicino un costo di mantenimento per i batteri riceventi.

Un fattore chiave per capire meglio la resistenza sarà appunto lo studio dei geni di resistenza agli antibiotici presenti negli elementi di trasferimento genico (come ad esempio i plasmidi), il cui sviluppo è favorito dal rilascio di antibiotici negli ecosistemi naturali (Cerrone et al., 2008). Per facilitare l'identificazione e la caratterizzazione di questi geni è stato creato un database (The Antibiotic Resistance Genes Database, ARDB, <http://ardb.cbc.umd.edu>) per unificare le informazioni disponibili sulla resistenza agli antibiotici (Liu & Pop, 2009).

Per contrastare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza sull'organismo umano, intensificato dal massiccio utilizzo di antibiotici in medicina veterinaria, l'Unione Europea ha bandito dal 2006 con il Regolamento 1831/2003/CE l'utilizzo degli antibiotici come promotori della crescita (Kemper, 2008; Commissione Europea, 2003) in quanto la somministrazione, avvenendo a basso dosaggio (concentrazione minima inibente, CMI) per modulare il metabolismo della flora batterica commensale del tubo digerente, può favorire la diffusione del fenomeno. Analogamente, molti Paesi hanno limitato l'uso di antibiotici in acquacoltura, soprattutto di quegli antibiotici utilizzati anche nella terapia delle infezioni umane. In altri Paesi come l'America, il Canada e l'Asia, sono invece ancora largamente usati anche come promotori della crescita. Sebbene l'utilizzo di antibiotici negli allevamenti sarebbe dovuto diminuire come conseguenza dell'attuazione dei Regolamenti adottati, l'abrogazione in Europa dell'uso degli antibiotici come promotori della crescita ha avuto come conseguenza l'aumento di utilizzo di antibiotici a fini terapeutici negli animali (Singer et al., 2003).

Questa situazione desta preoccupazione perché se è vero che alcuni autori hanno dimostrato che la riduzione del carico di antibiotici negli ecosistemi naturali può diminuire anche la quantità di geni di resistenza (Gonzalo et al., 1989) e la facilità di trasferimento all'organismo umano (Aarestrup et al., 2001), altri hanno invece evidenziato che seppure la resistenza diminuisce, questo declino è lento e parte della popolazione resistente rimane (Andersson, 2003). Inoltre, la presenza degli stessi geni di resistenza, attualmente riscontrati in agenti patogeni umani, è stata segnalata anche in ambienti non caratterizzati da una pregressa contaminazione da antibiotici (Pallecchi et al., 2008), indicando che i geni di resistenza agli antibiotici possono persistere anche in assenza di pressione selettiva antibiotica (Salyers & Amabile-Cuevas, 1997). Infatti, diversi meccanismi permettono il mantenimento e la diffusione dei geni di resistenza.

## MECCANISMI DI RESISTENZA

I microorganismi hanno diverse possibilità per evitare l'azione degli antibiotici che si possono così schematizzare:

- produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici (idrolisi da parte di  $\beta$ -lattamasi);
- alterazione della permeabilità della parete cellulare batterica (mutazioni nelle porine) che impediscono l'ingresso dell'antibiotico;
- alterazioni nel sito bersaglio dell'antibiotico all'interno della cellula batterica;
- sistemi di trasporto attivo come le pompe di efflusso nella parete cellulare, che impediscono l'accumulo di antibiotico all'interno della cellula;
- vie metaboliche alternative.

Tutti questi meccanismi possono essere intrinseci (ad esempio i Gram- non sono sensibili ai glicopeptidi perché la loro membrana esterna è ad essi naturalmente impermeabile, mentre i Gram+ per simili motivi non sono inibiti dalle polimixine o dall'acido nalidixico), o acquisiti attraverso la trasmissione genica della resistenza. Quest'ultima avviene mediante il passaggio di materiale genetico da un batterio all'altro principalmente attraverso i plasmidi, piccole molecole di DNA ad anello che non hanno alcuna connessione con il DNA della cellula, i quali introdotti in una cellula ospite possono restarvi sia allo stato integrato sia libero nel citoplasma. I plasmidi codificano per funzioni non indispensabili alla sopravvivenza della cellula batterica, ma garantiscono notevoli vantaggi in particolari condizioni di crescita o sviluppo e il caso dei plasmidi R, i plasmidi responsabili della resistenza antibiotica, ne è un valido esempio. Alcuni plasmidi, denominati plasmidi coniugativi, possiedono un set di geni che sono in grado di promuovere il loro trasferimento in cellule diverse (trasmissione orizzontale) attraverso un ponte citoplasmatico. Molti plasmidi accumulano una forma di resistenza multipla che vanifica l'effetto di numerosi antibiotici, rendendo inefficace la terapia antibatterica.

Proprio grazie a questa scoperta e ai successivi studi, venne introdotto il concetto di fattore di trasferimento per la resistenza, il Resistance Transfer Factor (RTF). È oggi noto come l'RTF sia strettamente collegato alle funzioni di replicazione e trasferimento di plasmidi ed in particolare come i geni che codificano per questo fattore siano posti sugli elementi mobili, quali i trasposoni, semplici o composti, e gli integroni. Grazie alla mappatura dei plasmidi e all'utilizzo della microscopia elettronica si è potuto avere un'idea delle possibilità di riarrangiamenti del DNA, ma solo dopo l'avvento del sequenziamento dello stesso DNA, alla fine del 1970, si è potuta comprendere la varietà e la

complessità dei meccanismi genetici legati al trasferimento della resistenza e della diffusione dei geni di resistenza (Roy, 2009).

## I GENI DI RESISTENZA ANTIBIOTICA COME CONTAMINANTI

L'acquisizione di resistenza agli antibiotici può produrre cambiamenti specifici nel metabolismo batterico che possono rivelarsi utili per la crescita batterica in alcuni habitat (Sanchez et al., 2002b; Alonso et al., 2004; Linares et al., 2005). I geni di resistenza agli antibiotici hanno una grande diffusione, a causa della loro origine da batteri ambientali (Davies, 1994; Alonso et al., 2001). Tuttavia, la presenza significativa di tali geni in agenti patogeni per l'uomo in zone caratterizzate da scarsa contaminazione da antibiotici (Pallecchi et al., 2008) indica che, una volta che tali elementi sono presenti nelle zone di trasferimento genico, la probabilità del loro mantenimento negli ecosistemi naturali può essere alta. Per questo motivo, i geni di resistenza agli antibiotici possono essere considerati loro stessi contaminanti. Poiché i geni di resistenza agli antibiotici si trovano naturalmente nei cromosomi dei batteri ambientali (D'Acosta et al., 2006; Wright, 2007; Martinez, 2008), solo quegli elementi che sono presenti negli agenti di trasferimento genetico e quindi possono essere trasferiti e incrementati in presenza di pressione antibiotica, dovrebbero essere considerati come contaminanti.

Il ritrovamento di specifici geni di resistenza nei batteri patogeni umani, animali o delle piante (o commensali) è un'indicazione di una contaminazione pregressa. A differenza della contaminazione da antibiotici, la contaminazione da geni di resistenza non è necessariamente locale, né dovuta ad un rilascio costante di antibiotici, perché una volta che questi geni sono nell'ambiente, possono, come già evidenziato, diffondere tra specie batteriche diverse e habitat diversi. È stato dimostrato che i geni di resistenza possono migrare tra sistemi acquatici collegati. Non è chiaro, tuttavia, se la presenza di tali geni è il risultato della migrazione di batteri resistenti oppure tali geni siano stati trasmessi mediante HGT (Koike et al., 2007). La contaminazione da geni di resistenza agli antibiotici può aumentare le probabilità che agenti patogeni per l'uomo possano acquisire resistenza. Per questo motivo, è stato suggerito di trattare separatamente gli scarichi di ospedali, che contengono batteri commensali umani, batteri infettivi (resistenti e suscettibili) ed antibiotici, per evitare lo scambio di materiale genetico negli impianti di depurazione, (Pauwels e Verstraete, 2006).

## EFFETTI DEGLI ANTIBIOTICI SULL'ECOSISTEMA

Il forte aumento delle concentrazioni antibiotiche negli ecosistemi naturali, come conseguenza delle attività umane (terapia umana e veterinaria, agricoltura), provoca non solo la selezione di microrganismi resistenti agli antibiotici, ma altera la struttura delle comunità microbiche naturali e la fisiologia dei microrganismi (Ding & He, 2010). Gli antibiotici sono, infatti, sostanze esplicitamente designate per avere un effetto sui microrganismi. Tali sostanze possono avere un effetto (diretto o indiretto) anche su microrganismi non-target che hanno funzioni ecologiche importanti come, ad esempio, quelli, dei fanghi degli impianti di depurazione (Ding & He, 2010) o microrganismi degli ecosistemi riceventi (acqua o suolo), (Kotzerke et al., 2008). Una volta raggiunti i diversi ecosistemi, i residui antibiotici si possono considerare un fattore ecologico che guida i cambiamenti della struttura delle comunità batteriche autoctone (Aminov & Mackie, 2007), influenzandone la crescita, le attività enzimatiche e la diversità della comunità batterica e in ultima analisi le funzioni ecologiche come la produzione di biomassa, la trasformazione delle sostanze nutrienti (Thiele-Bruhn & Beck 2005; Kotzerke et al., 2008) e la trasformazione e degradazione di sostanze xenobiotiche (Accinelli et al., 2006). La biodiversità microbica ha, infatti, un'importanza funzionale nel mantenimento dei processi biologici nell'acqua e nel suolo, perché la maggior parte delle trasformazioni nei cicli biogeochimici sono mediate esclusivamente dai microrganismi. Le variazioni nella struttura microbica delle comunità, collegata con una riduzione della biodiversità, conducono a perdite di stabilità funzionale. Analogamente, è stato affermato che alcuni elementi che servono per resistere a concentrazioni elevate di antibiotici, hanno diversi ruoli funzionali (es. l'omeostasi cellulare, enzimi metabolici) nel loro ospite originale (Martinez et al., 2007; Martinez et al., 2009). I test di ecotossicità che vengono effettuati per testare la tossicità di queste molecole vengono solitamente effettuati con concentrazioni molto elevate e per brevi periodi di tempo. Nella condizione reale di contaminazione, invece, bisogna considerare che gli organismi vengono esposti in modo continuo (per lungo periodo) agli antibiotici ed inoltre a livelli sub-terapeutici (Lindberg et al., 2007). Poiché concentrazioni di antibiotici sub-inibitorie attivano specifiche risposte nei batteri (Martinez, 2012), la presenza di antibiotici necessariamente modificherà l'attività metabolica delle comunità microbiche presenti in questi ambienti contaminati. Inoltre, l'impatto sulla struttura delle popolazioni batteriche dovuta alla presenza di antibiotici potrebbe rimanere

anche quando essi siano stati completamente mineralizzati. Il suolo, in particolare, può ricevere una porzione rilevante di antibiotici escreti attraverso l'applicazione di letame e fanghi di depurazione come fertilizzanti (Thiele-Bruhn, 2003) con evidenti riflessi sulla comunità microbica autoctona.

## EFFETTI DIRETTI

La struttura della comunità microbica può cambiare con l'esposizione agli antibiotici. Il motivo intrinseco è che gli antibiotici, anche quelli ad ampio spettro, hanno effetti selettivi su diversi gruppi microbici. Il gruppo potrebbe essere ampio come i funghi o i batteri oppure più stretto come un unico genere o una singola specie. Come risultato finale vi è l'effetto selettivo che altera l'abbondanza relativa di specie microbiche, e l'interferenza sulle interazioni tra le diverse specie.

Gli effetti diretti sulle comunità microbiche del suolo sono attualmente oggetto di studio (Stone et al., 2011), con un'attenzione particolare alle funzioni ecosistemiche che alcuni gruppi microbici svolgono, tra i quali il ciclo dei nutrienti, la degradazione della sostanza organica e la degradazione di sostanze xenobiotiche, come ad esempio i pesticidi nel suolo (Accinelli et al., 2006).

Sono stati evidenziati effetti degli antibiotici sulle funzioni ecologiche, come il ciclo dell'azoto, la metanogenesi, e la solfato riduzione (Ding & He, 2010). È noto, infatti, che la nitrificazione e denitrificazione viene effettuata da parte di diversi procari ed in particolare la nitrificazione da parte di batteri ed *Archaea* ammonio-ossidanti (AOB e AOA). (Schauss et al., 2009). È stato dimostrato che l'applicazione di concime organico di derivazione suina ("swine manure") contenente antibiotici (tilosina) cambia in modo fondamentale il comportamento dell'azoto mediato dalle comunità microbiche all'interno del suolo stesso. È stato dimostrato inoltre che i sulfamidici inducono un cambiamento nella comunità microbica diminuendo non solo la biomassa microbica, ma soprattutto il rapporto tra batteri e funghi (Demoling et al., 2009). Gli effetti sulla popolazione microbica dipendono, comunque, dalle caratteristiche del suolo (Čermák et al., 2008), dei gruppi microbici (Hammesfahr et al., 2008), e dalla dose di antibiotico presente (Zielezny et al., 2006). In Tab. 3 sono indicati i principali studi riguardanti gli effetti degli antibiotici sulle comunità microbiche.

Tab. 3 - Effetto degli antibiotici sulle comunità microbiche di ambienti naturali (da Ding &amp; He, 2010)

Antibiotico	Conc. (mg/kg)	Parametro testato	Effetto <sup>a</sup>	Condizioni	Tempo (g)	Metodo	Rif.
Amoxicillina	10-100	Trasferibilità della resistenza	Aumento	Suolo trattato con letame	18	Conta CFU, Isolamento di plasmidi esogeni, DGGE	Binh et al., 2007
		Profilo batterico mediante DGGE	Alterato				
Ciprofloxacina	0,43-5 (mg/L)	Resistenza alla colonizzazione di <i>Salmonella kedougou</i>	Diminuzione, maggiormente a 0,43 mg/L	Chemostato inoculato con <i>Salmonella</i>	41	Conta CFU	Carman et al., 2004
	0,2-2 (mg/L)	Tasso mineralizzazione del pirene	Diminuito notevolmente	Sedimenti marini	77	Misura della CO <sub>2</sub> prodotta	Naslund et al., 2008
		Comunità microbica	Alterata notevolmente		49	T-RFLP	
	0,2-200 (mg/L)	Biomassa, PLFA, markers della solfato-riduzione e batteri Gram-negativi	Aumento con le concentrazioni	Sedimenti di palude salata	30	PLFA	Còrdova-Kreylos & Skow, 2007
Indicatori dello stress nutritivo			Diminuiti				
Lincomicina	0,5-500	Profili T-RFLP	Alterati notevolmente	Suoli con alto e basso pH	>10	Conta CFU, T-RFLP	Čermák et al., 2008
		Profili T-RFLP (geni omologhi di resistenza alla lincomicina)	Alterati notevolmente				
		% attinomiceti	Diminuita notevolmente				
		% di produttori di antibiotici tra gli attinomiceti	Diminuita notevolmente	Suolo con alto pH	7		
Natamicina	50-200 (mg/L)	Struttura della comunità batterica (analisi dello spazio intragenico ribosomiale)	Alterata notevolmente	Sospensioni di suolo e rizosfera in agar	7	Conta cell coltivabili/fingerprintin g comunità batterica	Mohamed et al., 2005
		Rapporto funghi/batteri CFUs	Diminuito notevolmente				
Acido Ossolinico	9 g/kg <sup>b</sup>	Comunità microbica	Un ceppo isolato	Acqua sedimentazione e	Non indicato	Isolamento batteri e test di sensibilità	Tendencia & De LaPena, 2001
		% di isolati resistenti agli antibiotici	Elevata				

segue

<sup>a</sup> Comparato con trattamento senza antibiotico, se non indicato diversamente

<sup>b</sup> Mangime somministrato 1 volta/settimana in gamberetti di stagno

CFU = Unità Formanti Colonia; DGGE = Elettroforesi su Gel in Gradiente Denaturante; T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism); PLFA = Analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi.

segue

Antibiotico	Conc. (mg/kg)	Parametro testato	Effetto <sup>a</sup>	Condizioni	Tempo (g)	Metodo	Rif.	
Ossi tetraciclina	10	CFU di Batteri e <i>Actinomyces</i>	Diminuisce rispettivamente del 22,2%-31,7%	suolo rizosfera grano	5-30	Conta CFU in piastre, saggio di attività enzimatica	Yang et al., 2009	
		Attività fosfatasi alcalina	Diminuzione del 41,3%					
	>20 µg/L	Tasso di selezione di geni resistenti	Aumento	Mesocosmi contenenti acqua superficiale incontaminata	56	qPCR	Knapp et al., 2008	
	250 µg/L	Rapporto tra geni totali e resistenti alle tetracicline	Aumento					
		0,81-0,93	Respirazione indotta da substrato	Diminuzione del 10%	Suolo superficiale incontaminato trattato con paglia di mais o glucosio	1-2 ore	Saggio di attività	Thiele-Bruhn & Beck, 2005
		5,5-7,35	Attività di riduzione Fe(III)	Diminuzione del 10%		7	SIR/Fe (III) riduzione	
100-1000		Rapporto funghi/batteri	Aumento significativo	14		Carbonio microbico estratto con fumigazione e concentrazione di ergosterolo		
Strepto micina	400 mg/L	Ossidazione ammonio	Inibizione del 75%	Fanghi attivi	2-4 ore	Attività nitrificante calcolata dalla produzione di nitriti e nitrati	Tomlinson et al., 1966	
Sulfacloro piridazina	115	PICT	Aumento significativo	Suolo trattato con liquame suino fresco	7	PICT	Schmitt et al., 2005	
	100	PICT		Suolo trattato con farina alfalfa				
Sulfodiazina	1	PICT	Aumento di un fattore 2-5	Suolo hotspot	5-15 settimane	PICT	Brandt et al., 2009	
	10-100		Aumento di un fattore 1,5-3,5	Suolo				
	10-100	Rapporto AOA/AOB	Aumento significativo	Suolo trattato con letame suino	61	qPCR per i geni ammonio-ossidanti AOA/AOB	Schauss et al., 2009	
	10-100	Rapporto funghi/batteri con PLFA	Aumento in alcuni casi	Suolo trattato con letame suino	61	PLFA	Hammesfahr et al., 2008	
Profili DGGE <i>Bacteria</i> $\beta$ - <i>proteobacteria</i> <i>Pseudomonas</i>		Cambiate rispettivamente bande 8/3/5	32		DGGE			

segue

<sup>a</sup> Comparato con trattamento senza antibiotico, se non indicato diversamente

CFU = Unità Formanti Colonia; qPCR = Real Time Polymerase Chain Reaction; SIR = Substrate Induced Respiration; PICT = Pollution-Induced Community Tolerance; AOA = Archaea ammonio-ossidanti; AOB = Batteri ammonio ossidanti; PLFA = Analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi; DGGE = Elettroforesi su Gel in Gradiente Denaturante.

segue

Antibiotico	Conc. (mg/kg)	Parametro testato	Effetto <sup>a</sup>	Condizioni	Tempo (g)	Metodo	Rif.
Sulfodiazina	10-100	Conta di batteri resistenti alla sulfadiazina	Aumento significativo	Suolo limo-argilloso e limo-argilloso miscelato a letame contenente sulfadiazina	32-61	Conta batteri coltivabili (MPN)	Heuer & Smalla, 2007
		Frequenza di geni di resistenza alla sulfadiazina	Aumento significativo			qPCR	
	10	Attività ammonio-ossidativa	Diminuzione	Suolo trattato con letame	32	Saggio attività microbica	Kotzerke et al., 2008
		Respirazione basale del suolo	Diminuzione				
		Attività ammonio-ossidativa	Diminuzione				
	100	Denitrificazione	Leggera Diminuzione				
		1-50	Profilo batterico con DGGE	Variazione dell'intensità delle bande	Suolo trattato con glucosio	48	DGGE
		Diversità (Indici Shannon-Wiener)	Prima diminuita, poi recuperata dopo 48 g	Saggio di respirazione del suolo			
		Respirazione basale suolo	Diminuzione significativa				
		>0,15	Frequenza dei geni di resistenza alla sulfadiazina ( <i>sul2</i> )	Influenza significativa	Suolo trattato con letame contenente sulfadiazina	175	qPCR
	1-100	Rapporto di copie geniche <i>sul2</i> /16S rRNA	Aumento di 1-2 unità log	Suolo trattato con letame	61	qPCR	Heuer et al., 2009
Sulfa metoxazolo	20-500	PICT	Aumentodi un fattore 2	Suolo trattato con letame da maiali trattati con alfalfa o antibiotici	1-5 settimane	PLFA/PICT	Demoling et al., 2009
		Proporzione funghi/batteri PLFA	Aumento				
	500	PICT	Aumento di un fattore 2	Suolo non trattato			
Sulfapiridina	0,05-1,17	Respirazione indotta con substrati	Diminuita del 10%	Suolo superficiale incontaminato trattato con paglia di mais o glucosio	1-2 ore	SIR/Fe (III) riduzione	Thiel-Bruhn & Beck, 2005
	0,003-1,14	Attività di riduzione Fe(III)	Diminuita del 10%		7		
	100-1000	Rapporto funghi/batteri	Aumento significativo		14	Carbonio microbico estratto con fumigazione e concentrazione di ergosterolo	

segue

<sup>a</sup> Comparato con trattamento senza antibiotico, se non indicato diversamente

MPN = Most Probable Number; qPCR = Real Time Polymerase Chain Reaction; DGGE = Elettroforesi su Gel in Gradiente Denaturante; PICT = Pollution-Induced Community Tolerance; PLFA = Analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi; SIR = Substrate Induced Respiration.

segue

Antibiotico	Conc. (mg/kg)	Parametro testato	Effetto <sup>a</sup>	Condizioni	Tempo (g)	Metodo	Rif.
Tetracicline	5-500	Rapporto G+/G- PLFA	Diminuzione	Suolo con o senza letame suino (ricco in geni aventi resistenza alle tetracicline)	8 settimane	PLFA, qPCR	Hund-Rinke et al., 2004
		Rapporto funghi/batteri PLFA	Aumento				
Tetracicline	0,003-0,1	Batteri resistenti alle tetracicline	Aumento di CFU dopo trattamento con letame suino ma poi diminuito ai valori di controllo	Suolo trattato con letame suino contenente tetracicline	8 mesi	Conta CFU	Sengeløv et al., 2003
Tilosina	2000	Diversità della comunità microbica (numero di bande nei profili DGGE)	Diminuita ai gg 15 e 22, ma ritorno ai valori di controllo dopo 33 gg	Suolo sabbioso	2 mesi	Morfologia colonie, DGGE, utilizzo unica fonte di C	Westergaard et al., 2001
		Struttura comunità microbica (bande DGGE)	Alterata				
		% di CFU resistenti alla tilosina	Aumento da <1% a >30%				
	2000	Respirazione indotta con substrato	Aumento	Suolo trattato con substrati	60	Morfologia delle colonie, DGGE, utilizzo unica fonte di C	Müller et al., 2002
	50-1500	PICT	Aumento iniziale, poi diminuita dopo 25 gg, e ritorno ai valori di controllo dopo 95 gg	Suolo con o senza alfalfa	95	PICT	Demoling & Bååth, 2008
>50	Tasso di crescita batterica	Diminuita, con IC <sub>50</sub> di 960 mg/kg	2				
sulfametazina + tilosina + clorotetraciclina	10	Isolamento batteri antibiotico-degradatori	Isolamento batterio degradante la sulfametazina ( <i>Microbacterium sp.</i> )	Suolo trattato a lungo termine	10 anni	Isolamento batteri	Topp et al., 2012
	10	Degradabilità degli antibiotici (DT <sub>50</sub> )	Aumentata per sulfametazina e per tilosina	Suolo trattato a lungo termine	10 anni		

<sup>a</sup> Comparato con trattamento senza antibiotico, se non indicato diversamente

PLFA = Analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi; qPCR = Real Time Polymerase Chain Reaction; CFU = Unità Formanti Colonia; DGGE = Elettroforesi su Gel in Gradiente Denaturante.

## EFFETTI INDIRETTI

Le basse concentrazioni ambientali dei farmaci come gli antibiotici (ng/L) sono tali da stimolare una risposta omeostatica da parte delle popolazioni naturali, attraverso lo sviluppo di meccanismi di resistenza (Allen et al., 2010; Birnbaum & Fenton, 2003) e possono avere anche effetti indiretti sia su singoli ceppi batterici che sugli ecosistemi. Quest'ultimo aspetto, a tutt'oggi, risulta ancora poco conosciuto e studiato. Inoltre, gli effetti a lungo termine sui tassi e sulla stabilità della funzione ecosistemica potrebbero essere significativi (Perry et al., 1989). In ogni caso gli effetti sono correlati alla concentrazione di antibiotico presente, alla sua biodisponibilità, al tempo di esposizione (Ding & He, 2010) e al tipo di matrice (suolo o acqua) nel quale agiscono. All'interno di una stessa matrice diversi fattori, quali solubilità in acqua, tessitura del suolo, capacità di adsorbimento, pH, contenuto d'acqua, temperatura, tempi di applicazione, ma anche processi naturali come congelamento, scongelamento, essiccamento e riuniformazione possono influenzare il sequestro, la trasformazione e il rilascio delle sostanze antibiotiche in quanto alterano le proprietà chimico-fisiche della matrice. Pertanto la biodisponibilità di un antibiotico può dipendere anche da condizioni climatiche (Schauss et al., 2009).

Un aspetto interessante, che è stato messo in luce, è la possibilità di considerare gli antibiotici come molecole di segnale tra cellule, che possono regolare l'espressione genica delle popolazioni microbiche e possibilmente l'interazione di queste popolazioni con gli organismi presenti nel loro ambiente limitrofo (Yim et al., 2007; Cowen & Steinbach, 2008).

## CONCLUSIONI

Il rilascio di elevate concentrazioni di antibiotici e geni di resistenza in ecosistemi naturali è un evento recente in termini evolutivi. Entrambi i tipi di contaminazione possono influenzare la struttura e l'attività delle popolazioni microbiche ambientali. Dato che i microrganismi ambientali sono la fonte originale di geni di resistenza acquisiti attraverso il trasferimento genico orizzontale da agenti patogeni umani, questi cambiamenti sono importanti per il futuro della salute umana.

La presenza di popolazioni microbiche più o meno efficienti nella rimozione di tali molecole può essere considerata una misura della capacità omeostatica di un ecosistema.

Tuttavia, la presenza di popolazioni specifiche non esclude che ci possano essere degli effetti secondari sulla struttura e funzione delle comunità microbiche, in termini di esclusione di specie chiave, di alterazioni di funzioni, inibizione di attività specifiche, ecc. Anche se i programmi nazionali per controllare la resistenza antimicrobica e per razionalizzare l'uso degli antibiotici negli esseri umani stanno riducendo la quantità di antibiotici utilizzati per la terapia umana, non è pensabile una loro completa eliminazione. È quindi prevedibile che le quantità di antibiotici rilasciate nell'ambiente si mantengano in futuro a livelli piuttosto elevati. Ciò significa che oltre a politiche di controllo nell'uso di antibiotici, sono necessari studi per migliorare la loro degradazione.

Le informazioni disponibili supportano la convinzione che l'utilizzo di antibiotici con fini diversi da quelli terapeutici possa arricchire le comunità microbiche di batteri resistenti in grado di infettare l'uomo. Per quanto riguarda i geni di resistenza, la situazione è più complessa, dato che non sono "contaminanti degradabili", ma sono elementi auto-replicativi. Anche se una riduzione della diffusione della resistenza è stata riportata dopo l'interruzione di terapie con un determinato antibiotico, alcuni lavori indicano che è improbabile il ripristino totale della popolazione alla sua precedente situazione di antibiotico-sensibilità. Per ridurre al minimo l'impatto dei geni di resistenza, dovrebbero essere valutate misure di isolamento che evitino, per quanto possibile, il contatto tra i batteri legati alla sfera umana con quelli ambientali. Acque, fanghi e in generale tutti i residui contaminati con antibiotici dovrebbero essere depurati prima del loro rilascio nell'ecosistema naturale ricevente.

## BIBLIOGRAFIA

AARESTRUP F.M., SEYFARTH A.M., EMBORG H.D., PEDERSEN K., HENDRIKSEN R.S., BAGER F. (2001): "Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 2054-2059.

ACCINELLI C., HASHIM M., EPIFANI R., SCHNEIDER R.J., VICARI A. (2006): "Effects of the antimicrobial agent sulfamethazine on metolachlor persistence and sorption in soil", *Chemosphere*, 63, 1539-1545.

- ALLEN H.K., DONATO J., WANG H.H., CLOUD-HANSEN K.A., DAVIES J., HANDELSMAN J. (2010): "Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments", *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 251-259.
- ALONSO A., MORALES G., ESCALANTE R., CAMPANARIO E., SASTRE L., MARTINEZ J.L. (2004): "Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology", *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, 432-434.
- ALONSO A., SANCHEZ P., MARTINEZ J.L. (2001): "Environmental selection of antibiotic resistance genes", *Environ. Microbiol.* **3**, 1-9.
- AMINOV R.I. & MACKIE R.I. (2007): "Evolution and ecology of antibiotic resistance genes", *FEMS Microbiol. Lett.*, **271**, 147-161.
- ANDERSSON D.I. (2003): "Persistence of antibiotic resistant bacteria", *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 452-456.
- BATT A.L., BRUCE I.B., AGA D.S. (2006): "Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges", *Environ. Pollut.* **142**, (2), 295-302.
- BINH C.T.T., HEUER H., GOMES N.C.M., KOTZERKE A., FULLE M., WILKE B.M., SCHLOTTER M., SMALLA K. (2007): "Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **62**, 290-302.
- BIRNBAUM L.S., FENTON S.E. (2003): "Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors", *Environ. Health Perspect.*, **111**, 389-394.
- BLACKWELL P.A., BOXALL A.B., KAY P., NOBLE H. (2005): "Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines", *J. Agric. Food Chem.*, **53**, (6), 2192-2201.
- BOXALL A.B.A. (2004): "The environmental side effects of medication", *EMBO Rep.*, **5**, (12), 1110-1116.
- BRANDT K.K., SJOHOLM O.R., KROGH K.A., HALLING-SØRENSEN B., NYBROE O. (2009): "Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates", *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 2963-2968.
- CALAMARI D., ZUCCATO E., CASTIGLIONI S., BAGNATI R., FANELLI R. (2003): "Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy", *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1241-1248.
- CARMAN R.J., SIMON M.A., FERNANDEZ H., MILLER M.A., BARTHOLOMEW M.J. (2004): "Ciprofloxacin at low levels disrupts colonization resistance of human fecal microflora growing in chemostats", *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **40**, 319-326.
- ČERMÁK L., KOPECKÝ J., NOVOTNÁ J., OMELKA M., PARKHOMENKO N., PLHÁČKOVÁ K., SÁGOVÁ-MAREČKOVÁ M. (2008): "Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment", *Appl. Soil Ecol.*, **40**, 348-358.
- CHRISTEN V., HICKMANN S., RECHENBERG B., FENT K. (2010): "Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action", *Aquat. Toxicol.*, **96**, 167-181.
- COMMISSIONE EUROPEA (2003): "Regolamento (CE) N. 1831/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:IT:PDF>.
- CÓRDOVA-KREYLOS A.L., SCOW K.M. (2007): "Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities", *ISME J.*, **1**, 585-595.
- COWEN L.E., STEINBACH W.J. (2008): "Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance", *Eukaryot. Cell.*, **7**, 747-764.
- DAVIES J. (1994): "Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes", *Science*, **264**, 375-382.
- DAVIES J.E. (1997): "Origin, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants", *Ciba Found. Symp.*, **207**, 15-35.
- D'ACOSTA V.M., MCGRANN K.M., HUGHES D.W., WRIGHT G.D. (2006): "Sampling the antibiotic resistome", *Science*, **311**, 374-377.
- DAZ-CRUZ M.S., LÓPEZ DE ALDA M.J., BARCELÓ D. (2003): "Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge", *Trend Anal. Chem.*, **22**, (6), 340-351.

- DEMAIN A.L. (2000): "Small bugs, big business: The economic power of the microbe", *Biotechnol. Adv.*, **18**, 499-514.
- DEMOLING L.A., BÅÅTH E. (2008): "No long-term persistence of bacterial pollution-induced community tolerance in tylosin-polluted soil", *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 6917-6921.
- DEMOLING L.A., BÅÅTH E., GREVE G., WOUTERSE M., SCHMITT H. (2009): "Effects of sulfamethoxazole on soil microbial communities after adding substrate", *Soil Biol. Biochem.*, **41**, 840-848.
- DING C. & HE J. (2010): "Effect of antibiotics in the environment on microbial populations", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 925-941.
- DOERR-MACEWEN N. A., HAIGHT M. E. (2006): "Expert stakeholders' views on the management of human pharmaceuticals in the environment", *Environ. Manag.*, **38**, 853-866.
- DOLLIVER H., GUPTA S. (2008): "Antibiotic Losses in Leaching and Surface Runoff from Manure-Amended Agricultural Land", *J. Environ. Qual.*, **37**, (3), 1245-1253.
- EMEA (2006): "Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use", Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. London, European Medicines Agency.
- FAJARDO A., MARTINEZ-MARTIN N., MERCADILLO M., GALAN J.C., GHYSELS B., MATTHIJS S., CORNELIS P., WIEHLMANN L., TUMMLER B., BAQUERO F., MARTINEZ J.L. (2008): "The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens", *PLoS ONE*, **3**: e1619 doi:10.1371/journal.pone.0001619.
- GONZALO M.P., ARRIBAS R.M., LATORRE E., BAQUERO F., MARTINEZ J.L. (1989): "Sewage dilution and loss of antibiotic resistance and virulence determinants in *E. coli*", *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**, 93-96.
- HALLING-SØRENSEN B., NORS NIELSEN S., LANSKY P.F., INGERSLEV F., HOLTEN LÜTZHØFT H.C., JØRGENSEN S.E. (1998): "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review", *Chemosphere*, **36**, (2), 357-393.
- HAMMESFAHR U., HEUER H., MANZKE B., SMALLA K., THIELE-BRUHN S. (2008): "Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils", *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 1583-1591.
- HEINEMANN M., KUMMEL A., RUINATSCHA R., PANKE S. (2005): "In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Staphylococcus aureus* metabolic network", *Biotechnol. Bioeng.*, **92**, 850-864.
- HEUER H., SMALLA K. (2007): "Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months", *Environ. Microbiol.*, **9**, 657-666.
- HEUER H., FOCKS A., LAMSHÖFT M., SMALLA K., MATTHIES M., SPITELLER M. (2008): "Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil", *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 1892-1900.
- HEUER H., KOPMANN C., BINH C.T.T., TOP E.M., SMALLA K. (2009): "Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G plus C content", *Environ. Microbiol.*, **11**, 937-949.
- HUND-RINKE K., SIMON M., LUKOW T. (2004): "Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance", *J. Soils Sediments*, **4**, 11-16.
- KEMPER N. (2008): "Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment", *Ecol. Indic.*, **8**, 1-13.
- KNAPP C.W., ENGEMANN C.A., HANSON M.L., KEEN P.L., HALL K.J., GRAHAM D.W. (2008): "Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures", *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 5348-5353.
- KOIKE S., KRAPAC I.G., OLIVER H.D., YANNARELL A.C., CHEE-SANFORD J.C., AMINOV R.I., MACKIE R.I. (2007): "Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period", *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4813-4823.

- KOTZERKE A., SHARMA S., SCHAUSS K., HEUER H., THIELE-BRUHN S., SMALLA K., WILKE B.M., SCHLOTER M. (2008): "Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure", *Environ. Pollut.* **153**, 315-322.
- KÜMMERER K. (2003): "Significance of antibiotics in the environment", *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**, 5-7.
- KÜMMERER K. (2009): "Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I", *Chemosphere*, **75**, 417-434.
- KWON J.W. (2011): "Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **87**, (1), 40-44.
- LINARES J.F., LOPEZ J.A., CAMAFEITA E., ALBAR J.P., ROJO F., MARTINEZ J.L. (2005): "Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Bacteriol.*, **187**, 1384-1391.
- LINDBERG R.H., BJÖRKLUND K., RENDAHL P., JOHANSSON M.I., TYSKLIND M., ANDERSSON B.A. (2007): "Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants", *Water Res.*, **41**, (3), 613-619.
- LOUVET J.N., GIAMMARINO C., POTIER O., PONS M.N. (2010): "Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge", *Environ. Pollut.*, **158**, (3), 688-693.
- MARTINEZ J.L. (2008): "Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments", *Science*, **321**, (5887), 365-367.
- MARTINEZ J.L. (2009): "Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants", *Environ. Pollut.*, **157**, (11), 2893-2902.
- MARTINEZ J.L. (2012): "Natural Antibiotic Resistance and Contamination by Antibiotic Resistance Determinants: The Two Ages in the Evolution of Resistance to Antimicrobials", *Front. Microbiol.*, **3**, 1-3.
- MARTINEZ J.L., BAQUERO F. (2000): "Mutation frequencies and antibiotic resistance", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 1771-1777.
- MARTINEZ J.L., BAQUERO F., ANDERSSON D.I. (2007): "Predicting antibiotic resistance", *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 958-965.
- MARTINEZ J.L., SANCHEZ M.B., MARTINEZ-SOLANO L., HERNANDEZ A., GARMENDIA L. FAJARDO A., ALVAREZ-ORTEGA C. (2009): "Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems", *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 430-449.
- MOHAMED M.A.N., RANJARD L., CATROUX C., CATROUX G., HARTMANN A. (2005): "Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere", *J. Microbiol. Methods*, **60**, 31-40.
- MÜLLER A.K., WESTERGAARD K., CHRISTENSEN S., SØRENSEN S.J. (2002): "The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances", *Microb. Ecol.*, **44**, 49-58.
- NASLUND J., HEDMAN J.E., AGESTRAND C. (2008): "Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment", *Aquat. Toxicol.*, **90**, 223-227.
- PALLECCHI L., BARTOLONI A., PARADISI F., ROSSOLINI G.M. (2008): "Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications", *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, **6**, 725-732.
- PAUWELS B., VERSTRAETE W. (2006): "The treatment of hospital wastewater: an appraisal", *J. Water Health*, **4**, (4), 405-416.
- PERRY P.H. (2009): "Genetic mechanism of Transfer of Drug resistance", in: "*Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, (Volume 1), Douglas L. Mayers Ed., Humana Press, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 53-64.
- PERRY D.A., AMARANTHUS M.P., BORCHERS J.G., BORCHERS S.L., BRAINERD R.E. (1989): "Bootstrapping in ecosystems", *Bioscience*, **39**, 230-237.
- SALYERS A.A., AMABILE-CUEVAS C.F. (1997): "Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2321-2325.

- SANCHEZ P., ALONSO A., MARTINEZ J.L. (2002): "Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3386-3393.
- SCHAUSS K., FOCKS A., LEININGER S., KOTZERKE A., HEUER H., THIELE-BRUHN S., SHARMA S., WILKE B.M., MATTHIES M., SMALLA K., MUNCH J.C., AMELUNG W., KAUPENJOHANN M., SCHLOTTER M., SCHLEPER C. (2009): "Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils", *Environ. Microbiol.*, **11**, 446-456.
- SCHMITT H., HAAPAKANGAS H., van BEELEN P. (2005): "Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance", *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 1882-1892.
- SENGELØV G., AGERSO Y., HALLING-SØRENSEN B., BALODA S.B., ANDERSEN J.S., JENSEN L.B. (2003): "Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry", *Environ. Int.*, **28**, 587-595.
- SINGER R.S., FINCH R., WEGENER H.C., BYWATER R., WALTERS J., LIPSITCH M. (2003): "Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings", *Lancet Infect. Dis.*, **3**, 47-51.
- SINGER A.C., HOWARD B.M., JOHNSON A.C., KNOWLES C.J., JACKMAN S., ACCINELLI C., BARRA CARACCILO A., BERNARD I., BIRD S., BOUCARD T., BOXALL A., BRIAN J.V., CARTMELL E., CHUBB C., CHURCHLEY J., COSTIGAN S., CRANE M., DEMPSEY M.J., DORRINGTON B., ELLOR B., FICK J., HOLMES J., HUTCHINSON T., KARCHER F., KELLEHER S.L., MARSDEN P., NOONE G., NUNN M.A., OXFORD J., RACHWAL T., ROBERTS N., ROBERTS M., SACCA M.L., SANDERS M., STRAUB J.O., TERRY A., THOMAS D., TOOVEY S., TOWNSEND R., VOUIVOULIS N., WATTS C. (2008): "Meeting report: risk assessment of tamiflu use under pandemic conditions", *Environ. Health Perspect.*, **116**, 1563-1567.
- TENDENCIA E.A., De LA PENA L.D. (2001): "Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds", *Aquaculture*, **195**, 193-204.
- THIELE-BRUHN (2003): "Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review", *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, **166** (4), 145-167.
- THIELE-BRUHN S., BECK I.C. (2005): "Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass", *Chemosphere*, **59**, 457-465.
- TOMLINSON T.G., BOON A.G., TROTMAN C.N.A. (1966): "Inhibition of nitrification in activated sludge process of sewage disposal", *J. Appl. Bacteriol.*, **29**, 266-291.
- TOPP E., CHAPMAN R., DEVERS-LAMRANI M., HARTMANN A., MARTI R., MARTIN-LAURENT F., SABOURIN L., SCOTT A., SUMARAH M. (2012): "Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp.", *J. Environ. Qual.*, **42**, 173-178.
- WATKINSON A.J., MURBY E.J., KOLPIN D.W., COSTANZO S.D. (2009): "The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water", *Sci. Total Environ.*, **407**, 2711-2723.
- WESTERGAARD K., MÜLLER A.K., CHRISTENSEN S., BLOEM J., SØRENSEN S.J. (2001): "Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community", *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 2061-2071.
- WILKE B.M., MATTHIES M., AMELUNG W., KLASMEIER J., SCHLOTTER M. (2009): "Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems", *Trend Anal. Chem.*, **28**, (5), 2077-2081.
- WRIGHT G.D. (2007): "The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity", *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 175-186.
- YAN G Q.X., ZHANG J., ZHU K.F., ZHANG H. (2009): "Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil", *J. Environ. Sci. (China)*, **21**, 954-959.
- YIM G., WANG H.H., DAVIES J. (2007): "Antibiotics as signalling molecules", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **362**, 1195-200.
- ZIELEZNY Y., GROENEWEG J., VEREECKEN H., TAPPE W. (2006): "Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity", *Soil Biol. Biochem.*, **38**, 2372-2380.

ZUCCATO E., CASTIGLIONI S., BAGNATI R., MELIS M., FANELLI R. (2010): "Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment", *J. Hazard. Mater.*, **179**, (1-3), 1042-1048.

ZUCCATO E., CASTIGLIONI S., FANELLI R., BAGNATI R. (2007): "Inquinamento da farmaci: le evidenze", *Ricerca & Pratica*, **23**, (2), 67-73.

## DETERMINAZIONE DI PRINCIPI ATTIVI FARMACEUTICI NELLE ACQUE MEDIANTE SPE ED ANALISI IN HPLC-UV/FLUORESCENZA

a cura di Patrolecco L., Ademollo N. e Capri S.

CNR-IRSA, Area Ricerca Roma 1 - Montelibretti, Monterotondo (RM)

### RIASSUNTO

Viene descritto un protocollo per la determinazione di nove principi attivi farmaceutici appartenenti a diverse classi terapeutiche e tre ormoni steroidei in acque superficiali inquinate e di scarico. Il metodo si basa su un'estrazione in fase solida (SPE) mediante cartucce pre-impaccate con una fase polimerica ed analisi in HPLC con rivelazione simultanea UV-fluorescenza.

I recuperi degli analiti da matrici reali sono risultati soddisfacenti con valori compresi tra 65% e 104% (coefficiente di variazione  $\leq 16\%$ ), mentre i limiti di quantificazione variavano tra 10 ng/L e 1100 ng/L, per tutte le matrici analizzate. Il metodo sviluppato viene proposto per analisi di routine di principi farmaceutici in matrici acquose inquinate, quali le acque di scarico, in alternativa a tecniche più sofisticate e costose non sempre disponibili.

### SUMMARY

In this paper we present a procedure for the analysis of nine selected pharmaceuticals belonging to different therapeutic classes and three steroid hormones in wastewaters and polluted surface waters. This procedure is based on solid phase extraction (SPE) using polymeric extraction cartridges and HPLC with simultaneous UV and fluorescence detection. The method was validated on spiked real water samples (river water and effluent from a WWTP) and showed satisfactory accuracy and sensitivity, with average recoveries in the 65-104% range and relative standard deviations (RSD)  $\leq 16\%$ . The limits of quantification (LOQs) ranged from 10 to 1100 ng/L for all spiked matrices. The method developed is proposed for routine analysis of pharmaceuticals in polluted waters as a useful alternative when more sophisticated techniques are not available.

### 1. INTRODUZIONE

I composti farmaceutici rappresentano una classe di contaminanti emergenti per l'ambiente acquatico e sono oggetto di attenzione da parte della comunità scientifica (Jones et al., 2001; Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011). Questo crescente interesse non è dovuto soltanto all'ampio utilizzo di farmaci per uso umano e veterinario, ma anche al miglioramento delle tecniche analitiche che consentono la determinazione di queste sostanze nelle acque anche a livelli di tracce ( $<1 \mu\text{g/L}$ ) e subtracce ( $<1 \text{ng/L}$ ). La produzione mondiale di sostanze farmaceutiche per uso umano e veterinario ammonta a diverse migliaia di tonnellate all'anno e nella sola Unione Europea circa 4.000 farmaci sono attualmente in uso (Mompelat et al., 2009). La loro presenza nell'ambiente acquatico è dovuta principalmente (70-80%) alla insufficiente rimozione di questi composti negli impianti di trattamento delle acque reflue, mentre il restante 20-30% è dovuta ad altre fonti di inquinamento (reflui zootecnici e industriali, smaltimento improprio o illegale di farmaci inutilizzati o scaduti) (Fent et al., 2006). Una volta rilasciati nei corpi idrici recettori, molti residui farmaceutici tendono a distribuirsi nei diversi comparti ambientali (acque superficiali, acque sotterranee, suoli, sedimenti e organismi) in base alle caratteristiche chimico-fisiche e al grado di persistenza e refrattarietà alla biodegradazione (Bottoni et al., 2010). Queste sostanze dovendo esplicare un effetto biologico a basse dosi in un organismo umano potrebbero avere un effetto negativo su organismi non bersaglio anche a concentrazioni molto basse (Pomati et al., 2006). La registrazione e la commercializzazione dei farmaci sono esentate dagli obblighi previsti dal regolamento REACH e, attualmente, una procedura per stabilire il loro possibile impatto sull'ambiente non è necessaria. Tuttavia, a causa della loro presenza ubiquitaria nell'ambiente, possono essere oggetto, in futuro, di regolamentazione in materia di tutela delle acque. Un valore di soglia di 10 ng/L per le acque superficiali è stato recentemente proposto in Europa per alcune classi di farmaci (EMA, 2006; Schmitt et al., 2009). Questo valore è stato superato in misura significativa in diversi fiumi europei (Loos et al., 2009; González Alonso et al., 2010), mentre concentrazioni comprese tra 0,1 e 250 ng/L sono state riscontrate nel fiume Po (Castiglioni et al., 2004; Zuccato et al., 2010).

La carenza di dati riguardanti la diffusione di detti contaminanti nell'ambiente unita all'assenza di protocolli analitici validati a livello europeo rende difficoltosi il confronto e l'interpretazione dei dati ambientali disponibili. La determinazione analitica di farmaci in matrici ambientali è complicata dalla presenza concomitante di diversi principi attivi, appartenenti a diverse classi terapeutiche, e dai loro bassi livelli ambientali. Pertanto, la definizione di nuovi protocolli analitici in grado di analizzare simultaneamente un gran numero di residui (metodi multiresiduo) e/o classi di composti riveste un'importanza cruciale; le tecniche impiegate devono essere caratterizzate da una elevata sensibilità ed accuratezza, robustezza analitica e speditezza operativa. LC-MS, LC-MS-MS e GC-MS sono state generalmente utilizzate per determinare farmaci nelle acque naturali (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011; Maskaoui & Zhou, 2010; Varga et al., 2010; Hernández et al., 2007). Queste tecniche utilizzano strumentazioni piuttosto costose e sofisticate, che richiedono costante manutenzione e personale tecnico di elevata competenza.

Lo scopo di questo studio è stato lo sviluppo di una procedura analitica sufficientemente sensibile e di semplice applicazione, che consentisse la quantificazione di farmaci in acque contaminate a livello di ng/L. La procedura proposta prevede l'estrazione in fase solida (SPE) del campione acquoso mediante cartucce pre-impaccate con una fase polimerica e l'analisi in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelazione UV-fluorescenza. I farmaci da analizzare sono stati scelti in base alle informazioni disponibili riguardanti i consumi e la loro presenza in acque superficiali europee: carbamazepina (anti-epilettico); gemfibrozil, acido clofibrato, fenofibrato (regolatori lipidici); ibuprofene, naprossene, ketoprofene, fenoprofene e diclofenac (antinfiammatori); 17- $\alpha$ -etinilestradiolo (ormone steroideo sintetico); 17- $\beta$ -estradiolo ed estrone (ormoni steroidei naturali). La procedura messa a punto è stata applicata all'analisi di campioni reali, in particolare acqua di scarico in ingresso ed uscita da un impianto di depurazione della città di Roma ed acqua del fiume Tevere prelevata a monte e a valle dell'agglomerato urbano.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Raccolta dei campioni reali

I campioni d'acqua, prelevati in due siti del tratto urbano del fiume Tevere, a monte ed a valle della città di Roma (RN e RS, rispettivamente) e all'ingresso (IN) e all'uscita (OUT) di uno degli impianti di trattamento delle acque reflue della città, sono stati raccolti in bottiglie pulite, di vetro scuro.

In laboratorio, i campioni sono stati filtrati attraverso filtri in fibra di vetro (0,7  $\mu$ m) (Whatman, Maidstone, UK) per rimuovere il materiale in sospensione. Le bottiglie sono state conservate al buio a 4°C fino al momento dell'analisi. Prima dell'estrazione SPE i campioni acquosi sono stati portati a pH 3,6 con acido acetico glaciale. L'estrazione è stata effettuata entro 48 ore dal prelievo.

### 2.2 Reattivi e prodotti chimici

La formula di struttura e il nome commerciale dei farmaci e degli ormoni considerati in questo studio sono riportati in Tab. 1. Gli standard dei nove farmaci (carbamazepina, acido clofibrato, diclofenac, fenofibrato, fenoprofene, gemfibrozil, ibuprofene, ketoprofene e naprossene) e dei tre ormoni steroidei (17- $\beta$ -estradiolo, 17- $\alpha$ -etinilestradiolo ed estrone) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania). Soluzioni di riferimento concentrate dei singoli analiti sono state preparate sciogliendo 5 mg di ciascun composto in 10 mL di acetonitrile e conservate al buio a -20°C. Soluzioni di riferimento diluite degli analiti in miscela sono state preparate periodicamente diluendo opportune aliquote delle soluzioni concentrate con acetonitrile/acqua (45/55, v/v) e poi conservate a 4°C.

Per quanto concerne l'analisi cromatografica, l'acqua distillata è stata ulteriormente purificata mediante l'apparato Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Metanolo, acetonitrile, acetone e n-esano di grado HPLC sono stati ottenuti da VWR (Radnor, PA, USA). Acido acetico glaciale (99%) di grado analitico è stato fornito da Carlo Erba (Milano, Italia). Le cartucce di estrazione Si-C18 e Strata-X (500 mg/6 mL) sono state fornite da Supelco (Bellefonte, PA, USA) e Phenomenex (Torrance, CA, USA), rispettivamente.

Un pH-metro Modello PHM 240 (Radiometer, Copenhagen, Danimarca) con elettrodo di vetro combinato è stato utilizzato per la misura del pH dei campioni.

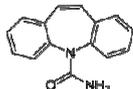
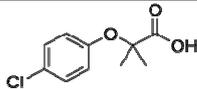
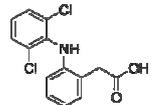
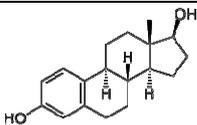
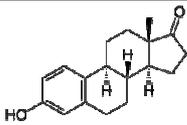
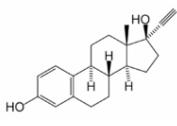
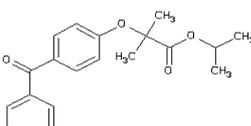
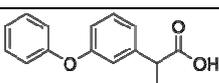
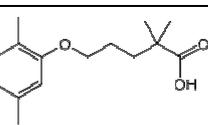
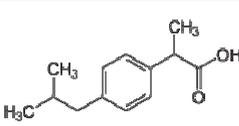
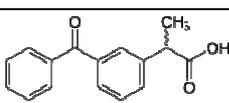
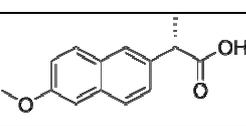
### 2.3 Procedura di estrazione

La procedura di estrazione SPE è stata eseguita modificando un metodo validato riportato in letteratura (Varga et al., 2010). Le due fasi adsorbenti impiegate (Silice-C18 e Strata-X polimerica a fase inversa) sono state condizionate seguendo differenti modalità, come descritto in dettaglio al paragrafo 3.2. 1000 mL di acqua ultrapura o 500-1000 mL di campione reale filtrato sono stati trasferiti, attraverso un tubo di Teflon, nelle cartucce SPE inserite in un sistema di estrazione multiposto (Supelco 12-port, Bellefonte, PA, USA) collegato ad una pompa da vuoto.

La pompa è stata regolata in modo da consentire il passaggio del campione in cartuccia ad un flusso di circa 10 mL/min.

Prima dell'eluizione, le cartucce sono state lavate con 10 mL di metanolo/acqua (5/95, v/v) seguiti da 10 mL di n-esano, regolando il flusso a circa 1 mL/min (Santos et al., 2005).

Tab 1 - Struttura chimica e classe terapeutica dei composti analizzati

Composto	Struttura chimica	Classe terapeutica
Carbamazepina <i>5H-dibenzo[b,f]azepine-5-carboxamide</i>		Antiepilettico
Acido clofibrico <i>2-(4-Chlorophenoxy)-2-methylpropanoic acid</i>		Metabolita del clofibrato, regolatore lipidico
Diclofenac <i>2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetic acid</i>		Antinfiammatorio
17-β-Estradiolo		Estrogeno naturale
Estrone		Estrogeno naturale
17-α-Etinilestradiolo		Estrogeno sintetico
Fenofibrato <i>propan-2-yl 2-{4-[(4-chlorophenyl)carbonyl]phenoxy}-2-methylpropanoate</i>		Regolatore lipidico
Fenoprofene <i>2-(3-phenoxyphenyl)propanoic acid</i>		Antinfiammatorio
Gemfibrozil <i>2,2-Dimethyl-5-(2,5-dimethylphenoxy)pentanoic acid</i>		Regolatore lipidico
Ibuprofene <i>(RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl)propanoic acid</i>		Antinfiammatorio
Ketoprofene <i>(RS)-2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid</i>		Antinfiammatorio
Naproxene <i>(+)-(S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid</i>		Antinfiammatorio

Dopo ogni lavaggio, le fasi adsorbenti sono state essiccate per 20 e 45 minuti, rispettivamente. Due diversi solventi (acetone e metanolo) sono stati testati come fase eluente (vedi paragrafo 3.2) regolando il flusso a 1 mL/min. L'eluato è stato concentrato in un pallone mediante rotoevaporatore (Büchi, Flawil, Svizzera) a un volume finale di qualche mL e poi trasferito quantitativamente in una provetta a fondo conico. Dopo aver evaporato il solvente sotto leggera corrente di azoto fin quasi a secco, il residuo è stato ricostituito con 0,5 mL di acetonitrile/acqua (45/55, v/v), quindi 50 µL di residuo sono stati iniettati nella colonna HPLC.

#### 2.4 Analisi cromatografica

L'analisi cromatografica è stata effettuata con uno strumento Varian modello 9010 (Walnut Creek, CA, USA) equipaggiato con un iniettore Rheodyne modello 7125 avente un "loop" di 50 µL, un rivelatore UV/Visibile LC-95 Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) (cella a flusso di 18 µL) e un rivelatore fluorimetrico Perkin Elmer LS 30 (larghezza della fenditura 10 nm, cella a flusso di 7 µL). I due rivelatori sono stati collegati in serie e i segnali raccolti da un sistema di acquisizione dati Perkin Elmer (NCI 900) mentre i cromatogrammi sono stati processati da un sistema di elaborazione dati TotalChrom Perkin Elmer. Gli analiti sono stati separati su una colonna cromatografica C18 a fase inversa Alltima (250x4,6 mm, 5 µm) (Alltech, Sedriano, Italia) e dotata di precolonna Alltima riempita con la stessa fase stazionaria. Come fasi mobili per l'eluizione cromatografica sono state impiegate acetonitrile (fase A) e acqua acidificata a pH 3,6 con acido acetico glaciale (fase B). L'analisi cromatografica è stata effettuata in gradiente mantenendo la composizione iniziale della fase mobile (45% A, 55% B) per 5 minuti, incrementando poi la percentuale della fase A linearmente fino all'80% (20%B) in 20 minuti ed infine ripristinando in 10 minuti le condizioni iniziali. I composti sono stati identificati e quantificati confrontando, rispettivamente, i tempi di ritenzione e le aree dei picchi del cromatogramma ottenuto dall'analisi del campione acquoso con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento. Tutti gli analiti sono stati determinati mediante la rivelazione in fluorescenza con l'eccezione dei composti nonfluorescenti carbamazepina, ketoprofene e diclofenac, che sono stati misurati in UV. Le lunghezze d'onda analitiche (eccitazione=230 nm, emissione=302 nm per la fluorescenza e 230 nm per l'UV) sono state scelte sulla base di criteri di selettività, sensibilità e riproducibilità delle misure.

La presenza di composti farmaceutici in campioni ambientali è stato confermato anche confrontando le concentrazioni ottenute con entrambi i rivelatori mediante il test del *t* di Student e il valore calcolato è risultato inferiore a quello tabulato ( $p < 0,05$ ) in tutti i casi.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Taratura

Sono state preparate soluzioni di taratura, a partire dalle soluzioni di riferimento concentrate di ogni singolo analita, aventi concentrazioni comprese tra 0,01-2,0 µg/mL in modo da coprire l'intervallo di concentrazioni atteso per i composti considerati in acque superficiali. Le rette di taratura sono state ottenute tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni dei singoli analiti in ascissa e le aree dei picchi corrispondenti in ordinata. A seconda del composto analizzato, il coefficiente di correlazione variava in uno stretto intervallo compreso tra  $r=0,989$  per l'acido clofibrico e  $r=0,999$  per il gemfibrozil. Un tipico cromatogramma ottenuto analizzando una soluzione di taratura è riportato in Fig. 1.

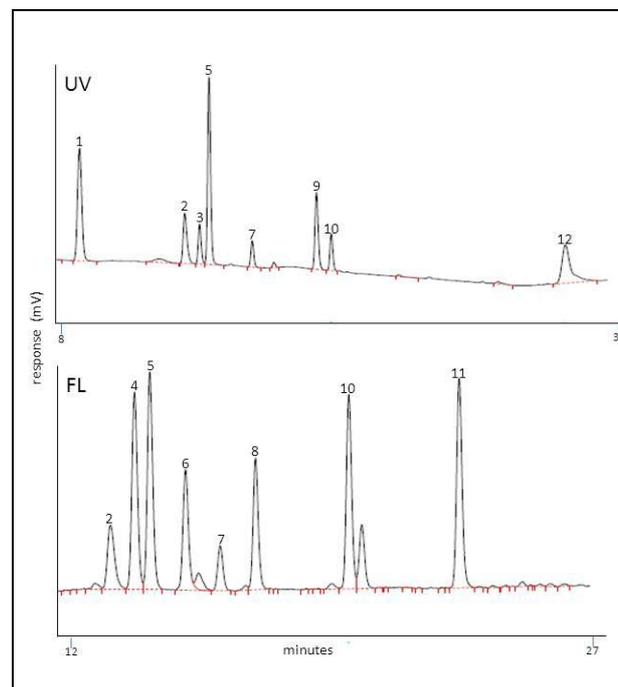


Fig.1 - Cromatogramma di una soluzione di riferimento di principi attivi farmaceutici ed ormoni con rivelatori UV e fluorescenza. 1: carbamazepina; 2: acido clofibrico; 3: ketoprofene; 4: 17-β-estradiolo; 5: naproxene; 6: 17-α-etinilestradiolo; 7: estrone; 8: fenoprofene; 9: diclofenac; 10: ibuprofene; 11: gemfibrozil; 12: fenofibrato.

### 3.2 Ottimizzazione dell'estrazione SPE

Il protocollo di estrazione in fase solida (SPE) è stata ottimizzato utilizzando soluzioni acquose di acqua ultrapura addizionate di una quantità nota degli analiti oggetto di studio e variando le condizioni di attivazione ed eluizione delle cartucce SPE.

Sono state seguite tre diverse procedure come descritto in Tab. 2.

In particolare, è stata valutata l'efficienza di recupero degli analiti dalla cartuccia in fase di eluizione, ottenuta impiegando metanolo e acetone, così come l'effetto dell'acidificazione sul campione trattato. Inoltre, sono stati confrontate due diverse fasi adsorbenti, la Strata-X, basata sul copolimero stirene-divinilbenzene opportunamente modificato per aumentare la capacità di ritenzione di miscele di composti polari e non polari, e la tradizionale Si-C18.

Tab. 2 - Descrizione delle diverse procedure di eluizione applicate per l'ottimizzazione dell'estrazione SPE

Procedura	Attivazione cartuccia	Campione	Eluizione
1	5 mL metanolo + 10 mL acqua Milli-Q a pH= 3,6	acqua Milli-Q a pH=3,6 + soluzione di riferimento multicomponente	10 mL metanolo
2	5 mL acetone+ 5 mL metanolo + 10 mL acqua Milli-Q	acqua Milli-Q + soluzione di riferimento multicomponente	10 mL acetone
3	5 mL acetone+ 5 mL metanolo + 10 mL acqua Milli-Q a pH= 3,6	acqua Milli-Q a pH=3,6 + soluzione di riferimento multicomponente	10 + 10 mL acetone

Per le prove di recupero 1000 mL di acqua Milli-Q sono stati contaminati artificialmente con una miscela di nove farmaci e tre ormoni steroidei in modo da ottenere una concentrazione dei singoli analiti di 50-1000 ng/L. Al fine di migliorare il recupero di tutti gli analiti, è importante asciugare completamente la fase solida prima dell'eluizione, rimuovendo l'acqua residua mediante applicazione del vuoto per almeno 45 minuti, come precedentemente descritto al punto 2.3. L'analisi cromatografica di una serie di bianchi procedurali, eseguiti per verificare l'eventuale presenza di sostanze interferenti, introdotte durante la fase di manipolazione ed estrazione del campione, non ha evidenziato alcuna interferenza significativa.

In Tab. 3 sono riportate le percentuali di recupero ottenute utilizzando diverse procedure di attivazione e di eluizione delle cartucce testate (Strata-X e Si-C18). Per la maggior parte dei composti analizzati i risultati migliori sono stati ottenuti con le Strata-X applicando le condizioni della procedura 3 di Tab. 2, con valori compresi tra l'80% (estrone) e il 105% (ibuprofene) e coefficienti di variazione (RSD) che variano nell'intervallo 3-13%. Per quanto concerne la fase adsorbente Si-C18, le procedure 1 e 3, che prevedono l'attivazione della fase con acqua acidificata a pH=3,6 e l'acidificazione dei campioni sempre a pH=3,6, hanno mostrato efficienze di recupero per i composti acidi (acido clofibrico, ketoprofene, naproxene, fenoprofene, diclofenac, ibuprofene, gemfibrozil) più elevate rispetto a quelle ottenute senza correzione del pH (procedura 2 di Tab. 2).

Con quest'ultima procedura, infatti, i valori di recupero sono risultati insoddisfacenti (non superiori al 50%) e affetti da scarsa ripetibilità (Tab. 3). Il condizionamento della fase Si-C18 e l'acidificazione del campione a pH=3,6 sono necessari per limitare la dissociazione di tali composti ed aumentare la capacità di ritenzione della fase adsorbente. Questa osservazione è stata confermata, seppur in minor misura, anche dalla fase adsorbente Strata-X, che ha mostrato valori di recupero non pienamente soddisfacenti (50-70%) utilizzando la procedura 2. Alcuni studi (Santos et al., 2005; Stafiej et al., 2007) hanno evidenziato che l'acidificazione dei campioni a pH molto basso (pH=2) può facilitare l'estrazione di sostanze interferenti da acque naturali. La nostra scelta di ricorrere ad una acidificazione più blanda (pH=3,6) rappresenta un buon compromesso per ottenere recuperi degli analiti soddisfacenti e, nello stesso tempo, ridurre le interferenze della matrice. Per quanto concerne i composti neutri e gli ormoni, sono stati ottenuti buoni valori di recupero con entrambe le fasi adsorbenti testate e non è stata osservata alcuna influenza da parte del pH utilizzato.

Infine, i recuperi ottenuti con acetone come fase eluente sono risultati significativamente più alti (procedura 2 e 3) per quasi tutti i composti analizzati rispetto alla procedura 1, in cui è stato impiegato metanolo, indipendentemente dalla fase adsorbente considerata. L'utilizzo dell'acetone invece del metanolo si è tradotto in un ulteriore vantaggio per i più ridotti tempi di evaporazione dell'estratto.

A conclusione della sperimentazione volta alla messa a punto della procedura SPE sono state effettuate prove di eluizione con volumi crescenti di acetone (1x10 mL, 2x10 mL e 3x10 mL) e Strata-X come fase adsorbente per valutare l'effetto del volume di fase eluente sull'efficienza di recupero degli analiti. I recuperi più elevati sono stati ottenuti con 2x10 mL di acetone (dati non mostrati); quest'ultimo risultato, insieme a quelli descritti in precedenza, hanno consentito di definire una procedura ottimizzata (fase adsorbente Strata-X, acidificazione del campione a pH=3,6, fase eluente 2x10 mL di acetone) che è stata utilizzata nelle successive prove di validazione su matrici reali.

### 3.3 Validazione del metodo

La precisione e l'accuratezza del metodo sono state valutate effettuando prove di recupero da campioni reali contaminati artificialmente con aggiunte note degli analiti oggetto di studio. I campioni reali erano costituiti da acqua del fiume Tevere (1000 mL) e da un refluo in ingresso ed uscita di un impianto municipale di depurazione (500 mL).

Tab. 3 - Accuratezza e precisione (ripetibilità) ottenute utilizzando diverse fasi adsorbenti (Strata X, Si-C18) e procedure di estrazione (1-2-3, come in Tab. 2)

Composto	Strata-X (n=5)			Si-C18 (n=5)		
	1	2	3	1	2	3
	R ± RSD	R ± RSD	R ± RSD	R ± RSD	R ± RSD	R ± RSD
Carbamazepina	85 ± 8	80 ± 11	93 ± 10	82 ± 5	87 ± 7	86 ± 5
Acido clofibrico	95 ± 6	50 ± 4	91 ± 4	82 ± 8	44 ± 6	88 ± 3
Ketoprofene	100 ± 3	55 ± 7	96 ± 12	69 ± 6	35 ± 3	82 ± 8
Estradiolo	62 ± 6	83 ± 12	91 ± 6	59 ± 3	81 ± 12	83 ± 10
Naproxene	74 ± 9	65 ± 6	97 ± 3	65 ± 3	53 ± 10	84 ± 6
Etinilestradiolo	69 ± 4	66 ± 10	85 ± 8	61 ± 3	85 ± 9	80 ± 9
Estrone	3 ± 13	78 ± 8	80 ± 10	32 ± 10	86 ± 5	74 ± 13
Fenoprofene	75 ± 9	50 ± 5	100 ± 5	74 ± 13	44 ± 7	81 ± 10
Diclofenac	56 ± 2	57 ± 8	97 ± 5	10 ± 3	32 ± 10	73 ± 6
Ibuprofene	80 ± 10	60 ± 12	105 ± 7	63 ± 6	46 ± 11	86 ± 9
Gemfibrozil	75 ± 4	70 ± 6	92 ± 9	9 ± 3	51 ± 7	77 ± 5
Fenofibrato	17 ± 6	70 ± 14	88 ± 13	35 ± 12	51 ± 14	63 ± 12

R=recupero (%); RSD=deviazione standard relativa

Le concentrazioni scelte per le aggiunte sono state selezionate in base ai valori riscontrati, per i diversi analiti, in acque superficiali e di scarico e variavano nell'intervallo 50-1000 ng/L. Il calcolo delle percentuali di recupero è stato effettuato tenendo conto delle concentrazioni presenti nei campioni senza aggiunta. La precisione, la ripetibilità (RSD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono riportati in Tab. 4. I valori di recupero ottenuti con campioni di acqua di fiume sono in buon accordo con i dati riportati da Santos e collaboratori (2005) per la stessa matrice, risultando compresi tra 86% (estradiolo) e 104% (ibuprofene).

Nel caso dei reflui, il recupero più elevato è stato ottenuto con il ketoprofene (100%) nell'effluente mentre i recuperi più bassi hanno riguardato acido clofibrico, etinilestradiolo ed estradiolo (65, 76 e 79%, rispettivamente) nell'influente. La ripetibilità complessiva (n=5) della procedura di estrazione si è rivelata soddisfacente con valori di RSD che vanno dal 4% al 13% per l'acqua di fiume e dal 5% al 16% per i reflui. I LOQ per ciascun composto sono stati calcolati in base al rapporto segnale-rumore ottenuto analizzando, mediante HPLC-UV-FL, campioni acquosi contaminati artificialmente, utilizzando almeno cinque cromatogrammi differenti.

I suddetti LOQ sono risultati compresi tra 10 e 800 ng/L per campioni di acqua di fiume, tra 30 e 1100 ng/L per campioni di influente e tra 10 e 850 ng/L per campioni di effluente. Questi dati sono comparabili o inferiori ai valori riportati in letteratura per matrici ambientali o biologiche analizzate con la stessa tecnica strumentale (Santos et al., 2005; Stafiej et al., 2007; González-Barrero et al., 2003; Osytek et al., 2008; Nasir et al., 2011).

I risultati ottenuti confermano la possibilità di applicare il metodo sviluppato a campioni reali, nonostante le possibili interferenze che possono essere presenti in matrici acquose complesse come le acque di scarico. Sebbene tecniche più avanzate basate sulla spettrometria di massa (HPLC-MS o MS-MS, GC-MS o MS-MS) siano effettivamente più indicate per la determinazione di farmaci in acque naturali, non si possono trascurare alcune limitazioni.

Per esempio, la GC-MS richiede una maggiore manipolazione del campione per trasformare gli analiti in derivati termicamente stabili, con possibili errori e contaminazioni dello stesso (Ruikang et al., 2011). In LC-MS, qualora questa tecnica venga applicata alle acque reflue, la complessità della matrice potrebbe comportare una soppressione della ionizzazione elettrospray, con conseguenze negative sulla riproducibilità e accuratezza dell'analisi (Zwiener & Frimmel, 2004; Pan et al., 2006; Ternes, 2001). Inoltre, tali apparecchiature sono piuttosto costose e richiedono la presenza di personale esperto altamente qualificato. La strumentazione HPLC-UV-FL, al contrario, caratterizzata da minori costi e maggiore facilità di gestione, può rappresentare un'utile alternativa nelle analisi routinarie di prodotti farmaceutici in matrici acquose inquinate.

Tab. 4 - Accuratezza, precisione (ripetibilità) e limiti di quantificazione ottenuti analizzando campioni reali con aggiunta di analiti

Composto	Acqua di fiume (n=5)			Influente (n=5)			Effluente (n=5)		
	LOQ (ng/L)	R (%)	RSD (%)	LOQ (ng/L)	R (%)	RSD (%)	LOQ (ng/L)	R (%)	RSD (%)
Carbamazepina	50	89	13	95	83	11	60	87	8
Acido clofibrico	700	100	8	970	62	7	800	65	5
Ketoprofene	50	100	5	110	88	15	60	100	11
Estradiolo	10	86	11	30	76	8	20	79	9
Naproxene	60	93	9	150	84	13	70	88	10
Etinilestradiolo	20	100	6	50	72	9	20	76	6
Estrone	800	89	9	1100	80	14	850	84	9
Fenoprofene	30	91	12	55	89	16	30	92	11
Diclofenac	100	94	4	210	87	11	110	90	12
Ibuprofene	160	104	5	345	90	9	190	88	13
Gemfibrozil	10	98	9	30	92	15	10	95	16
Fenofibrato	110	95	10	215	90	12	120	89	8

LOQ= limite di quantificazione; R=recupero (%); RSD= deviazione standard relativa

### 3.4 Applicazione del metodo a campioni reali

Il metodo messo a punto è stato utilizzato per la determinazione di principi attivi farmaceutici selezionati in alcune matrici reali caratterizzate da livelli di concentrazione e complessità differenti.

In Tab. 5 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di campioni di acqua prelevati nel tratto urbano del fiume Tevere, in due siti a monte ed a valle della città di Roma (RN e RS, rispettivamente) e nei reflui in ingresso (IN) e in uscita (OUT) di un impianto di depurazione.

Nel sito RN, solo la carbamazepina (antiepilettico), l'ibuprofene e il naproxene (antinfiammatori) sono stati riscontrati in concentrazioni significative ( $63 \pm 7$ ,  $95 \pm 8$  e  $264 \pm 5$  ng/L, rispettivamente). Nel sito RS sono stati determinati sei dei nove farmaci selezionati; l'ibuprofene presentava il valore di concentrazione più elevato ( $210 \pm 13$  ng/L), mentre la concentrazione di ormoni steroidei è risultata al di sotto dei limiti di quantificazione (Tab. 4).

Con l'eccezione del naproxene, le concentrazioni più alte riscontrate nel campione RS rispetto a RN potrebbero riflettere la peculiarità del sito RS, posizionato a valle di un impianto di depurazione che raccoglie gli scarichi della zona meridionale della città di Roma. La minore presenza complessiva di farmaci e i più bassi livelli di concentrazione nei campioni prelevati nel sito RN, il cui tratto fluviale è caratterizzato da un minor tasso di urbanizzazione, sembrano confermare l'importanza degli impianti di trattamento come fonte principale di prodotti farmaceutici per l'ambiente acquatico.

Le concentrazioni più elevate di farmaci si sono registrate nel refluo in ingresso (IN) a un impianto di depurazione che tratta acque di scarico civili (Tab. 5). Diversi antinfiammatori (ketoprofene, naproxene, diclofenac, ibuprofene), la carbamazepina e il regolatore lipidico gemfibrozil sono stati riscontrati in concentrazioni significative, superiori di un ordine di grandezza rispetto alle acque di fiume, con valori compresi tra 115 ng/L e 6624 ng/L. In uscita all'impianto (OUT), le concentrazioni degli stessi farmaci sono risultate più basse, comprese nell'intervallo 78-1003 ng/L, ma comunque tali da suggerire una difficoltà di rimozione di questi composti negli impianti di depurazione convenzionali.

Le Figg. 2-3 mostrano, a titolo esemplificativo, i cromatogrammi ottenuti analizzando un campione di acqua di fiume ed uno di effluente con rivelatori UV e fluorescenza.

Tab. 5 - Concentrazioni di principi attivi farmaceutici in acque di fiume (RN, sito a nord di Roma; RS, sito a sud di Roma) e in reflui civili in ingresso (IN) ed in uscita (OUT) da un impianto di depurazione

Composto	Fiume Tevere (ng/L)		Refluo (ng/L)	
	RN	RS	IN	OUT
Carbamazepina	$63 \pm 7$	$75 \pm 12$	$115 \pm 4$	$78 \pm 9$
Acido clofibrico	nd	nd	nd	nd
Ketoprofene	nd	$150 \pm 6$	$250 \pm 7$	$175 \pm 7$
Estradiolo	nd	nd	nd	nd
Naproxene	$264 \pm 5$	$200 \pm 9$	$1079 \pm 8$	$526 \pm 12$
Etinilestradiolo	nd	nd	nd	nd
Estrone	nd	nd	nd	nd
Fenoprofene	nd	nd	nd	nd
Diclofenac	nd	$120 \pm 5$	$1020 \pm 3$	$507 \pm 5$
Ibuprofene	$95 \pm 8$	$210 \pm 13$	$6624 \pm 6$	$1003 \pm 9$
Gemfibrozil	nd	$65 \pm 13$	$578 \pm 10$	$242 \pm 6$
Fenofibrato	nd	nd	nd	nd

nd=not detectable;  $\pm$  RSD=deviazione standard relativa

#### 4. CONCLUSIONI

Una procedura analitica sufficientemente sensibile e di semplice applicazione, basata su una preconcentrazione del campione mediante SPE ed analisi in HPLC con rivelazione UV-fluorescenza, è stata proposta per la determinazione simultanea di nove farmaci e tre ormoni steroidei in acque naturali inquinate e di scarico. I recuperi degli analiti dalle cartucce SPE utilizzate (Strata-X) risultano soddisfacenti, con valori superiori all'80% per tutti gli analiti considerati.

I limiti di quantificazione ottenuti con questo metodo, compresi tra 10 ng/L e 1100 ng/L, consentono, con l'eccezione di ormoni steroidei e acido clofibrico, la determinazione di questi composti anche in matrici complesse come le acque di scarico. Il protocollo analitico sviluppato richiede strumentazioni meno sofisticate e costose rispetto a quelli basati sull'impiego di HPLC-MS o GC-MS e può costituire un'alternativa per analisi routinarie di farmaci in acque inquinate.

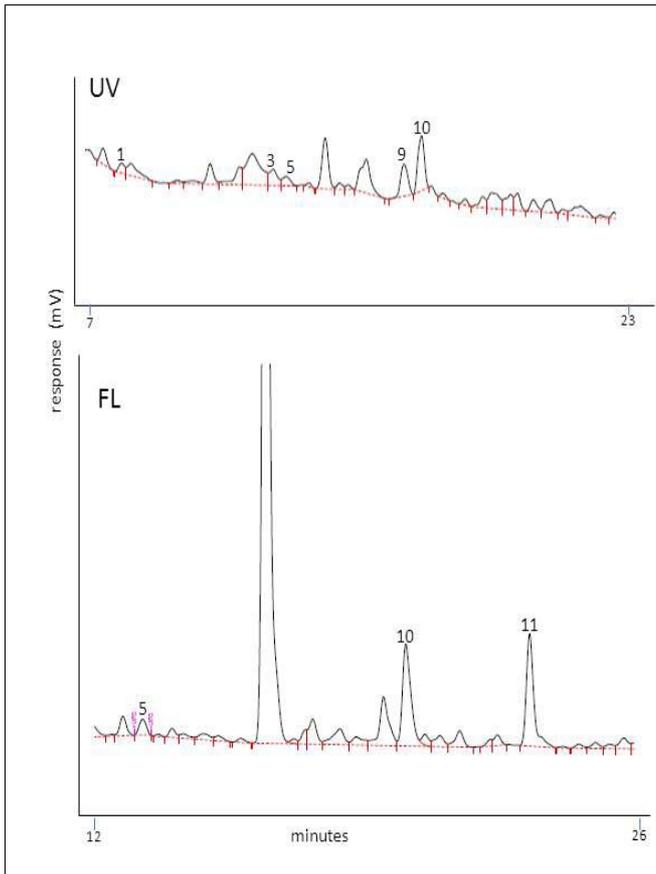


Fig. 2 - Tipico cromatogramma ottenuto analizzando un'acqua superficiale (fiume Tevere) con rivelatori UV e fluorescenza (FL). 1: Carbamazepina; 3: Ketoprofene; 5: Naproxene; 9: Diclofenac; 10: Ibuprofene; 11: Gemfibrozil.

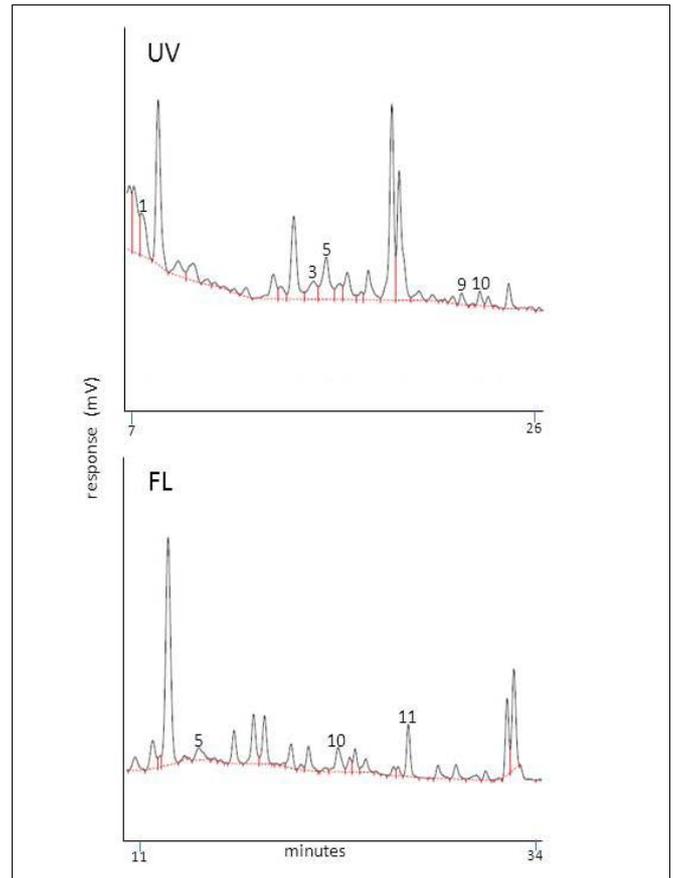


Fig. 3 - Tipico cromatogramma ottenuto analizzando un effluente con rivelatori UV e fluorescenza (FL). 1: Carbamazepina; 3: Ketoprofene; 5: Naproxene; 9: Diclofenac; 10: Ibuprofene; 11: Gemfibrozil.

## BIBLIOGRAFIA

BAKER D.R., KASPRZYK-HORDERN B. (2011): "Critical evaluation of methodology commonly used in a sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A.*, **1218**, 7901-7913.

BOTTONI P., BARRA CARACCILO A. (2010): "Pharmaceutical as priority water contaminants", *Toxicol. Environ. Chem.*, **92**, 549-565.

CASTIGLIONI S., FANELLI R., CALAMARI D., BAGNATI R., ZUCCATO E. (2004): "Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy", *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **39**, 25-32.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY/COMMITTEE for MEDICINAL PRODUCTS for HUMAN USE (EMA/CHMP) (2006): "Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use", London, UK, EMA, EMA/CHMP/SWP/4447/00.

FENT K., WESTON A.A., CAMINADA D. (2006): "Review ecotoxicology of human pharmaceuticals", *Aquat. Toxicol.*, **76**, 122-159.

GONZÁLEZ ALONSO S., CATALÀ M., MAROTO R.R., RODRÍGUEZ GIL J.L., GIL DE MIGUEL A., VALCÀRCEL Y. (2010): "Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain)", *Environ. Intern.*, **36**, 195-201.

GONZÁLEZ-BARRIERO C., LORES M., CASAIS M.C., CELA R. (2003): "Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceutical in wastewaters by high-performance liquid chromatography-post-column photochemically induced fluorimetry", *J. Chrom. A*, **993**, 29-37.

HERNÁNDEZ F., SANCHO J.V., IBÁÑEZ M., GUERRERO C. (2007): "Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS", *Trends Anal. Chem.*, **26**, 446-485.

JONES O.A.H., VOULVOULIS N., LESTER J.N. (2001): "Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review", *Environ. Technol.*, **22**, 1383-1394.

LOOS R., GAWLIK B.M., LOCORO G., RIMAVICIUTE E., CONTINI S., BIDOGLIO G. (2009): "EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters", *Environ. Pollut.*, **157**, 561-568.

MASKAOUI K., ZHOU J.L. (2010): "Colloids as a sink for certain pharmaceuticals in the aquatic environment", *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **17**, 898-907.

MOMPELAT S., LE BOT B., THOMAS O. (2009): "Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water", *Environ. Intern.*, **35**, 803-814.

NASIR F., IQBAL Z., KHAN A., AHMAD L., SHAH Y., KHAN A.Z., KHAN J.A., KHAN S. (2011): "Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV", *J. Chrom. B*, **879**, 3434-3443.

OSYTEK A., BIESAGA M., PYRZYNSKA K., SZEWCZYŃSKA M. (2008): "Quantification of some active compounds in air samples at pharmaceutical workplaces by HPLC", *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 1283-1286.

PAN C., LIU F., JI Q., WANG W., DRINKWATER D., VIVILECCHIA R. (2006): "The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development", *J. Phar. Biomed. Anal.*, **40**, 581-590.

POMATI F., CASTIGLIONI S., ZUCCATO E., FANELLI R., VIGETTI D., ROSSETTI C., CALAMARI D. (2006): "Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells", *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 2442-2447.

RUIKANG H., ZHAOGUANG Y., LIFENG Z. (2011): "Trace analysis of acidic pharmaceutical residues in waters with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry via methylation derivatization", *Talanta*, **85**, 1751-175.

SANTOS J.L., APARICIO I., ALONSO E., CALLEJÓN M. (2005): "Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors", *Anal. Chim. Acta*, **550**, 116-122.

SCHMITT H., BOUCARD T., GARRIC J., JENSEN J., PARROTT J., PERY A., ROMBKE J., STRAUB J.O., HUTCHINSON T.H., SÁNCHEZ-ARGÜELLO P., WENNMALM A., DUISYY K. (2009): "Recommendations on the environmental risk assessment of pharmaceuticals: effect characterization", *Integr. Environ. Assess. Manag.*, **6**, 588-602.

STAFIEJ A., PYRZYNSKA K., REGAN F. (2007): "Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection", *J. Sep. Sci.*, **30**, 985-991.

TERNES T.A. (2001): "Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples", *Trends Anal. Chem.*, **20**, 419-434.

VARGA M., DOBOR J., HELENKÁR A., JURECSKA L., YAO J., ZÁRAY G. (2010): "Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry", *Microchem. J.*, **95**, 353-358.

ZUCCATO E., CASTIGLIONI S., BAGNATI R., MELIS M., FANELLI R. (2010): "Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment", *J. Hazard. Mater.*, **179**, 1042-1048.

ZWIENER C., FRIMMEL F.H. (2004): "LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment – a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids", *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 862-874.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI PARMA



CONTROLLI ANALITICI AREA EMILIA  
LABORATORIO REGGIO EMILIA



FONDAZIONE AMGA

Corso di formazione e Aggiornamento professionale

**ANALISI DELLA MICROFAUNA E APPLICAZIONE DELL'INDICE BIOTICO  
DEL FANGO (SBI) NELLA STIMA DI EFFICIENZA DEI FANGHI ATTIVI**

24/27 Giugno 2013

L'analisi microscopica del fango attivo è un eccellente mezzo per ottenere indicazioni sulla qualità biologica di depurazione. Lo scopo del corso è quello di mettere a disposizione di coloro che operano nel controllo e nella gestione degli impianti a fanghi attivi le più moderne tecniche di identificazione, classificazione e conteggio dei microrganismi (microfauna) che colonizzano il fango attivo.

Costituiranno, inoltre, argomento del presente corso la ricerca delle possibili cause di scorretto funzionamento e le principali strategie di intervento che si evidenzieranno attraverso l'analisi microscopica. In particolare verrà illustrato ed applicato lo **SLUDGE BIOTIC INDEX (SBI)**, un metodo in grado di fornire valutazioni numeriche dell'efficienza biologica di depurazione, sulla base della struttura in specie della microfauna.

**Sede del corso:**

Campus Università di Parma  
Dipartimento di BioScienze

**Segreteria**

Sig.ra Maura Davoli  
Laboratori Iren Acqua Gas SpA – sede di Reggio Emilia  
Via Nubi di Magellano 30, 42123 Reggio Emilia  
Tel. 0522/297207-297500  
Fax. 0522/297542  
e-mail [maura.davoli@irenacquagas.it](mailto:maura.davoli@irenacquagas.it)

### ISCRIZIONE

Il corso è riservato a 30 partecipanti la cui scelta sarà basata esclusivamente sull'ordine cronologico di ricevimento della scheda di iscrizione e del successivo pagamento. Il corso sarà effettuato solo al raggiungimento di un numero minimo di 10 partecipanti.

Le domande dovranno pervenire all'organizzatore entro il 31 Maggio 2013.

Quota di partecipazione:

€ 750,00 + IVA 21%, per il primo partecipante

€ 650,00 + IVA 21% per ogni partecipante successivo al primo della stessa azienda/ente

€ 700,00 + IVA 21% per iscrizioni pervenute entro il 03/06/13

Inviare via e-mail o fax a:

#### Segreteria organizzativa

Maura Davoli

Laboratori Iren Acqua Gas SpA

Via Nubi di Magellano 30

42123 Reggio Emilia

Tel. 0522-297207

Fax. 0522-297542

[maura.davoli@irenacquagas.it](mailto:maura.davoli@irenacquagas.it)

Nel caso di pagamento effettuato da Enti pubblici, l'importo è da intendersi esente da IVA, ai sensi dell'art. 14, comma 10 della Legge n° 537/93.

La quota è comprensiva delle colazioni di lavoro e del materiale didattico tra cui il manuale "Depurazione Biologica nei Fanghi attivi".

Al ricevimento della scheda di iscrizione seguirà conferma scritta dell'accettazione. La quota di iscrizione dovrà essere saldata tramite bonifico bancario a favore di LIAG SpA – Agenzia 1040 Banca di Legnano – Novi Ligure - (IT12Z0320448420000000030826-BIC BDLEIT2LXXX).

A seguito della conferma di iscrizione verrà fatturato il 100% della quota, anche in caso di mancata partecipazione al corso, a meno che pervenga disdetta scritta entro il 10/06/2013.

Ai partecipanti verrà rilasciato un attestato di frequenza.

### DOCENTI DEL CORSO

Prof. Paolo Madoni – Dipartimento di BioScienze, Università di Parma (Responsabile del corso)

Dott.ssa Lorena Guglielmi – Iren Acqua Gas SpA – Reggio Emilia

#### In collaborazione con:

Dipartimento di BioScienze – Università degli Studi di Parma



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



Controlli Analitici Area Emilia  
Laboratorio Reggio Emilia

Corso di formazione e  
Aggiornamento professionale:

## ANALISI DELLA MICROFAUNA E APPLICAZIONE DELL'INDICE BIOTICO DEL FANGO (SBI) NELLA STIMA DI EFFICIENZA DEI FANGHI ATTIVI

24 / 27 Giugno 2013

CAMPUS UNIVERSITARIO  
PARCO AREA DELLA SCIENZE  
PARMA



**FINALITÀ E CONTENUTI DEL CORSO**

L'analisi microscopica del fango attivo è un eccellente mezzo per ottenere indicazioni sulla qualità biologica di depurazione, che i controlli convenzionali (osservazioni visive, determinazioni chimiche, test vari) non sempre possono fornire. L'osservazione microscopica del fiocco di fango (forma, dimensioni) e dei suoi costituenti quali i microrganismi filamentosi e la microfauna, è un utile strumento di monitoraggio, diagnosi e gestione del processo depurativo dei liquami, ormai utilizzato, per la sensibilità e l'efficacia dimostrata, nei principali paesi industrializzati. Com'è noto, il ruolo della biomassa nel processo a fanghi attivi è duplice: metabolizzare la sostanza organica contenuta nei liquami e costruire dei fiocchi di fango capaci di sedimentare per gravità dall'acqua depurata all'interno del sedimentatore finale. L'efficacia di rimozione della sostanza organica è strettamente correlata alla struttura della microfauna che colonizza il fango. Il riconoscimento delle varie forme di protozoi che costituiscono la microfauna, è di fondamentale importanza al fine della valutazione di performance del reattore biologico.

Lo scopo del corso è quello di mettere a disposizione di coloro che operano nel controllo e nella gestione degli impianti a fanghi attivi, le più moderne tecniche di identificazione, classificazione e conteggio dei microrganismi (microfauna) che colonizzano il fango attivo.

Inoltre costituiranno argomento del presente corso la ricerca delle possibili cause di scorretto funzionamento e le principali strategie di intervento che si evidenzieranno attraverso l'analisi microscopica. In particolare verrà illustrato ed applicato lo **SLUDGE BIOTIC INDEX (SBI)**, il nuovo metodo obiettivo in grado di fornire valutazioni numeriche dell'efficienza biologica di depurazione, sulla base della struttura, in specie della microfauna. Questo nuovo metodo è stato formulato e semplificato tenendo presente le esigenze degli operatori e gestori degli impianti. I valori di SBI e le classi di qualità ottenibili dall'applicazione del metodo permettono all'operatore di comparare giorno per giorno le condizioni operative dell'impianto.

Le innovazioni apportate dal nuovo metodo sono tali da rendere il corso estremamente utile anche a coloro che già utilizzano la microfauna per il controllo di efficienza dei fanghi attivi.

**PROGRAMMA**

**Lunedì**

- Apertura del corso
- Ruolo della microfauna nel processo a fanghi attivi
- Illustrazione dell'Indice Biotico del Fango (SBI)
- Guida alla sistematica dei protisti
- Procedure per l'osservazione e il conteggio della microfauna
- Utilizzo del software Lisa-Micro

**Martedì**

Esercitazioni pratiche di analisi microscopica del fango attivo: identificazione e conteggio dei vari elementi della microfauna, applicazione dell'Indice Biotico del fango, valutazione della qualità biologica di depurazione ed individuazione di eventuali cause di inefficienza.

**Mercoledì, Giovedì**

I partecipanti analizzeranno, sotto la guida diretta dei docenti, differenti campioni di fanghi attivi ed approfondiranno le tecniche di osservazione, identificazione e conteggio della microfauna. Di ogni impianto analizzato sarà compilata la relativa scheda di analisi microscopica e saranno espressi giudizi sulla qualità biologica del fango attivo (SBI). Saranno inoltre valutate le possibili cause di disfunzione e le principali strategie di intervento.

**Orario del corso:**

- 9-13: inizio corso
- 13-14: colazione di lavoro
- 14-18: ripresa corso

**Sede del corso:**

Campus Università di Parma  
Laboratorio di Biologia – Plesso Polifunzionale Didattico

**Segreteria organizzativa:**

Laboratori Iren Acqua Gas SpA  
Sig.ra Maura Davoli  
Via Nubi di Magellano 30, 42123 Reggio Emilia

**SCHEDA DI ISCRIZIONE**

Corso di formazione e aggiornamento professionale  
**ANALISI DELLA MICROFAUNA E APPLICAZIONE  
DELL'INDICE BIOTICO DEL FANGO (SBI) NELLA  
STIMA DI EFFICIENZA DEI FANGHI ATTIVI**  
Parma, 24/27 Giugno 2013

COGNOME .....

NOME .....

AZIENDA/ENTE.....

INDIRIZZO .....

CAP ..... CITTÀ .....

TEL ..... FAX .....

e-mail .....

Mi impegno al pagamento della quota di partecipazione (gli Enti esenti da IVA alleggeranno la dichiarazione di esenzione) che verserò alla conferma dell'accettazione della mia iscrizione, secondo le modalità di pagamento indicate in altra pagina di questo depliant.

Firma: ..... Data: .....

Intestazione fattura (Azienda, Ente, persona fisica): .....

Indirizzo: .....

CAP ..... Città .....

p.IVA/cod.fisc.: .....

Informativa sul trattamento dei dati personali (D.Lgs.196/03)

I dati acquisiti sono utilizzati da LIAG SpA per l'invio di proprie comunicazioni e non vengono divulgati a terzi. In caso di Vostra richiesta, avrete la possibilità di verificare, rettificare o cancellare i Vostri dati. La firma in calce acconsente all'invio delle future iniziative di LIAG SpA.

Firma: ..... Data: .....

## Registration

### Fee

Full three-day course (Modules 1&2): 300 €

Lectures only (Module 1): 200 €

Both modules have 10% reduction for SETAC members

Fees include course material, lunches and coffee breaks.

### Conditions

The number of participants is limited to 30 for the lab demonstration part of the course.

No restrictions apply to the lecture part (module 1).

Requests for participation will be selected according to the date of receipt.

Please register before **March 31<sup>st</sup>, 2013** using the registration form attached.

Participants will receive an attendance certificate upon course completion.

### Contact

If you required further info please contact

#### Simona Rossetti

E [rossetti@irsa.cnr.it](mailto:rossetti@irsa.cnr.it)

T +39 06 9067 2697

#### Anna Barra Caracciolo

E [barracaracciolo@irsa.cnr.it](mailto:barracaracciolo@irsa.cnr.it)

T +39 06 9067 2786

or visit our website

## Venue

Module 1 will be taught at the CNR headquarter, Piazza Aldo Moro, 7 - 00185 Rome

The lab demonstration will take place in the premises of the Water Research Institute, IRSA-CNR, Area della Ricerca di Roma RM1- Via Salaria km 29,300 0015 Monterotondo (Rome).

## Lecturers and tutors

Simona Rossetti, *IRSA-CNR, Italy*

Anna Barra Caracciolo, *IRSA-CNR, Italy*

Federico Aulenta, *IRSA-CNR, Italy*

Claudia Beimfroh, *Vermicon, Germany*

Philippe Corvini, *University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland, Switzerland*

Paola Grenni, *IRSA-CNR, Italy*

Nicolas Kalogerakis, *Technical University of Crete, Greece*

Caterina Levantesi, *IRSA-CNR, Italy*

Mauro Majone, *Sapienza University of Rome, Italy*

Bruna Matturo, *IRSA-CNR, Italy*

Jochen Müller, *UFZ, Germany*

Maurizio Petruccioli, *DIBAF, University of Tuscia, Italy*

Valter Tandoi, *IRSA-CNR, Italy*

Paul Wilmes, *University of Luxembourg, Luxembourg*

Giulio Zanaroli, *University of Bologna, Italy*



## TRAINING COURSE

Contaminated site remediation:  
Application of advanced tools to  
control biological processes

27 - 29 May 2013, Rome

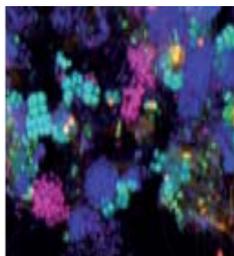
[www.minotaurus-project.eu](http://www.minotaurus-project.eu)



The MINOTAURUS project is supported by the European Commission in the 7<sup>th</sup> Framework Programme for Research and Technological Development under Grant Agreement No. 265946 within the theme Biotechnology for the environment - soil and water treatment and bioremediation

Organised by  
Water Research Institute, IRSA-CNR  
in collaboration with  
EU funded project MINOTAURUS  
(GA No. 265946)  
and SETAC Italian Branch





## Who should attend?

Our course is dedicated to all seeking basic and advanced-level training on bio-tools for the characterization of microbial communities involved in biotechnological processes.

This course is beneficial for practitioners, operators and researchers interested in developing or applying molecular biology-related and biotechnological methods.

## What will you learn?

The course will focus on selected aspects of molecular biology that provides principles for understanding the structure and function of mixed microbial communities responsible for bioremediation processes and wastewater treatment.

Several molecular biology techniques will be presented and several examples of molecular applications will be highlighted.

Upon completion of this course, participants will

- have gained an understanding of techniques that are currently being utilized in the biological characterization of contaminated soil and groundwater;
- be familiar with concepts pertaining to basic molecular biology principles and techniques for understanding various areas of research and their applications.

The course will be presented by internationally recognized experts in the field and during the laboratory session the course faculty will be assisted by tutors.

## Programme

### Monday - May 27<sup>th</sup> - Module 1 - Lectures

- 9.30 Registration
- 10.00 Introduction and course objectives. *V. Tansoi, IRSA-CNR; N. Kalogenkis, Technical University of Crete, Greece*
- 10.15 Overview of Minotaurus Project: Microorganism and enzyme Immobilization: Novel techniques and approaches for upgraded remediation of underground, wastewater and soil. *P. Corvini, FHNW, Switzerland*
- 10.45 In situ bioremediation of chlorinated solvents: frontiers and challenges. *F. Asidena, IRSA-CNR, Italy*
- 11.15 Use of isotope-based methods for in situ monitoring of bioremediation processes. *J. Müller, UFZ, Germany*
- 11.45 From integrated omics to Eco-Systems Biology of microbial community-driven processes. *P. Wilmes, University of Luxembourg, Luxembourg*
- 12.30 - 14.00 Lunch
- 14.00 Characterization of mixed microbial cultures involved in wastewater treatment and bioremediation of contaminated sites by in situ detection methods. *S. Rossetti, IRSA-CNR, Italy*
- 14.30 Easy and reliable industrial application of FISH: the VIT-technology. *C. Beinfels, Vermicon, Germany*
- 15.00 Biological recovery of pesticide contaminated soil and groundwater. *A. Barra Caracciolo, IRSA-CNR, Italy*
- 15.30 Coffe break
- 16.00 Characterization of microbial communities involved in the degradation of (chlorinated) organic pollutants with Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *G. Zanaroli, University of Bologna, Italy*
- 16.30 Cell sorting - Reverse Transcriptase PCR approach: an useful strategy for the rapid identification of unknown microorganisms in mixed microbial populations. *C. Levantesi, IRSA-CNR, Italy*
- 17.00 Mycoremediation of historically contaminated soils and impact on microbiota population. *M. Petruccioli, DIBAF, University of Tuscian, Italy*

## Programme

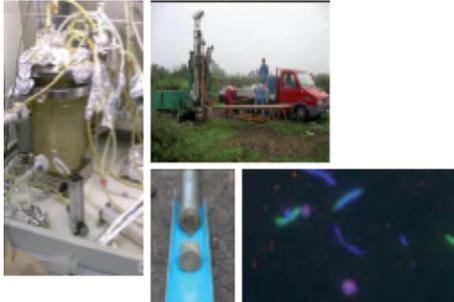
### Tuesday - May 28<sup>th</sup> - Module 2 - Lab demo (part 1)

- 9.00 - 12.30 Laboratory demo
- Participants will be divided into small groups for laboratory activities
- Fluorescence In Situ Hybridization analysis (FISH)
  - Real Time PCR and gene expression analysis by RT-qPCR
- 12.30 14.00 Lunch
- 14.00 - 18.00 Laboratory demo
- Epifluorescence microscopy analysis of FISH samples
  - Functional genes expression analysis by RT-qPCR.

### Wednesday - May 29<sup>th</sup> - Module 2 - Lab demo (part 2)

- 9.00 - 12.30 Laboratory demo
- FISH VIT technology, cell sorting
  - Reverse Transcriptase PCR
- 12.30 - 13.00 Conclusive remarks and closing
- 14.00 Tutors are available for further details and discussion on the techniques presented in laboratory demos

[www.minotaurus-project.eu](http://www.minotaurus-project.eu)



## TRAINING COURSE

Contaminated site remediation:  
Application of advanced tools to  
control biological processes

27 - 29 May 2013, Rome

Organised by  
Water Research Institute, IRSA-CNR  
in collaboration with  
EU funded project MINOTAURUS  
(GA No. 265946)  
and SETAC Italian Branch



## Registration form

Name

First name

Affiliation

Street

Postal Code

Town

Country

Email

Phone

Fax

VAT number

SETAC member

Module 1

(lectures, 27 May; 200 €)

Modules 1 & 2

(whole course 27 - 29 May, lectures and  
lab demo; 300 €)

Date, place

Signature

Please return before March 31<sup>st</sup>, 2013 by  
email to: [rossetti@irsa.cnr.it](mailto:rossetti@irsa.cnr.it)

The number of participants is limited to 30 for  
the lab demonstration part of the course.

No restrictions apply to the lecture part (mo-  
dule 1).

Requests for participation will be selected ac-  
cording to the date of receipt

You will receive an email to confirm your re-  
gistration with course details and payment  
instructions.

Fees include course material, coffee breaks  
and lunch.

The course will be held at CNR headquarter,  
Piazza Aldo Moro, 7 - 00185 Rome (Day 1)  
The lab demonstration will take place in the  
premises of Water Research Institute, IRSA-  
CNR, Area della Ricerca di Roma RM1-  
Via Salaria km 29,300 0015 Monterotondo  
(Rome).

[www.minotaurus-project.eu](http://www.minotaurus-project.eu)

**24<sup>th</sup> International Specialized Course \24° Corso Internazionale di Specializzazione  
“OPERATION AND CONTROL OF ACTIVATED SLUDGE PROCESSES USING MICROBIOLOGICAL  
ANALYSIS” \“CONTROLLO E GESTIONE DEL PROCESSO A FANGHI ATTIVI TRAMITE METODI  
MICROBIOLOGICI”**

Perugia (Italy), Villa Umbra, loc. Pila. **24-28 June\Giugno 2013**

**COURSE CONTENT \PRESENTAZIONE**

The activated sludge process is the most commonly used biological wastewater treatment process in the world. Activated sludge can biodegrade many organic pollutants, oxidize and remove reduced nitrogen compounds and promote the enhanced removal of phosphate from municipal and industrial wastewaters. Recent process modifications include biological nutrient removal (BNR), sequencing batch reactors (SBRs) and membrane bioreactors (MBRs) and moving bed bioreactors (MBBRs).

Solid backgrounds in process engineering and microbiology are required for the diagnosis, control and resolution of common activated sludge process problems such as deterioration of settling properties, foam formation and loss of specialized organisms.

This Course, which is the **24<sup>th</sup>** of this series, will consist of presentations on activated sludge process modifications including BNRs, SBRs, MBRs and MBBRs, and on the microbiology of these and other activated sludge process variations. The course will consist of two distinct modules:

**I - Base Module:** Two days lectures on a range of activated sludge topics, and presentation of case studies of the resolution of activated sludge operating problems. This Module will conclude with “Case History” presentations by participants and discussion of possible solutions of problems by the course faculty

**II Specialized Module:** Two and one-half days of laboratory exercises on the microscopic evaluation of activated sludge for process control including a demonstration of FISH (fluorescent in situ hybridization) analysis.

The course is designed for operators and designers of municipal and industrial biological wastewater treatment plants and researchers and graduate students studying the activated sludge process.

The course faculty will be presented by internationally recognized experts.

During the laboratory session (Module II) the course faculty will be assisted by tutors.

Il processo a fanghi attivi è tuttora il più utilizzato dei metodi biologici per il trattamento delle acque di scarico. Il fango attivo è in grado di degradare moltissimi inquinanti organici, ossidare e rimuovere composti ridotti dell'azoto, promuovere fenomeni di rimozione biologica dei fosfati, da acque di scarico urbane ed industriali. Le più recenti modificazioni del processo includono la Rimozione Biologica dei Nutrienti (BNR), i Reattori Sequenziali (SBR), i Bioreattori a Membrana (MBR) ed i Bioreattori a Letto Mobile (MBBR). Solide conoscenze dell'Ingegneria dei processi e della Microbiologia sono oggi richieste per la diagnosi, il controllo e la soluzione dei comuni problemi che di frequente occorrono, come il deterioramento delle proprietà di sedimentazione del fango attivo, la formazione di schiume o la perdita di particolari popolazioni microbiche.

Il Corso, arrivato alla sua **XXIV** edizione, consisterà in una serie di presentazioni sulle moderne configurazioni del processo a fanghi attivi, comprese BNR, SBR, MBR e MBBR. Il Corso sarà articolato in due Tematiche, su due livelli di approfondimento:

**I - Modulo Base:** Due giorni di lezioni sul Processo a Fanghi Attivi e sui metodi di controllo delle disfunzioni, inclusa una presentazione di casi di studio da parte dei Partecipanti ed una discussione con i Docenti sulle possibili soluzioni dei problemi illustrati.

**II - Modulo Specialistico:** Due giornate e mezzo per l'identificazione microscopica delle principali popolazioni filamentose presenti nel fango attivo, inclusa una dimostrazione della tecnica FISH (ibridazione fluorescente in situ), tecnica di ampia applicabilità per molte delle popolazioni microbiche presenti nel fango attivo.

Il Corso è diretto a progettisti, tecnici ed operatori di impianti di trattamento biologici industriali ed urbani, a ricercatori e studenti di Dottorato.

Il gruppo docente è costituito da esperti di ampia esperienza a livello internazionale.

Durante il lavoro in laboratorio (modulo II) il gruppo docente sarà assistito da tutors.

**PROGRAMME \PROGRAMMA****I - BASE MODULE: SPECIAL LECTURES ON PRINCIPLES AND STRATEGIES FOR ADDRESSING ACTIVATED SLUDGE PROCESS OPERATING PROBLEMS AND DESIGN ISSUES****I - MODULO BASE: PRESENTAZIONI SUI PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO E CONTROLLO****Monday June 24 : Study and remedial actions of the technology****Lunedì 24 Giugno: Processo a Fanghi attivi e metodi di controllo delle disfunzioni****8:30 Registration \ Registrazione****9:30 Welcome address \ Saluto delle Autorità****9:45 Introduction and course objectives \ Introduzione e obiettivi del corso (Valter Tandoi)****10:00 The activated sludge process: an old, versatile, widely-utilised technology. \ Il processo a fanghi attivi: una antica, versatile, ampiamente utilizzata tecnologia. (David Jenkins )**

Process configurations for carbon, nitrogen and phosphorus removal: common problems encountered, design principles. From traditional to advanced configurations (successes and failures) \ Configurazioni di processo per la rimozione del carbonio, dell'azoto e del fosforo; comuni problemi gestionali, principi di progettazione. Dalle configurazioni tradizionali a quelle avanzate.

**10:30 Discussion \ Discussione****10:45 The activated sludge community; nature and composition of flocs, main microbial populations and their roles. Pathogen removal and fate through the whole process.\ Composizione microbica del fango attivo: natura dei fiocchi biologici, principali popolazioni batteriche, rimozione e destino dei microrganismi patogeni attraverso il processo. ( Valter Tandoi )**

Activated sludge floc structure, and chemical composition, activated sludge microbial components (filamentous and floc forming bacteria, fungi, microfauna), physical structure, desirable properties. Fate of pathogenic microorganisms in the process. \ Struttura dei fiocchi di fango attivo, i polimeri, composizione chimica, componenti microbici (batteri fiocco formatori e filamentosi, funghi, microfauna), struttura fisica, proprietà richieste. Destino dei microrganismi patogeni nelle varie fasi del processo.

**11:15 Discussion \ Discussione****11:30 Coffee break \ Pausa caffè****11:45 Protozoa as indicators of activated sludge quality. \ I protozoi come indicatori dello stato del fango attivo. (Gianpiero Cesaro).**

The Role of protozoa and the sludge biotic index (SBI): twenty years' of application, limits and perspectives. \ Il ruolo dei protozoi e l'Indice Biotico del Fango (SBI): venti anni di applicazioni, limiti e prospettive.

**12:30 Discussion \ Discussione****13:00 Lunch \ Pranzo****14:30 Secondary clarifier. \ Il sedimentatore secondario ( Michele Torregrossa )**

Fundamental, design, analysis, solids flux theory. Typical operating problems. \ Fondamenti, progettazione, analisi, teoria del flusso solido. Comuni casi di disfunzione.

**15:15 Discussion \ Discussione****15:30 Resources recovery from municipal wastewater./ Recupero di risorse dalle acque di scarico urbane. (Roberto Ramadori )**

New approaches to wastewater treatment are developing with the aim to recovery energy, nutrients and water; some examples of emerging technologies will be presented.\ Crescente interesse di ricerca e sviluppo destano recenti approcci innovativi alla depurazione delle acque di scarico urbane che si propongono l'obiettivo di recuperare energia, nutrienti e acqua; verranno presentati alcuni esempi di tecnologie innovative.

**16:15 Discussion \ Discussione**

**16:30 Influence of process configuration on micro-organism growth. \ Influenza della configurazione del processo sulla crescita microbica. ( Jiri Wanner )**

Effect of reactor configuration and environmental conditions, aerobic, anaerobic, anoxic selectors. \ Effetto della configurazione del reattore e delle condizioni operative; selettori aerobici, anaerobici, anossici.

**17:00 Discussion \ Discussione****17:15 Closure \ Chiusura dei lavori****Tuesday June 25: The future of the activated sludge process****\ Martedì 25 Giugno: Il futuro del processo a fanghi attivi****9:00 Filamentous bulking sludge: causes, control strategies and control options domestic and industrial systems. \ Il bulking filamentoso: cause e strategie di controllo per sistemi urbani ed industriali. (David Jenkins)**

Plant operation, chlorination, coagulants, polymers, etc.. \ Conduzione dell'impianto, clorazione, efficacia di additivi (coagulanti e polielettroliti), etc..

**9:45 Discussion \ Discussione****10:00 Identifying filamentous bacteria- filling in the gaps. \ Identificazione dei batteri filamentosi: completare il quadro. (Robert Seviour).**

The true identity of the previously unidentified filamentous Eikelboom type 0092 and type 0914, the phylogeny and in situ physiology of the bulking filamentous Candidatus 'Monilibacter batavus', the diversity among the foaming Mycolata (*Gordonia amarae* and related bacteria) and its implications for foaming control. \ Identità dei Morfortipi di Eikelboom Tipo 0092 e Tipo 0914, filogenesi e metabolismo in situ del Candidatus "Monilibacter batavus", la diversità dei Micolata (*Gordonia amarae* e batteri correlati) i batteri promotori di schiume, e le implicazioni nel controllo del fenomeno.

**10:45 Discussion \ Discussione****11:00 Coffee break \ Pausa caffè****11:30 Foaming. \ Schiume Biologiche. (David Jenkins)**

Types of foaming, nature and mechanisms of biological foam formation, role of surfactants, foaming measurement, nocardioform and *Microthrix parvicella* foaming and control. Foaming control methods and foam disposal. \ Tipi di schiume, natura e meccanismi di formazione della schiuma biologica, ruolo dei tensioattivi, stima delle schiume, schiume da Nocardioformi e *Microthrix parvicella*. Metodi di trattamento delle schiume.

**12:00 Discussion \ Discussione****12:15 New activated sludge technology. \ Nuove tecnologie a fanghi attivi. (Jiri Wanner)**

Membrane bioreactors, Biological nutrient removal, Sequencing batch reactors, Moving beds Bioreactors, Anammox process. Operating problems. \ Bioreattori a membrane, rimozione biologica di nutrienti, reattori sequenziali, Bioreattori a letto mobile, processo Anammox. Problemi operativi.

**12:45 Discussion \ Discussione****13:00 Lunch \ Pranzo****14:30 Microbiological Studies on activated sludge microbial components.\ Studi microbiologici dei componenti microbici del fango attivo. (Valter Tandoi)**

Several studies in the past have addressed the properties of relevant microbial components: *Microthrix parvicella*, *Thiothrix* spp., *Nocardia*, *Acinetobacter*, etc.: how utilise these information to operate the plant. \ In passato molti studi hanno mostrato le proprietà di rilevanti popolazioni microbiche: *Microthrix parvicella*, *Thiothrix* spp., *Nocardia*, *Acinetobacter*; come utilizzare le informazioni per la conduzione degli impianti

**15:15 Discussion \ Discussione****15:30 Practical remedial actions. \ Esame dei casi di studio. (coordinated by \ coordinato da Michele Torregrossa)**

Presentation by participants of case studies, problems at their treatment plants and discussion of possible solutions by the course faculty. \ Presentazione da parte dei partecipanti di Casi di Studio, problemi riscontrati presso i propri impianti di trattamento. Discussione delle possibili soluzioni con i Docenti

**16:30 Closure \ Chiusura dei lavori**

**THE SPECIALIZED MODULE: MICROSCOPIC IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS BACTERIA AND FLOC CHARACTERISTICS BY OPTICAL AND EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY****MODULO SPECIALISTICO: DESCRIZIONE DEL FANGO ATTIVO ED IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI FILAMENTOSI TRAMITE MICROSCOPIA OTTICA ED IN EPIFLUORESCENZA****Wednesday - Thursday June 26-27 \ Mercoledì – Giovedì 26-27 Giugno****09:00 - 13:00 \ 14:30 – 17:00****Laboratory and Tutorial Session (Course faculty and tutors). \ Sessioni di laboratorio con docenti e tutors.**

Laboratory and tutorial sessions consisting of exercises to practice microscopic analysis of activated sludge and filamentous bacteria. Sampling, transport, and storage of activated sludge. The light microscope, components and adjustment. Phase contrast and bright field observations. Stain preparation and staining procedures: Neisser, Gram, India ink, and Sulphur Test. Review of filamentous organism types, activated sludge floc characterization, filamentous organism identification and counting methods. Nocardioform counting methods.

\ Esercitazioni pratiche per l'esame microscopico del fango attivo e per il riconoscimento dei batteri filamentosi. Osservazione in contrasto di fase ed in campo chiaro. Campionamento, trasporto e conservazione dei campioni. Il microscopio ottico, componenti e messa a punto. Preparazione dei reattivi ed esecuzione delle colorazioni specifiche: Neisser, Gram, test dell' Inchiostro di China, test delle inclusioni di zolfo. Il riconoscimento dei batteri filamentosi tramite il Manuale di identificazione. La descrizione delle caratteristiche del fango attivo, i metodi di conteggio, Conta dei Nocardioformi.

(Lunch and Coffee breaks will be served \ Sono previste le Pause Caffè e le Colazioni di lavoro)

**Friday June 28 \ Venerdì 28 Giugno****09:00 Application of epifluorescence microscopy to activated sludge \ Applicazione della microscopia in epifluorescenza ai fanghi attivi (Marco De Sanctis)**

The epifluorescence microscope. Estimation of nitrifiers and filamentous bacteria in activated sludge by FISH. Visualization of storage products in activated sludge by epifluorescence microscopy and Nile Blue staining. Storage PHA determination by GC analysis. \ Il microscopio in epifluorescenza. Stima dei batteri nitrificanti e filamentosi nei fanghi attivi mediante FISH. Visualizzazione dei prodotti di stoccaggio nei fanghi attivi mediante microscopia in epifluorescenza e colorazione del Nilo Blue. Metodo GC per la determinazione dei polimeri di stoccaggio.

**09:30 Discussion \ Discussione****9:45 The FISH protocol (Fluorescent in situ hybridization) and molecular probe definition \ Il protocollo FISH e la scelta delle sonde molecolari (Robert Seviour)**

The epifluorescence microscope. FISH protocol and procedure. \ Il microscopio in epifluorescenza ed il protocollo per l'esecuzione della FISH.

**10:30 Discussion \ Discussione****10:45 Coffee break \ Pausa caffè****11:00 Microscopic examination of activated sludge. \ Esame al microscopio dei fanghi attivi.**

Examination of activated sludge samples from the participants' plants. Course summary and presentation of certificates of participation. \ Esame dei campioni di fango attivo portati dai partecipanti. Sommario del Corso e consegna dei Certificati di partecipazione.

**13:00 Close – Lunch \ Chiusura dei lavori – Pranzo**

**FACULTY AND TUTORS /DOCENTI E ASSISTENTI**

- David Jenkins, University of California at Berkeley, USA  
[flocdoc@pacbell.net](mailto:flocdoc@pacbell.net) )
- Robert Seviour, La Trobe University, Bendigo (VC) Australia  
[R.Seviour@latrobe.edu.au](mailto:R.Seviour@latrobe.edu.au) )
- Jiri Wanner, VSCHT, Prague Inst. of Chemical Technology, Czech Republic  
[Jiri.Wanner@vscht.cz](mailto:Jiri.Wanner@vscht.cz) )
- Roberto Ramadori, Water Research Institute IRSA-CNR, Roma Italy  
[ramadori@irsa.cnr.it](mailto:ramadori@irsa.cnr.it) )
- Valter Tandoi, Water Research Institute IRSA-CNR, Roma Italy  
[tandoi@irsa.cnr.it](mailto:tandoi@irsa.cnr.it) Tel.: 39 06 90672782)
- Michele Torregrossa, University of Palermo, Faculty of Engineering – Italy  
[mtorre@idra.unipa.it](mailto:mtorre@idra.unipa.it) )
- Gianpiero Cesaro, Water Pollution Control Plant NOLA, Napoli Italy  
[gp.cesaro@tin.it](mailto:gp.cesaro@tin.it)
- Marco De Sanctis, Water Research Institute (IRSA)-CNR, Roma Italy  
[desanctis@irsa.cnr.it](mailto:desanctis@irsa.cnr.it)
- Roberta Porcu, Water Research Institute (IRSA)-CNR, Roma Italy  
[porcu@irsa.cnr.it](mailto:porcu@irsa.cnr.it)

**LANGUAGE \LINGUE**

The official languages of the Course will be English and Italian. Simultaneous translation to and from Italian and English will be provided. \ Le lingue ufficiali del Corso saranno l'inglese e l'italiano. Sarà attivato il servizio di traduzione simultanea.

**Venue / Sede del Corso: Villa Umbra, Loc. Pila, 06132 Perugia Italy**

**ACCOMMODATIONS / LOGISTICA**

Accommodations in Perugia and at the Pila Conference Centre are available, at a reasonable price. To book conference center rooms please contact: \ Per la sistemazione alberghiera sarà possibile prenotare presso la sede del corso. Per prenotare contattare:

**Cooperativa La Torre, Tel.\Fax- 0039\075\5159784 Email- [villaumbra@cooperativalatorre.com](mailto:villaumbra@cooperativalatorre.com)**

**REGISTRATION FEES /QUOTE DI PARTECIPAZIONE**

I Module\o (2 days\gg)	II Module\o (2,5 days\gg)	I+II Mod. (4,5 days\gg)
Participant\te € 750,00	Participant\i € 1.250,00	Participant\te € 1.650,00
Member\Socio IWA € 700,00	Member\Soci IWA € 1.150,00	Member\Soci IWA € 1.500,00
Student\te € 350,00	Student\te € 650,00	Student\te € 800,00

\ (Quote esenti IVA ai sensi dell'articolo 10, comma 1, n. 20 del D.P.R. 633/1972)

**NOTE:** It is possible to register for only Module I or Module II or for both I and II Mod. Group Discount: 10% for groups of 2 or more from the same company registering at the same time. \ **NOTA:** Si può partecipare anche solo ad un modulo. Sconto del 10%, in caso di iscrizione cumulativa, due o più persone dello stesso ente, a partire dalla seconda quota

**The Registration Fee includes \ La quota di iscrizione è comprensiva di:**

- Course material \ Materiale didattico
- Identification manual (Second Module) \ Manuale di Identificazione (II Modulo)
- IWA scientific and technical report on activated sludge solids separation problems \ IWA Rapporto tecnico
- Lunches and coffee breaks \ Colazioni di lavoro e pause caffè

Please, return the attached registration form by fax or email. You will receive an email to confirm your registration and indicate the details of the Course. Early registration is urged since the Module II is limited to 25 people. In case of cancellation after **May 31 2013**, without written communication, a charge of 50% of the registration fee will be applied. On request we will send the course materials. \ Si prega di inviare la scheda di iscrizione allegata per fax o email. Un messaggio di ricezione confermerà la vostra registrazione ed i dettagli del Corso. E' suggerita una iscrizione in tempi rapidi in quanto la partecipazione al II Modulo è limitata a 25 persone In caso di eventuale rinuncia non pervenuta per iscritto entro il **31 Maggio 2013**, sarà addebitato il 50% della quota di partecipazione e, su richiesta, verrà inviata la documentazione.



**SCHEDA DI ISCRIZIONE  
REGISTRATION FORM**

Corso Internazionale \ International Course  
**“CONTROLLO E GESTIONE DEL PROCESSO A FANGHI ATTIVI TRAMITE METODI MICROBIOLOGICI  
 /OPERATION AND CONTROL OF ACTIVATED SLUDGE PROCESSES USING MICROBIOLOGICAL METHODS”**  
**VILLA UMBRA (LOC. PILA) Perugia Italy, 24-28 Giugno \ June 2013**

La presente scheda, debitamente compilata in ogni sua parte, deve essere inviata tramite Email o fax a: \  
 Please return the completed form by Email or fax, to: Ida Basile Tel. (+39) 3388070574  
 Villa Umbra Tel. (+39) 075-5159728 Fax (+39) 075-5159785

Email : [ida.basile@villaumbra.org](mailto:ida.basile@villaumbra.org) ([www.villaumbra.org](http://www.villaumbra.org))  
[tandoi@irsa.cnr.it](mailto:tandoi@irsa.cnr.it) ([www.irsa.cnr.it](http://www.irsa.cnr.it))

Iscrizione per /Registration for: **C 1291**

- Modulo/Module I
- Modulo/Module II
- Modulo/Module I + II
- Socio/Member IWA    yes/    o
- Studente/Student    yes/    o

**DATI DEL PARTECIPANTE \PARTICIPANT'S DETAILS**

COGNOME-NOME \SURNAME-NAME \_\_\_\_\_

DATA E LUOGO DI NASCITA \DATE AND PLACE OF BIRTH \_\_\_\_\_

INDIRIZZO \ADDRESS \_\_\_\_\_

C.A.P.-CITTA \ZIP CODE-CITY \_\_\_\_\_

NAZIONE \COUNTRY \_\_\_\_\_

C.FISC.-P.IVA \TAX CODE (\*) \_\_\_\_\_

Tel \Phone \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_

CELL. \MOBILPHONE \_\_\_\_\_ EMAIL \_\_\_\_\_

(\*) **NON COMPILARE NEL CASO IN CUI SI PARTECIPI A NOME DELL'ENTE /PLEASE DO NOT COMPLETE IF YOU  
 PARTECIPATE ON BEHALF OF YOUR COMPANY**

**DATI DELL'ENTE \AFFILIATION DETAILS**

ISTITUTO ENTE \INSTITUTION \_\_\_\_\_

INDIRIZZO \ADDRESS \_\_\_\_\_

C.A.P.-CITTA \ZIP CODE-CITY \_\_\_\_\_

P.IVA \VAT \_\_\_\_\_

INDICARE NELLA CAUSALE DEL PAGAMENTO: COD. C1291 E NOME DEL PARTECIPANTE  
 \PLEASE INDICATE IN THE PAYEMENT: COD. C1291 AND NAME OF PARTECIPANT

Data \Date \_\_\_\_\_ Firma \Signature \_\_\_\_\_

Autorizzo al trattamento dei dati personali riportati nella presente scheda nel rispetto della legge 196/2003.  
 I hereby authorize to process and store my personal data pursuant according to italian law 196/2003 exclusively for scientific and organizing purposes.

**“Scuola Umbra di Amministrazione  
 Pubblica”**

Villa Umbra - loc. Pila 06132 Perugia  
 tel 075-5159724 - 744 - 728 fax 075-5159785

*istituto di ricerca sulle acque - cnr*

## NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a *Quaderni* (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque. Area della Ricerca RM1 – Montelibretti  
Via Salaria km 29,300 C.P. 10 - 00015 Monterotondo (RM)

Tel. 06/90672850 - Fax 06/90672787

Direttore responsabile: Maurizio Pettine

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Polesello S., Mascolo G., Guzzella L.

Segreteria di redazione: S. Ghergo

Distribuito "on-line": [www.irsa.cnr.it/Notiziario](http://www.irsa.cnr.it/Notiziario)